

**Makroskopische und molekularbiologische Evaluation des Einheilens
neu entwickelter Polymerimplantate bei osteochondralen Kniedefekten
am Schafmodell**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Tüngler, Tim Ludwig
aus Göttingen

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Experimentelle Unfallchirurgie,
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

1. Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Rickert
Tag der Disputation: 07.05.2026

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Wissenschaftliche Grundlagen	3
1.1.1	Knochen	3
1.1.2	Hyaliner Knorpel.....	10
1.2	Aktuelle Therapieansätze	17
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Versuchstiere	27
2.2	Implantate und Biogel	31
2.3	Operation und postoperatives Scoring	34
2.4	Probenentnahme und -präparation	39
2.5	Makroskopie.....	40
2.6	Real-time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion.....	44
2.7	Statistik.....	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Makroskopische Auswertung.....	52
3.2	Molekularbiologische Auswertung	63
4	Diskussion	79
4.1	Diskussion der makroskopischen und molekularbiologischen Diskrepanz	81
4.2	Einordnung der makroskopischen Ergebnisse	81
4.3	Einordnung der molekularbiologischen Ergebnisse.....	83
4.4	Die Rolle der subchondralen Knochenphase	84
4.5	Der Einfluss biologischer Faktoren.....	88
4.6	Chondroinduktives saures Milieu?.....	90
4.7	Zeitlicher Verlauf der Knorpelreifung	93

4.8	Patellae	95
4.9	Limitationen der Studie	96
4.10	Ausblick und translationale Perspektive	100
5	Zusammenfassung.....	102
6	Summary	103
7	Abkürzungsverzeichnis.....	104
8	Abbildungsverzeichnis	107
9	Tabellenverzeichnis	109
10	Literaturverzeichnis.....	110
11	Publikationsverzeichnis	124
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	125
13	Danksagung.....	126

1 Einleitung

Bereits 1773 schrieb der Londoner Anatom und Chirurg Sir William Hunter: „Ein geschädigter Knorpel kann allgemein als beschwerliche Erkrankung angesehen werden; dies verlangt zur Heilung Komplexeres als bei einem brüchigen Knochen und ist, wenn einmal zerstört, nicht mehr zu reparieren.“ (Hunter 1995). Dabei führen osteochondrale Defekte zu einer höheren mechanischen Belastung der umgebenden Gelenkstrukturen und einer gesteigerten intraartikulären Zytokinkonzentration (Gratz et al. 2009; Fraser et al. 2003). Bereits kleine Knorpelschäden können so zur frühzeitigen Entwicklung einer Arthrose führen (Schinhan et al. 2012). Bei der Arthrose handelt es sich um die am häufigsten auftretende chronisch-degenerative Gelenkerkrankung, welche mit einem fortschreitenden Abbau des hyalinen Gelenkknorpels einhergeht (Fuchs et al. 2017). Weltweit sind etwa 407 Millionen Menschen von einer Knie- oder Hüftarthrose betroffen (Steinmetz et al. 2023). Das Verhältnis zwischen osteochondralen Läsionen und der Arthrose ist dabei bidirektional; sie kann sowohl das Resultat als auch die Ursache der Läsionen sein. Weitere Gründe für osteochondrale Defekte können andere chronisch-degenerative Erkrankungen wie zum Beispiel die Osteochondrosis dissecans (OD), entzündliche Prozesse, wie die rheumatoide oder septische Arthritis, sowie diverse Traumata sein. Osteochondrale Defekte treten alters- und geschlechtsübergreifend auf und betreffen sowohl körperlich schwerarbeitende Menschen als auch weniger aktive Menschen. Für die Patienten resultieren daraus eine reduzierte Lebensqualität, eine verringerte Leistungsfähigkeit und anhaltende Schmerzen (Heir et al. 2010). Neben der individuellen Belastung geht damit eine enorme wirtschaftliche Belastung des Gesundheitssystems einher. 2008 betrug die Kosten zur Behandlung degenerativer Gelenkerkrankungen rund 15 Milliarden Euro. Dies entsprach etwa sieben Prozent der gesamten nationalen Gesundheitsausgaben (Schewe et al. 2008). Noch heute ist die Behandlung osteochondraler Läsionen eine große Herausforderung in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Eine Auswertung von mehr als 30.000 Kniegelenkarthroskopien ergab, dass rund 60 % der Patienten ausgeprägte Knorpelschäden aufwiesen (Curl et al. 1997). Eingeteilt wurden Knorpelschäden ursprünglich nach der vierstufigen Klassifikation von Outerbridge, welche 1961 erstmals beschrieben wurde (Outerbridge 1961).

Tab. 1: Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge

Grad	Beschreibung
0	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter Oberfläche
1	Leichte Schwellung und Erweichung des Knorpels bei glatter Oberfläche ohne Fibrillationen
2	Oberflächliche Risse und Fissuren im Knorpel, < 50 % der Knorpeldicke; Durchmesser < 1,3 cm
3	Tiefe Fissuren und Aufrauungen, > 50 % der Knorpeldicke, jedoch nicht bis zum subchondralen Knochen; Durchmesser > 1,3 cm
4	Vollständiger Knorpelverlust mit Freilegung des subchondralen Knochens

Der heutige Standard zur Beurteilung von Knorpelschäden ist die Arthroskopie mittels einer 2003 von der International Cartilage Repair Society (ICRS) entwickelten Einteilung, welche eine Erweiterung der Outerbridge-Klassifikation darstellt (Brittberg und Winalski 2003).

Tab. 2: Klassifikation von Knorpelschäden nach den Kriterien der ICRS

Grad	Beschreibung
0	Keine erkennbaren Defekte
1a	Intakte Knorpeloberfläche, Fibrillationen und/oder Erweichung
1b	1a + oberflächliche Risse/Fissuren
2	Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke
3a	Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierten Knorpelschicht
3b	Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, bis in die kalzifizierte Knorpelschicht
3c	Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte
3d	Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, mit periläsionärer Blasenbildung
4a	Osteochondrale Läsion mit Durchbruch der subchondralen Platte
4b	Osteochondrale Läsion mit Ausdehnung bis tief in die Spongiosa

Zusätzlich zur korrekten Klassifikation und Diagnostik ist die Entwicklung adäquater Therapieansätze essenziell für die Behandlung osteochondraler Defekte. Bis diese etabliert sind, müssen verschiedene Phasen durchlaufen werden. Im Rahmen präklinischer Studien kommen dabei häufig Tiermodelle zum Einsatz. Gut geeignet als Versuchstiere sind Ziegen, Minischweine und Schafe. Diese weisen im Vergleich zum Menschen Ähnlichkeiten hinsichtlich der Knorpeldicke, des Gewichts, der skelettalen Reife, der Knochenmineraldichte und der Größe des „critical size defects“ auf (Moran et al. 2016). Letzterer beschreibt die Defektgröße, welche die regenerativen Fähigkeiten des Körpers übersteigt und ohne Intervention nicht vollständig ausheilt. Besonders Schafe werden gern für orthopädisch-unfallchirurgische und biomaterialwissenschaftliche Studien genutzt und sind gut etabliert (Meng et al. 2020). Die Größe des „critical size defects“ beträgt bei Schafen 7 mm im Durchmesser und bei Menschen 10 mm. Die menschliche Knorpeldicke liegt im Schnitt bei 2,4–2,6 mm, variiert aber je nach Gelenk. Beim Schaf beträgt die Knorpeldicke 0,7–1,7 mm (Meng et al. 2020; Moran et al. 2016). Schafe sind bereits im Alter von zwei bis drei Jahren knochenadult, sodass keine wachstumsbedingten Überlagerungseffekte mehr auftreten (Meng et al. 2020). Außerdem sind Schafe sehr anpassungs- und widerstandsfähig. Sie sind anspruchslos in der Fütterung, friedfertig, pflegeleicht und gut trainierbar, was ihr Handling sowie die postoperative Nachsorge erleichtert. Ein weiterer wesentlicher Aspekt für den Einsatz von Schafen in der orthopädisch-unfallchirurgischen Forschung sind die Gewichtsverhältnisse und die Belastung der Gelenke, vor allem der Kniegelenke, die denen der Menschen sehr ähnlich sind (Meng et al. 2020). Auch der Aufbau und die Größe einzelner Knochen, wie z. B. des distalen Femurs, ähneln sich stark. Dies erleichtert eine spätere Translation der Ergebnisse in die Humanmedizin. So können neue Behandlungsmethoden in vergleichbaren Dimensionen präklinisch getestet werden, in denen sie später eingesetzt werden sollen.

1.1 Wissenschaftliche Grundlagen

1.1.1 Knochen

Der menschliche Körper besitzt insgesamt 213 Knochen (Clarke 2008). In ihrer Gesamtheit bilden Knochen als hartes Binde- und Stützgewebe das Skelettsystem. Darüber hinaus dienen sie als Muskelansatzpunkte der Bewegungsfähigkeit des menschlichen Körpers. Gleichzeitig schützen sie die inneren Organe und spielen als Speicher für Phosphat,

Calcium und das Knochenmark eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel sowie Phosphathaushalt (Datta et al. 2008; Taichman 2005). Zudem ist das enthaltene Knochenmark an der Hämato- sowie Lymphopoese beteiligt und dient als Stammzellreserve.

Je nach Lokalisation erfüllen Knochen verschiedene Funktionen und sind anderen biomechanischen Anforderungen ausgesetzt. Dies wird vor allem durch die unterschiedlichen mikroskopischen Strukturen des Knochens ermöglicht. Es wird zwischen dem kortikalen und dem spongiösen Knochen unterschieden. Die äußerste Schicht des Knochens ist das Periost (Buckwalter et al. 1996). Das Periost wird daher auch als Knochenhaut bezeichnet. Es ist aus zwei Schichten aufgebaut. Die außenliegende Schicht verbindet benachbarte Knochen miteinander, während die innere Schicht, das sogenannte Kambium, Osteoprogenitorzellen und Gefäße enthält. Allerdings ist die osteogene Aktivität des Kambiums nach Erreichen der Skelettreife beinahe gänzlich erschöpft (Buckwalter et al. 1996). Über sogenannte Sharpey-Fasern ist das Periost mit dem darunterliegenden kortikalen Knochen verbunden. Bei den Sharpey-Fasern handelt es sich um kräftige Kollagenfasern, welche einerseits den Knochen mit Sehnen und Bändern verbinden, andererseits die Blutversorgung der Kortikalis gewährleisten (Clarke 2008). Durch die Fähigkeit der Periostzellen, Knochen resorbieren und neu bilden zu können, wird ihnen aufgrund des appositionellen Wachstums eine entscheidende Rolle bei der Kallusbildung in der initialen Frakturheilung zuteil (Buckwalter et al. 1996). Schräge Kanäle, sogenannte Volkmann-Kanäle, verbinden das Periost direkt mit dem Endost, einer dünnen Membran an der inneren Knochenoberfläche, und dem Knochenmarkraum (Buckwalter et al. 1996).

Der kortikale Knochen/die Kortikalis entspricht der Substantia compacta und wird auch Knochenrinde genannt. Rund 80 % der Knochenmasse bestehen aus der Substantia compacta (Clarke 2008; Melsen und Steiniche 1993). Aufgrund ihrer geringen Porosität von 5–10 % ist die Kortikalis hauptverantwortlich für die mechanische Torsions- und Biegefestigkeit der Knochen. Der spongiöse Knochen/die Spongiosa stellt nur ca. 20 % der mikroskopischen Knochenstruktur dar. Wegen der höheren Porosität von 50–90 % ist der Anteil an der gesamten Knochenfläche aber deutlich größer und beträgt etwa 80 % (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008; Melsen und Steiniche 1993). Zudem ist die metabolische Aktivität der Spongiosa um einiges höher, da sie der Knochenrinde innen anliegt und über das Endost eine direkte Kontaktfläche zum zentral gelegenen Knochenmark aufweist (Buckwalter et al. 1996; Safadi et al. 2009). Das Endost kleidet die Volkmann-Kanäle aus

und ist durch den Gehalt an osteoprogenitorischen Zellen sowie Blutgefäßen bedeutend für die Knochenneubildung (Clarke 2008; Nather 2005). Durch den Kontakt zu zirkulierenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen reagieren die Zellen des spongiösen Knochens schneller auf mechanische Reize und weisen einen höheren Zellumsatz auf.

Histologisch bestehen Knochen aus zwei verschiedenen Arten: dem Geflechtknochen und dem Lamellenknochen (Buckwalter et al. 1996). Der Geflechtknochen bezeichnet den unreifen Knochen, welcher vor allem im Rahmen der desmalen Ossifikation in der Embryonalentwicklung oder bei neu gebildetem Knochen, z. B. nach Frakturen, zu finden ist. Es handelt sich dabei um ein flexibles, weniger stabiles Knochengeflecht aus unregelmäßig angeordneten Kollagenfibrillen (Buckwalter et al. 1996). Im Gegensatz dazu ist der Lamellenknochen mit seinen dichten, geordneten Kollagenfibrillen sehr stabil (Matos et al. 2008). Die wesentlichen Elemente des Lamellenknochens sind die Osteone. Osteone werden aus konzentrischen Lamellen gebildet, welche einen zentralen Havers-Kanal umgeben. Der Havers-Kanal enthält Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern (Jepsen 2009; Safadi et al. 2009). Aus dem zentralen Kanal ragen Zellfortsätze, sogenannte Canaliculi heraus, welche den Havers-Kanal mit den Osteozyten verbinden und eine Nährstoffdiffusion ermöglichen (Buckwalter et al. 1996). Die Grenzen benachbarter Osteone werden als Zementlinien bezeichnet. Zementlinien sind feine Schichten organischer Matrix und trennen einzelne Osteone voneinander. Frakturen verlaufen in der Regel entlang dieser Linien und selten quer durch die Osteone (Jepsen 2009; Safadi et al. 2009). Die Spongiosa besitzt ebenfalls Lamellen. Allerdings sind die Lamellen nicht konzentrisch aufgebaut, sondern halbkreisförmig und setzen sich zu dreidimensionalen Trabekeln zusammen. Daraus resultiert die große Oberfläche des spongiösen Knochens (Jepsen 2009). Statt über zentrale Havers-Kanäle wird die Spongiosa direkt über das Knochenmark versorgt, welches sich zwischen den Trabekeln befindet. Dabei sind die Räume zwischen den Trabekeln reich an weiten Blutkapillaren, den sogenannten Sinusoiden. Über diese Sinusoide werden die Trabekel ernährt, was der Spongiosa eine deutlich höhere Stoffwechselaktivität als den kortikalen Osteonen verleiht (Jepsen 2009). Gemeinsam mit der Oberflächenvergrößerung durch die Trabekelstruktur ist dies ein wesentlicher Faktor für das bessere Einheilen von Knochentransplantaten und Implantaten im spongiösen Knochen.

Neben dem mikroskopischen und histologischen Aufbau gibt es viele weitere Merkmale nach denen Knochen unterschieden werden können wie z. B. der Lage, der Größe oder der Form (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008; Safadi et al. 2009). Am häufigsten wird jedoch zwischen den Röhrenknochen und Plattenknochen unterschieden. Röhrenknochen bestehen aus drei Bereichen mit verschiedenen Charakteristika: 1) Diaphyse 2) Metaphyse 3) Epiphyse (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Die Diaphyse ist der stabilitätsverleihende Knochenschaft mit einem Hohlraum, der Knochenmarkhöhle und dicker kortikaler Wand. In der Markhöhle der langen Extremitätenknochen, wie z. B. dem Femur, befindet sich der größte Anteil des Knochenmarks. Die Beschaffenheit erinnert an eine Röhre und ist namensgebend für die Röhrenknochen. Die Metaphyse bildet den Übergang zwischen Diaphyse und Epiphyse. Dabei handelt es sich um die aufgeweiteten Endbereiche der Knochen vor dem Beginn der Gelenkfläche. Das Endstück der Knochen mit der Gelenkfläche bildet die Epiphyse. Diese besteht hauptsächlich aus spongiösem Knochen und wird nur von einer dünnen kortikalen Schicht umgeben (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Durch diesen dreigeteilten Aufbau und die damit einhergehende Verteilung von dichter Kortikalis in der Diaphyse und Spongiosa in der Meta- und Epiphyse sind Röhrenknochen sehr stabil und belastungsfest, weisen gleichzeitig aber auch eine gewisse Flexibilität und Dämpfungsfunktion auf. Plattenknochen sind hingegen flache Knochen ohne vergleichbaren mehrteiligen Aufbau. Sie bestehen größtenteils aus spongiösem Knochen und sind rundum von einer kortikalen Schicht umgeben. Plattenknochen, wie die Schädelknochen, erfüllen primär eine Schutzfunktion (Clarke 2008).

Das Knochengewebe setzt sich aus einem organischen und einem anorganischen Teil zusammen. Neben dem organischen und anorganischen Teil besteht das Knochengewebe zu 5–10 % aus Wasser und Lipiden (Burr und Akkus 2013). Die anorganische Substanz besteht zu 98 % aus Hydroxylapatitkristallen und macht etwa 70 % des Knochens aus (Netter und Böttcher 2001). Sie verleiht dem Knochen die Stabilität und ihr Verlust führt wie bei der Osteomalazie oder Rachitis zur Erweichung des Knochens (Heath 2009). Das organische Material bildet ca. ein Viertel der Knochensubstanz und besteht zu etwa 90 % aus Matrix. Diese Matrix enthält wiederum zu 85–90 % Kollagen Typ 1 (Col1) (Burr und Akkus 2013). Weitere Bestandteile der organischen Matrix sind Kollagen Typ 3 und 5, nicht-fibrilläres Kollagen sowie nicht-kollagene Proteine. Zu den nicht-kollagenen Proteinen zählen unter anderem Proteoglykane, Proteolipide, Glykoproteine und Wachstumsfaktoren wie Osteonektin, Osteocalcin, Bone-Sialoproteine, Interleukin 1 und 6,

Transforming Growth Factor β (TGF- β) sowie Bone morphogenetic proteins (BMP) (Buckwalter et al. 1996; Burr und Akkus 2013; Clarke 2008; Gundberg 2003). Insgesamt ist die organische Matrix samt ihrer Bestandteile ausschlaggebend für die Form und Zugfestigkeit des Knochens (Buckwalter et al. 1996).

Die übrigen 10 % der organischen Substanz werden von einem zellulären Anteil bestehend aus Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten gebildet (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Osteoblasten stammen aus der mesenchymalen Stammzelllinie und gehen aus Osteoprogenitorzellen hervor, während Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen. Osteoprogenitorzellen befinden sich in den Knochenkanälen, dem End- und Periost sowie dem Knochenmark (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Die Differenzierung zu Osteoblasten geschieht unter dem Einfluss der spezifischen Transkriptionsfaktoren runt-related transcription factor 2 (Runx2), distal-less homeobox 5 und Osterix sowie molekularen und mechanischen Stimuli über die Zwischenstufe der Präosteoblasten. Präosteoblasten zeigen eine hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) und differenzieren wiederum durch Runx2 und Osterix zu reifen, kubischen Osteoblasten (Florencio-Silva et al. 2015). Die Hauptfunktion reifer Osteoblasten ist die Proteinbiosynthese. Sie exprimieren beispielsweise Kollagen Typ 1, 3, 5, Osteocalcin sowie Bone-Sialoprotein und tragen so als Knochenbildungszellen zur Synthese der organischen Knochenmatrix bei (Clarke 2008).

Die nicht-mineralisierte Knochenmatrix wird als Osteoid bezeichnet und mineralisiert durch die in Matrixvesikeln ausfallenden Calcium- und Phosphationen mithilfe des ALP, welches sich an der extrazellulären Membran der Osteoblasten befindet. Die Matrixvesikel werden nach apikal von der Zellmembran der Osteoblasten abgekapselt. Osteoblasten können entweder in die Osteoprogenitorzelllinie zurückkehren, als ruhende Osteoblasten an der Zelloberfläche verweilen oder sich zu rundlichen Osteozyten entwickeln (Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Letztere stellen mit einem Anteil von ca. 90 % die am häufigsten vorkommenden Knochenzellen dar (Buckwalter et al. 1996). Nach der Differenzierung aus Osteoblasten über die Stadien des Osteoidosteozyten und Präosteozyten befinden sie sich für bis zu mehrere Jahrzehnte eingemauert in mineralisierter, organischer Matrix mit kleinen Hohlräumen, den sogenannten Lakunen (Clarke 2008). Durch die Bildung zytoplasmatischer Fortsätze ist eine direkte Zellkommunikation benachbarter Osteozyten möglich. Dabei erfüllen sie insbesondere regulatorische Funktionen in der

Homöostase der Mineralisierung und dienen als Mechanosensoren für den Knochenumbau (Chen et al. 2015; Clarke 2008). Osteozyten sind die Hauptproduzenten von Osteoprotegerin (OPG) und rezeptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). Über diese kontrollieren sie das Ausmaß der Knochenresorption. Während OPG die Osteoklastenaktivität reduziert, führt die Expression von RANKL zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten (Bellido et al. 2019; Moreira et al. 2000). Damit sind Osteozyten ein zentraler Pfeiler der Knochenphysiologie.

Neben Osteozyten produzieren auch Osteoblasten, Stromazellen und aktivierte T-Zellen RANKL. RANKL bindet nach seiner Freisetzung am rezeptor activator of NF- κ B (RANK)-Rezeptor, welcher sich auf Osteoklasten und den Osteoklastenvorläuferzellen befindet. Daraufhin wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Expression osteoklastogener Aktivitätsparameter wie dem Cathepsin K (CtsK) führt. Ebenso fördern Vitamin D₃, Parathormon (PTH) und proinflammatorische Zytokine die Osteoklastenaktivierung durch die Synthese von RANKL. Das OPG hingegen hemmt die Osteoklastenaktivität, indem es durch seine strukturelle Analogie der N-terminalen Region statt des RANK am RANKL binden kann und so die RANK/RANKL-Interaktion unterbindet. Antiinflammatorische Zytokine unterstützen die Hemmung der Osteoklasten (Amarasekara et al. 2018; Bellido et al. 2019; Moreira et al. 2000). Die reifen, mehrkernigen Osteoklasten entstammen der hämatopoetischen Stammzellreihe und proliferieren unter dem Einfluss von macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und RANKL. Sie sind vor allem für die Knochenresorption verantwortlich (Clarke 2008). Durch eine Neuausrichtung des Zytoskeletts geschieht die Anheftung der polarisierten Osteoklasten an die abzubauen Knochenmatrix. Osteoklasten bauen ausschließlich mineralisierten Knochen ab. Dabei wird die anorganische Matrix dekalzifiziert und die organische Matrix proteolysiert. Während der Umbauprozesse befinden sich die Osteoklasten in tiefen Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen (Bellido et al. 2019; Buckwalter et al. 1996; Clarke 2008). Hydrolytische Enzyme, wie beispielsweise das CtsK, werden über Mikrovilli im Faltsaum der Osteoklasten (Ruffled Border) in die Howship-Lakunen transportiert. Die Resorptionslakunen besitzen durch H⁺-ATPasen in der Ruffled Border ein saures Milieu und werden mit ringförmig angeordneten Aktinfilamenten gegenüber der intakten Knochenmatrix versiegelt (Arana-Chavez und Bradaschia-Correa 2009; Bellido et al. 2019). Das saure Milieu ermöglicht die Entkalkung der Hydroxylapatitkristalle in der anorganischen Matrix und bereitet den enzymatischen Abbau der organischen Matrix vor,

der unter anderem durch CtsK vermittelt wird (Arana-Chavez und Bradaschia-Correa 2009; Florencio-Silva et al. 2015). Nach Abschluss der Knochenresorption leiten ein erhöhter extrazellulärer Calciumgehalt, der Verlust der Integrin-vermittelten Adhäsion und ein Mangel an antiapoptotischen Zytokinen die Apoptose der Osteoklasten ein (Bellido et al. 2019).

Das Zusammenspiel aller Knochenbestandteile ist der entscheidende Faktor für die physiologischen Eigenschaften des Knochens. Der überwiegende Teil des Knochengewebes geht aus dem Mesoderm hervor. Seine Stabilität erhält der Knochen durch die Mineralisierung löslichen Kalziums und Phosphats zu kristallinem Kalziumphosphat in der organischen Matrix (Clarke 2008). Die Ossifikation erfolgt über zwei verschiedene Wege: 1) die enchondrale Ossifikation und 2) die desmale Ossifikation. Diese sind sowohl bei der Knochenneubildung als auch bei der Knochenheilung im reifen Skelett zu beobachten (Shapiro 2008; Sommerfeldt und Rubin 2001).

Die enchondrale Ossifikation beinhaltet eine knorpelige Zwischenstufe und ist vor allem beim Längenwachstum der Röhrenknochen sowie bei der Frakturheilung bedeutsam (Ortega et al. 2004; Shapiro 2008). Dabei proliferieren und hypertrophieren zunächst ruhende Chondrozyten als Reaktion auf osteogene Stimuli aus einer hyalinen Knorpelmatrix (Olsen et al. 2000; Ortega et al. 2004). In der Folge setzen die Chondrozyten ALP frei, was zu deren Apoptose und der Freisetzung angiogener Faktoren wie dem vascular endothelial growth factor (VEGF) führt. Daraufhin entsteht eine Matrix, in die Kapillaren und Osteoprogenitorzellen einwandern. Letztere entwickeln sich weiter zu Osteoblasten und bilden schließlich neuen Knochen (Ortega et al. 2004; Shapiro 2008).

Die desmale Ossifikation verläuft ohne knorpeliges Zwischenstadium. Insbesondere bei der Bildung von Plattenknochen oder der primären Knochenheilung ist die Ossifikation aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) über Osteoprogenitorzellen bis hin zu Osteoblasten von Bedeutung (Dimitriou et al. 2005; Olsen et al. 2000; Shapiro et al. 2008). Das Wachstum und die Neubildung des Knochens werden dabei ständig an die biomechanischen Belastungen adaptiert. Das Wolffsche Gesetz besagt, dass sich „im Gefolge primärer Abänderungen der Form und Inanspruchnahme oder auch bloß der Inanspruchnahme der Knochen, bestimmte, nach mathematischen Regeln eintretende Umwandlungen der inneren Architektur und ebenso bestimmte, denselben mathematischen Regeln folgende

sekundäre Umwandlungen der äußeren Form der betreffenden Knochen vollziehen" (Wolff 2010). So passen sich auch Knochentransplantate den einwirkenden Kräften an und eine fehlende Belastung kann eine übermäßige Knochenresorption ähnlich wie beim zahnlosen Kiefer nach sich ziehen (Khan et al. 2005).

Diese dynamische Anpassungsfähigkeit des Knochens setzt sich ein Leben lang in Form eines kontinuierlichen Umbaus fort. Der Knochen unterliegt einem ständigen Gleichgewicht zwischen Abbau und Neubildung, um seine strukturelle Integrität zu erhalten, Mikrotraumata zu reparieren und die Mineralhomöostase zu erhalten (Clarke 2008; Hadjidakis und Androulakis 2006). Dieser als „Remodeling“ bezeichnete Prozess ist essenziell für die langfristige Stabilität und Funktionalität des Skeletts (Clarke 2008; Plotkin und Stains 2015). Jährlich werden etwa 2–3 % des kortikalen Knochens umgebaut (Clarke 2008). Das Remodeling beginnt mit der Initiationsphase, in der alter oder beschädigter Knochen gezielt durch Osteoklasten resorbiert wird. Die sich anschließende Transitionsphase steuert die Knochenbildung in der finalen Formationsphase durch die Freisetzung von Signalmolekülen. Schließlich wird in der finalen Formationsphase neue Knochenmatrix von Osteoblasten synthetisiert (Clarke 2008). Die Regulation dieses Prozesses erfolgt über mechanische und biochemische Signale. So führt eine mechanische Belastung zur osteozytenvermittelten Mechanotransduktion mit resultierender Freisetzung wachstumsfördernder Faktoren wie insulin-like growth factor 1, Prostaglandinen und Stickstoffoxid (NO). Bei geringer Belastung wird hingegen Sclerostin ausgeschüttet, welches die Knochenbildung über die Aktivierung von Osteoklasten hemmt (Florencio-Silva et al. 2015). Biochemisch wird der Knochenstoffwechsel durch lokale Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und BMP sowie systemische Hormone wie PTH, Vitamin D3, Schilddrüsen- und Steroidhormone reguliert (Hadjidakis und Androulakis 2006).

1.1.2 Hyaliner Knorpel

An den Gelenkflächen des menschlichen Körpers bilden der subchondrale Knochen und der hyaline Knorpel eine funktionelle Einheit, um die einwirkenden biomechanischen Kräfte gleichmäßig auf das Skelettsystem zu übertragen. Der hyaline Gelenkknorpel ist nur wenige Millimeter dick und überdies nur sehr begrenzt teilungs- und regenerationsfähig, da der Knorpel ein avaskuläres, bradytrophes Gewebe ist (Muir 1995; Shapiro et al. 1993). Dennoch ermöglicht er aufgrund seiner einzigartigen Struktur eine

reibungslöse Beweglichkeit und Druckelastizität der Gelenke. Bisher gibt es kein industriell gefertigtes Material mit gleichwertigen Eigenschaften (Bruns und Steinhagen 1999; Buckwalter und Mankin 1998b).

Der hyaline Gelenkknorpel gehört zum Bindegewebe und besteht ähnlich wie der Knochen aus einem zellulären Anteil und einer wasserhaltigen Matrix. Die Matrix imponiert makroskopisch gläsern und verleiht dem hyalinen Knorpel seinen Namen (von griechisch *hyalos* – „Glas“). Ihre strukturellen Merkmale erhält die Knorpelmatrix durch den hohen Wassergehalt und ein Netzwerk aus makromolekularen Bestandteilen (Martinek 2003). Die Knorpelmatrix besteht zu etwa 60–80 % aus Wasser und bildet ca. 97 % des gesamten Knorpelgewebes. Den zweitgrößten Anteil der extrazellulären Matrix (EZM) bilden Kollagenfasern Typ 2 mit 10–20 %. Darauf folgt das Aggrecan als massenanteilig dominierendes Proteoglykan, welches 5–7 % repräsentiert. Zu den übrigen Bestandteilen gehören andere Proteoglykane und Kollagentypen, Link-Proteine, Anchorin, Hyaluronate, Fibronectin sowie verschiedene Lipide. Diese machen in ihrer Gesamtheit weniger als 5 % der hyalinen Knorpelmatrix aus (Martinek 2003).

Der hohe Wasseranteil und die Interaktion mit den Makromolekülen sind ausschlaggebend für die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels. Dabei befindet sich der größte Wasseranteil an der Knorpeloberfläche (Mow et al. 1984). Zu den chemisch und mechanisch wasserbindenden Elementen gehören unter anderem die Proteoglykane. Diese machen etwa 25–35 % der Knorpelmasse aus (Roughley und Lee 1994). Proteoglykanmonomere besitzen ein zentrales Protein mit angehängten Polysacchariden unterschiedlicher Konstitution. Produziert werden Proteoglykane von den Chondrozyten und Synoviozyten, wobei sie eine Halbwertszeit von etwa 400–800 Tagen besitzen (Buckwalter und Mankin 1998b). Über Link-Proteine gehen sie eine Verbindung mit Hyaluronaten ein, wodurch bis zu 10.000 nm lange Aggregate gebildet werden, welche auch als Aggrecane bezeichnet werden. Aggrecane stellen den größten Anteil der Proteoglykane in der Knorpelmatrix dar. Hauptvertreter der Polysaccharide sind die Glykosaminoglykane. Diese verleihen den Proteoglykanen aufgrund ihrer negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen die hohe Wasserbindungsfähigkeit, da sie die positiv geladenen Kationen des Wassers anziehen. Zu den Glykosaminoglykanen gehören unter anderem Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Die Hyaluronsäure ist die undissoziierte, protonierte Form der Hyaluronate. Glykosaminoglykane sind im Knorpel

unterschiedlich verteilt (Buckwalter und Mankin 1998b; Martinek 2003; Roughley und Lee 1994). Ebenfalls relevant für die Bindung des Wassers sind die Glykoproteine und die nicht-kollagenen Proteine. Diese stellen etwa 15–20 % des Knorpelgewichts dar und sind außerdem an der stabilitätsverleihenden, strukturellen Organisation des Knorpels beteiligt (Buckwalter und Mankin 1998b). Zu den Glykoproteinen und nicht-kollagenen Proteinen gehören das Link-Protein, Anchorin, Fibronectin und Tenascin. Die genaue Funktion der beiden Letztgenannten ist nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch ein Einfluss bei der Zelladhäsion und der Signalweiterleitung sowie bei pathologischen Prozessen diskutiert. Link-Proteine binden Hyaluronsäure an die Proteoglykane und tragen zur Stabilisierung ihrer Aggregate bei. Anchorin fungiert als Oberflächenprotein, das die Kollagenfibrillen mit den Matrix-Chondrozyten verbindet (Martinek 2003).

Kollagene bilden das Gerüst des hyalinen Knorpelgewebes und sind maßgeblich für seine funktionelle Integrität. Es gibt verschiedene Kollagenarten im menschlichen Körper. Insgesamt kommt das Col1 am häufigsten vor. Es ist wesentlicher Bestandteil von Knochen, Faserknorpel, Sehnen und Bändern (Naomi et al. 2021; Ricard-Blum 2011). Mit einem Anteil von 90–95 % ist das Kollagen II (Col2) der vorherrschende Kollagentyp im hyalinen Knorpel, die übrigen 5–10 % werden von Kollagen VI, IX, X und XI gebildet (Martinek 2003). Der prozentuale Anteil des Col2 am Knorpelgewicht beträgt dabei rund 60 % (Eyre 1995; Martinek 2003). Kollagene bestehen aus einzelnen Fasern, welche ihrerseits aus einzelnen Kollagenfibrillen hervorgehen. Die Grundeinheit der Kollagenfibrillen ist das Tropokollagen. Das Tropokollagen ist eine aus drei α -Polypeptidketten zusammengelagerte Triple-Helix. Die Triple-Helix wird durch Wasserstoffbrücken sowie kovalente Quervernetzungen stabilisiert. Sie entsteht durch die Hydrolyse von Prolin und Lysin mit anschließender Glykolisierung. In diesem Prozess wird zunächst das Prokollagen produziert und im Anschluss durch die Peptidase zum triplehelikalen Tropokollagen aus α -Polypeptidketten umgewandelt (Peltonen et al. 1985). Die Bestandteile der EZM unterliegen einem kontinuierlichen Turnover und sind so in der Lage, sich in einem limitierten Umfang an unterschiedliche Belastungen anzupassen (Muir 1995; Shapiro et al. 1993).

Der zelluläre Anteil beträgt im hyalinen Knorpel lediglich 1–3 % und wird von einem einzigen Zelltyp gebildet, den hochdifferenzierten Chondrozyten (Buckwalter und Mankin 1998b; Martinek 2003). Diese entstehen aus Chondroblasten und liegen im Knorpel

in isogenen Gruppen vor. Kennzeichnend für eine isogene Gruppe ist, dass alle Chondrozyten demselben Chondroblasten entstammen und folglich die gleichen genetischen Merkmale aufweisen. Die EZM um eine isogene Gruppe herum wird Territorium genannt. Die Einheit aus einem Territorium und der zugehörigen isogenen Gruppe wird als Chondron definiert (Amr et al. 2022). Chondrozyten kommen in unterschiedlicher Form und Größe vor. Eine zentrale Rolle in ihrer Entwicklung und Differenzierung nimmt der Transkriptionsfaktor Sry-related high-mobility-group box gene 9 (Sox9) ein. Sox9 ist ein essenzieller Regulator der Chondrogenese, der die Expression vieler knorpelspezifischer Gene steuert (Akiyama 2008; Song und Park 2020).

Chondrozyten sind für die Synthese und den Erhalt der EZM verantwortlich. Hervorzuheben ist ihre Bedeutung für die Produktion des Col2, das dem Gewebe seine Viskoelastizität verleiht. Zusätzlich stellen sie Proteoglykane und Glykoproteine her, die zur mechanischen Stabilität und Wasserbindungsfähigkeit des Knorpels beitragen (Buckwalter und Mankin 1998a; Martinek 2003). Als Teil des bradytrophen Knorpelgewebes sind die Chondrozyten nicht an das Blut- oder Lymphsystem angebunden und ihr Stoffwechsel muss über die Diffusion von Nährstoffen aus der extrazellulären Grundsubstanz gewährleistet werden (Martinek 2003).

Entscheidend für die langfristige Funktionalität des Knorpelgewebes ist die Chondrozytenmatrix. Diese Matrix dient nicht nur als mechanischer Schutz für die Chondrozyten, sondern unterstützt auch die Beständigkeit ihrer Form und ihres Phänotyps. Sie fungiert als Medium für den Transport von Nährstoffen, neu synthetisierten Molekülen, Wachstumsfaktoren und Stoffwechselabfallprodukten. Darüber hinaus wandelt die Chondrozytenmatrix mechanische Belastungen des Knorpels in Signale um, die die metabolische Aktivität der Chondrozyten beeinflussen. Beispielsweise führt eine chronische Minderbeanspruchung des Knorpels zu einer deutlichen Verringerung der Proteoglykansynthese und des Aggregationsgrades. Dadurch wird die mechanische Stabilität und Druckelastizität des Knorpels negativ beeinflusst. Eine starke Druckbelastung hingegen führt zu einem Anstieg der Syntheseleistung (Gray et al. 1988). Obwohl der genaue Mechanismus dieser Signalübertragung noch nicht vollständig geklärt ist, werden elektrische und physikochemische Effekte als Grundlage vermutet (Martinek 2003).

Der hyaline Gelenkknorpel muss hohen mechanischen Belastungen standhalten. Entsprechend ist seine Struktur darauf abgestimmt und lässt sich zonal einteilen. Es kann zwischen vier verschiedenen Zonen unterschieden werden. Die oberflächliche Zone ist die Gleit- oder Tangentialzone. Sie liegt der kongruierenden Gelenkfläche unmittelbar auf. Ihre Funktion ist es, eine möglichst hohe Gleitfähigkeit mit geringem Friktionsindex zu gewährleisten. Dafür sind die Kollagenfasern und die Chondrozyten tangential zur Oberfläche angeordnet. Außerdem enthält diese Schicht das Proteoglykan Lubricin, welches die Gleitfähigkeit der Gelenkfläche zusätzlich erhöht. Die Gleitzone macht ungefähr 20 % der Knorpeldicke aus und weist den höchsten Wassergehalt aller Schichten auf (Klein et al. 2009; Yilmaz et al. 2023).

Die darunterliegende mittlere Zone, auch als Übergangszone bezeichnet, besteht aus einer ungeordneten Kollagen- und Chondrozytenarchitektur. Dahingegen sind die Kollagenfasern und Chondrozyten in der tiefen Zone, der Radiärzone, trajektoriell entlang der Kraft- und Spannungslinien sowie säulenartig senkrecht zur Oberfläche des Knorpels ausgerichtet. Die Kollagenfibrillen weisen hier den größten Durchmesser auf und die Chondrozyten liegen in isogenen Gruppen vor (Wirth und Rudert 1996). Zudem findet sich in der Radiärzone der höchste Gehalt an Proteoglykanen, weswegen diese Zone entscheidend für die Druckresistenz ist.

Die tiefe Zone und die Mineralisierungs-/Verkalkungszone werden von einer Grenzlinie getrennt, auch Tidemark genannt. Sie stellt die Grenze zwischen nicht-kalzifizierter und kalzifizierter Matrix dar und ist im Lichtmikroskop als basophile Linie zu erkennen (Martinek 2003). Die Tidemark fungiert als Anker für die Kollagene und beugt einer Delaminierung vor (Yilmaz et al. 2023). Die folgende Mineralisierungs- oder Verkalkungszone, trennt den hyalinen Knorpel vom darunterliegenden subchondralen Knochen. Kollagenfasern des Typ X strahlen zapfenartig in den Knochen ein, um den Knorpel stabil am subchondralen Knochen zu befestigen. Die dort befindlichen Chondrozyten zeigen eine fortgeschrittene Verkalkung und sind metabolisch häufig kaum mehr aktiv (Martinek 2003).

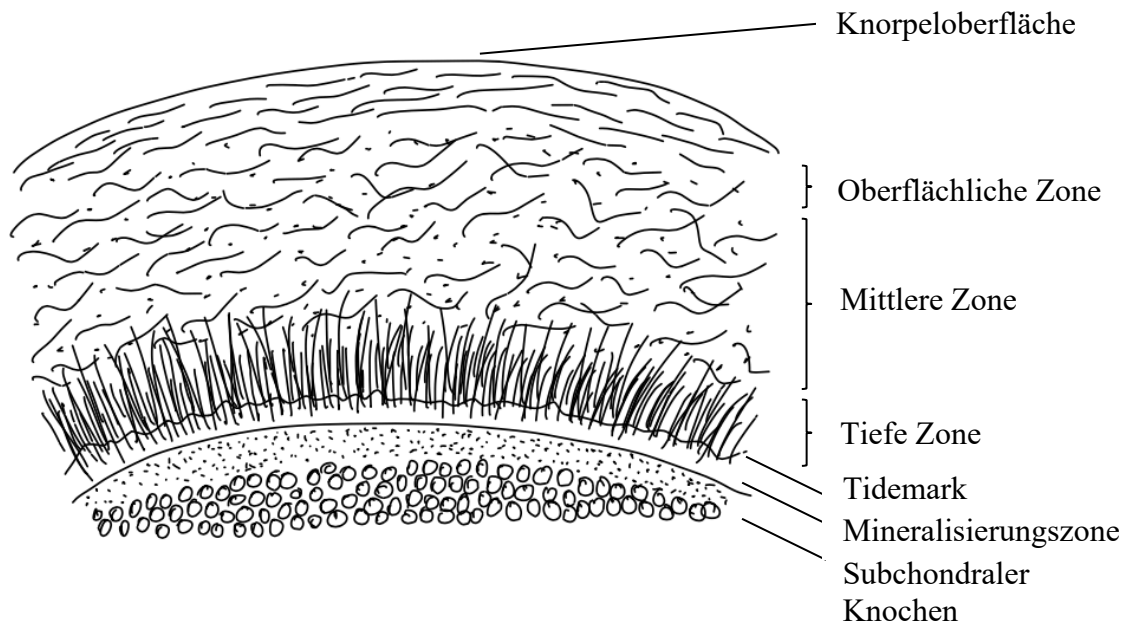


Abb. 1: Histologischer Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels

Schematische Darstellung der zonalen Gliederung des Gelenkknorpels. Gezeigt werden die oberflächliche Zone (Tangentialzone), die mittlere Zone (Übergangszone) und die tiefe Zone (Radiärzone). Die mineralisierte Knorpelschicht wird durch die Tidemark vom nicht-mineralisierten Knorpel getrennt und grenzt an den subchondralen Knochen. Modifiziert (mod.) nach Martinek 2003 (Martinek 2003).

Kleinste Veränderungen der Knorpelstruktur reichen aus, um einen fortschreitenden Gelenkverschleiß zu induzieren (Schinhan et al. 2012). Bereits 1773 formulierte Hunter, dass ein einmal zerstörter Knorpel, nicht repariert werden könne (Hunter 1995). Bis heute sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen des chondralen Alterungs- und Degenerationsprozesses nicht sicher nachvollzogen. Feststeht aber, dass eine Restitutio ad integrum des Knorpelgewebes aufgrund seiner fehlenden Blut-, Nerven- und Lymphgefäße sowie der daraus resultierenden, reduzierten Proliferations- und Wanderungsfähigkeit der Chondrozyten stark limitiert ist (Buckwalter und Mankin 1998b). Die Kombination aus Alterung, Degeneration und Entzündungsreaktionen führt bei ca. 20 % der Bevölkerung zu einer progressiven Verschlechterung der Gelenkfunktion (Nehrer und Neubauer 2023). Dabei kann die physiologische Alterung nicht mit pathologischen Defektveränderungen, beispielsweise im Rahmen der Osteoarthritis, gleichgesetzt werden (Buckwalter und Mankin 1998a; Yilmaz et al. 2023). Mit zunehmendem Alter reduziert sich die Anzahl der Chondrozyten, ihre Stoffwechselaktivität sowie ihre Anpassungsfähigkeit auf äußere Stimuli. Zudem nimmt der Wassergehalt der Matrix und die Größe der

Proteoglykane und Aggrecane ab, wohingegen die Konzentration von Abbauprodukten wie Aggrecan- und Link-Protein-Fragmenten ansteigt. Trotz einer verstärkten Kollagenvernetzung und dicker werdenden Kollagenfragmenten verliert der Knorpel diskret an mechanischer Festigkeit. Prinzipiell kann die Gelenkoberfläche aber auch im Alter stabil, glatt und widerstandsfähig bleiben (Martinek 2003).

Knorpeldefekte und degenerative Prozesse können biologisch in drei Kategorien unterteilt werden: 1) Matrixdefekte 2) chondrale Defekte ohne Beteiligung der subchondralen Lamelle 3) osteochondrale Defekte mit Beteiligung des subchondralen Knochens. Matrixdefekte können unter anderem aus stumpfen Traumata, statischer Kompression und Überbelastung oder Immobilisierung resultieren (Kuettner und Cole 2005; Nehrer und Neubauer 2023; Pearle et al. 2005). In der Folge kommt es zu einer Ruptur der Kollagenfibrillen und einem Funktionsverlust der Proteoglykane. Kompensatorisch ist die Syntheseleistung der Chondrozyten erhöht, um den Untergang der Matrixbestandteile durch deren Neuproduktion auszugleichen. Im Rahmen einer Defektgröße unterhalb des „critical size defects“ kann dies zur vollständigen Ausheilung der Läsion genügen (Nehrer und Neubauer 2023). Bei größeren chondralen Defekten ohne Beteiligung der subchondralen Lamelle genügen die Kompensationsmechanismen der Chondrozyten nicht. Veränderungen auf molekularer Ebene führen zu einer Degradation der interstitiellen Matrix und einer Destabilisierung des kollagenen Netzwerks. Katabole, proinflammatorische Einflüsse durch Zytokine wie Interleukine, Tumornekrosefaktor-alpha, Metalloproteinasen und deren Inhibitoren überwiegen. Ferner werden proteolytische Faktoren unter anderem durch Molekülfragmente aktiviert (Chevalier 1993; Kiani et al. 2002; Pearle et al. 2005). Die gesteigerte proteolytische Aktivität führt über eine Zellhypertrophie und eine Hochregulation von Kollagen Typ I und X zu einer gesteigerten Permeabilität sowie Verletzlichkeit des Knorpels mit einer Beeinträchtigung seiner biomechanischen Eigenschaften (Buckwalter et al. 2005; Gaissmaier et al. 2006; Pearle et al. 2005). Der Defekt kann sich auf den angrenzenden Knorpel und den subchondralen Knochen ausweiten. Ist der subchondrale Knochen mitbetroffen, so bildet sich zunächst ein Blutkoagulum. Im Verlauf strömen Stammzellen aus dem darunterliegenden Knochenmark ein und bilden eine fibrocartilaginäre Narbe. Der knöcherne Anteil kann meist vollständig regeneriert werden, während sich im chondralen Anteil oftmals nur Faserknorpel formt (Nehrer und Neubauer 2023). Faserknorpel weist einige strukturelle Unterschiede zum druckelastischeren hyalinen Knorpel auf und ist diesem funktionell deutlich unterlegen. Insbesondere ist die

Distanz der Chondrone im Faserknorpel relevant erhöht und zugleich der Kollagenanteil gegenüber dem Proteoglykananteil erheblich gesteigert (Benjamin und Ralphs 2004). So führt die progrediente Knorpeldegeneration samt insuffizienter Defektheilung häufig zu persistierenden Gelenkbeschwerden (Nehrer und Neubauer 2023).

1.2 Aktuelle Therapieansätze

Die Therapie gestaltet sich häufig schwierig, da Gelenke einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt sind und das Knorpelgewebe aufgrund der fehlenden Vaskularisierung nur eine geringe intrinsische Regenerationsfähigkeit aufweist (Buckwalter 2002). Zudem ist bei osteochondralen Läsionen der subchondrale Knochen mitbetroffen, welcher maßgeblich an der stufenfreien Regeneration der chondralen Gelenkfläche beteiligt ist (Sangiorgio et al. 2024). Die Regeneration der chondralen Gelenkfläche ist jedoch essenziell für die Wiederherstellung der schmerzfreien Gelenkbeweglichkeit. Bei der Behandlung von Traumata mit Gelenkbeteiligung oder chronisch-degenerativen Gelenkerkrankungen müssen daher sowohl der hyaline Knorpelbezug als auch der subchondrale Knochen adressiert werden.

Bisherige Therapieoptionen können in vier Gruppen unterteilt werden: 1) Konservative Behandlungsmethoden 2) Operative, gelenkerhaltende Verfahren 3) Biotechnologische Regenerationsansätze 4) Operative Eingriffe mit Gelenkersatz. Konservative Therapieoptionen zielen primär auf die Schmerzlinderung ab, während operative Verfahren darauf abzielen, die Progression degenerativer Veränderungen zu verlangsamen und die Gelenkfunktion wiederherzustellen oder das Gelenk zu ersetzen.

Zu den konservativen Behandlungsmethoden zählen physikalische Therapieverfahren, Krankengymnastik, Akupunktur, Kinesiotaping, medikamentöse Therapien und orthopädische Hilfsmittel wie z. B. Orthesen oder Schuhzurichtungen. Operativ kommen verschiedene Verfahren in Betracht. Ob das Gelenk erhalten werden kann, ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen wird das Alter der Patienten in die Indikationsstellung einbezogen. Die obere Altersgrenze liegt bei etwa 50–55 Jahren. Jedoch sollten auch das biologische Alter und der Defektgrad berücksichtigt werden (Hangody und Kárpáti 1997; Szerb et al. 2006). Zum anderen sind die Größe und Lage des Defektes sowie bestehende

Begleitpathologien ausschlaggebend. Eine Kontraindikation für gelenkerhaltende Therapien stellen gegenüberliegende Defekte dar, sogenannte „kissing-lesions“. Relevante Begleitpathologien sind etwa funktionelle Bandläsionen und -insuffizienzen oder Achsdeformitäten, welche vor der Therapie der Knorpelschäden korrigiert werden sollten.

Knochenmarkstimulierende Verfahren

Bei kleineren Läsionen mit einer Größe von bis zu ca. 2,5 cm² können knochenmarkstimulierende Verfahren Anwendung finden, welche erstmals 1959 durch Pridie et al. beschrieben wurden (Marder et al. 2005; Martin und Jakob 2022). Es wird zwischen der Mikro- und Nanofrakturierung unterschieden. Bei der Mikrofrakturierung (MFx) wird der Knochen nach rechtwinkliger Präparation des Defektrandes beispielsweise mit einer Ahle möglichst senkrecht zur subchondralen Platte perforiert. Die Löcher sollten dabei etwa 2–4 mm tief sein und in einem Abstand von 3–4 mm platziert werden. Der Defekt wird durch austretendes Blut mit MSC aufgefüllt. Im Verlauf bildet sich durch die Chondrogenese Faserknorpel. Es handelt sich bei der MFx um ein weitverbreitetes, günstiges Verfahren mit einfacher Handhabung und einzeitigem Vorgehen. Allerdings ist die MFx nur für Patienten ohne Gelenkfehlstellung geeignet und ein Patientenalter > 40 Jahre sowie größere Defekte sind prognostisch ungünstig (Kreuz et al. 2006b; Marder et al. 2005). Zudem kommt es häufig zur Bildung intraläsionaler Osteophyten und einer Befundverschlechterung nach wenigen Jahren (Kreuz et al. 2006a). In einem zusammenfassenden Review konnte gezeigt werden, dass die Gelenkfunktion nach einem Jahr zunächst besser wird, sich anschließend aber wieder verschlechtert (Mithoefer et al. 2009).

Die Nanofrakturierung (NFx) basiert auf dem gleichen Prinzip. Im Gegensatz zur MFx werden die Frakturierungslöcher aber gebohrt und sind etwa 1 mm groß sowie 9 mm tief. Neuere Arbeiten bestätigten den Vorteil von Bohrungen hinsichtlich der besseren Regeneratbildung und Mikroarchitektur des subchondralen Knochens (Eldracher et al. 2014). Jedoch eignet sich auch die NFx nur für kleinere Defekte und das gebildete Regenerat besteht ebenfalls größtenteils aus Faserknorpel. Daher wurden im Laufe der Zeit weitere Techniken mit dem Ziel entwickelt, hyalinen Gelenknorpel zu regenerieren und auch größere Defekte gelenkerhaltend versorgen zu können.

Matrixassoziierte autologe Chondrogenese (AMIC)

Ein Beispiel für solch eine Technik ist die matrixassoziierte autologe Chondrogenese (AMIC). Diese wurde erstmals 2003 von Behrens et al. (2005) beschrieben und kann als eine Erweiterung knochenmarkstimulierender Verfahren angesehen werden (Behrens 2005). Zunächst wird wie bei der MFX/NFX vorgegangen. Anschließend wird der Defektbereich mit einer exakt angepassten Kollagenmatrix bedeckt, wodurch das Blutkoagulum mit den MSC stabilisiert wird. Die Matrix verbessert zwar die Chondrogenese, muss aber ohne Überstand oder Stufenbildung an ihrer korrekten Position gehalten werden. Dazu wird sie in der Regel mit Fibrinkleber oder Nähten befestigt (Gille et al. 2005; Kramer et al. 2006). Die passgenaue Befestigung ist häufig problematisch und schafft im Falle des Fibrinklebers eine natürliche Knorpel-Knochen-Barriere. Verglichen mit den knochenmarkstimulierenden Verfahren ermöglicht es die AMIC aber, in einem einzeitigen Vorgehen bei verbesserter chondrogener Stimulation größere Defekte zu therapieren. Gille et al. (2010) empfehlen die Anwendung bis zu einer Defektgröße von 8 cm² (Gille et al. 2010). Allerdings ist die AMIC deutlich kostenintensiver als eine MFX/NFX und bisher fehlen überzeugende Langzeitergebnisse, die den Nutzen bei einer breiten Patientengruppe nachweisen können.

Autologe Chondrozytentransplantation (ACT)

Eine weitere Option zur Knorpelzelltransplantation ist die autologe Chondrozytentransplantation (ACT). Diese wurde zum ersten Mal von Lars Peterson durchgeführt und 1994 erstmals von Mats Brittberg publiziert (Brittberg et al. 1994; Grande et al. 1989). Es handelt es sich um ein zweizeitiges Verfahren, wobei in einer ersten Operation ein Knorpel-Knochen-Zylinder aus einem nicht belasteten Bereich des Gelenks entnommen wird. Im Anschluss werden die Chondroblasten isoliert und mithilfe spezieller Nährlösungen vier bis acht Wochen in vitro expandiert, bis sie in einem zweiten Eingriff transplantiert werden. Ursprünglich wurde die Knorpelzellsuspension mit einem Periostlappen oder später mit einer porcinen Kollagenmatrix im Defektareal fixiert, weswegen die ACT häufig auch als matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation bekannt ist (MACT). Heutzutage kann darauf oftmals verzichtet werden. Wie auch bei den knochenmarkstimulierenden Verfahren ist eine sorgfältige Defektpräparation mit glatten Knorpelrändern im Vorfeld essenziell. Ein Einbluten des Defektbetts sollte jedoch bei der (M)ACT vermieden werden. Indiziert ist die (M)ACT bereits ab einer Defektgröße von mehr als 2 cm²

(Niemeyer et al. 2023). Dabei konnten mehrere Studien bessere Ergebnisse der (M)ACT im Vergleich zu den knochenmarkstimulierenden Verfahren nachweisen (Mundi et al. 2016; Saris et al. 2014). Allerdings handelt es sich bei (M)ACT um ein aufwendiges Verfahren, welches mit hohem chirurgischem Aufwand und hohen Kosten einhergeht.

Minced-Cartilage

Ein Verfahren, welches besonders in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit erfahren hat, ist die Minced-Cartilage-Therapie. Es handelt sich um eine einzeitige Knorpelzelltransplantation, bei der intakter Gelenkknorpel in feine Fragmente zerkleinert und anschließend mithilfe eines Fibrinklebers oder verschiedener Matrices im Defektbereich fixiert wird. Die Verwendung von zerkleinerten Knorpelstückchen zur Behandlung chondraler Läsionen findet sich in der Literatur erstmals 1983 bei Albrecht et al. in einem Kaninchenmodell (Albrecht 1983). Seitdem wurde die Chondrozytenfreisetzung aus den Knorpelfragmenten weiter untersucht und versucht, die Knorpelintegration mit Matrixunterstützungen wie BioCartilage® und AutoCart® zu verbessern. Zudem konnte ein positiver Effekt auf die Defektheilung nachgewiesen werden, wenn den Knorpelfragmenten Eigenblutprodukte wie plättchenreiches Plasma beigemischt wurde (Barbarett et al. 2025). Angewendet wird das Minced-Cartilage-Verfahren ähnlich wie (M)ACT und AMIC bei kleinen bis mittelgroßen Knorpelläsionen (Schneider et al. 2024). Die Minced-Cartilage-Therapie liefert vielversprechende In-vitro-Ergebnisse und gute Ergebnisse in kleineren klinischen Studien (Cole et al. 2011; Massen et al. 2019). Dennoch bleibt die optimale Fixierung der Knorpelfragmente herausfordernd und zum jetzigen Zeitpunkt fehlen groß angelegte, klinische Studien über einen längeren Zeitraum mit ausreichender Standardisierung des Verfahrens (Ossendorff et al. 2023). Dazu haben alle bisher genannten Verfahren gemeinsam, dass sie lediglich bei isolierten Knorpelschäden ohne Beteiligung des subchondralen Knochens Anwendung finden und primär über die Defektauffüllung mittels eines Regeneratknorpels zur Verbesserung der Gelenkfunktion beitragen.

Additive Spongiosaplastik

Mit der Erkenntnis, dass der Intaktheit des subchondralen Knochens eine ebenso entscheidende Rolle bei der Versorgung von Knorpeldefekten zukommt, wurden auch die Therapieansätze weiterentwickelt. So werden die (M)ACT oder die Minced-Cartilage-Technik insbesondere bei größeren Defekten mit knöcherner Beteiligung immer häufiger um eine

Spongiosaplastik ergänzt (Christensen et al. 2015). Dafür muss zunächst der geschädigte Knochen entfernt und Spongiosa entnommen werden. Gewonnen wird die Spongiosa zu meist autolog aus dem Beckenkamm oder dem Tibiakopf, was zu postoperativen Schmerzen, Donorsite-Morbidität und potenziellen Komplikationen an der Entnahmestelle führen kann.

Osteochondrale autologe Transplantation (OAT)

Als weitere Möglichkeit zur Behandlung chondraler Läsionen mit knöcherner Beteiligung kommt die osteochondrale autologe Transplantation (OAT) infrage. Aufgrund des mosaikartigen Aussehens bei Einbringen mehrerer Transplantate wird sie auch als Mosaikplastik bezeichnet. Eine osteochondrale Transplantation taucht in der Literatur erstmals 1952 bei Wilson und Jacobs auf (Wilson und Jacobs 1952). Hangody/Kárpáti (1997) und Bobic (1997) modifizierten die Technik und etablierten die OAT in ihrer modernen Form (Bobic 1997; Hangody und Kárpáti 1997).

Bei der Mosaikplastik werden Knorpel-Knochen-Zylinder außerhalb der Hauptbelastungszone entnommen und nach Präparation des Defektbereichs „press-fit“ senkrecht zur Gelenkfläche implantiert (Salzmann et al. 2015). Größere Defekte können mit der sogenannten Mega-OAT versorgt werden. Als Spenderregion dienen dann die posterioren Femurkondylen (Muller et al. 2010). Die Zylinderlänge sollte hinsichtlich der Transplantatstabilität mehr als 15 mm betragen (Kock et al. 2006). Der Entnahmebereich bedarf keiner weiteren Behandlung. Nach dem Ausstanzen des Zylinders bildet sich durch die Einblutung und die resulterende Stammzellmigration neuer Knochen mit darüberliegendem Knorpelersatzgewebe. Die Anwendung wird mit der Mega-OAT bis zu einer Defektgröße von 9 cm² empfohlen (Brucker et al. 2008). Der limitierende Faktor ist vor allem die begrenzte Verfügbarkeit an Spenderregionen. Vorteile der Mosaikplastik sind das einzeitige Vorgehen, die rasche Belastbarkeit postoperativ und die vergleichsweise geringen Kosten. Nachteilig hingegen sind die Entnahmemorbidität, die Inkongruenz der Spender- und Empfängerregion sowie die Bildung minderwertigen Faserknorpels mit eventueller Stufenbildung an den Defekträndern.

Osteochondrale Allografts

Osteochondrale Knorpel-Knochen-Zylinder können auch als Allografts von menschlichen Spendern zum Einsatz kommen. Dies ist vor allem in den USA aufgrund der besseren Verfügbarkeit und der niedrigeren gesetzlichen Hürden populär. Jedoch besteht bei allogenen Verfahren ein zusätzliches Risiko an immunologischen Reaktionen und Infektionen (Aaboe et al. 1995; Kakaiya et al. 1991).

Endoprothetik

Die Endoprothetik bezeichnet den operativen Gelenkersatz mithilfe eines künstlichen Gelenks und kommt häufig als Mittel der letzten Wahl in der Versorgung osteochondraler Defekte zum Einsatz. Dennoch und auch weil aktuelle Therapiemöglichkeiten das Einbringen einer Endoprothese meist lediglich verzögern, ist die Endoprothetik noch immer ein zentraler Pfeiler im klinischen Alltag der Orthopädie und Unfallchirurgie. Es wird zwischen einem Total- und einem Teilersatz unterschieden. Bei einem Totalersatz werden alle Gelenkflächen durch künstliche Gelenkteile ersetzt, während beim Teilersatz gesunde Gelenkflächen belassen werden. Jährlich werden in Deutschland etwa 200.000 Hüfttotalendoprothesen, 170.000 Knieendoprothesen und rund 10.000 Schultertotalendoprothesen implantiert (Perka und Janz 2018). 2012 wurden nur in der Schweiz mehr Hüfttotalendoprothesen je 100.000 Einwohnern eingesetzt (Bleß und Kip 2017). Die Hüftendoprothetik wurde einst sogar als Operation des Jahrhunderts betitelt (Learmonth et al. 2007). Bereits 1890 konzipierte und implantierte Themistocles Gluck das erste künstliche Kniegelenk. Als Prothesenmaterial wählte Gluck Elfenbein und Nickelstahl, die Befestigung im Knochen erfolgte mit einem Gemisch aus Kolophonium und Gips (Wessinghage 1991). Seitdem entwickelten sich nahezu alle Aspekte der Endoprothetik stetig weiter. Mittlerweile weisen Prothesen bei 90 % der Patienten eine Standzeit von 20 Jahren auf (Perka und Janz 2018). Die Standzeit allein ist jedoch nicht ausschlaggebend für die Beurteilung des Behandlungserfolgs. Zunehmend gewinnen Qualitätsaspekte wie die Patientenzufriedenheit und Komplikationsvermeidung an Bedeutung. Nach wie vor geht die Implantation einer Endoprothese mit einigen potenziellen Komplikationen einher, die sich negativ auf das Therapieergebnis auswirken können. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die verwendeten Fremdmaterialien. Bei einem endoprothetischen Total- oder Teilersatz werden große Teile des Gelenks entfernt und durch künstlich hergestellte Materialien ersetzt (Claes 2012). Diese Materialien führen zwangsläufig zu einer

Exposition des humanen Gewebes gegenüber diversen Abrieb- und Korrosionsprodukten. Diese können unter anderem zu aseptischen Osteolysen, aseptischen Lockerungen oder periprothetischen Frakturen führen und langfristig Schmerzen sowie einen Funktionsverlust des neuen Gelenks bedingen (Schoon und Rakow 2023). Dazu kommen allgemeine Operationsrisiken aufgrund des erhöhten Interventionsumfangs. Das Hauptrisiko in diesem Kontext ist die periprothetische Infektion, welche ausgedehnte Revisionseingriffe und einen Ausbau der Prothese nach sich ziehen kann. Die Infektionsrate beträgt je nach Quelle 1–3 % für Primäreingriffe (Perka und Janz 2018). Außerdem birgt der Ersatz des natürlichen Gelenks spezifische Komplikationen, die bei gelenkerhaltenden Verfahren in dieser Form nicht zu beobachten sind. So kann es neben dem Materialverschleiß zu Lockerungen oder Luxationen der Prothesenkomponenten kommen (Healy et al. 2016). Schließlich ist die biomechanische Funktion eines künstlichen Gelenks der natürlichen Gelenksituation deutlich unterlegen und Patienten berichten häufig über ein verändertes propriozeptives Empfinden (Labanca et al. 2021; O’Connell et al. 2012).

Biotechnologische Regenerationsansätze

In der modernen Knorpeltherapie beruhen große Hoffnungen auf biotechnologischen Regenerationsansätzen. Dabei wird vor allem die Verwendung von MSC und Progenitorzellen in diversen Studien untersucht. Diese sollen zum einen beschädigtes Knorpelgewebe regenerieren und zum anderen eine fortschreitende Degeneration verzögern. MSC werden in der Regel aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe gewonnen. In diesem Kontext zeichnet sich auch die zunehmende Bedeutung gentherapeutischer Verfahren ab. So ist beispielsweise die Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen durch das virale Einschleusen spezifischer Gene Gegenstand aktueller Forschung (Baker 2009; Hochedlinger und Plath 2009). Nachdem die Stammzellen isoliert und in Zellkulturen expandiert wurden, können sie entweder direkt injiziert oder in eine Trägermatrix eingebettet transplantiert werden. Perkutane Injektionstherapien könnten dabei langfristig zur Reduktion der Operationsindikationen führen. Erste größere Studien konnten bereits gute Ergebnisse hinsichtlich der klinischen Symptomatik, der Überlebensdauer und der Knorpelmorphologie zeigen (Xu et al. 2015). In der Orthopädie ist die klinische Anwendung von Stammzellen bisher allerdings nicht zugelassen und daher momentan keine therapeutische Alternative.

Ein weiterer zentraler Bestandteil der aktuellen biotechnologischen Forschung ist das Tissue Engineering, das sich mit einer Vielzahl an Ersatzmaterialien für die Therapie von osteochondralen Defekten beschäftigt. Dazu zählen einige bereits beschriebene Verfahren wie die matrixassoziierten oder stammzellbasierten Therapien, aber auch die Implementierung synthetischer Materialien wie (Co-)Polymere.

Polymere besitzen in der Biomedizin einen hohen Stellenwert und werden längst als Schrauben, Stents oder Nahtmaterialien genutzt (Dresing und Slongo 2023; Orvin et al. 2016; Petersen und Zantop 2009). Es kann zwischen natürlichen und synthetischen Polymeren unterschieden werden. Zu den natürlichen Polymeren gehören etwa Kollagen und Hyaluron, während Poly-((D,L)-Laktid-co- ϵ -Caprolacton)-Methacrylat (LCM) oder Poly-(Alanin-co- ϵ -Caprolacton)-Methacrylat (ACM) zu den synthetischen Polymeren zählen. Das LCM kann dabei in verschiedenen Mischverhältnissen zum Einsatz kommen (16:4, 8:2 und 9:1). Kamplaitner et al. (2020) konnten die beste zelluläre Verträglichkeit und eine sehr gute Biokompatibilität im murinen Kalvarien-Defektmodell für das LCM mit einem Mischverhältnis von 16:4 (LCM3) bestätigen (Kamplaitner et al. 2020). Ebenso konnten Spreda et al. (2021) nachweisen, dass das LCM keinen zytotoxischen Einfluss auf die MSC hat (Spreda et al. 2021). Allerdings entsteht beim Abbau des LCM als Nebenprodukt Milchsäure, welche die Knochenstruktur beeinflussen könnte, da Hydroxylapatit (HA) als Hauptbestandteil der anorganischen Knochenmatrix im sauren Milieu degradiert. Daher wurde die chemische Zusammensetzung des LCM optimiert und das enthaltene Polylactid gegen Polyamid ausgetauscht. So entstand das ACM. Dies wird über Aminosäuren abgebaut und soll in der Folge eine Ansäuerung des Gewebes durch Abbauprodukte verhindern (Hauptmann et al. 2019; Hauptmann et al. 2022; Wunderer et al. 2025). Es wurde bisher jedoch noch nicht in vivo getestet. Perspektivisch könnten synthetische Polymere auch als Implantate zur Behandlung von osteochondralen Defekten in der Orthopädie und Unfallchirurgie zum Einsatz kommen. Die Entwicklung optimal angepasster Implantate ist Gegenstand aktueller Forschung. Bisherige Ergebnisse konnten zeigen, dass Implantate mit interkonnektierenden Poren besonders gut geeignet sind (Seo et al. 2014). Gleichzeitig gibt es für ihre Herstellung in der Literatur zahlreiche Publikationen zu unterschiedlichsten Materialien. Vago et al. (2002) nutzten beispielsweise gezielt die natürliche Porosität von Korallen für ihre Untersuchungen (Vago et al. 2002). Zudem werden vorzugsweise bi- oder polyphasische Implantate eingesetzt. Die Phasen sind an die unterschiedlichen Differenzierungswege von Osteoblasten und

Chondroblasten sowie die unterschiedlichen biomechanischen Anforderungen im Knochen- und Knorpelgewebe angepasst. Daher unterscheiden sie sich häufig in der Porengröße und dem verwendeten Material. Exemplarisch fanden in früheren Studien Titan und Polyurethan oder β -Tricalcium-Phosphat und D,L-poly-Lactid-Co-Glycolid Anwendung (Jiang et al. 2007; Olive et al. 2020). Zwar konnten einige In-vitro-Studien gute Ergebnisse für die Verwendung biphasischer Implantate erzielen, jedoch konnte bisher kein verfügbares Implantat bei einem größeren Patientenkollektiv eine langfristige Schmerzfreiheit bei vollem Bewegungsumfang bewirken (Liu et al. 2018; Sartori et al. 2017). Die rein strukturelle Unterstützung des Defekts scheint also nicht auszureichen, um eine vollständige biologische Regeneration zu induzieren.

Ein synthetisches Implantat bietet zwar die notwendige mechanische Stabilität und eine architektonische Vorlage für einwachsendes Gewebe, es ist in der Regel allerdings biologisch inaktiv. Um die körpereigenen Regenerationsprozesse aktiv zu stimulieren, verfolgt die moderne Gewebeforschung daher zunehmend den Ansatz, solche biologisch inaktiven Gerüste mit einer bioaktiven Komponente zu kombinieren. Ziel ist es, ein Mikroumfeld zu schaffen, das die EZM imitiert und so die Differenzierung von einwandernden Stammzellen fördert.

Besonders geeignet erscheinen dafür Hydrogele auf der Basis natürlicher Biopolymere wie dem Kollagen. Diese füllen einerseits die Poren und stabilisieren das initiale Blutkoagulum, andererseits bieten sie den Zellen durch spezifische Bindungssequenzen aktive Anhaftungspunkte und können gleichzeitig als Reservoir für endogene Wachstumsfaktoren dienen. Basierend auf diesem Prinzip der In-situ-Regeneration wird daher in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Kombination der Polymerimplantate mit einem kollagenhaltigen Biogel die osteochondrale Heilung entscheidend verbessern kann.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Zellkulturstudien haben gezeigt, dass Polymere eine hohe zelluläre Verträglichkeit besitzen. In Form von biphasischen Implantaten mit interkonnektierenden Poren sowie der Füllung des Lumens mit einem Kollagenfiller könnten sie die knöcherne Konsolidierung und die Bildung von hyalinem Knorpelgewebe fördern. Besonders vielversprechend erscheint die Verwendung von Implantaten aus dem Polymer ACM, da ACM über Aminosäuren und nicht wie das LCM über Milchsäure degradiert wird. Zudem ermöglichen moderne Herstellungsprozesse die Produktion monolithischer Polymerimplantate mittels eines laserbasierten 3D-Druckverfahrens, wodurch ein fließender Übergang der Knochen- und Knorpelphase geschaffen wird. Vor diesem Hintergrund erscheint der Einsatz dieser neuartigen Implantate erfolgversprechend für die künftige Behandlung osteochondraler Defekte. Im vorliegenden Großtierimplantationsmodell am Schaf werden folgende Fragestellungen erörtert:

- 1) Weisen poröse, biphasische Implantate aus dem Polymer ACM makroskopisch eine bessere knöcherne Integration und Knorpelregeneration auf als Implantate der gleichen Geometrie aus dem Polymer LCM?
- 2) Inwiefern unterscheiden sich poröse, biphasische Implantate aus dem Polymer ACM hinsichtlich der molekularbiologischen Expression knochen- und knorpelspezifischer Marker gegenüber Implantaten der gleichen Geometrie aus dem Polymer LCM?
- 3) Führt die Kollagenfüllung des 3D-Implantatlumens makroskopisch zu einer verbesserten Knorpelregeneration und knöchernen Konsolidierung im Vergleich zu Implantaten mit freiem Lumen?
- 4) Besitzt die Kollagenfüllung des Implantatlumens einen stimulierenden Effekt auf die Expression relevanter molekularbiologischer Marker für die Knorpelbildung und Knochenheilung im Vergleich zu Implantaten mit freiem Lumen?

Das Ziel der Arbeit ist es, die osteo- und chondroinduktiven Eigenschaften sowie das Potenzial zur Behandlung osteochondraler Defekte der neu entwickelten biphasischen Implantate und der Kollagenfüllung *in vivo* zu evaluieren. Die Ergebnisse sollen die Weiterentwicklung bestehender Behandlungsmethoden und die Translation in den klinischen Bereich unterstützen.

2 Material und Methoden

Das Großtierimplantationsmodell am Schaf wurde vor dessen Beginn vom Regierungspräsidium Gießen gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes mit dem Geschäftszeichen V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/28 Nr. G 2/2022 genehmigt. Das Projekt erhielt eine Förderung vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Förderkennzeichen: 13XP5089F).

2.1 Versuchstiere

Die tierexperimentelle Studie inkludierte 15 weibliche Rhönschafe mit einem Durchschnittsgewicht von $66,28 \pm 1,72$ kg (Abb. 2). Das Alter der Tiere lag zwischen drei und sieben Jahren. In diesem Alter gelten die Tiere als knochenadult, wodurch Wachstumseffekte ausgeschlossen werden können. Gleichzeitig sind noch keine typischen Alterungserscheinungen des Knochen- und Knorpelgewebes zu erwarten. Die Tiere wurden artgerecht auf dem Gelände der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde gehalten. Die tiermedizinische Überwachung und Betreuung erfolgte durch einen Fachtierarzt für kleine Wiederkäuer sowie das Pflegepersonal der Tierklinik. Alle beteiligten Personen waren umfassend im Umgang mit Schafen sowie in der Gewinnung und Aufarbeitung von Knochen- und Knorpelproben geschult. Teilweise brachten die Beteiligten auch Vorerfahrungen aus früheren Schafmodellen der Experimentellen Unfallchirurgie mit.



Abb. 2: Haltungsform der Schafe

Dargestellt ist eine Versuchsgruppe in der Weidehaltung im fortgeschrittenen Verlauf des dreimonatigen Untersuchungszeitraums. Die Tiere trugen Pedometer zur Erfassung der Bewegungsaktivität.

Die Schafe wurden gruppenweise in je einer 2er- und einer 3er-Box untergebracht, um dem Herdentrieb gerecht zu werden und kein Tier zu separieren. Die Boxen boten jedem Tier mindestens 1,8 m² Platz und waren mit Einstreu ausgelegt. Zur Förderung des Sozialverhaltens und der Gruppendynamik hatten die Schafe Sichtkontakt zueinander. Außerdem hatten die Tiere regelmäßig kontrollierten Auslauf in einem abgetrennten Freilaufbereich. Jeweils etwa ein bis zwei Monate nach der Operation folgte der Wechsel auf die Weide. Die Fütterung erfolgte mehrmals täglich mit einer bedarfsgerechten Menge an Mineral- und Kraftfutter. Darüber hinaus standen den Schafen jederzeit Wasser, Heu und Mineralien durch Lecksteine ad libitum zur Verfügung.

Vor Beginn des Versuchsvorhabens fand eine umfangreiche Eingangsdiagnostik statt. Die Eingangsdiagnostik beinhaltete eine klinische Untersuchung inklusive einer ultrasonografischen Untersuchung und eine Laborkontrolle des Blutes, um eine mögliche Trächtigkeit auszuschließen. Darüber hinaus wurden die Vitalparameter und das Körpergewicht der Tiere erhoben. Gegebenenfalls schloss sich eine Klauenpflege bei auffälligem Klauenstatus an. Nur rundum gesunde Tiere ohne klinische Auffälligkeiten wurden in das Projekt eingebunden. Das Projekt startete zunächst mit einer Eingewöhnungsphase, da Schafe Fluchttiere sind und den Umgang mit Menschen als Stress empfinden (Abb. 3). Um ihr Stresslevel zu senken, wurden die Tiere in der Eingewöhnungsphase durch ein

spielerisches Training an das Einfangen und Anfassen durch die betreuenden Personen gewöhnt. In diesem Kontext erfolgte auch eine schrittweise Gewöhnung an das Pedometer, sodass die Messungen der Bewegungsaktivität im Verlauf zur Routine wurden und die Schafe nicht beunruhigte. Das Pedometer wurde mit Watte, Klettbindern und einer elastischen Bandage am Bein fixiert. Zum Ablesen wurde lediglich die Bandage ab- und wieder aufgewickelt. Bei Bedarf erfolgte ein Wechsel von Watte und Bandage. Das Bewegungstraining bestand aus einer spielerischen Bewegungsmotivation mit Heu- und Futterbällen. Das gesamte Eingewöhnungstraining wurde nach Möglichkeit im gemeinsamen Auslauf durchgeführt. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil war das Erkennen individueller Schmerz- oder Stresszeichen und eine Veränderung der Schafe im Vergleich zum Ausgangszustand. Dazu wurde eine detaillierte Dokumentation der normalen Erscheinung jedes Tieres erstellt. Diese umfasste die tierspezifischen Charakteristika wie die Augenform, das Wangenprofil, das Profil von Unterlippe und Unterkiefer, die Ohrenstellung oder auch die Form der Nasenöffnung. Zudem wurden regelmäßig die Atemfrequenz, der Puls und die Temperatur gemessen, sodass individuelle Referenzwerte der jeweiligen Parameter erstellt werden konnten. Mithilfe der Referenzwerte gelang eine zuverlässige Einschätzung, ob festgestellte Veränderungen der Parameter als pathologisch oder physiologisch zu werten sind. Beispielsweise hätte eine erhöhte Atemfrequenz entweder auf Schmerzen und Stress hinweisen oder durch die natürliche Thermoregulation bedingt sein können.

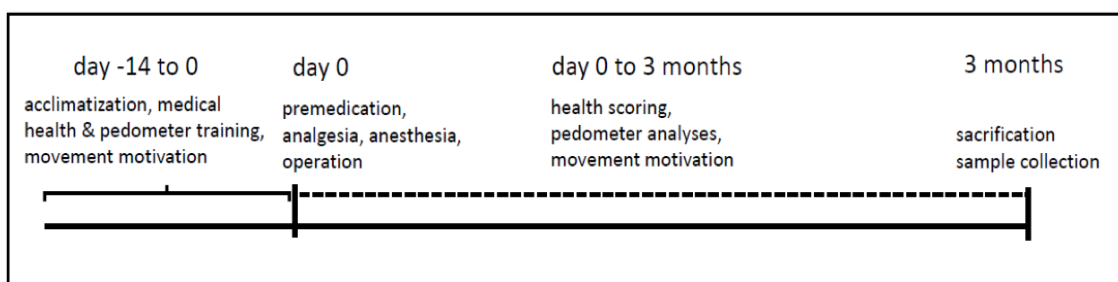


Abb. 3: Zeitlicher Ablauf des Projekts

Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs von der Akklimatisierungsphase (Tag -14 bis 0) über den Operationszeitpunkt (Tag 0) bis zum Studienende nach drei Monaten.

Pro Schaf wurden zwei Implantate in das linke Femur eingesetzt. Ein Implantat wurde distal in dem belasteten Bereich der medialen Femurkondyle platziert, das andere proximal davon, außerhalb der Hauptbelastungszone. Die Schafe wurden im Rahmen des Projekts in drei Gruppen aufgeteilt, jeweils bestehend aus fünf Tieren.

Gruppe 1) Die Tiere erhielten Implantate aus dem Polymer LCM3 ohne Kollagenfüllung des Implantatlumens (L-OB).

Gruppe 2) Jedes Schaf erhielt zwei Implantate aus dem Polymer LCM3 mit Kollagenfüllung der interkonnektierenden Poren (L-B).

Gruppe 3) In dieser Gruppe wurden Implantate aus dem Polymer ACM mit einem kollagenhaltigen Biogel verwendet (A-B).

Die Operationen der einzelnen Gruppen erfolgten zeitversetzt. Zwischen den Operationsdaten der ersten und der zweiten Gruppe lagen ca. zwei Monate, zwischen der zweiten und der dritten Gruppe lagen aus organisatorischen Gründen ca. sechs Monate. Eingestellt wurden die Schafe der dritten Gruppe aufgrund der jahreszeitbedingten Verschlämmung der Weide bereits drei Monate vor deren Operationstermin, wodurch sie eine längere Eingewöhnungsphase hatten. Auf eine Kontrollgruppe mit Leerdefekten wurde bewusst verzichtet, da es sich um Defekte „kritischer Größe“ handelte, also „critical size defects“, welche ohnehin nicht selbstständig regenerieren. Das Studiendesign basierte stattdessen auf einem paarweisen Vergleich, bei dem die Versuchsgruppen mit spezifischen Kontrollgruppen verglichen wurden (Tab. 3). Auf diese Weise konnte der Behandlungseffekt jeweils hinsichtlich der Implantatlokalisierung, des Implantatmaterials und der Biogelfüllung getrennt analysiert werden. In der späteren Auswertung wurden entweder die Gesamtergebnisse der Gruppen verglichen oder zusätzlich nach distalem, belastetem Bereich und proximalem, weniger stark belasteten Bereich differenziert.

Tab. 3: Darstellung der Versuchs- und zugehörigen Kontrollgruppen

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
L-B	L-OB
L-B, distaler Defekt	L-B, proximaler Defekt
L-OB, distaler Defekt	L-OB, proximaler Defekt
A-B	L-B
A-B, distaler Defekt	A-B, proximaler Defekt

2.2 Implantate und Biogel

Im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojekts Poly-Implant-Druck wurde die Herstellung biphasischer Implantate aus den synthetischen Polymeren LCM3 und ACM etabliert. Ein entscheidender Vorteil synthetischer Polymere im Vergleich zu anderen Materialien ist, dass sie sich mittels eines laserassoziierten 3D-Druckverfahrens fertigen lassen. Bei diesem Verfahren wird ein Laser über ein Scannersystem und ein nachgeschaltetes F-Theta Objektiv in ein Bad aus dem flüssigen, lichtempfindlichen Polymer Resin fokussiert. Über das F-Theta Objektiv wird sichergestellt, dass der Laserfokus unabhängig vom Ablenkwinkel des Scanners konstant gehalten wird. Dadurch kann an jedem Punkt exakt die gleiche Energiemenge eingebracht werden. Diese präzise Energiekontrolle ermöglicht die lokale Aushärtung des Materials in einem dreidimensionalen Punkt (Voxel). Das umgebende Resin bleibt dabei flüssig. Durch das computergesteuerte Bewegen des Fokuspunktes wird die komplexe 3D-Struktur des Implantats schichtweise aufgebaut (Abb. 4). Dieser Herstellungsprozess ist fundamental für die filigrane Porenarchitektur und den monolithischen Aufbau. In früheren Konstrukten mussten die einzelnen Phasen noch getrennt mit einer undurchlässigen Verbindungsschicht hergestellt werden. Inzwischen ist es durch den 3D-Druck möglich, biphasische Implantate präzise im Nano- bis Zentimeterbereich monolithisch zu produzieren.

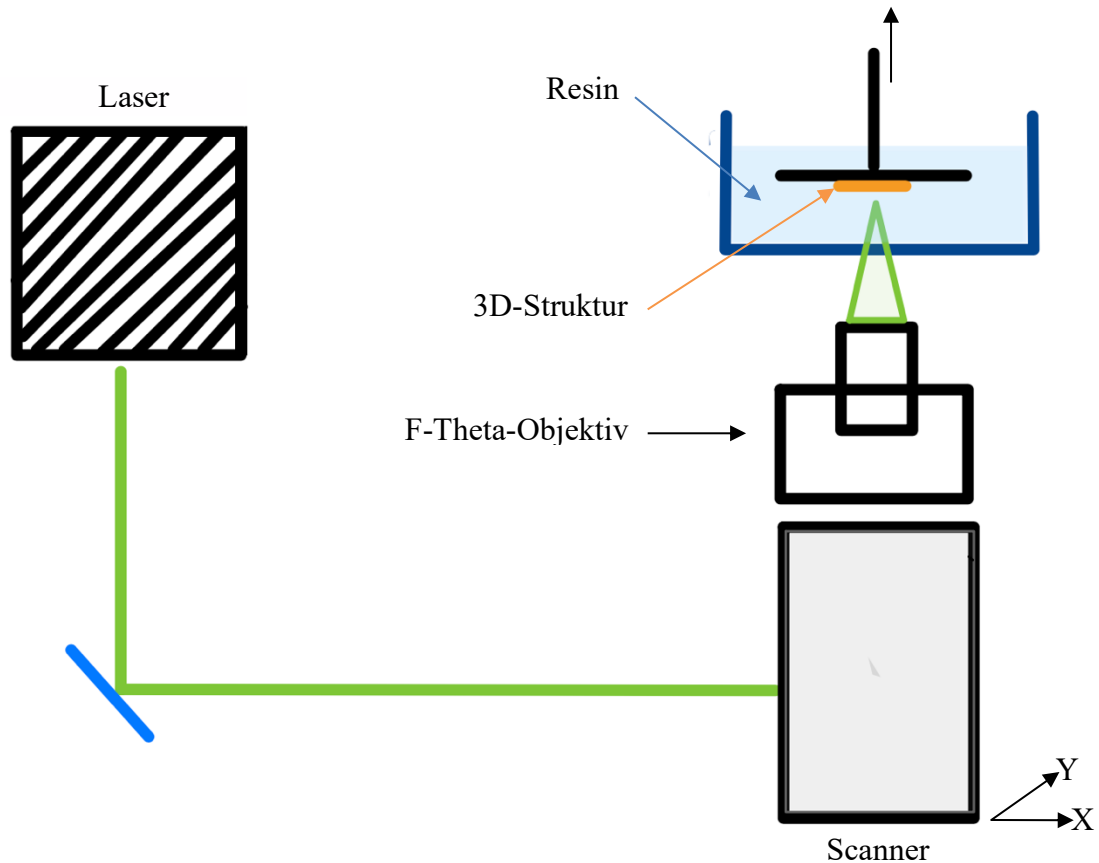


Abb. 4: Schematischer Aufbau der industriellen Zwei-Photonen-Polymerisationsanlage

Dargestellt ist das Funktionsprinzip der Zwei-Photonen-Polymerisation. Ein Laserstrahl wird über einen Scanner und ein F-Theta Objektiv präzise in den Badaufbau mit flüssigem Resin gelenkt. Durch die schichtweise, lokale Polymerisation des Materials wird die 3D-Struktur gefertigt. Dieser Aufbau ermöglicht die schnelle und präzise Herstellung der Scaffolds.

Die im Projekt verwendeten Implantate wiesen einen Durchmesser von 7 mm und eine Höhe von 10 mm auf. Multiphoton Optics GmbH (Würzburg, Deutschland), ein weiterer Projektpartner, hat die maschinelle Produktion der Polymerimplantate realisiert und damit die Herstellungszeit eines Exemplars von über 15 Stunden auf 1,5 Stunden reduziert. Perspektivisch wäre somit die automatisierte Herstellung der Implantate in größerer Stückzahl problemlos möglich.

Die gefertigten Implantate sind an die strukturellen Gegebenheiten der osteochondralen Zone optimal angepasst. Dabei wurde die Degradationsgeschwindigkeit so gewählt, dass

sich vor dem Abbau eine stabile Knochenphase als Grundlage für eine stufenlose Gelenkfläche bilden sollte. Die Implantatgeometrie zeichnet sich durch einen biomimetischen Übergang der Knorpel- und Knochenphase aus. Als Mimikry des osteochondralen Aufbaus besitzen die Implantate eine ideale Konfiguration für das Einwachsen von Knorpel- und Knochengewebe (Abb. 5). Wichtiger Bestandteil der Phasengeometrie sind die interkonnektierenden Poren mit einer gewebsspezifischen Porengröße. Die randständigen Poren der Knochenphase weisen eine Größe von 410–1036 μm auf, während die Poren im mittleren Bereich 522–1125 μm groß sind. Die gesamte Knochenphase besteht aus einer Schwarz-P-Struktur. Dabei sind die äußeren Wände dieser Schwarz-P-Struktur verdickt, was in einem Elastizitätsmodul (E-Modul) von 0,914 Megapascal (MPa) resultiert. Die Erhöhung des E-Moduls im Randbereich durch die Wandverdickung dient der biomechanischen Stabilität und dem Ausgleich mechanischer Belastungen. Der zentrale Bereich des Implantats ist der spongiösen Knochenstruktur entsprechend etwas dünner. Dort liegt ein E-Modul von 0,325 MPa vor. Die Knorpelphase hingegen setzt sich aus zwei unterschiedlichen Strukturen zusammen. Für das Pendant der Tangentialzone wurde eine Schwarz-P-Struktur mit einem E-Modul in x- und y-Richtung von 1,044 MPa und in z-Richtung von 0,928 MPa ausgewählt. In dieser obersten Zone beträgt die Porengröße 400–820 μm . Die restliche Knorpelphase wird von einer Diamantstruktur gebildet. Das E-Modul der Diamantstruktur erreicht einen Wert von 0,427 MPa bei einer Porengröße von 800 μm . Insgesamt bietet dieser Aufbau eine sehr gute Basis für die Zellintegration und -proliferation, den Nährstoffaustausch sowie den Abtransport von Abbauprodukten. Die interkonnektierenden Poren der Knochenphase sollen zusätzlich die Angiogenese fördern.

Neben der Struktur sind jedoch auch die bioaktiven Eigenschaften der Implantate entscheidend für den therapeutischen Erfolg. Deshalb wurde ein kollagenhaltiges Biogel (Kollagenfiller) vom BMBF-Verbundpartner Meidrix Biomedicals GmbH (Esslingen, Deutschland) entwickelt und zur Füllung des Implantatlumens eingesetzt. Das Kollagen wurde aus Rattenschwänzen isoliert und soll als biologische Matrix die Zellbesiedlung des Implantats erleichtern. In vitro wurde das Biogel sowohl in der Experimentellen Unfallchirurgie als auch bei den Verbundpartnern Meidrix und dem Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (IBA, Heiligenstadt, Deutschland) getestet. Die Vorgängerversion des verwendeten Kollagenfillers befindet sich bereits in der klinischen Anwendung.

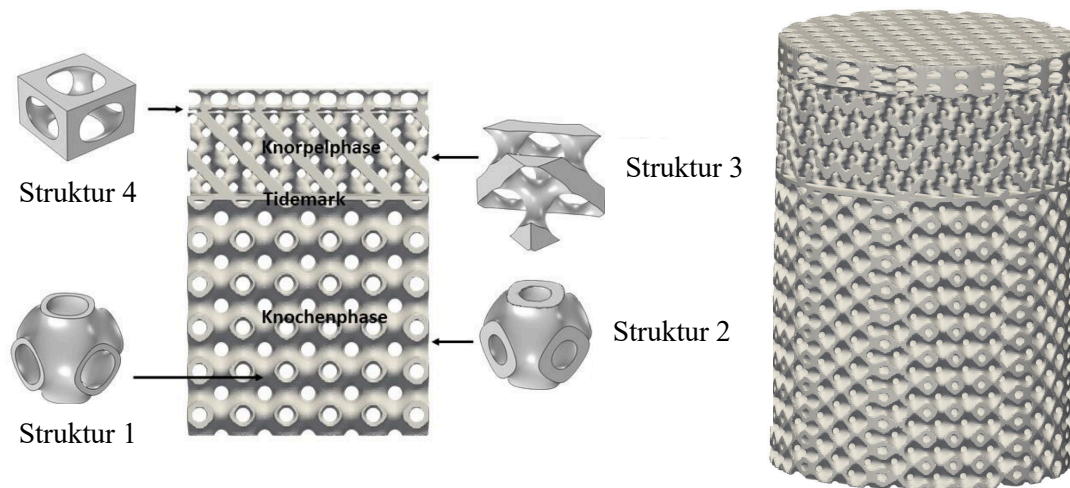


Abb. 5: Struktureller Aufbau der verwendeten Polymerimplantate

Die Abbildung illustriert das Design des biphasischen Gerüsts, das die natürliche Knochen-Knorpel-Einheit nachahmt. Links ist der schichtweise Aufbau dargestellt: Das Scaffold ist in eine obere Knorpelphase und eine untere Knochenphase unterteilt, die durch eine simulierte Tidemark getrennt sind. Jede Phase besteht aus spezifischen Porenarchitekturen mit definierten Porositäten, Porengrößen sowie mechanischen Eigenschaften (IBA, Hauptmann et al. 2019).

Tab. 4: Übersicht der Porenstrukturen

Struktur	Typ	Porosität	Porengröße	E-Modul
1	Schwarz-P dünn	0,871	522–1125 μm	0,325 MPa
2	Schwarz-P dick	0,713	410–1036 μm	0,914 MPa
3	Diamant skelettal	0,760	800 μm	0,427 MPa
4	Schwarz-P skelettal	0,738	400-820 μm	X,Y – 1,044 MPa Z – 0,928 MPa

2.3 Operation und postoperatives Scoring

Präoperative Vorbereitung

Präoperativ erhielten die Schafe 5–7 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht (mg/kg KG) Ketamin und 0,3 mg/kg KG Xylazin intramuskulär. Für die Applikation wurde die Wolle an der Injektionsstelle gescheitelt und die Haut desinfiziert. Es wurden maximal 5 ml pro Injektionsstelle injiziert. Sicherheitshalber wurde vor jeder Injektion aspiriert, um versehentliche Gefäßinjektionen auszuschließen. Des Weiteren wurde ein

venöser Zugang gelegt. Dazu wurde die linke Vena jugularis nach gründlicher Desinfektion und Entfernung der Wolle im Halsbereich mittels eines Venenverweilkatheters punktiert. Der Zugang wurde täglich kontrolliert und mit steriler Kochsalzlösung gespült. Der Venenverweilkatheter war insbesondere für die änesthesiologische und perioperative Medikamentenverabreichung von Nutzen. So bekamen die Schafe vor Beginn der Operation zur Infektionsprophylaxe intravenös (i.v.) ein Antibiotikum verabreicht. Sie erhielten 15 mg/kg KG Amoxicillin. Ferner konnte der Venenverweilkatheter auch für die Gabe der Bedarfsmedikamente wie Adrenalin, Atropin, Dopamin, Doxapram, Dexamethason oder Prednisolon genutzt werden.

Perioperative Anästhesie

Nach adäquater Prämedikation schloss sich die Einleitung der Narkose an und das jeweilige Schaf wurde in den Operationsaal gebracht. Die Narkoseeinleitung erfolgte mittels einer Bolusinjektion von 4 mg/kg KG Propofol über den venösen Zugang, um den Schluckreflex zu unterdrücken und die Intubation zu vereinfachen. Für die präoperative Schmerzausschaltung wurden 0,5 mg/kg KG Fentanyl und 3 mg/kg KG Ketamintropfen i.v. zur Schmerzausschaltung appliziert. Im Anschluss wurde die Intubation der veterinärmedizinischen Standards entsprechend in Brust-Bauchlage durchgeführt. Zunächst wurde der Kehlkopf mit einem Laryngoskop samt langem Spatel (Foregger) dargestellt. Nach regelrechter Darstellung wurde der Tubus unter Sichtkontrolle in der Trachea platziert, verblockt und fixiert. Um ein Aufgasen und einen möglichen Reflux von Pansensaft zu vermeiden, wurde eine Schlundsonde in den Pansen eingeführt.

Die Narkose wurde durchgehend inhalativ mit 1,5–2 % Isofluran aufrechterhalten. Die Anflutung erfolgte mit 2–3 %. Intraoperativ erfolgte eine maschinelle Beatmung mit kontinuierlichem Monitoring der Atemfrequenz, des Tidalvolumens, des Beatmungsdrucks, des CO₂-Partialdrucks und der Sauerstoffsättigung. Nach dem Etablieren der Erhaltungsnarkose wurde die Schmerztherapie intraoperativ durch eine kontinuierliche Infusion von 0,15–0,4 µg/kg/min Fentanyl und 25 mg/kg KG Metamizol ergänzt.

Operationsablauf

Für die Operation wurden die Tiere in Rechtsseitenlage positioniert. Das linke Kniegelenk wurde vor Operationsstart großzügig geschoren, mehrfach mit Jodlösung gereinigt und der gesamte Operationsbereich wurde steril abgedeckt. Darüber hinaus wurde vor Beginn der operativen Maßnahmen die Narkosetiefe überprüft. Dies geschah anhand des Zwischenklauenreflexes, des Cornealreflexes und der Bulbusstellung. Bei chirurgischer Toleranz sollte der Zwischenklauenreflex nicht mehr auslösbar sein, wohingegen der Corneal- und Lidreflex erhalten bzw. nur minimal auslösbar sein sollten. Die Bulbusstellung ist bei ausreichender Narkosetiefe ventral zentriert. Nachdem die chirurgische Toleranz gesichert wurde, wurde ein medialer, parapatellarer Hautschnitt mit einer Größe von 5–10 cm gesetzt. Danach folgte die Durchtrennung des medialen Retinaculums und die Patella wurde bei extendiertem Bein nach lateral geklappt. Zur Darstellung der medialen Femurkondyle wurden Hohlmann-Hebel eingesetzt.

Die defekt- und implantatassoziierten Operationsschritte erfolgten mithilfe des neu entwickelten Operationsinstrumentariums des Verbundpartners Mathys Orthopädie GmbH (Abb. 6). Dabei wurde jeweils zuerst der Defekt im Bereich des medialen Kondylus geschaffen. Dies geschah unter ständiger Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung, um Hitzenekrosen des angrenzenden Gewebes zu vermeiden. Die Defekte sollten entsprechend der Implantatgröße einen Durchmesser von 7 mm und eine Tiefe von 10 mm aufweisen. Die Implantate wurden nach der Defektpräparation im Press-fit-Verfahren eingebracht. Anschließend wurde ein weiterer Defekt gleicher Größe außerhalb der Hauptbelastungszone, proximal des ersten Defekts erstellt und ebenfalls mit einem der neu gefertigten biphasischen Polymerimplantate versorgt. Unebenheiten wurden bei Bedarf mit einem kollagenhaltigen Biogel ausgeglichen. Die Gelenkkapsel wurde mit resorbierbaren Vicrylfäden der Größe 0 verschlossen. Für die Hautnaht wurden monofile, resorbierbare Fäden der Größe 3-0 bis 4-0 verwendet. Abschließend wurde die Wunde mit einem Aluminium-Zink-Spray bedeckt, um zu verhindern, dass die Schafe an der Wunde manipulieren.

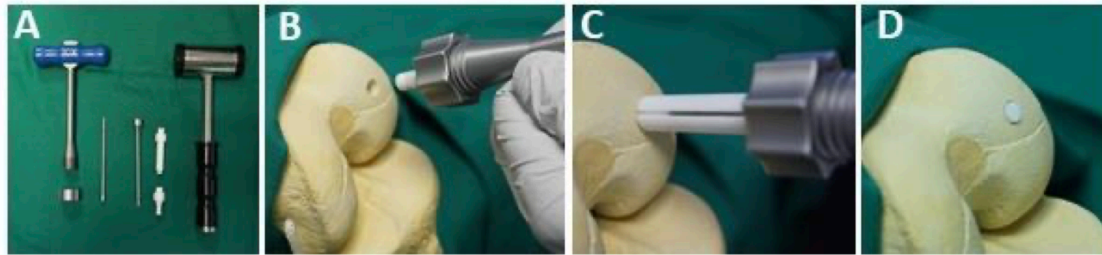


Abb. 6: Schematische Darstellung der Implantationsschritte mit dem neu entwickelten Instrumentarium der Firma Mathys Orthopädie GmbH

Dargestellt sind die einzelnen operativen Schritte: **A)** Das für die Implantation verwendete Instrumentarium. **B)** Das Setzen des osteochondralen Defekts. **C)** Das Einbringen des Polymerimplantats. **D)** Das finale Ergebnis mit dem bündig abschließenden Implantat.

Zur Lagekontrolle der Implantate wurden postoperativ noch in Narkose Röntgenaufnahmen des operierten Femurs angefertigt (Abb. 7).



Abb. 7: Intraoperative Röntgenaufnahme zur Kontrolle der korrekten Implantatpositionierung

Die laterale Röntgenaufnahme des Kniegelenks zeigt die korrekte Position des zylindrischen Implantats im medialen Femurkondylus. Die weißen Pfeile markieren die Position des röntgendichten Implantats, das bündig mit der subchondralen Knochenlamelle abschließt.

Narkoseausleitung

Nach dem Ende aller operativen Maßnahmen und dem Anfertigen der Röntgenaufnahmen wurde die Narkose unter Berücksichtigung der atemdepressiven Wirkung von Fentanyl beendet. Die Beatmung der Schafe erfolgte so lange, bis die eigenständige Atmung zurückkehrte. Anschließend wurden die Schlundsonde und der Tubus entfernt. Die Schafe kehrten danach in ihre Boxen zurück und konnten die Extremitäten unmittelbar vollbelasten.

Pedometer und postoperative Schmerztherapie

Nach der Operation wurde das Pedometer mit einer Watte zur Polsterung und einer elastischen Binde am linken Os metatarsale angebracht. Bei Verschmutzung oder Druckstellen wurde das Befestigungsmaterial erneuert. Gegebenenfalls wurde die kontralaterale Extremität für das Anbringen des Pedometers genutzt. Das Pedometer hätte bis zu 30.000 Schritte täglich dokumentieren können und wurde täglich im Rahmen des postoperativen Scorings abgelesen.

Die postoperative Schmerztherapie beinhaltete die Gabe von 0,01 mg/kg KG Buprenorphin alle 4–6 Stunden für 7 Tage und 3 mg/kg KG Ketaminprofen i.v. alle 24 Stunden für 3 Tage. Zur antibiotischen Abschirmung wurde Amoxicillin alle zwei Tage über insgesamt 7 Tage i.v. appliziert.

Postoperative Versorgung und Scoring

Im Rahmen der postoperativen Nachsorge wurden die Temperatur, das Gewicht und die Operationswunde täglich kontrolliert. Zudem fand täglich, je nach Zustand der Tiere und insbesondere in den ersten drei postoperativen Wochen auch mehrmals täglich, ein ausführliches Scoring statt. Das Scoring umfasste neben der Messung der Vitalparameter und des Gewichts eine Einschätzung des Spontanverhaltens sowie des Allgemeinzustands mit Fokus auf spezifische Schmerzzeichen. Zur Beurteilung dieser Zeichen wurde unter anderem die Sheep Grimace Scale herangezogen (Häger et al. 2017). Außerdem erfolgte eine klinische Evaluation der operierten Extremität und der Wundheilung. Alle Parameter wurden in Punktwerten zusammengefasst. Daraus ergab sich ein Gesamtscore zwischen 0 und 80 Punkten. Dieser Score diente der Einschätzung des Belastungszustands des jeweiligen Schafes. Bei 0–5 Punkten lag definitionsgemäß keine Belastung des Schafes vor

und es ergab sich kein Handlungsbedarf. Bei 5–9 Punkten lag eine geringe Belastung vor, woraufhin zweimal täglich eine Kontrolle mit Fokus auf Pansenaktivität, Futteraufnahme, optionaler Leckerligabe bei guter Pansenaktivität und gegebenenfalls eine Wunddesinfektion notwendig war. Lag der Score zwischen 10–19 Punkten, wurde die Belastung des jeweiligen Schafes als mittelgradig eingestuft. Daraufhin mussten die Tiere dreimal täglich untersucht werden. Dies inkludierte eine Analgetikumüberwachung, Wunddesinfektion, Antibiose, Versorgung bei vermehrtem Liegen, optionale Leckerligabe und Glucoseinfusion bei intakter Verdauung. Wäre der Score nach maximal 65 Stunden unverändert gewesen, hätte in Rücksprache mit dem Projektleiter, dem Tierarzt und den Tierenschutzbeauftragten die Euthanasie eingeleitet werden müssen. Bei einer hohen Belastung, also einem Score von mehr als 20 Punkten, hätte zwangsläufig und unmittelbar die Euthanasie erfolgen müssen. Neben dem regelmäßigen Scoring fand mindestens einmal wöchentlich eine dokumentierte, tierärztliche Untersuchung statt.

2.4 Probenentnahme und -präparation

Die Probenentnahme und -präparation erfolgte nach einer dreimonatigen Standzeit. Die Schafe wurden im operativen Setting unter kontrollierten Bedingungen schmerzfrei eingeschläfert. Zunächst erhielten sie eine allgemeine Anästhesie, bevor sie eine intravenöse Sturzinfusion von 400–800 mg/kg KG Pentobarbital erhielten. Die Wirksamkeit der Infusion wurde vor der Probenentnahme überprüft.

Für die operative Entnahme wurden zuerst die distalen Femora unter sterilen Bedingungen freipräpariert. Danach wurde das distale Knochenende ca. 5–10 cm über dem Ende der proximalen Gelenkfläche abgesetzt. Die entnommenen Knochen wurden ohne Zeitverzug auf Eis gelagert und in das Labor der Experimentellen Unfallchirurgie transportiert, um strukturelle Veränderungen durch autolytische Prozesse zu vermeiden. Im Labor erfolgte die sorgfältige Präparation der Defektstellen samt der Entfernung von überschüssigem Muskel- und Fettgewebe. Im Anschluss an die Präparation wurden mehrere drei Millimeter dicke Sagittalschnitte der distalen Femora mit einer Knochensäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) angefertigt (Abb. 8). Aus einer dieser Knochenscheiben wurden Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen gewonnen. Die Proben wurden jeweils aus der Knochen- und Knorpelphase sowie aus dem Interface der jeweiligen

Phasen entnommen. Diese wurden unmittelbar in RNAlater® (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA) bei -80 °C gelagert, sodass bis zur Weiterverwendung keine molekularbiologischen Parameter verloren gehen konnten.

Außerdem wurden die Patellae entnommen, präpariert und zur späteren Begutachtung in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Patellae wurden anhand ihres optischen Erscheinungsbildes auf strukturelle Veränderungen untersucht, um mögliche Degenerationsprozesse im Zusammenhang mit den Polymerimplantaten zu identifizieren.

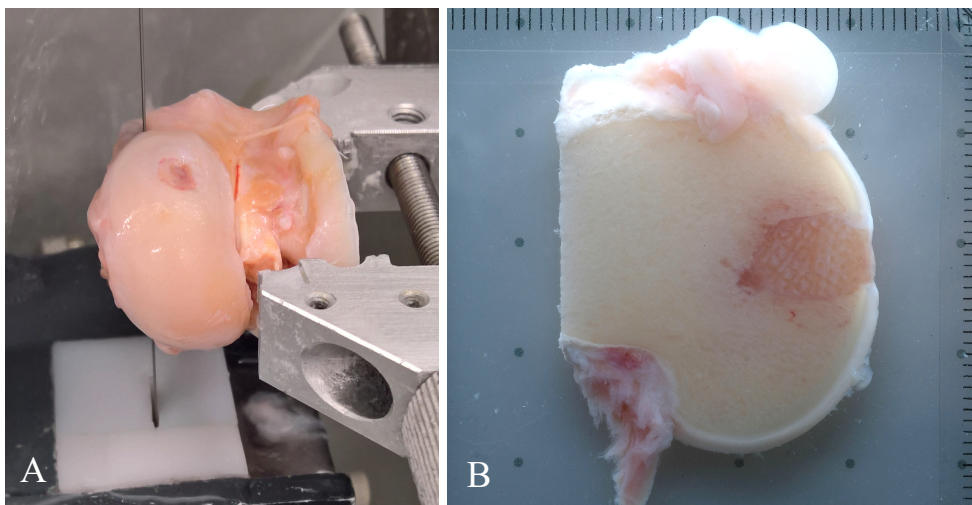


Abb. 8: Präparation und makroskopische Ansicht des Defektbereichs

A) Zur Untersuchung des Regenerats wurde das eingespannte distale Femur in sagittale Scheiben geschnitten. **B)** Der beispielhafte Sagittalschnitt zeigt die Integration des Implantats im subchondralen Knochen und dem umliegenden Knorpelgewebe.

2.5 Makroskopie

Unmittelbar nach der Probenentnahme und -präparation schloss sich eine systematische Fotodokumentation der entnommenen Femora unter standardisierten Bedingungen an. Die angefertigten Bilder dienten als Grundlage für die anschließende makroskopische Evaluation der Implantateinheilung (Abb. 9).

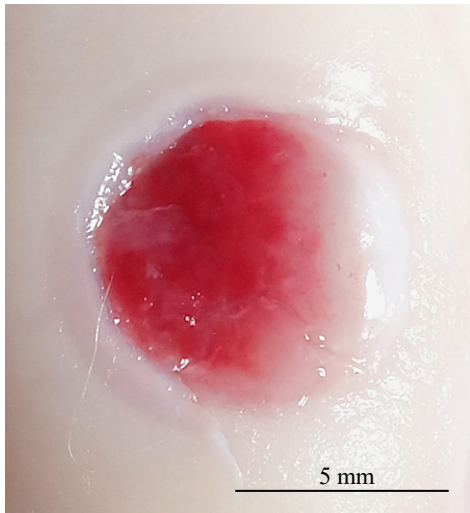


Abb. 9 Beispielaufnahme zur makroskopischen Bewertung der Defektzonen

Dargestellt ist die makroskopische Ansicht eines Knorpeldefekts als Resultat der standardisierten Fotodokumentation zur makroskopischen Evaluation der Implantateinheilung.

Zur objektivierbaren Beurteilung der osteochondralen Defektregeneration wurden etablierte makroskopische Scores herangezogen (Tab. 5; Tab. 6). Konkret wurden ein mod. makroskopischer Score der ICRS sowie nach Wayne et al. (Wayne-Score) als Bewertungsgrundlage genutzt (Brittberg und Winalski 2003; Wayne et al. 2005). Die makroskopische Bewertung der Bilder anhand des mod. ICRS- und Wayne-Scores nahmen drei unabhängige Untersucher mit klinischer Expertise in einem doppelverblindeten Design vor. So wurde eine möglichst hohe interne Validität und Objektivität des Scorings gewährleistet.

Neben den Kriterien der Scores wurde das generelle Erscheinungsbild der Präparate beurteilt. Darüber hinaus wurde anhand eines neu entwickelten Scores die Höhendifferenz des Regenerats zur umgebenden Knorpelfläche im Sagittalschnitt quantifiziert und die Defektgröße ermittelt (Tab. 7).

Die Bildauswertung und die Vermessung der Höhendifferenz sowie der jeweiligen Defektgröße geschah mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ (Version 1.53, National Institutes of Health, USA).

Tab. 5: Mod. ICRS-Score zur makroskopischen Evaluation osteochondraler Defekte (Brittberg und Winalski 2003)

Kriterium	Beschreibung	Punkte
Oberfläche	100 % der Defektfläche aufgefüllt	4
	>75 % der Defektfläche aufgefüllt	3
	>50 % der Defektfläche aufgefüllt	2
	>25 % der Defektfläche aufgefüllt	1
	0–25 % der Defektfläche aufgefüllt	0
Integration zum umliegenden Gewebe	Komplette Integration	4
	Demarkationslinie <1 mm	3
	75 % des Transplantates integriert, 25 % aber mit Spalt >1 mm	2
	50 % des Transplantates integriert, 50 % aber mit Spalt >1 mm	1
	Maximal 25 % des Transplantates integriert	0
Makroskopisches Aussehen	Intakte glatte Oberfläche	4
	Aufgeraute Oberfläche mit Fibrillationen	3
	Kleine Fissuren	2
	Viele kleine oder wenige große Fissuren	1
	Degeneration der transplantierten Oberfläche	0
Grad der Defektregeneration	Grad I: normal	12
	Grad II: fast normal	11–8
	Grad III: pathologisch	7–4
	Grad IV: stark pathologisch	3–1

Tab. 6: Mod. Score nach Wayne et al. zur makroskopischen Evaluation osteochondraler Defekte (Wayne et al. 2005)

Kriterium	Beschreibung	Punkte
Bedeckung	75–100 %	4
	50–75 %	3
	25–50 %	2
	< 25 %	1
	Glatt	0
Farbe	Normal	4
	0–25 % abnormal	3
	25–50 % abnormal	2
	50–75 % abnormal	1
	75–100 % abnormal	0
Defektgrenze	Unsichtbar	4
	0–25 % sichtbar	3
	25–50 % sichtbar	2
	50–75 % sichtbar	1
	75–100 % sichtbar	0
Oberflächenglätte	Glatt, bündig angrenzend	4
	Glatt, erhöht	3
	25–50 % unregelmäßig	2
	50–75 % unregelmäßig	1
	75–100 % unregelmäßig	0

Tab. 7: Score zur Beurteilung der Höhendifferenz des Implantats im Sagittalschnitt

Grad	Beschreibung	Punkte
Ia	kein Absinken/Absinken ≤ 1 mm	2
	kein Überstehen/Überstehen ≤ 1 mm	
IIa	leichtes Absinken > 1 mm – ≤ 3 mm	1
IIb	leichtes Überstehen > 1 mm – ≤ 3 mm	
IIIa	starkes Absinken > 3 mm	0
IIIb	starkes Überstehen > 3 mm	

2.6 Real-time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Die molekularbiologische Analyse erfolgte mittels real-time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (real-time RT-PCR). Es wurden Proben der Osteo- und Chondrophase sowie dem Interface der jeweiligen Phasen gewonnen. Untersuchte Marker für die knöcherne Integration der Osteophase waren ALP als Osteoblastenaktivitätsmarker, CtsK als Osteoklastenaktivitätsparameter, Runx2 als Transkriptionsfaktor für die Osteoblasten und Col1 als Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix. Marker für die Knorpelbildung waren Col1, welches sich vor allem im Faserknorpel wiederfindet, Col2 als Hauptstrukturkomponente des hyalinen Knorpels und Sox9 als zentraler Transkriptionsfaktor in der Chondrogenese. Beta-2-Mikroglobulin (B2M) wurde als interne Referenz herangezogen.

RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion der Knochenproben (Osteophase + Interface der Osteophase) wurde mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und anschließend abgewogen. Maximal 100 mg Knochengewebe wurden dann mit 1 ml Qiazol Lysisreagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) und einer Keramikugel in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Das Homogenisieren und Lysieren der Zellen erfolgte mit der Schwingmühle MM400 (Retsch, Haan, Deutschland) bei einer Frequenz von 30 Hz für eine Minute. Im Anschluss wurde das Homogenat 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 200 Mikroliter (μ l) Chloroform 99 % (Sigma-Aldrich, St.-Louis, MO, USA) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß 15 s lang stark geschüttelt wurde. Daraufhin folgte eine zwei- bis dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation schloss sich die Zentrifugation mit der Mikro 22R Zentrifuge (Hettich, Nierenstein, Deutschland) zur Phasentrennung der Proben an. Die Proben wurden mit 14.000 revolutions per minute (rpm) bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der wässrige Phasenüberstand wurde anschließend ohne Berührung der unteren Phase abpipettiert, um Kontaminationen zu vermeiden, und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung des abpipettierten Phasenvolumens wurde Ethanol 70 % (Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) im Verhältnis 1:1 zugefügt und das Probengemisch auf eine RNeasy Mini Spin Säule aufgetragen (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Darin wurde es bei 8.000 relative centrifugal force (g) und Raumtemperatur für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Gemäß dem Herstellerprotokoll wurde die in der Spin Säule gebundene RNA in den nächsten Schritten mit zwei verschiedenen Puffern ebenfalls bei 8.000 g und Raumtemperatur für 15 s gewaschen: Zunächst mit 700 µl RW1 Buffer, gefolgt von zwei Durchgängen mit 500 µl RNA Protect Elution Buffer (RPE, Qiagen). Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nachdem Waschen wurde die Säule in ein Sammelgefäß gestellt und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dadurch wurden letzte Ethanolreste entfernt und im Anschluss konnte die Säule in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß übertragen werden. Dort wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Qiagen) hinzugefügt und nach fünfminütiger Inkubation folgte eine letzte Zentrifugation zur Elution bei 8.000 g für 1 min bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Konzentration und Reinheit der Probe spektrometrisch mit dem Nanodrop®-Spectrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) gemessen. Nach der Analyse wurde das Eluat wieder bei -80 °C eingefroren.

Im Gegensatz dazu wurde die RNA der Knorpelproben (Knorpelphase + Interface der Knorpelphase) aufgrund der geringeren Probengrößen mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) extrahiert. Grundsätzlich ist die Vorgehensweise ähnlich wie beim RNeasy Lipid Tissue Kit, einige Details unterscheiden sich jedoch voneinander: Angefangen mit der Probenmenge, so wurden zu Beginn nur maximal 5 mg der Probe mit 1 ml Qiazol homogenisiert. Außerdem wurde die Probe nach der Phasentrennung und der Zugabe von Ethanol 70 % nicht in eine RNeasy Mini Spin Säule, sondern in eine RNeasy MinElute Säule überführt, welche wiederum in einem 2-ml-Sammelgefäß platziert wurde. Danach erfolgte analog zum Lipid Tissue Mini Kit die Zentrifugation bei 8.000 g für 15 s und das sich anschließende 15-sekündige Waschen der Säule mit 700 µl RW1 Buffer sowie 500 µl RPE bei 8.000 g und Raumtemperatur. Allerdings wurde das 2-ml-Sammelgefäß zwischen den Zyklen wegen des Durchflusses gewechselt und es erfolgte nur ein Durchgang mit dem RPE Buffer. Stattdessen schloss sich ein weiterer Durchgang mit 500 µl Ethanol 80 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 2 min bei 8.000 g und Raumtemperatur an. Nach erneutem Austausch des 2-ml-Sammelgefäßes wurde die Probe für 5 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Vor der spektrometrischen Konzentrationsmessung wurde die Säule dann in ein 1,5-ml-Sammelgefäß gestellt und bei höchster Geschwindigkeit lediglich 1 min mit 14 µl RNase-freiem Wasser zentrifugiert. Danach erfolgte die Gehalts- und Reinheitsbestimmung mit dem Nanodrop und die Lagerung bei -80 °C.

cDNA-Synthese

Die extrahierte RNA wurde im nächsten Schritt in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde das Verfahren der reversen Transkription mit dem Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) angewendet. Die RNA sowie die Reagenzien des Kits wurden zunächst aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht, um eine gleichmäßige Verteilung ihrer Bestandteile zu gewährleisten. Lediglich die Quantiscript Reverse Transkriptase (Qiagen) wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert, sodass ihre enzymatische Aktivität erhalten blieb.

Im Anschluss daran wurde ein RT Mastermix für die reverse Transkription (RT+) und ein RT Mastermix als Negativkontrolle (RT-) angesetzt. Der RT+ Mastermix bestand für eine cDNA-Synthese aus 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer (5x) und 1 µl RT Primer Mix (Qiagen). Der RT- Mastermix wurde für eine cDNA-Synthese hingegen aus 2 µl Quantiscript RT Buffer (5x), 0,5 µl RT Primer Mix und 0,5 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) angesetzt. Die benötigten Volumina wurden im Vorfeld basierend auf der Probenanzahl multipliziert, damit der entsprechende Mastermix für alle Proben eines Durchgangs ausreichte.

Danach wurde die Elimination der genomischen DNA vorbereitet, indem eine Lösung aus RNA, gDNA Wipeout Buffer und bei Bedarf RNase-freiem Wasser mit einem Gesamtvolumen von 21 µl hergestellt wurde. Dafür wurde die jeweils vorhandene RNA-Menge der Proben mit 3 µl gDNA Wipeout Buffer (Qiagen) versetzt und die eventuell resultierende Differenz bis zu einem Endvolumen von 21 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Nach dem sorgfältigen Mischen und Anzentrifugieren der entstandenen Lösung, folgte die Inkubation für 5 min bei 42 °C im Thermocycler (I-Cycler, Bio-Rad, München, Deutschland) mit anschließender Kühlung der Proben auf Eis. Von diesen angesetzten 21 µl wurden 14 µl für die RT+ und 7 µl für die RT- in je einen neuen Reaktionsgefäß transferiert. Schließlich wurden 6 µl des RT+ Mastermixes in das RT+ Reaktionsgefäß bzw. 3 µl des RT- Mastermixes in das RT- Reaktionsgefäß pipettiert, bevor die reverse Transkription der Probe für 30 min bei 42 °C im Thermocycler erfolgte. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase schloss sich eine dreiminütige Inkubation bei 95 °C im Thermocycler an. Die Proben wurden nach der cDNA-Synthese bei -20 °C aufbewahrt.

Primer-Etablierung

Zur Durchführung der real-time RT-PCR wurden Primer für die Genabschnitte von ALP, CtsK, Runx2, Col1, Col2 sowie Sox9 etabliert. Dies geschah mittels real-time RT-PCR von Verdünnungsreihen qualitativ hochwertiger cDNA-Proben samt der zu testenden Primer zur Darstellung sogenannter Standardkurven. Die Auswahl der Primer erfolgte auf der Grundlage publizierter mRNA-Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Synthetisiert wurden die Primer von Eurofins Genomic (Ebersberg, Deutschland). Die Primer-Details wurden über eine Datenbank ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Tabelle 5 bietet eine Übersicht über die Primer-Details. Die Sequenzen wurden als forward (F) und reverse (R) angegeben.

Tab. 8: Primer-Übersicht

Primer	Accessionnummer	Sequenz	Länge (Basenpaare)
B2M <i>nicht intronspannend</i>	XM_042250117.2	F: CCAGAAGATG- GAAAGCCAAA R: AGCGTGGGACAGAAGG- TAGA	159
CtsK <i>nicht intronspannend</i>	XM_004002465.4	F: GGGTCAATGTGGTT- CCTGTT R: GCAGCCATCATTCTCA- GACA	133
Col1 <i>nicht intronspannend</i>	XM_027974705.2	F: CCAGTCACCTGCG- TACAGAACG R: GCCAGTGTCTCCTTT- GGGTCC	246
ALP <i>nicht intronspannend</i>	XM_042244637.2	F: TCAGCAGACCCT- GAAAAATG R: TTCTTAGCCACGTT- GGTGTTG	60
Col2a1 <i>nicht intronspannend</i>	XM_042246798.2	F: ACCCAGAACCA- ACACAATCC R: TCAGTGCAGAGTCCTAG- AGTG	81
sox9 <i>nicht intronspannend</i>	XM_027974011.3	F: AGAAGGAGAGCGAG- GAGGAC R: GTGCGGCTTGTTCTTGCT	131
runx2 <i>nicht intronspannend</i>	XM_060403662.1	F: TGCAACAAGACCTGCCCG R: ACAGCAGAGGCATTTTCG- GAG	125

Die Primer-Etablierung erfolgte mit dem QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Beim Auftauen der Reagenzien wurde darauf geachtet, das SYBR Green (Qiagen) stets im Dunkeln aufzutauen, um dem Zerfall der enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe und einer Strukturveränderung vorzubeugen.

Zunächst wurde dann ein Mastermix angesetzt. Dafür wurden 5 µl SYBR Green, 0,8 µl nukleasefreies Wasser (Qiagen) und 0,2 µl des jeweiligen Primers verwendet. Analog zum Vorgehen bei der cDNA-Synthese wurden die Volumina abhängig von der Probenanzahl multipliziert. Nach der Herstellung des Mastermixes wurde die Verdünnungsreihe einer ausgewählten cDNA-Probe vorbereitet. Je nach Primer wurde eine qualitativ hochwertige Knochen- oder Knorpelprobe gewählt, die eine hohe RNA-Konzentration aufwies. Die Ausgangsprobe jeder Verdünnungsstufe waren 4 µl cDNA der vorherigen Stufe, sodass die ursprüngliche cDNA mit jeder Stufe um das Zehnfache verdünnt wurde. Die Verdünnung erfolgte pro Stufe mit 36 µl nukleasefreiem Wasser. Im Anschluss an die Vorbereitung des Mastermixes sowie der Verdünnungsreihe wurden 6 µl des Mastermixes in Glaskapillaren (Roche, Basel, Schweiz) vorgelegt und 4 µl der cDNA-Verdünnungen in den Mastermix hineinpipettiert. Danach wurden die Proben bei 450 g und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert (Mikro 22R, Hettich), bevor sich die real-time RT-PCR im LightCycler 2.0 (Roche, Basel, Schweiz) anschloss. Diese startete mit einer initialen Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 2 min, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen. Letztere gliederten sich in eine weitere Denaturierungsphase für 5 s bei 95 °C mit nachfolgender Primerhybridisierung (Annealing-Phase) und Elongation bei 60 °C für 10 s. Nach einer Abkühlung auf 60 °C für 15 s schloss sich daraufhin eine Temperaturerhöhung auf 95 °C an, um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen. Die Temperatur wurde jeweils um 0,1 °C pro Sekunde erhöht und sorgte für die Dissoziation der doppelsträngigen DNA. Durch die Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen wurde der gebundene Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und konnte so, wie die Schmelztemperaturen, mithilfe der LightCycler-Software (Version 4.1, Roche) ausgewertet werden. Die Schmelzkurven und -temperaturen variieren genau wie die Fluoreszenzsignale. Je nach Zusammensetzung der Basensequenz kann unterschieden werden, ob spezifische DNA-Fragmente oder unspezifische Nebenprodukte, wie z. B. Primer-Dimere, entstanden sind. Sämtliche Proben einer Verdünnungsreihe wurden in Doppelbestimmung mit einfacher Negativkontrolle analysiert. Nach der Aufzeichnung der Schmelzkurve erfolgte die graduelle Kühlung mit 20 °C/s auf 40 °C für 30 s, um die Reaktion zu beenden.

Letztlich kann aus der real-time RT-PCR im Rahmen der Primer-Etablierung eine Standardkurve erstellt werden, woraus die Effizienz des jeweiligen Primers abgeleitet werden kann. Ein Wert von 2 bedeutet, dass die DNA pro PCR-Zyklus verdoppelt wird. Deutlich abweichende Werte können beispielsweise auf eine fehlerhafte Verdünnungsreihe oder auf unspezifische PCR-Produkte hindeuten. Für den Runx2-Primer ergab die Standardkurve beispielsweise eine Effizienz von 2,097 (Abb. 10).

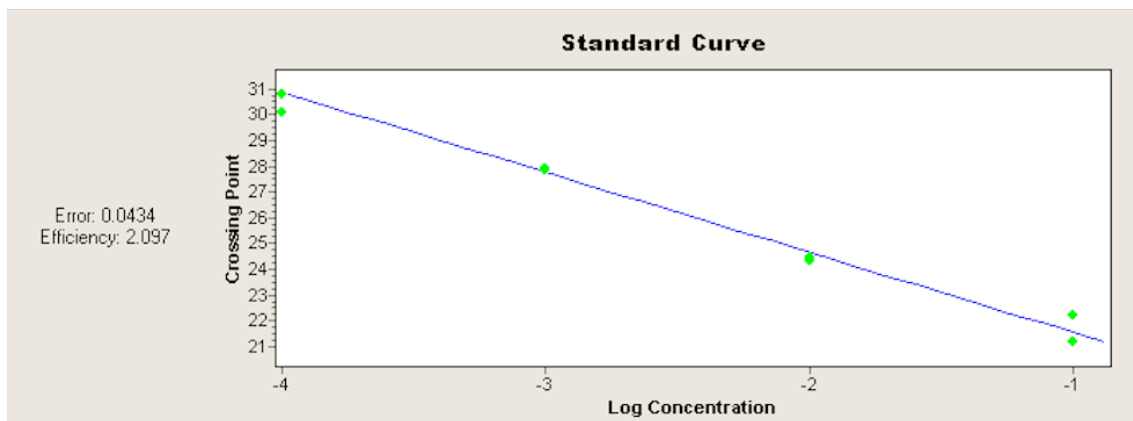


Abb. 10 Standardkurve Primer Runx2

Die Abbildung veranschaulicht die Effizienzbestimmung anhand einer exemplarischen Standardkurve von Runx2. Die aus der Steigung der Regressionsgeraden abgeleitete PCR-Effizienz beträgt im vorliegenden Beispiel 2,097.

Real-time RT-PCR

Es konnte nun nach erfolgreicher cDNA-Synthese sowie Primer-Etablierung die real-time RT-PCR zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression in den ovinen Knochen- und Knorpelproben durchgeführt werden. Die Durchführung war beinahe identisch zur bereits beschriebenen real-time RT-PCR im Rahmen der Primer-Etablierung. Allerdings wurden keine Verdünnungsreihen der cDNA angesetzt. Stattdessen wurden die cDNA-Proben in einem fixen Verhältnis von 1:10 verdünnt. Außerdem enthielt der Mastermix 10 µl der Forward- und 10 µl der Reverse-Sequenz des verwendeten Primers. Darüber hinaus wurde dieser unverändert angesetzt. Ebenfalls unverändert erfolgte eine Doppelbestimmung sämtlicher Proben mit einfachen RT-negativen Kontrollen ohne cDNA-Anteil sowie die Datenaufbereitung mit der LightCycler-Software (Version 4.1, Roche). Für jede Probe wurde eine Schmelz- und eine Amplifikationskurve generiert (Abb. 11;

Abb. 12). Während die Schmelzkurve Rückschlüsse auf die Spezifität der PCR-Produkte zuließ, konnte anhand der Amplifikationskurve der sogenannte Crossing Point (CP) oder Cycle Threshold ermittelt werden. Der CP gibt an, wie viele PCR-Zyklen erforderlich sind, bis die DNA-Fragmente in ausreichender Menge vorliegen, um durch ihre Fluoreszenz mess- und nachweisbar zu werden. Folglich ist ein niedriger CP mit einem hohen Gehalt an DNA in der Probe assoziiert. Zur Berechnung der relativen Expression wurde zunächst der CP-Wert des B2M als Referenzwert für die allgemeine Gewebeaktivität von dem CP-Wert des relevanten Zielgens subtrahiert. Mit dem resultierenden ΔCP -Wert konnten dann die $\Delta\Delta\text{CP}$ -Werte im jeweiligen Gruppenvergleich errechnet werden, indem der ΔCP -Mittelwert der Kontrollgruppe von dem ΔCP -Wert der untersuchten Probe abgezogen wurde (siehe 2.1). Schließlich ergibt sich der Wert für die relative Expression des Zielgens daraus als $2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$.

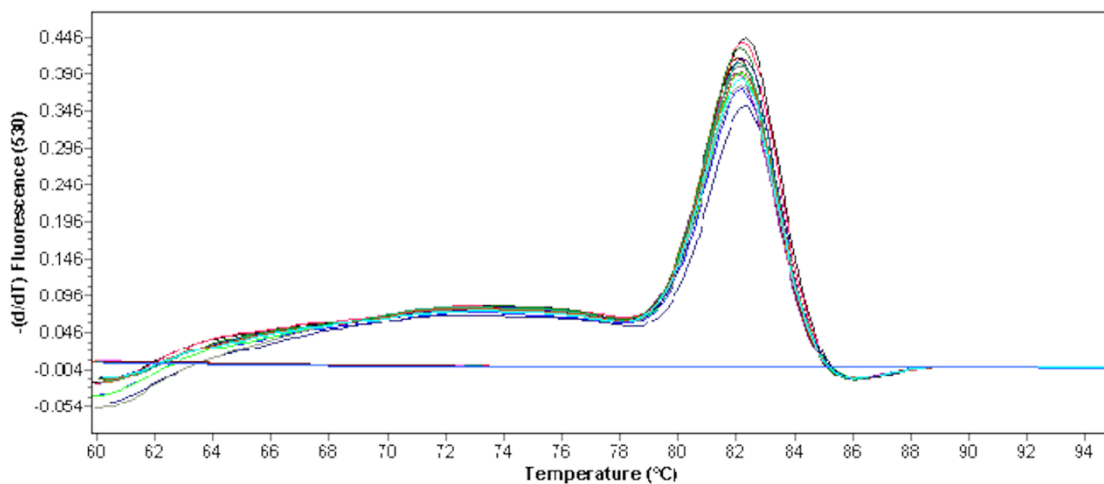


Abb. 11 Schmelzpunktkurven

Aus den Schmelzpunktkurven von Runx2 ergibt sich eine übereinstimmende Schmelztemperatur von etwa 82 °C.

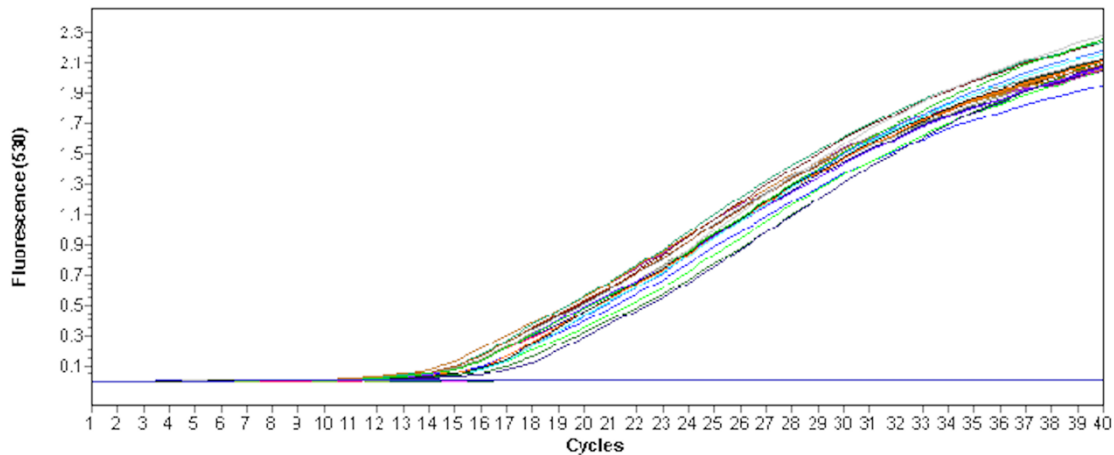


Abb. 12 Amplifikationskurven

Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen. Der Zyklus, ab dem die Vervielfältigung der DNA exponentiell ansteigt und das Fluoreszenzsignal sich signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt, wird als Crossing Point bezeichnet. Dieser wurde automatisiert von der LightCycler-Software bestimmt.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software SPSS (Version 28, SPSS Institute Inc., Chicago, USA) erstellt. Zunächst wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft, ob die Daten normalverteilt sind. Da keine Normalverteilung vorlag, schlossen sich die parameterfreien Tests nach Kruskal-Wallis, Wilcoxon und Mann-Whitney an. Das Signifikanzniveau α wurde als $p \leq 0,05$ definiert, β wurde mit 0,2 angenommen. Mithilfe der Software G*Power (Version 3.1.9.7, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde die Berechnung der benötigten Gruppengröße durchgeführt. Für die Visualisierung der Daten wurden Box-Whisker-Plots genutzt, welche ebenfalls mittels SPSS generiert wurden. Die Boxen selbst repräsentieren den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile, während die Linien innerhalb der Boxen den Medianwert markieren. Die Whiskers hingegen geben die Spannweite der Daten innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands an. Datenpunkte außerhalb dieser Spanne werden als Ausreißer durch Kreise oder Sterne dargestellt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf einer umfassenden makroskopischen und molekularbiologischen Analyse der Defektregenerationen. So konnte sowohl auf struktureller als auch auf genetischer Ebene eine detaillierte Evaluation der Heilungsprozesse abgeleitet werden.

3.1 Makroskopische Auswertung

Die standardisiert angefertigten Fotoaufnahmen zur makroskopischen Evaluation wurden doppelblind von drei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Daraus wurde für alle Schafe und Gruppen ein Gesamtscore gebildet. Die Gruppen wurden jeweils in zwei Subgruppen unterteilt, sodass eine separate Bewertung der distalen und proximalen Implantateinheilung möglich war. Im Folgenden wird der jeweilige Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung des errechneten Gesamtscores angegeben (MW \pm SD). Negative Werte für die Höhendifferenz der Implantate zum umliegenden Knorpelgewebe beschreiben eine Implantatsinterung.

Gruppe L-OB

Die Gruppe L-OB ohne Porenfüllung diente als Referenzgruppe für die Gruppe L-B und wurde aufgrund der Operationsreihenfolge als erstes ausgewertet. Makroskopisch wiesen alle Defekte dieser Gruppe, insbesondere die Defekte in der Femurkondyle, eine fortgeschrittene Defektfüllung auf und ließen die Bildung eines knorpelartigen Ersatzgewebes vermuten. Teilweise waren kleine Fissuren und Fibrillationen sowie farbliche Unterschiede der regenerierten Knorpeloberfläche zu erkennen (Abb. 13).

Objektiviert ergab sich daraus für die distalen Defekte der Gruppe L-OB nach der Auswertung aller drei Prüfer ein durchschnittlicher mod. ICRS-Score von $7,80 \pm 1,90$. Im mod. Score nach Wayne et al. (2005) lag der Punktwert im Mittel bei $9,50 \pm 2,08$. Die gemessene Höhendifferenz zur angrenzenden Knorpeloberfläche lag über alle Defekte dieser Subgruppe hinweg zwischen -1 mm und +1 mm ($-0,08 \pm 0,48$ mm). Dies resultierte in einem Gesamtscore von 2 ± 0 Punkten. Die durchschnittliche Defektgröße betrug 11,82 mm x 7,19 mm.

Die proximalen Defekte dieser Gruppe konnten einen durchschnittlichen mod. ICRS-Score von $8,25 \pm 1,60$ erreichen. In der Auswertung des mod. Wayne-Scores fiel die Differenz zu den distalen Defekten etwas deutlicher aus. Der Durchschnittswert im mod. Score nach Wayne et al. (2005) lag bei $10,83 \pm 2,19$. Die Höhendifferenz ergab eine durchschnittliche Implantatsinterung der proximalen Regenerate von $-0,23 \pm 0,92$ mm und damit einen Gesamtscore von $1,75 \pm 0,50$. Die proximalen Defekte wiesen eine Größe von $11,19$ mm x $7,08$ mm auf. Allerdings konnte die makroskopische Auswertung anhand der Schnittbilder in dieser Untergruppe nur bei vier Proben erfolgen. Ein Defekt musste wegen unzureichender Beurteilbarkeit aus der Wertung genommen werden.

Für die gesamte Gruppe L-OB (distale + proximale Defekte) lag der mod. ICRS-Score bei $7,89 \pm 1,99$, der mod. Wayne-Score bei $10,07 \pm 3,2$ und die Höhendifferenz bei $1,89 \pm 0,31$ Punkten. Somit entsprach die Implantateinheilung der Gruppe L-OB im Gruppendurchschnitt insgesamt etwa einer „fast normalen Defektregeneration“ (Grad II) gemäß dem mod. ICRS-Score.

Auch in der separaten Betrachtung beider Gruppen entsprach die Implantateinheilung jeweils einer „fast normalen Defektregeneration“ (Grad II) gemäß dem mod. ICRS-Score mit einer durchschnittlichen Höhendifferenz von $\leq \pm 1$ mm. Es konnten keine signifikanten, makroskopischen Unterschiede innerhalb der Gruppe L-OB zwischen den distalen und proximalen Defekten mit den angewendeten Testverfahren festgestellt werden ($p > 0,05$).

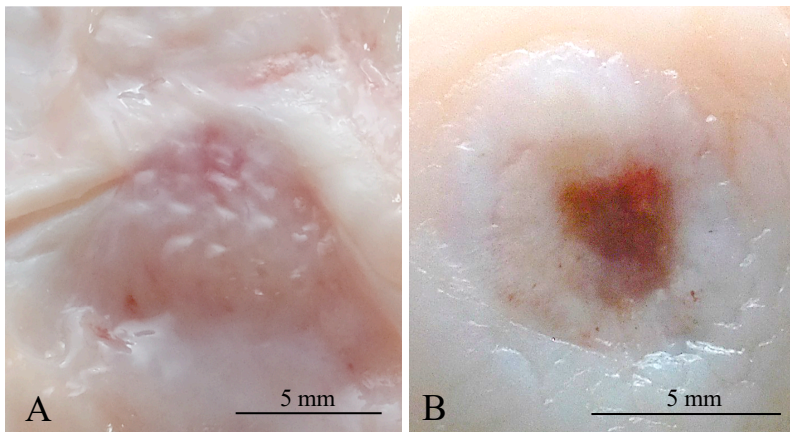


Abb. 13: Makroskopische Befunde der Defektregeneration in der Gruppe L-OB

Die Abbildung zeigt exemplarisch makroskopische Ergebnisse der Referenzgruppe L-OB. Die Defekte wiesen eine fortgeschrittene Defektfüllung mit einem weißlich-transparenten, knorpelartigen Ersatzgewebe auf. **A)** Proximaler Defekt: Zeigt eine Oberfläche mit leichten Fissuren und Fibrillationen. **B)** Distaler Defekt: Zeigt einen gut regenerierten Defekt mit zentralen farblichen Unterschieden.

Gruppe L-B

In dieser Gruppe sollte insbesondere der Einfluss des kollagenhaltigen Biogels auf die Defektheilung im Vergleich zur ersten Gruppe analysiert werden. Es wurden die gleichen Polymerimplantate wie in der Gruppe L-OB verwendet, allerdings mit einem Kollagen-filler in den interkonnektierenden Implantatporen, um eine bessere Zellbesiedelung der Implantate zu erzielen. Größtenteils zeigte sich in dieser Gruppe augenscheinlich eine progressive Transplantateinheilung mit Bildung eines makroskopisch knorpelcharakteristischen Gewebes (Abb. 14). Die Defektgrenzen waren jedoch häufig klar zu erkennen und die Knorpeloberfläche schien bei drei Defekten klar uneben zu sein. Außerdem zeigten sich Fissuren und farbliche Unterschiede. Insbesondere ein Schaf fiel mit einer unterdurchschnittlichen Defektheilung auf.

Nach der Auswertung aller drei Prüfer erreichten die distalen Defekte der Gruppe L-B einen durchschnittlichen mod. ICRS-Score von $6,93 \pm 3,39$. Die Evaluation anhand der Kriterien des mod. Wayne-Score spiegelte sich in einem Gesamtscore von $9,47 \pm 4,95$ wider. Drei der fünf Regenerate wiesen eine Höhendifferenz von $\leq \pm 1$ mm zum umliegenden Knorpelgewebe auf, bei den anderen beiden wurden Werte $\geq \pm 1$ mm und

$\leq \pm 3$ mm gemessen. Diese Werte resultierten in einem Score von $1,60 \pm 0,55$ und einer mittleren Höhendifferenz von $-0,04 \pm 0,92$ mm. Zudem wurde für diese Gruppe eine Defektgröße von $12,51$ mm x $7,52$ mm ermittelt.

Im Vergleich dazu wurden die proximalen Defekte der Gruppe L-B mit einem durchschnittlichen mod. ICRS-Score von $7,00 \pm 3,50$ bewertet. Der mod. Wayne-Score ergab nach Einschätzung der Untersucher einen Punktwert von $8,93 \pm 4,16$, wobei vier der fünf Implantate $\leq \pm 1$ mm Höhendifferenz zum angrenzenden Knorpel zeigten. Nur ein Wert lag zwischen ≥ 1 mm und ≤ 3 mm. So ergab sich ein Score für die Höhendifferenz von $1,80 \pm 0,45$ Punkten bei durchschnittlich $-0,70 \pm 0,76$ mm Differenz. Die Größe der proximalen Defekte betrug $11,64$ mm x $7,18$ mm.

Nach dreimonatiger Standzeit konnten die Defektregenerationen der distalen sowie der proximalen Defekte mit einem mod. ICRS-Gesamtscore von $6,97 \pm 3,51$ als Grad III zusammengefasst werden. Anders als in Gruppe L-OB bedeutet dies, dass es sich gemäß dem mod. ICRS-Score in der Gruppe L-B insgesamt um eine „pathologische Defektregeneration“ handelt. Im mod. Wayne-Score errechnete sich aus den Werten ein Gesamtscore von $9,20 \pm 4,51$ Punkten. Die Höhendifferenzen zum benachbarten Knorpelrand führten in der Gruppe zu einem Score von $1,7 \pm 0,46$.

Bei der separaten Betrachtung beider Subgruppen fällt auf, dass die distalen Defekte nur einen minimal höheren Gesamtscore erreicht haben als die proximalen Defekte und beide Subgruppen auch in der Einzelanalyse einen pathologischen Heilungsgrad III aufwiesen. Dabei konnte in dieser Gruppe weder mit dem Mann-Whitney-U noch dem Wilcoxon- oder Kruskal-Wallis-Test ein signifikantes Ergebnis zwischen der distalen und proximalen Implantatintegration nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

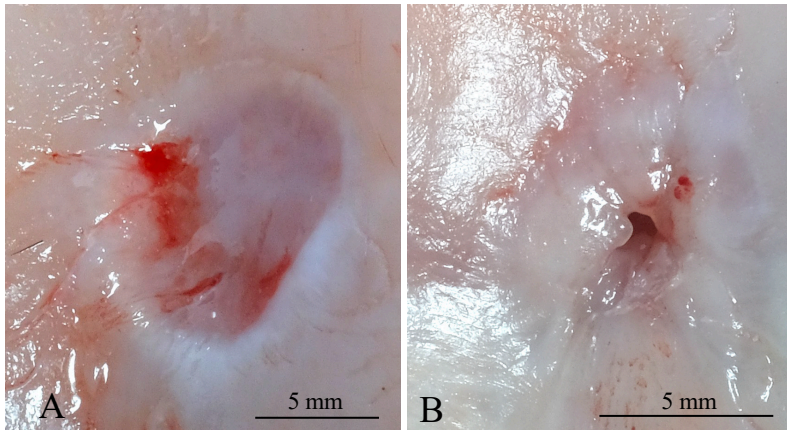


Abb. 14: Makroskopische Befunde der Defektregeneration in der Gruppe L-B

Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der makroskopischen Ergebnisse in der Gruppe L-B mit Kollagenfüllung. Die Defektregeneration war von variabler Qualität und insgesamt „pathologisch“. **A)** Proximaler Defekt: Zeigt einen teilweise gefüllten Defekt mit zentralen blutigen Arealen. **B)** Distaler Defekt: Stellt einen Defekt mit einer deutlichen zentralen Vertiefung und Perforation dar.

Gruppe A-B

Das in der dritten Gruppe verwendete ACM sollte gemeinsam mit dem verwendeten Kollagenfiller die beste Zellverträglichkeit und -integration ermöglichen. In der visuellen Inspektion wurde aufgrund des farblichen und strukturellen Erscheinungsbildes trotz erkennbar Defektgrenzen und vorhandener Fibrillationen vor allem für die distalen Defekte eine gute Knorpelneubildung angenommen (Abb. 15). Die proximalen Transplantate waren optisch stärker vom gesunden Knorpelgewebe abgrenzbar und in zwei Fällen nicht mehr zu beurteilen, da die Knorpelphase bei der Präparation abgelöst wurde.

In den Scores stellten sich die Beobachtungen wie folgt dar: Die distal in den Femurcondylen gesetzten Implantate erzielten hinsichtlich ihrer Einheilung nach drei Monaten den höchsten Durchschnittswert im mod. ICRS-Score aller Gruppen mit $8,40 \pm 2,31$ Punkten. Selbiges gilt für den mod. Wayne-Score. Auch unter Anwendung dieses Scores erhielten die distalen Defekte der Gruppe A-B im Gruppenvergleich nach doppelverblindeter Einschätzung mit $11,00 \pm 3,24$ die meisten Punkte. Alle fünf gebildeten Defektregenerate wiesen dabei einen maximalen Höhenunterschied von $\leq \pm 1$ mm zum gesunden Knorpelgewebe auf und wurden bei einer durchschnittlichen Differenz von $0,42 \pm 0,33$ mm mit 2 ± 0 Punkten gescort. Die gemessene Defektgröße lag bei 10,46 mm x 6,78 mm.

Die Analyse der proximalen Score-Ergebnisse ergab hingegen einen mod. ICRS-Score von $7,11 \pm 3,50$. Auf der Grundlage des mod. Wayne-Scores wurden für die proximalen Defektregenerationen $9,56 \pm 5,21$ Punkte vergeben. Dabei zeigte sich in dieser Untergruppe mit 1 ± 0 über alle Gruppen hinweg der geringste Score für das Sintern/Überstehen der eingehielten Implantate. Zwar lag die durchschnittliche Höhendifferenz mit $0,55 \pm 1,82$ in einem sehr guten Bereich, jedoch war dies nur der Fall, da sich die eingesunkenen und überstehenden Regenerate im Mittelwert ausglich. Einzeln betrachtet wiesen alle Defektzonen eine Sinterung/einen Überstand von $\geq \pm 1$ mm und $\leq \pm 3$ mm auf, bei einer Defektgröße von $10,73$ mm x $7,10$ mm. Dabei konnten von den fünf proximalen Defekten der A-B-Implantate nur drei in die makroskopische Auswertung einbezogen werden. Bei zwei Transplantaten wurde im Rahmen der Präparation die Knorpelphase beschädigt. Eine statistische Berücksichtigung und die adäquate Anwendung der Scores waren infolgedessen nicht möglich.

Distale und proximale Scores ergaben gemeinsam betrachtet einen mod. ICRS-Score von $7,92 \pm 3,31$ für die gesamte Gruppe A-B. Damit wurde die Defektheilung dieser Gruppe nach mod. ICRS-Score insgesamt als „fast normal“ (Grad II) klassifiziert. Während der mod. Wayne-Score einen Punktwert von $10,46 \pm 4,77$ in der Gruppenanalyse ergab, erbrachte die Auswertung der durchschnittlichen Gelenkflächenhöhe einen Score von $1,63 \pm 0,52$.

In dieser Gruppe fiel ein großer Unterschied zwischen den distalen und proximalen Ergebnissen auf. Im belasteten Bereich des Gelenks zeigte sich die beste Defektreparatur mit dem höchsten Gesamtscore unter allen Teilgruppen. Die unabhängige Kategorisierung der Prüfer erfolgte als „fast normale Defektregeneration“ (Grad II) nach mod. ICRS-Score. Dahingegen wurden die Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone überwiegend als drittgradig eingestuft. Dennoch konnte mithilfe der einzelnen Testverfahren keine statistisch signifikante Aussage getroffen werden, ob der Implantationsort einen Einfluss auf die Regeneration und den damit einhergehenden Score hat ($p > 0,05$).

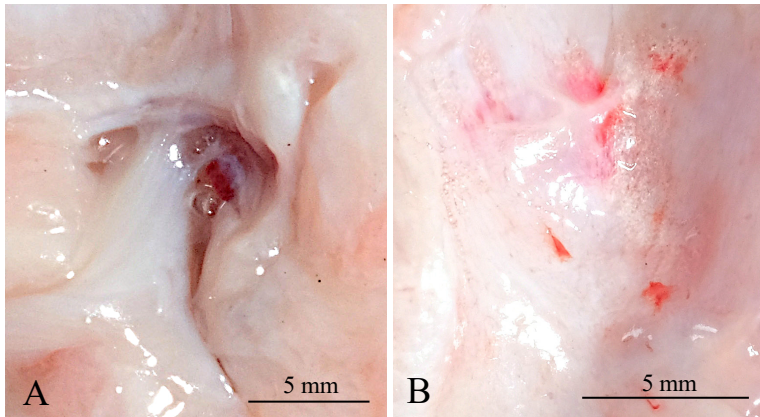


Abb. 15: Makroskopische Befunde der Defektregeneration in der Gruppe A-B.

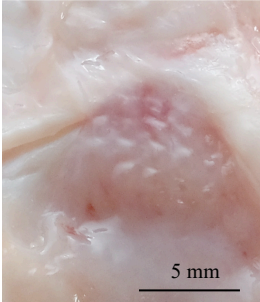
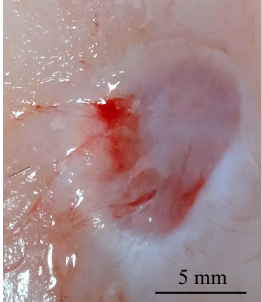
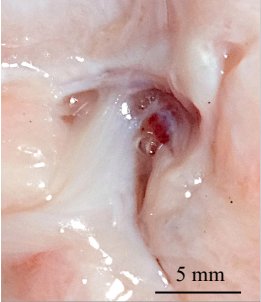
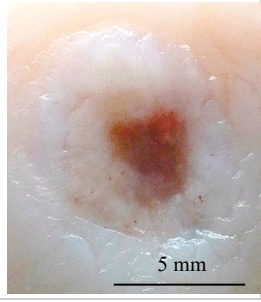
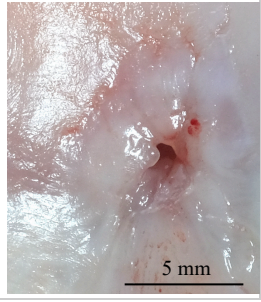

Dargestellt ist exemplarisch die beobachtete große Bandbreite an Heilungsergebnissen in dieser Gruppe. **A)** Proximaler Defekt: Repräsentativ für eine unterdurchschnittliche Regeneration mit unvollständiger Füllung und irregulärer Oberfläche. **B)** Distaler Defekt: Im Gegensatz dazu zeigt dieses Beispiel eine sehr gute Defektreparatur mit einer vollständigen, gut integrierten und knorpelähnlichen Oberfläche.

Gesamtauswertung aller Gruppen

Für eine bessere Veranschaulichung und für einen direkten Vergleich der Ergebnisse werden die zentralen Mittelwerte der makroskopischen Scores aller Gruppen in einer tabellarischen Übersicht abgebildet (Tab. 9). Insgesamt ließen sich im statistischen Vergleich der Implantationsgruppen mit den oben genannten Tests aus dem makroskopischen Scoring keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 16; Abb. 17; Abb. 18). Kein Implantat erreichte einen „normalen“ Regenerationsgrad gemäß dem mod. ICRS-Score. Drei Defekte konnten in der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Zudem waren die Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen samt zugehöriger Subgruppen mitunter sehr groß. So ergab die Auswertung von Schaf 7 in Gruppe L-B sowohl für den distalen als auch für den proximalen Defekt eine „stark pathologische Defektregeneration“ im mod. ICRS-Score (Grad IV). Die Defektheilung von Schaf 10 aus der gleichen Gruppe wurde hingegen übereinstimmend mit 11 von 12 möglichen Punkten als „fast normal“ (Grad II) klassifiziert. Aber auch die Bewertungen der Prüfer wiesen punktuell eine starke Varianz auf und resultierten in abweichenden Scores. In einem Fall betrug die Differenz der vergebenen Scores 11 Punkte für die gleichen Bilder.

Gleichwohl zeigte sich in der Gesamtschau eine „fast normale Defektregeneration“ (Grad II) nach dem mod. ICRS- Score. Makroskopisch betrachtet, scheint die Mehrzahl aller untersuchten Polymere eine suffiziente Einheilung gezeigt zu haben. Dies untermauert das grundsätzliche Potenzial dieser Materialien zur Heilungsförderung und zur Bildung eines makroskopisch knorpelähnlichen Ersatzgewebes.

Tab. 9 Makroskopische Scores im Gruppenvergleich

		<u>L-OB</u>	<u>L-B</u>	<u>A-B</u>
P	Mod. ICRS-Score:	8,25 ± 1,60	7,00 ± 3,50	7,11 ± 3,50
	Mod. Wayne-Score:	10,83 ± 2,19	8,93 ± 4,16	9,56 ± 5,21
	Höhendifferenz:	-0,23 ± 0,92 mm	-0,70 ± 0,76 mm	0,55 ± 1,82 mm
				
D	Mod. ICRS-Score:	7,80 ± 1,90	6,93 ± 3,39	8,40 ± 2,31
	Mod. Wayne-Score:	9,50 ± 2,08	9,47 ± 4,95	11,00 ± 3,24
	Höhendifferenz:	-0,08 ± 0,48 mm	-0,04 ± 0,92 mm	0,42 ± 0,33 mm
				

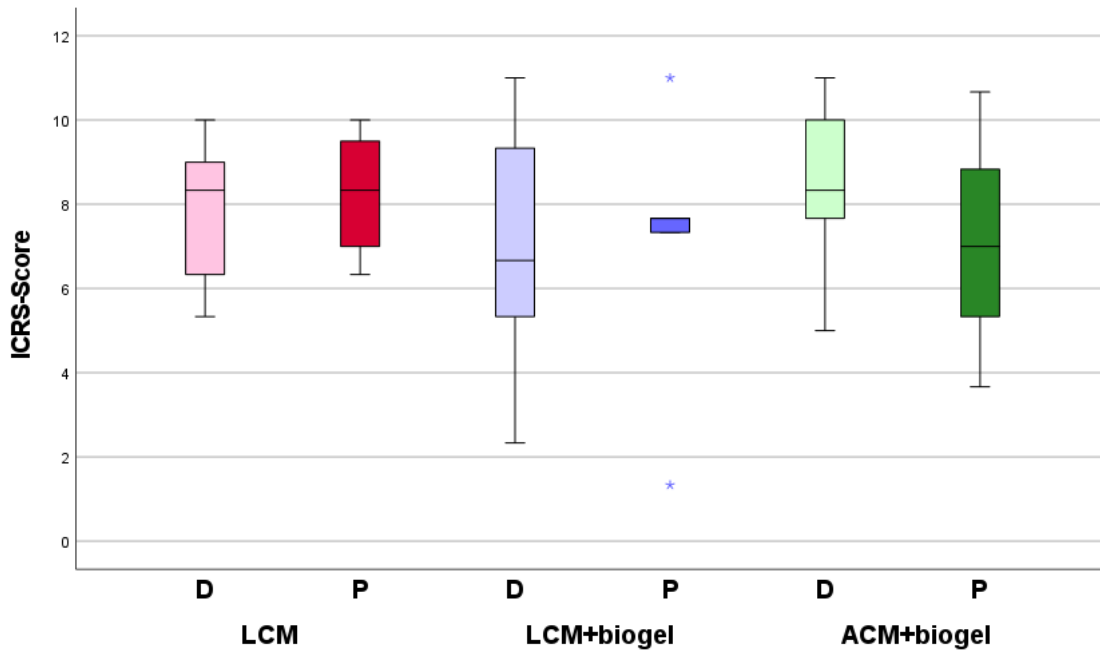


Abb. 16: Vergleich mod. ICRS-Scores abhängig von Implantattyp und -position

Die Box-Whisker-Plots zeigen die Verteilung der mod. ICRS-Scores für die drei Behandlungsgruppen, jeweils unterteilt nach distaler (D) und proximaler (P) Implantatposition. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

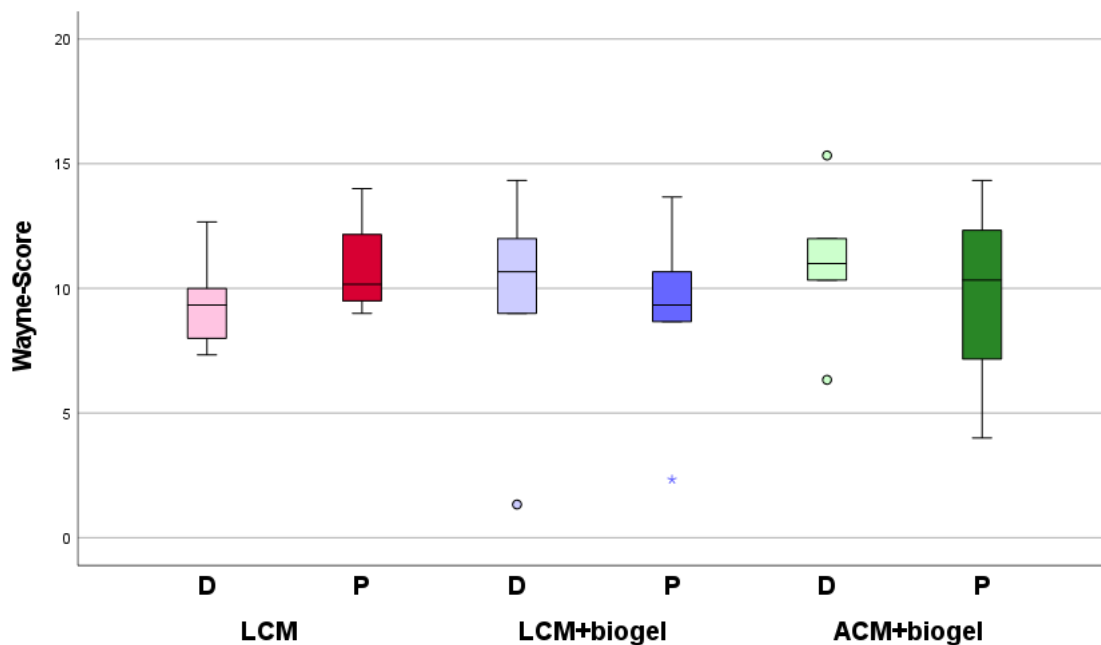


Abb. 17: Vergleich mod. Wayne-Scores abhängig von Implantattyp und -position

Die Box-Whisker-Plots zeigen die Verteilung der mod. Wayne-Scores für die drei Behandlungsgruppen, jeweils unterteilt nach der Implantatposition. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

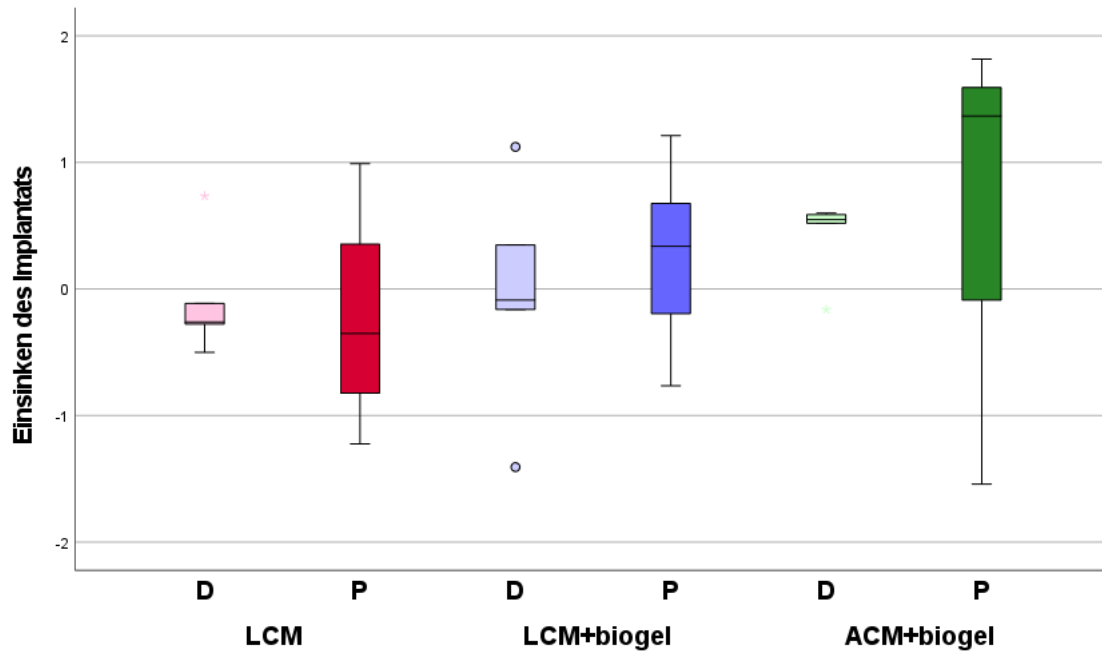


Abb. 18: Vergleich des neu entwickelten Scores für das Einsinken der Implantate in Abhängigkeit von Implantattyp und -lokalisierung

Die Box-Whisker-Plots zeigen die Ergebnisse des neu entwickelten Scores für das Sintern der Implantate in den drei Behandlungsgruppen, jeweils unterteilt nach der Implantatposition. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Patellae

Im Rahmen der makroskopischen Evaluation wurden auch die Patellarrückflächen der operierten Extremität begutachtet (Abb. 19). Eine Anwendung der Scores fand allerdings nicht statt, da keine Defektheilung analysiert werden sollte. Die Betrachtung der Patellarrückflächen ist relevant, um sekundäre biomechanische Anpassungen infolge der Polymerimplantation zu erfassen. Sie könnte Hinweise auf adaptive oder degenerative Prozesse liefern, die durch eine veränderte Gelenkbelastung entstehen. Möglich wäre beispielsweise eine veränderte Druckverteilung durch die inkongruente Neubildung von Knochen- und Knorpelgewebe mit resultierender Stufenbildung innerhalb der Gelenkfläche. Außerdem könnten sichtbare Degenerationszeichen der Knochen- oder Knorpelsubstanz Aufschluss über die Langzeitverträglichkeit und die Funktionalität der Polymerimplantate geben. Die Beurteilung erfolgte im Gruppen- und Seitenvergleich.

Intraoperativ wurden zum Zeitpunkt der Defektsetzung bei keinem Schaf Degenerationen der Patellarrückfläche dokumentiert. Nach der Polymerimplantation und dreimonatiger Standzeit wurden gruppenübergreifend Veränderungen der operierten, linken Seite gegenüber der unbehandelten, rechten Seite beobachtet. Die nicht-operierten Patellae waren von einem glatten, gleichmäßigen Knorpelbezug ohne strukturelle Auffälligkeiten bedeckt. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den operierten Patellae überwiegend ungleichmäßige, arthrotisch-veränderte Gelenkflächen mit einer starken Proliferation des periartikulären Weichteilgewebes. Bei vier Schafen zeigten sich osteochondrale Defekte mit freiliegendem subchondralen Knochen (ICRS Grad IV). Auffällige Unterschiede der Degenerationsprozesse konnten im Gruppenvergleich nicht festgestellt werden.

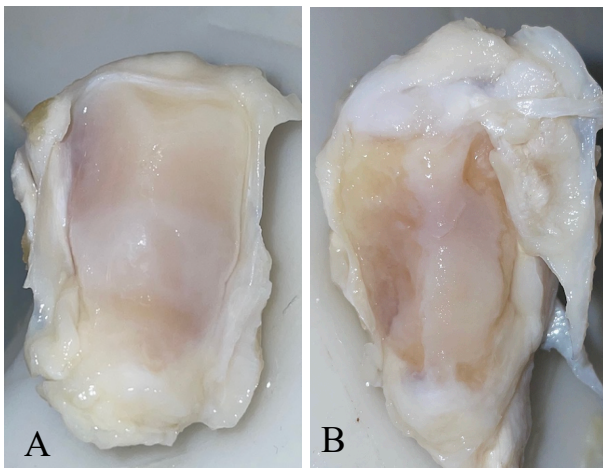


Abb. 19: Makroskopische Ansicht der Patellarrückflächen

Dargestellt sind die makroskopischen Befunde der Patellae. **A)** Bildet einen intakten Knorpelbelag ab. **B)** Weist arthrotische Veränderungen auf. Erkennbar sind die ungleichmäßige Gelenkoberfläche und die starke Proliferation des periartikulären Weichteilgewebes.

3.2 Molekularbiologische Auswertung

Nach der Berechnung der relativen Expression aller Zielgene wurden die Ergebnisse gruppenweise miteinander verglichen. Die statistische Auswertung wurde entsprechend den unterschiedlichen Primern getrennt für die osteogenen und die chondrogenen Marker dargestellt. In den folgenden Unterkapiteln wird für den Vergleich der Genexpressionen stellenweise der jeweilige Medianwert mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Die grafische Darstellung in den folgenden Diagrammen zeigt auf der Y-Achse die relative Expression als $2^{-\Delta\Delta CT}$ und auf der X-Achse die verglichenen Kohorten. Die in der Y-Achsenbeschriftung zusätzlich angegebene Formel veranschaulicht lediglich den grundlegenden Zwischenschritt zur Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes. Das Signifikanzniveau ist mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

Osteogene Marker

ALP

Die Untersuchung der ALP-Genexpression ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Osteophase. Der globale Vergleich aller untersuchten Gruppen resultierte in einem p-Wert von 0,072 (Kruskal-Wallis-Test; Abb. 20). Die paarweisen Vergleiche der distalen und der proximalen Proben innerhalb der Gruppe A-B ($p = 0,773$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur), der Gruppe L-B ($p = 0,076$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur) und der Gruppe L-OB ($p = 0,117$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur) zeigten keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der mRNA-Expression.

In der Interface-Osteophase (IO) hingegen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der ALP-Expression innerhalb der Gruppe L-B festgestellt werden (Abb. 21). Dabei war die Expression in den proximalen Proben signifikant höher als in den distalen Proben ($p = 0,047$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur). Weitere Vergleiche in dieser Phase waren statistisch nicht signifikant. So ergaben sich etwa zwischen den Gruppen A-B und L-B ($p = 0,306$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur) oder zwischen den Gruppen L-B und L-OB ($p = 0,361$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur) jeweils p-Werte oberhalb des Signifikanzniveaus. Auch die umfassende Analyse der Daten aus der Chondrophase (C) und der Interface-Chondrophase (IC) erbrachte keine weiteren statistisch signifikanten Ergebnisse für die ALP-Expression.

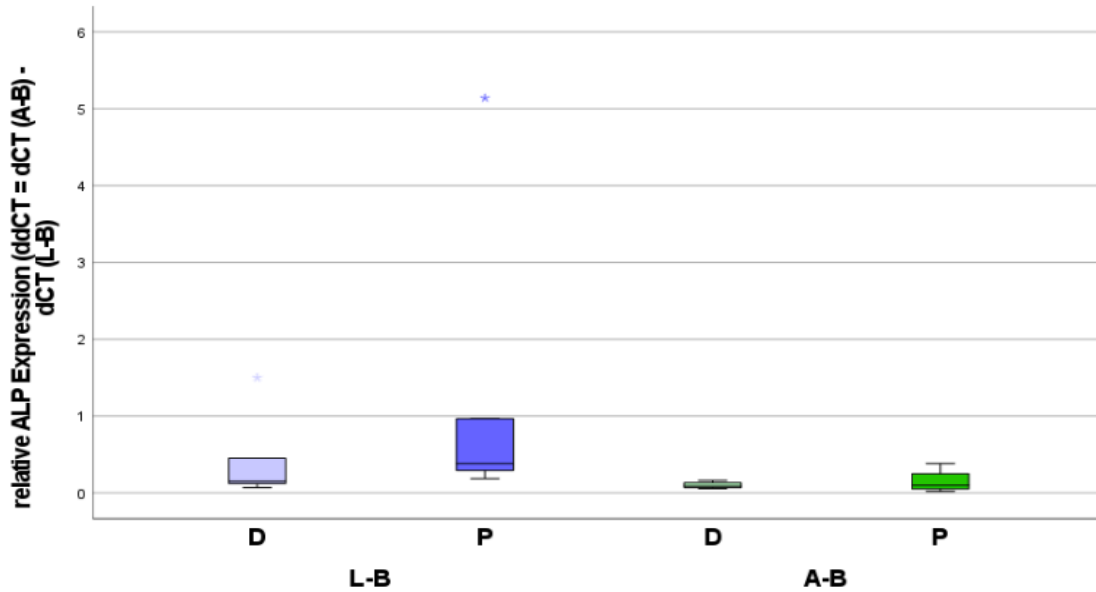


Abb. 20: Relative ALP-Genexpression in der Osteophase

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relative Genexpression der ALP in der Osteophase abhängig von dem Implantattyp und der Implantatlokalisation. Weder im globalen noch im paarweisen Vergleich zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,072$; Kruskal-Wallis-Test, paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur).

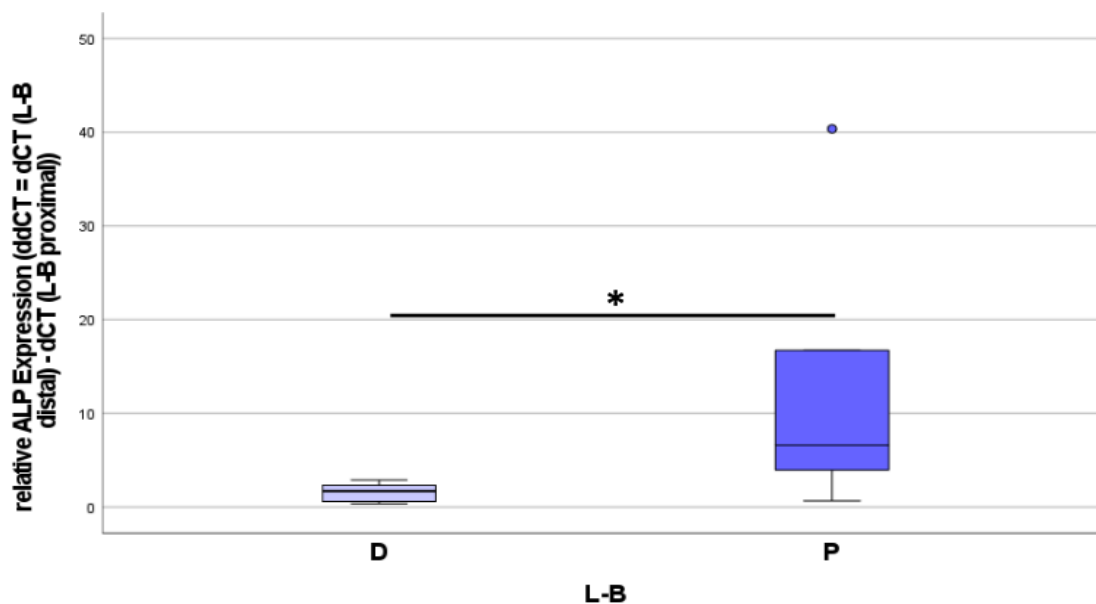


Abb. 21: ALP-Genexpression in der Interface-Osteophase der Gruppe L-B

Die Abbildung zeigt den Vergleich der relativen ALP-Expression in der Interface-Osteophase zwischen den distalen (D) und proximalen (P) Proben der Gruppe L-B. Die Expression in den proximalen Proben war statistisch signifikant höher als in den distalen Proben ($p = 0,047$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur).

CtsK

Für das CtsK wurde in der Osteophase ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den Gruppen L-B und L-OB nachgewiesen ($p = 0,047$; Kruskal-Wallis-Test). Der nachfolgende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test lokalisierte diesen Unterschied spezifisch im proximalen Bereich: Es konnte eine signifikant höhere Expression in der L-OB-Gruppe verglichen mit der korrespondierenden L-B-Gruppe ($p = 0,016$) gemessen werden (Abb. 22). Im distalen Bereich war jedoch mit einem p-Wert von $0,151$ (Mann-Whitney-U-Test) kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Auch in der Interface-Osteophase konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen L-B und L-OB bestätigt werden ($p = 0,021$; Kruskal-Wallis-Test). Der anschließende Mann-Whitney-U-Test ergab im Vergleich zur Osteophase aber eine umgekehrte Verteilung der Signifikanz: In der Interface-Osteophase wurde eine signifikant höhere Expression im distalen Defektbereich der L-OB-Gruppe im Vergleich zur L-B-Gruppe ($p = 0,016$) festgestellt, während der p-Wert für den Vergleich im proximalen Bereich mit $0,056$ lediglich eine statistische Tendenz ohne Signifikanz nachweisen konnte (Abb. 23). Deskriptiv spiegelte sich diese Tendenz dabei anhand der Medianwerte als eine deutlich höhere Expression in der Gruppe L-OB im Vergleich zur Gruppe L-B wider. In der Gruppe L-OB lag der Medianwert bei $2,41 \pm 3,86$, während dieser in der Gruppe L-B $0,32 \pm 1,12$ betrug. In allen übrigen Vergleichen wurden für die CtsK-Expression keine signifikanten Unterschiede gefunden.

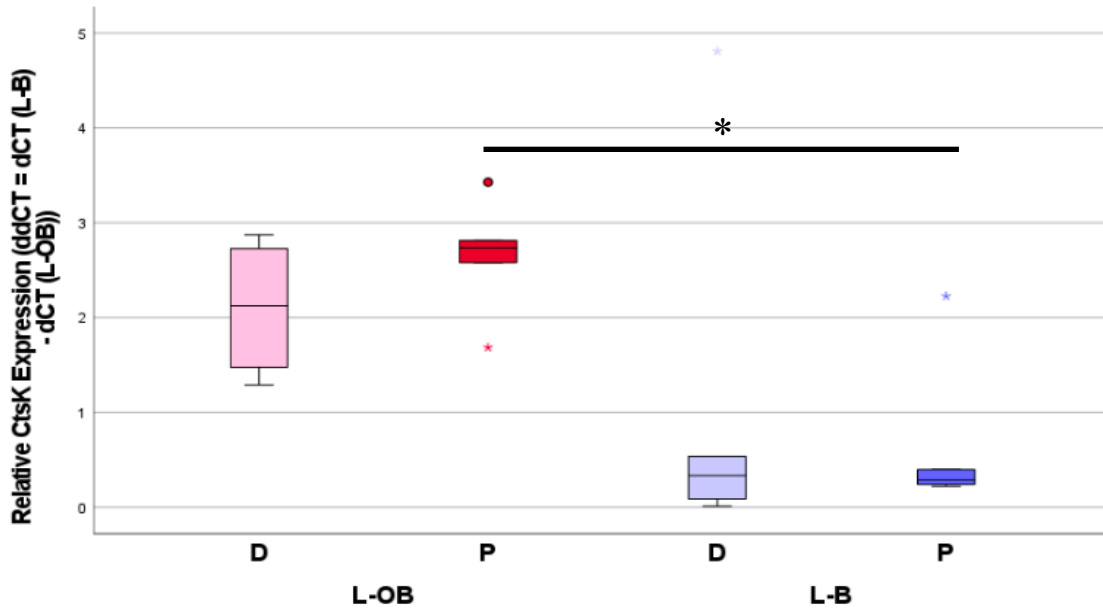


Abb. 22: Relative CtsK-Genexpression in der Osteophase

Die Box-Whisker-Plots vergleichen die relative Genexpression von CtsK in der Osteophase zwischen den Gruppen L-OB und L-B in distaler und proximaler Position. Dabei wiesen die proximalen Proben der Gruppe L-OB eine statistisch signifikant höhere Expression als die korrespondierenden Proben der Gruppe L-B auf ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test).

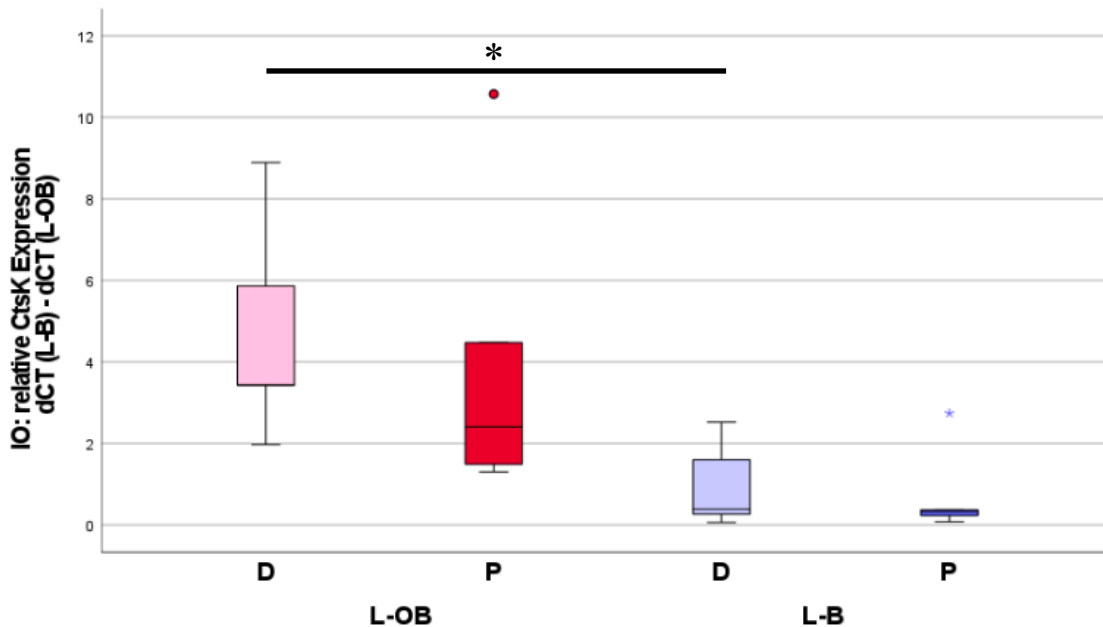


Abb. 23: Relative CtsK-Genexpression in der Interface-Osteophase

Gezeigt wird der Vergleich der relativen CtsK-Expression in der Interface-Osteophase zwischen den Gruppen L-OB und L-B. In dieser Zone wurde eine signifikant höhere Expression im distalen Defektbereich der L-OB-Gruppe im Vergleich zur L-B-Gruppe festgestellt ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test).

Runx2

Die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors Runx2, der eine Schlüsselrolle in der Differenzierung von Osteoblasten spielt, wies in der Osteophase einen signifikanten Unterschied zwischen den distalen und proximalen Proben der Gruppe L-B auf ($p = 0,016$; paarweiser Test mit Bonferroni-Korrektur; Abb. 24). Dabei war die Expression in den proximalen Proben statistisch signifikant höher als in den Proben des distalen Bereichs derselben Gruppe. Hinsichtlich der Genexpression war der Vergleich in der Osteophase der Gruppen L-B und L-OB mit einem p-Wert von 0,058 (Kruskal-Wallis-Test) statistisch nicht signifikant (Abb. 25).

In der Interface-Osteophase wurden für Runx2 insgesamt keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt. Lediglich der Vergleich zwischen den distalen und proximalen Proben innerhalb der L-B-Gruppe kann mit einem p-Wert von 0,056 (Mann-Whitney-U-Test) als eine Tendenz zur Signifikanz gewertet werden, ohne diese jedoch zu erreichen. Anhand der Medianwerte zeigte sich dabei eine höhere Expression in den proximalen Proben im Vergleich zu den distalen Proben. Der Medianwert betrug für die proximalen Proben $1,07 \pm 4,63$ und für die distalen Proben $1,38 \pm 1,16$. Die übrigen Gruppenvergleiche konnten für die Runx2-Expression keine weiteren signifikanten Unterschiede oder Tendenzen nachweisen.

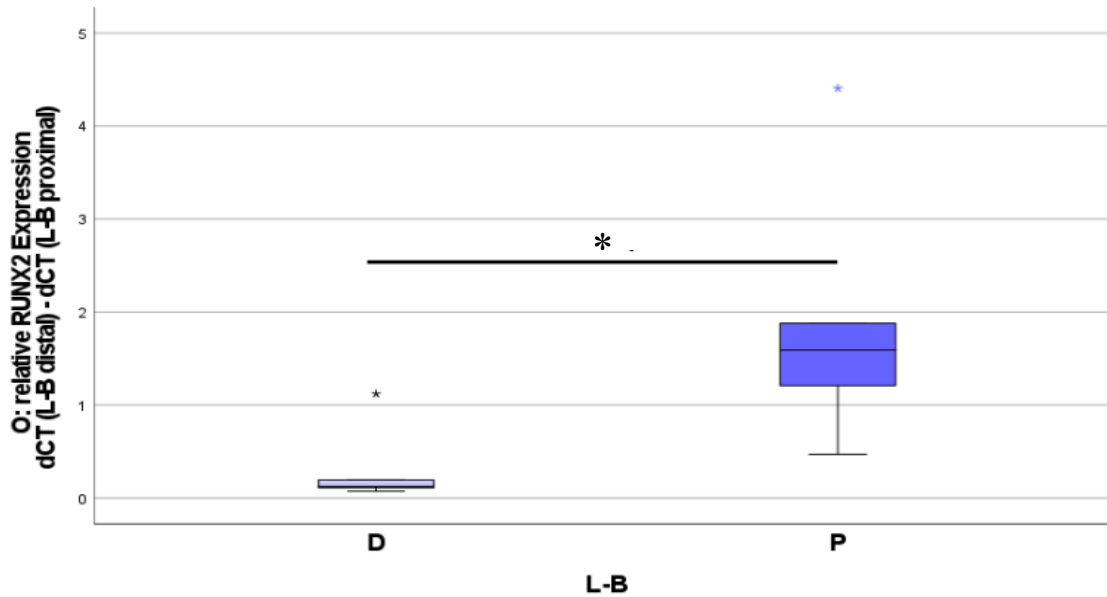


Abb. 24: Relative Runx2-Genexpression in der Osteophase der Gruppe L-B

Dargestellt ist der statistisch signifikante Unterschied in der Runx2-Expression innerhalb der Gruppe L-B bezogen auf die Osteophase. Die proximalen Proben zeigten eine signifikant höhere Runx2-Expression als die distalen Proben ($p = 0,016$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur).

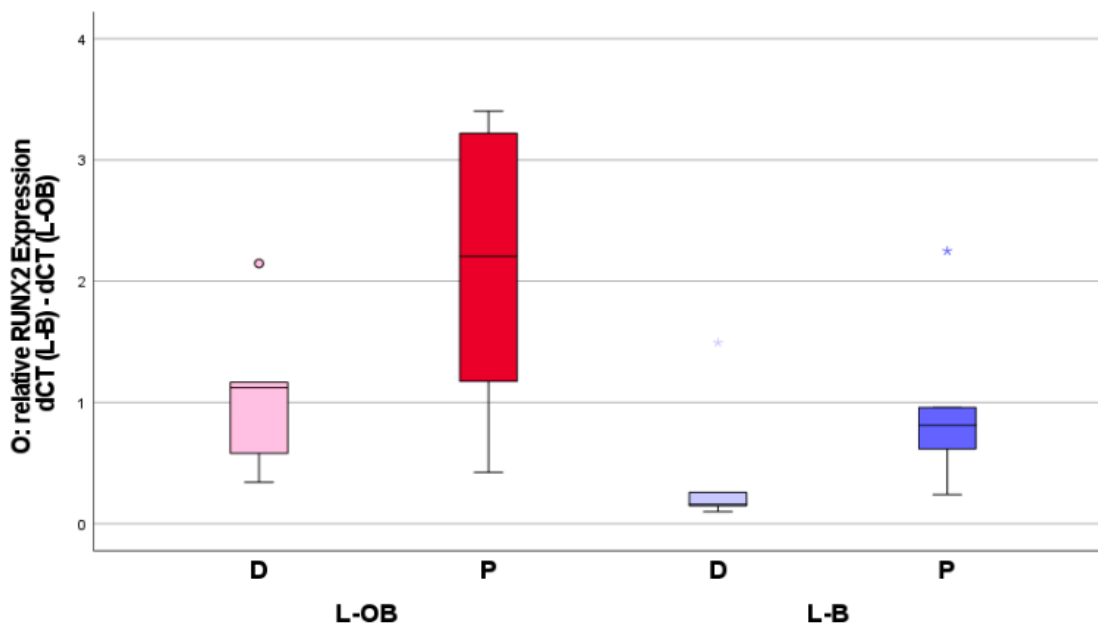


Abb. 25: Runx2-Expression im Gruppenvergleich in der Osteophase

Die Abbildung vergleicht die Runx2-Expression der Gruppen L-B und L-OB. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen nachgewiesen werden ($p = 0,058$; Kruskal-Wallis-Test).

Col1

Bei der Expression von Col1, dem Hauptstrukturprotein der Knochenmatrix, wurden über die verschiedenen Defektphasen hinweg signifikante Unterschiede beobachtet. In der Osteophase zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen L-B und L-OB ($p = 0,011$; Kruskal-Wallis-Test). Der paarweise Vergleich ergab eine signifikant höhere Expression in der proximalen L-OB-Probe als in der korrespondierenden L-B-Probe ($p = 0,032$; Mann-Whitney-U-Test). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der proximalen Proben sowohl innerhalb der L-B-Gruppe ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test) als auch innerhalb der L-OB-Gruppe ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test) signifikant höher war als in den distalen Proben (Abb. 26).

In der Interface-Osteophase wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert, es zeigte sich jedoch eine Tendenz zur Signifikanz im Vergleich zwischen distalen und proximalen Proben der L-B-Gruppe ($p = 0,056$; Mann-Whitney-U-Test).

Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen L-B und L-OB wurde in der Chondrophase gefunden ($p = 0,044$; Kruskal-Wallis-Test). Dort ergab der paarweise Vergleich eine signifikant höhere Expression im proximalen Defekt der L-OB-Gruppe ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 27).

Auch in der Interface-Chondrophase gab es eine Signifikanz für die Col1-Expression in den proximalen Proben der L-OB-Gruppe verglichen mit den distalen Proben derselben Gruppe ($p = 0,032$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 28).

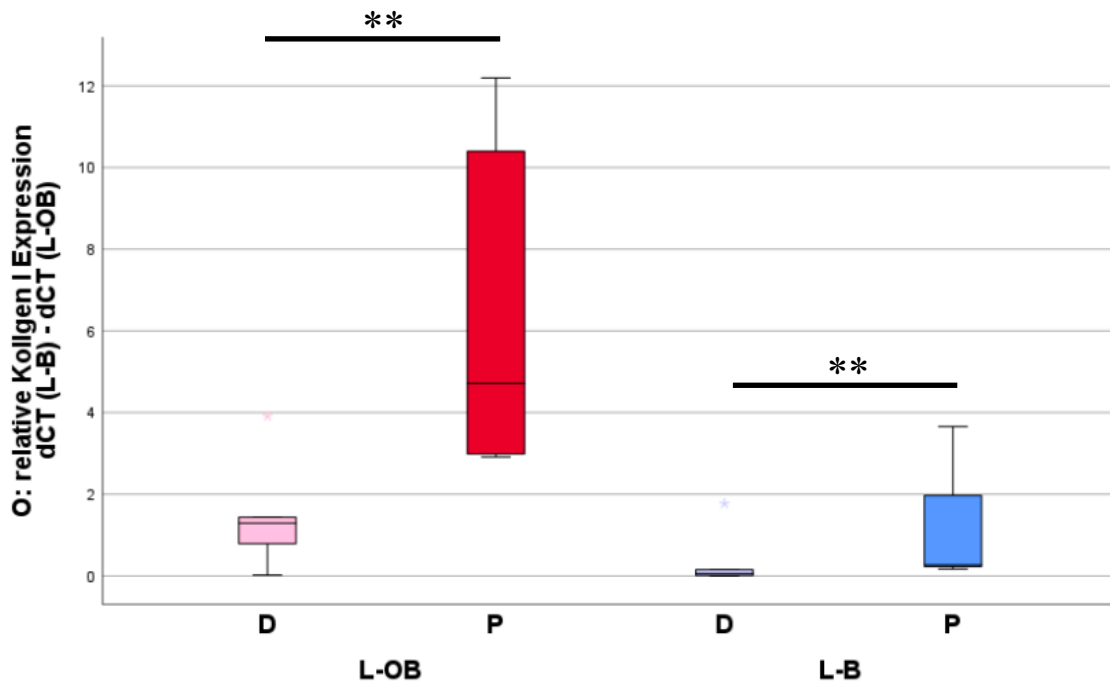


Abb. 26: Relative Coll1-Genexpression in der Osteophase

Die Box-Whisker-Plots zeigen die relative Genexpression des Coll1 in der Osteophase. Der Gruppenvergleich zwischen L-B und L-OB war statistisch signifikant ($p = 0,011$; Kruskal-Wallis-Test). Die Analyse ergab zudem sowohl innerhalb der Gruppe L-B ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test) als auch innerhalb der Gruppe L-OB ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test) eine signifikant höhere Expression in den proximalen Proben im Vergleich zu den distalen Proben.

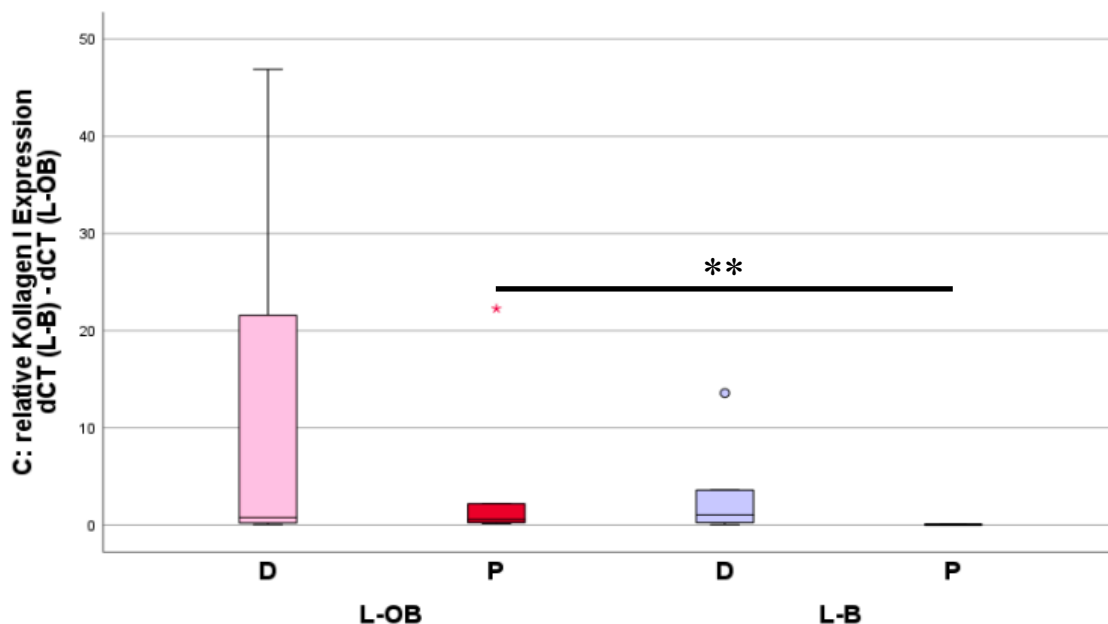


Abb. 27: Relative Coll1-Genexpression in der Chondrophase

In der Chondrophase ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,044$; Kruskal-Wallis-Test). Dieser war auf eine signifikant höhere Coll1-Expression in den proximalen Proben der L-OB-Gruppe zurückzuführen ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test).

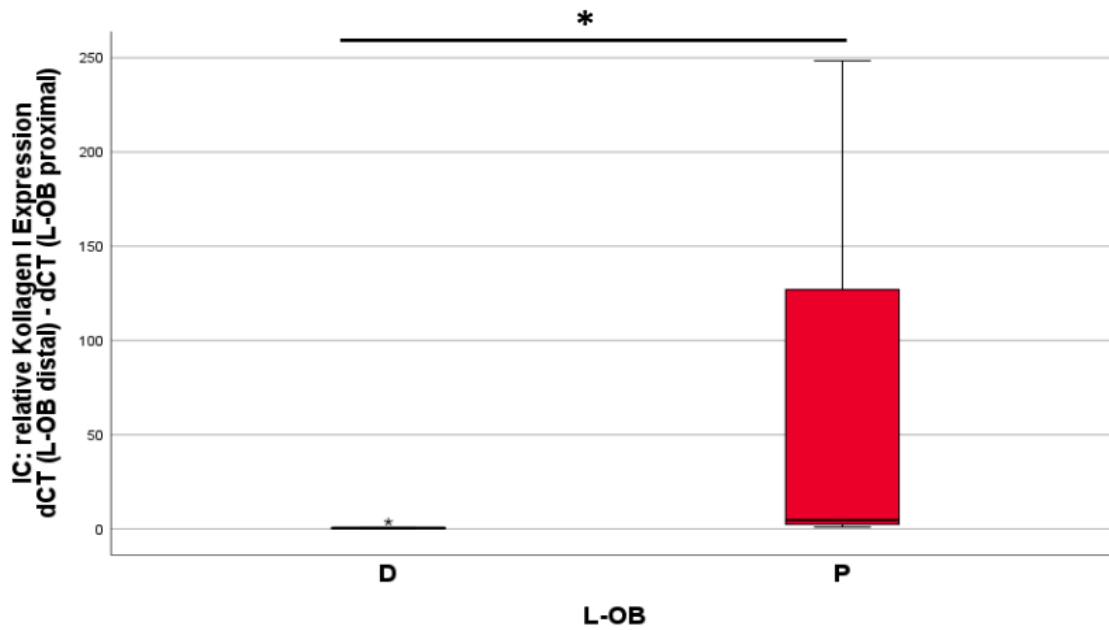


Abb. 28: Relative Col1-Genexpression in der Interface-Chondrophase der Gruppe L-OB

Die Abbildung zeigt den Vergleich der relativen Col1-Expression innerhalb der Gruppe L-OB in der Interface-Chondrophase. Dabei wiesen die proximalen Proben eine statistisch signifikant höhere Expression auf als die distalen Proben ($p = 0,032$; Mann-Whitney-U-Test).

Chondrogene Marker

Col2

Die Untersuchung des für den hyalinen Knorpel spezifischen Markers Col2 wies in der Chondrophase signifikante Differenzen zwischen den Gruppen A-B und L-B nach ($p = 0,017$; Kruskal-Wallis-Test). Der nachfolgende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test ergab eine signifikant stärker ausgeprägte Expression in den distalen Proben der L-B-Gruppe als in den distalen Proben der A-B-Gruppe ($p = 0,045$; Abb. 29).

In der Interface-Chondrophase wurde ebenfalls eine signifikante Differenz zwischen den Gruppen A-B und L-B gemessen ($p = 0,024$; Kruskal-Wallis-Test). Analog zur Chondrophase war auch hier die Expression im distalen Defekt der L-B-Gruppe signifikant höher als im korrespondierenden Bereich der A-B-Gruppe ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 30). Alle übrigen Gegenüberstellungen zeigten für die Col2-Expression keine statistisch signifikanten Unterschiede.

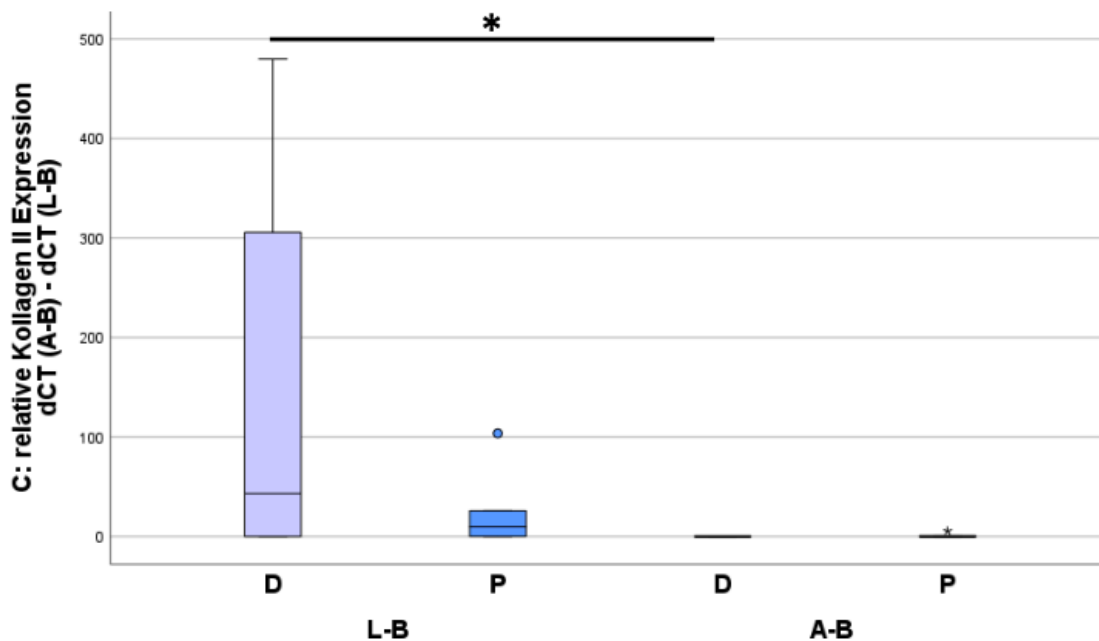


Abb. 29: Relative Col2-Genexpression in der Chondrophase

Zu sehen ist die relative Genexpression des chondrogenen Markers Col2 in der Chondrophase. Der Gruppenvergleich zwischen der Gruppe A-B und der Gruppe L-B war statistisch signifikant ($p = 0,017$; Kruskal-Wallis-Test). Der paarweise Vergleich ergab eine signifikant höhere Expression in den distalen Proben der L-B-Gruppe verglichen mit den distalen Proben der A-B-Gruppe ($p = 0,045$; Mann-Whitney-U-Test).

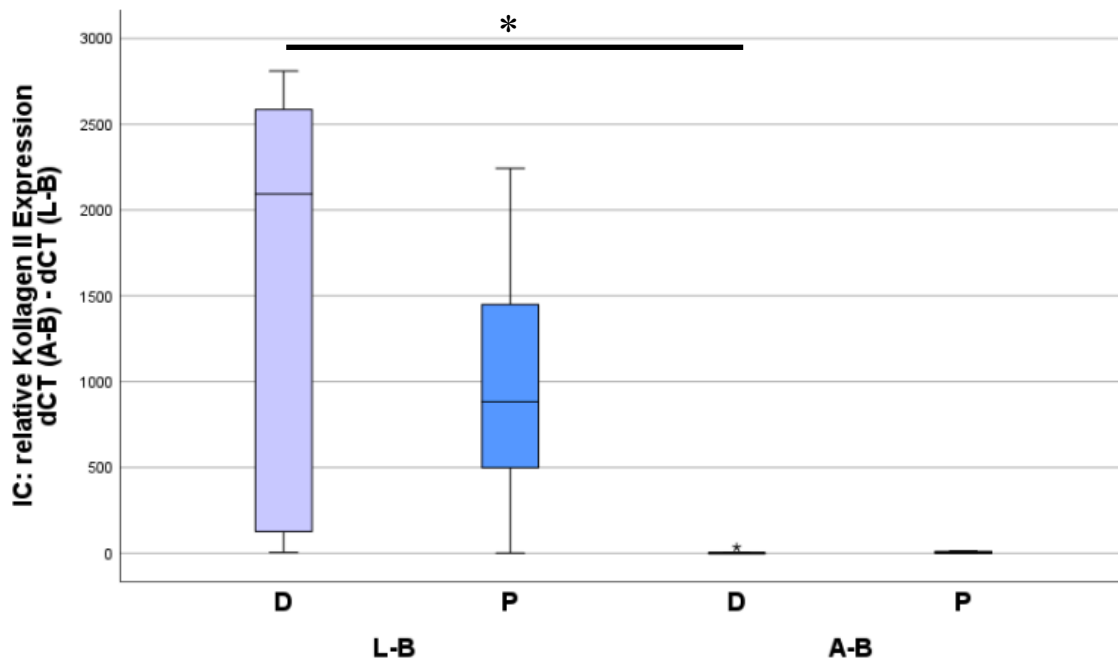


Abb. 30: Relative Col2-Genexpression in der Interface-Chondrophase

Dargestellt ist die relative Col2-Expression in der Interface-Chondrophase. Analog zur Chondrophase wurde auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen A-B und L-B nachgewiesen ($p = 0,024$; Kruskal-Wallis-Test). Die Expression in den distalen Defekten der Gruppe L-B war dabei signifikant höher als im korrespondierenden Bereich der Gruppe A-B ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test).

Sox9

Für den chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox9 wurden signifikante Expressionsmuster vor allem in den chondrogenen Phasen beobachtet. Hochsignifikante Unterschiede konnten in der Chondrophase im globalen Vergleich der Gruppen A-B und L-B ermittelt werden ($p = 0,002$; Kruskal-Wallis-Test). Mittels des paarweisen Vergleichs konnte dieser Unterschied im proximalen Defektbereich lokalisiert werden. Dort wies die A-B-Gruppe eine statistisch signifikant niedrigere Sox9-Expression auf als die L-B-Gruppe ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 31).

In der Interface-Chondrophase zeigten sich komplexere Expressionsmuster. Signifikanzen ergaben sich sowohl im Vergleich zwischen den Gruppen A-B und L-B ($p = 0,004$; Kruskal-Wallis-Test) als auch zwischen den Gruppen L-B und L-OB ($p = 0,039$; Kruskal-Wallis-Test). In den anschließenden paarweisen Analysen konnte festgestellt werden, dass die Sox9-Expression im distalen Defekt der A-B-Gruppe signifikant niedriger war als die der L-B-Gruppe ($p = 0,009$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 32). Gleichzeitig war die Expression im distalen Bereich der L-B-Gruppe signifikant höher als in der L-OB-Gruppe ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 33). Neben diesen gruppenübergreifenden Unterschieden wurde auch innerhalb der L-B-Gruppe eine Diskrepanz hinsichtlich der räumlichen Sox9-Regulation nachgewiesen. So wurde in den distalen Defekten signifikant mehr Sox9 exprimiert als in den proximalen Defekten ($p = 0,047$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur; Abb. 34).

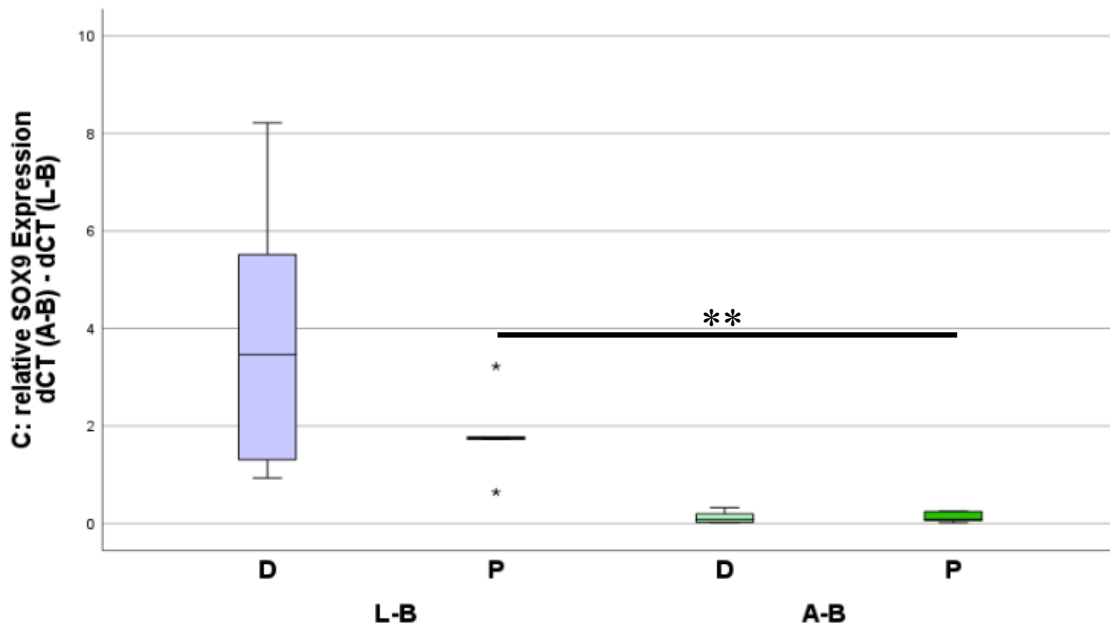


Abb. 31: Relative Sox9-Genexpression in der Chondrophase

Die Box-Whisker-Plots bilden die relative Genexpression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 in der Chondrophase ab. Der Gruppenvergleich zwischen der Gruppe A-B und L-B war hochsignifikant ($p = 0,002$; Kruskal-Wallis-Test). Dieser war auf eine signifikant niedrigere Expression in den proximalen Proben der Gruppe A-B im Vergleich zur Gruppe L-B zurückzuführen ($p = 0,008$; Mann-Whitney-U-Test).

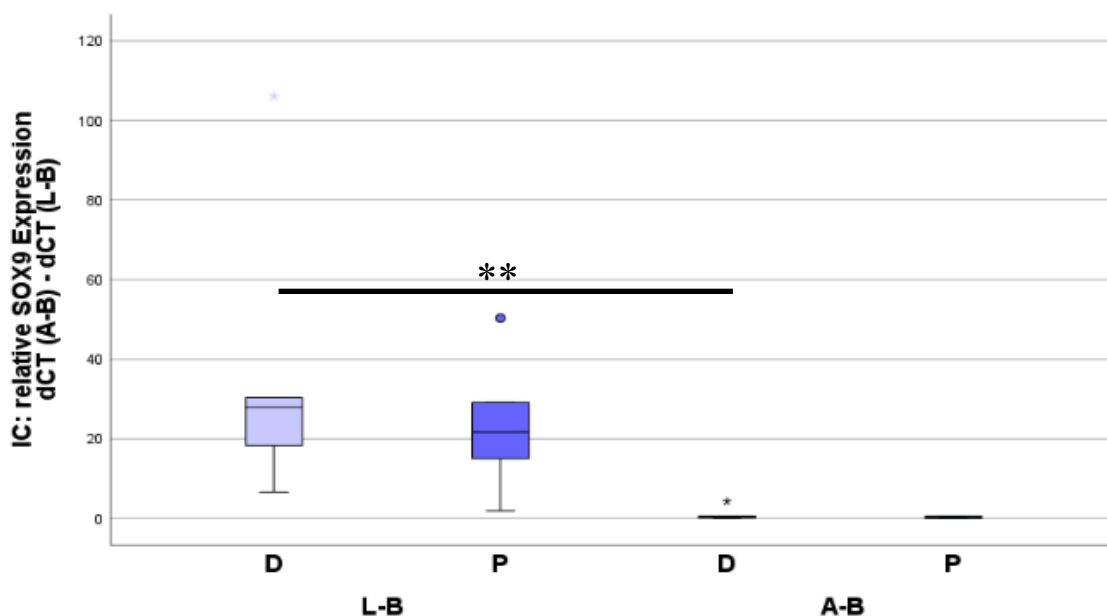


Abb. 32: Relative Sox9-Genexpression in der Interface-Chondrophase (L-B/A-B)

Dargestellt ist die relative Sox9-Genexpression in der Interface-Chondrophase, welche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen A-B und L-B aufwies ($p = 0,004$; Kruskal-Wallis-Test). Die Expression in den distalen Defekten der Gruppe A-B war dabei signifikant niedriger als in den distalen Defekten der Gruppe L-B ($p = 0,009$; Mann-Whitney-U-Test).

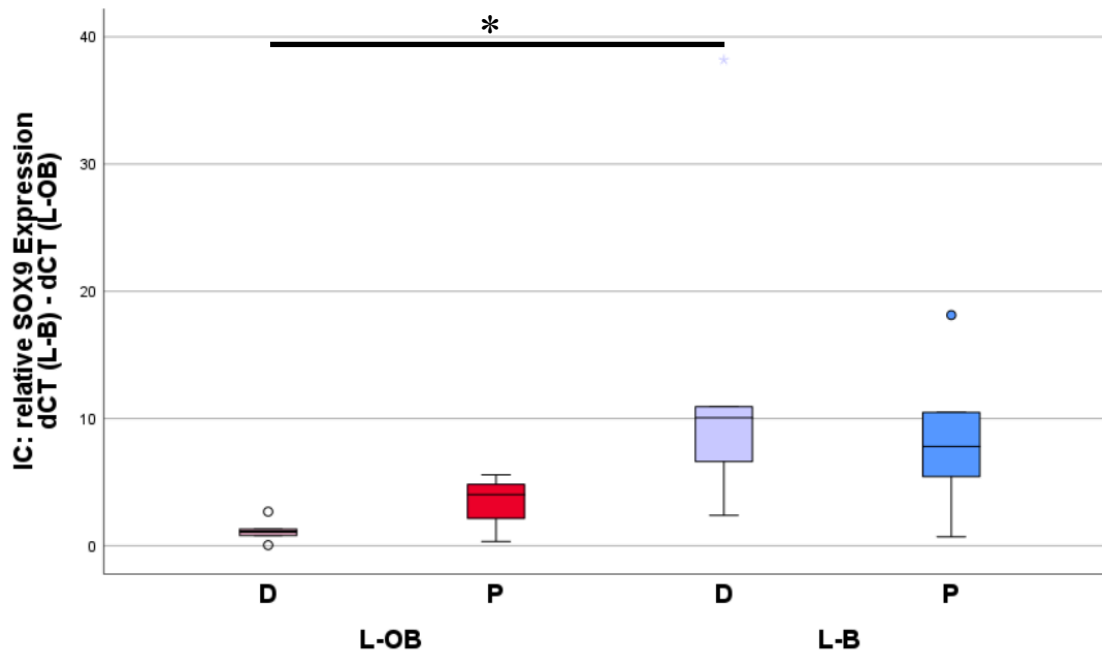


Abb. 33: Relative Sox9-Genexpression in der Interface-Chondrophase (L-OB/L-B)
 Dargestellt ist die relative Sox9-Genexpression in der Interface-Chondrophase, welche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen L-B und L-OB aufwies ($p = 0,039$; Kruskal-Wallis-Test). Die Expression in den distalen Defekten der Gruppe L-B war dabei signifikant höher als in den distalen Defekten der Gruppe L-OB ($p = 0,016$; Mann-Whitney-U-Test).

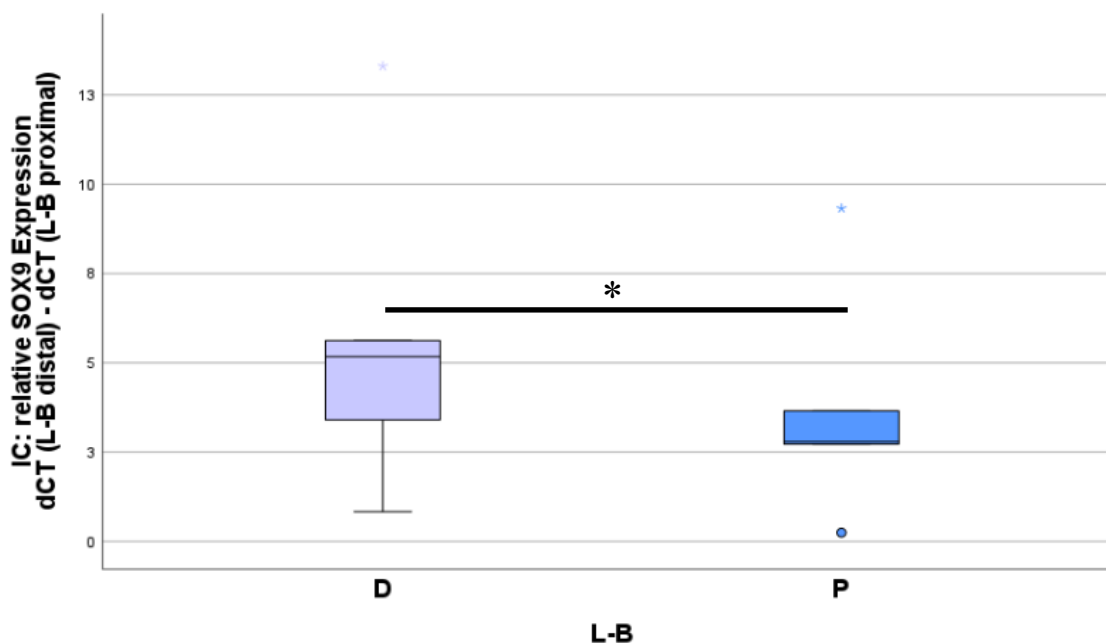


Abb. 34: Sox9-Expression der Interface-Chondrophase innerhalb der Gruppe L-B
 Die Abbildung zeigt die Diskrepanz der Sox9-Expression innerhalb der L-B-Gruppe in der Interface-Chondrophase. Die Expression war in den distalen Proben signifikant höher als in den proximalen Proben ($p = 0,047$; paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur).

Zusammenfassende Übersicht der molekularbiologischen Ergebnisse

Die nachfolgenden Tabellen fassen die signifikanten Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung zusammen. Die Darstellung ist zur besseren Übersicht in osteogene und chondrogene Marker unterteilt. Gezeigt werden jeweils die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) in der Genexpression zwischen den Versuchsgruppen und Implantatpositionen.

Tab. 10: Signifikanzen der osteogenen Marker

<u>Marker</u>	<u>Phase</u>	<u>Vergleich</u>	<u>Signifikantes Ergebnis</u>	<u>p-Wert (Test)</u>
ALP	IO	D vs. P (L-B)	↑ in P	p = 0,047 (paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur)
CtsK	O	L-B vs. L-OB (P)	↓ in L-B vs. L-OB	p = 0,016 (Mann-Whitney-U)
	IO	L-B vs. L-OB (D)	↓ in L-B vs. L-OB	p = 0,016 (Mann-Whitney-U)
Runx2	O	D vs. P (L-B)	↑ in P	p = 0,016 (paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur)
Col1	O	L-B vs. L-OB P)	↓ in L-B vs. L-OB	p = 0,032 (Mann-Whitney-U)
	O	D vs. P (L-B)	↑ in P	p = 0,008 (Mann-Whitney-U)
	O	D vs. P (L-OB)	↑ in P	p = 0,008 (Mann-Whitney-U)
	C	L-B vs. L-OB (P)	↓ in L-B vs. L-OB	p = 0,008 (Mann-Whitney-U)
	IC	D vs. P (L-OB)	↑ in P	p = 0,032 (Mann-Whitney-U)

Tab. 11: Signifikanzen der chondrogenen Marker

<u>Marker</u>	<u>Phase</u>	<u>Vergleich</u>	<u>Signifikantes Ergebnis</u>	<u>p-Wert (Test)</u>
Col2	C	A-B vs. L-B (D)	↓ in A-B vs. L-B	p = 0,045 (Mann-Whitney-U)
	IC	A-B vs. L-B (D)	↓ in A-B vs. L-B	p = 0,016 (Mann-Whitney-U)
Sox9	C	A-B vs. L-B (P)	↓ in A-B vs. L-B	p = 0,008 (Mann-Whitney-U)
	IC	A-B vs. L-B (D)	↓ in A-B vs. L-B	p = 0,009 (Mann-Whitney-U)
	IC	L-B vs. L-OB (D)	↑ in L-B vs. L-OB	p = 0,016 (Mann-Whitney-U)
	IC	D vs. P (L-B)	↑ in D	p = 0,047 (paarweiser Vergleich mit Bonferroni-Korrektur)

4 Diskussion

Die Behandlung osteochondraler Läsionen stellt eine zentrale Herausforderung in der modernen Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Der hyaline Gelenkknorpel bildet mit seiner einzigartigen Struktur die Grundlage der schmerzfreien Gelenkbeweglichkeit. Allerdings besitzt der hyaline Knorpel aufgrund seiner Avaskularität und der geringen Zelldichte nur eine sehr limitierte intrinsische Heilungskapazität (Buckwalter und Mankin 1998b). Einmal entstandene Knorpeldefekte regenerieren daher oftmals nicht vollständig. Selbst kleinste Läsionen können unbehandelt im Verlauf zu chronischen Schmerzen mit fortschreitender Gelenkdegeneration bis hin zum Vollbild einer manifesten Arthrose führen (Schinhan et al. 2012). Typische Ursachen osteochondraler Läsionen sind beispielsweise degenerative Prozesse, rheumatisch-entzündliche Erkrankungen oder Traumata jeglicher Genese (Heir et al. 2010). Dies wirkt sich nicht nur negativ auf die Lebensqualität der betroffenen Patienten aus, sondern stellt durch die hohen direkten und indirekten Behandlungskosten auch eine erhebliche sozioökonomische Belastung für die weltweiten Gesundheitssysteme dar (Hunter und Felson 2006; Steinmetz et al. 2023).

Die aktuellen operativen Therapieverfahren versuchen, diese Problematik auf unterschiedlichen Wegen zu adressieren. Jedoch weisen alle bisherigen Verfahren spezifische Nachteile auf und führen häufig zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Knochenmarkstimulierende Techniken wie die Mikro- oder Nanofrakturierung sind zwar technisch einfach und kostengünstig, resultieren jedoch überwiegend in der Bildung biomechanisch minderwertigen Faserknorpels. Neben den biomechanischen Eigenschaften ist zudem die zeitliche Haltbarkeit des Faserknorpels deutlich eingeschränkt, insbesondere bei größeren Defekten und höherer Belastung (Bae et al. 2006). Dagegen ermöglichen autologe osteochondrale Transplantationen zwar den Transfer von hochwertigem hyalinen Knorpel, allerdings sind diese durch eine signifikante Entnahmemorbidität und die begrenzte Verfügbarkeit von Spenderarealen limitiert. Diese Problematiken ergeben sich bei zellbasierten Therapien wie der ACT zwar nicht, dafür sind zellbasierte Therapien wiederum logistisch aufwendig, kostenintensiv und erfordern zwei operative Eingriffe mit jeweiligen Operations- und Anästhesierisiken.

Aufgrund der klinischen Notwendigkeit wurden neue Verfahren mit dem Ziel entwickelt, innovative biologische und funktionelle Alternativen zu schaffen. Es entstand das Tissue

Engineering als modernes, hochdynamisches Forschungsfeld (Langer und Vacanti 1993). Ziel des Tissue Engineering ist die interdisziplinäre Entwicklung biologischer Ersatzgewebe zur Regeneration und Wiederherstellung geschädigter Gewebestrukturen. Dabei werden biokompatible Trägermaterialien und wachstumsfördernde Faktoren kombiniert, um die körpereigenen Heilungsprozesse ohne die Nachteile der herkömmlichen Verfahren zu unterstützen (O'Brien 2011).

Dieser vielversprechende Lösungsansatz im Rahmen der herausfordernden Behandlung osteochondraler Läsionen ist das Kernelement der vorliegenden Arbeit. Diese positioniert sich innerhalb des wissenschaftlichen Spannungsfeldes rundum biotechnologische Therapieansätze bei Knochen-Knorpel-Defekten und evaluiert die Verwendung monolithischer, biphasischer Polymerimplantate sowie einer bioaktiven Kollagenfüllung. Hergestellt wurden die Implantate in einem laserassoziierten 3D-Druckverfahren mittels hochpräziser Zwei-Photonen-Polymerisation. Die Zwei-Photonen-Polymerisation ermöglicht die Kontrolle über die Makro- und Mikroarchitektur zur Produktion einer nahtlosen Verbindung der porösen Knochenphase und der kanalikulären Knorpelphase. Konkret war das Ziel der Studie, die grundsätzliche Eignung der neu entwickelten Polymerimplantate aus unterschiedlichen Materialien im klinisch hochrelevanten Großtiermodell am Schaf zu untersuchen. Verglichen wurde der Regenerationseffekt in Abhängigkeit der verwendeten Polymere LCM3 und ACM sowie des Kollagen-Biogels. Zur Evaluation des Knochen- und Knorpel-Phänotyps wurden anerkannte sowie neu entwickelte makroskopische Scores herangezogen und molekularbiologische Analysen zur funktionellen Analyse des gebildeten Regeneratgewebes genutzt. Das Schaf wurde als Tiermodell gewählt, da es in der orthopädisch-unfallchirurgischen Forschung gut etabliert ist. Schafe weisen ähnliche Gewichtsverhältnisse, eine ähnliche Belastung der Kniegelenke, eine ähnliche Knorpeldicke und eine ähnliche Größe des „critical size defects“ auf (Meng et al. 2020; Moran et al. 2016). Mit einem gewählten Alter der Tiere zwischen drei bis sieben Jahren wurde sichergestellt, dass die Schafe knochenadult sind. Dadurch konnten wachstumsbedingte Überlagerungseffekte ausgeschlossen werden (Meng et al. 2020).

4.1 Diskussion der makroskopischen und molekularbiologischen Diskrepanz

In der Gesamtauswertung dieser Arbeit zeigte sich eine deutliche Diskrepanz der makroskopischen und molekularbiologischen Ergebnisse. Diese Diskrepanz der Ergebnisse dominiert als wissenschaftliches Leitmotiv den Hauptbestandteil der Diskussion. Auf makroskopischer Ebene offenbarte sich nach dem dreimonatigen Untersuchungszeitraum zunächst ein primär positives Bild. Insgesamt erschien die Gelenkoberfläche aus chirurgischer Perspektive zufriedenstellend wiederhergestellt. Die überwiegende Zahl der entnommenen Defektproben ergab eine optisch gute Regeneration mit der Bildung eines weißlichen, knorpelartigen Ersatzgewebes. Dies spiegelte sich in einem durchschnittlich „fast normalen“ Erscheinungsbild gemäß dem ICRS-Score wider (Grad II). Allerdings konnten im statistischen Vergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Implantatgruppen oder den verschiedenen Implantatlokalisationen festgestellt werden.

Die alleinige morphologische Wiederherstellung der Gelenkkontur ist jedoch kein hinreichender Prädiktor für die funktionelle Heilung. Die tatsächliche Qualität des Gewebes und ob es sich um biomechanisch minderwertigen Faserknorpel oder qualitativ hochwertigen hyalinen Knorpel handelt, wird erst auf molekularer und zellulärer Ebene deutlich.

Die molekularbiologische Analyse der Genexpression mittels real-time RT-PCR und Blick auf die zellulären Prozesse lieferte ein weitaus differenzierteres Bild. Es zeigten sich signifikante, teils kontraintuitive Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen sowohl für die Lokalisation als auch die Art der verwendeten Implantate. Diese Differenzen offenbarten, dass fundamentale, regenerative Prozesse unsichtbar unter der makroskopisch sehr ähnlichen Gelenkoberfläche ablaufen und gründliche molekularbiologische Analysen essenziell für eine sichere Interpretation der Ergebnisse sind.

4.2 Einordnung der makroskopischen Ergebnisse

Die makroskopische Evaluation diente in dieser Arbeit als primäres Instrument zur Beurteilung der morphologischen Defektheilung. Zur Objektivierung wurden mit dem mod. ICRS-Score und dem mod. Score nach Wayne et al. (2005) zwei etablierte Bewertungssysteme herangezogen. Beide Scores sind in der präklinischen Knorpelforschung weit

verbreitet. Ihre Relevanz zur objektiven Beurteilung der Defektregeneration für verschiedene Tiermodelle wird durch zahlreiche Studien belegt und ermöglicht einen guten Vergleich mit anderen Arbeiten (Nguyen-Thanh et al. 2022; Niu et al. 2023; Yilmaz et al. 2025). Aussagekräftig sind die Scores vor allem für die Beurteilung der Oberflächenintegrität, der Defektauffüllung und der Integration zum umliegenden Gewebe. Für die spezifische Frage nach der Implantatsinterung wurde ein eigener Score entwickelt, welcher die Höhendifferenz der Implantate zum umliegenden Knorpelgewebe abbildet. Insgesamt erwies sich der ICRS-Score als am besten geeignet, um einen globalen Überblick über den Regenerationsgrad zu erhalten, während der mod. Score nach Wayne et al. (2005) eine gute Aussage über die Oberflächenqualität und das Aussehen des neu gebildeten Ersatzgewebes erlaubte.

Basierend auf diesen Scores konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Implantatgruppen nachgewiesen werden. Dies unterstreicht eine zentrale Limitation der rein makroskopischen Beurteilung. Die hohe biologische Varianz im Großtiermodell und die subjektiven Komponenten der Scores erschweren den Nachweis echter Unterschiede bei kleinen Gruppengrößen. Dennoch zeigten sich deskriptive Tendenzen: Die distalen ACM-Implantate der Gruppe A-B erzielten im mod. ICRS-Score und im mod. Score nach Wayne et al. (2005) die höchsten Durchschnittswerte aller Untergruppen. Dies deutet darauf hin, dass das ACM mit der Biogelfüllung unter Belastung makroskopisch die vielversprechendste Regeneration einer glatten, gut integrierten Knorpeloberfläche fördert. Im Vergleich dazu zeigten die LCM-Implantate mit der Biogelfüllung eine größere Streuung und im Mittel eine als „pathologisch“ einzustufende Regeneration.

Diese Ergebnisse müssen im Kontext der generellen Herausforderungen des osteochondralen Tissue Engineerings betrachtet werden. Wie ein Übersichtsartikel von Niu et al. (2023) zeigt, bleibt die vollständige Regeneration von hyalinem Knorpel mit nahtloser Integration und angepassten biomechanischen Eigenschaften die größte Hürde bei der Entwicklung neuer Implantate (Niu et al. 2023). Vor diesem Hintergrund sind die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate als positiv zu bewerten. Andere Arbeitsgruppen, die den ICRS-Score im Schafmodell nach zwölf Wochen anwendeten, kamen zu vergleichbaren Ergebnissen für zellfreie Scaffolds. Beispielsweise erreichten Yilmaz et al. (2025) für ihre zellfreien Kontrollgruppen ebenfalls Ergebnisse einer „fast normalen“ Defektregeneration (Yilmaz et al. 2025). Die zeitabhängige Dynamik der Heilung wird

durch Studien mit kürzeren Beobachtungszeiträumen untermauert. So stellten Nguyen-Thanh et al. (2022) in einem Kaninchenmodell einen signifikanten Anstieg des ICRS-Scores von 2,3 nach zwei Wochen auf 5,3 nach sechs Wochen dar (Nguyen-Thanh et al. 2022). Die in unserer Arbeit beobachteten Heilungsergebnisse scheinen also im erwartbaren Rahmen für einen dreimonatigen Beobachtungszeitraum zu liegen. Die große Varianz innerhalb der Gruppen ist dabei ebenfalls ein wiederkehrendes Thema in der Literatur und unterstreicht die Herausforderung präklinischer Großtierstudien.

4.3 Einordnung der molekularbiologischen Ergebnisse

Im Gegensatz zur makroskopischen Analyse lieferte die molekularbiologische Auswertung ein deutlich differenzierteres Bild der zellulären Prozesse und erlaubt eine detailliertere Interpretation der Implantateignung.

Hinsichtlich der Knorpelregeneration erwies sich das LCM-Implantat mit Biogel als überlegen. Die signifikant höhere Expression von Col2 und Sox9 als Schlüsselmarker für hyalinen Knorpel wiesen im Vergleich zur ACM-Gruppe auf eine stärkere chondrogene Differenzierung hin. Das durch den LCM-Abbau entstehende, leicht saure Milieu scheint also tatsächlich einen chondroinduktiven Stimulus darzustellen. Zudem zeigte sich innerhalb dieser Gruppe eine klare Überlegenheit der distal platzierten Implantate im Vergleich zu den proximal platzierten Scaffolds, was sich in einer signifikant höheren Expression von Col2 und Sox9 manifestierte. Insgesamt suggerieren die Ergebnisse, dass das LCM-Polymer mit dem Biogel sein chondroinduktives Potenzial am besten unter mechanischer Belastung entfalten könnte.

In Bezug auf die osteogene Aktivität ergibt sich ein komplexeres Bild. Die Osteoblastenmarker Runx2 und ALP wurden in den proximalen Implantaten der Gruppe L-B am stärksten exprimiert. Womöglich unterstützt das kollagenhaltige Biogel die osteogene Differenzierung in einem mechanisch ruhigeren Umfeld also am effektivsten.

Im Kontext des Knochenbaus und damit der Osteoklastenaktivität demonstrierten die Daten einen klaren Vorteil für die Verwendung des Biogels. Die Expression des Resorptionsmarkers CtsK war in der LCM-Gruppe ohne Biogel signifikant höher als in der

Gruppe mit Biogel. Dies legt nahe, dass der Kollagenfiller nicht nur die Knochenneubildung fördert, sondern gleichzeitig den Knochenabbau hemmt und somit ein günstiges Milieu für die Osseointegration schafft.

Dabei stellen die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Marker fest etablierte und validierte Zielgene zur Charakterisierung von Knorpel- und Knochengewebe in der muskuloskelettalen Forschung dar. Andere Arbeitsgruppen, welche ebenfalls osteochondrale Defekte im Großtiermodell untersuchten, haben sich auf selbige Schlüsselmarker fokussiert und deren Relevanz bestätigt. So nutzten beispielsweise auch Levingstone et al. (2016) Col2 und Col1, um zwischen hyalinem Knorpel und Faserknorpel zu differenzieren (Levingstone et al. 2016). Ähnlich validierte eine Arbeit von Adams und Cottrell (2024) ein osteochondrales 3D-Modell unter anderem durch den Nachweis von ALP, Runx2, Col1, Col2 und CtsK (Adams und Cottrell 2024). Die Notwendigkeit zur molekularbiologischen Analyse mit den verwendeten Zielgenen wird in aktuellen Übersichtsartikeln wie dem von Niu et al. (2023) bekräftigt. Sie betonen, dass eine Evaluation von osteochondralen Scaffolds zwingend Schlüsselmarker für die Chondrogenese (z. B. Col2 und Sox9) und für die Osteogenese (z. B. Runx2 und ALP) umfassen muss, um die Qualität beider Gewebephasen adäquat beurteilen zu können (Niu et al. 2023). Daraus lässt sich die Eignung unseres Marker-Panels zur simultanen Beurteilung von Osteogenese, Chondrogenese und Knochenumbau ableiten.

4.4 Die Rolle der subchondralen Knochenphase

Das primäre Ziel jeder osteochondralen Defektregeneration ist die stufenfreie Wiederherstellung einer funktionell belastbaren Gelenkfläche. Eine Grundvoraussetzung dafür ist eine stabile Verankerung und nahtlose Integration des Implantats im umliegenden subchondralen Knochen. Der artikuläre Knorpel und der subchondrale Knochen müssen als eine funktionelle Einheit betrachtet werden. Beide Gewebe stehen in einem permanenten biochemischen und biomechanischen Austausch. Somit bedingt die Intaktheit des einen Gewebes unmittelbar den Zustand des anderen. Defekte in einer Schicht resultieren im zeitlichen Verlauf somit häufig in Defekten der gesamten Gelenkfläche. Ursachen für solche Defekte können einerseits pathologische Prozesse, wie z. B. Arthrose mit Zystenbildung oder subchondrale Sklerosierung, sein, aber auch instabil sitzende Implantate oder unzureichende Defektregenerationen des subchondralen Knochens.

Ein relevanter Faktor ist dabei die Wahl eines Materials mit adäquaten Materialeigenschaften. Dieses Problem konnte unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Arbeit bereits eindrücklich nachweisen. Schleicher et al. (2013) verwendeten in einem Schafmodell ein biphasisches Implantatgerüst aus synthetischem HA und Kollagen. Dieses Gerüst führte nach sechs Wochen bereits zu einem deutlichen Sintern der Gelenkfläche, da keine ausreichende subchondrale Integration erreicht wurde. Im Gegensatz dazu hielt ein vergleichbares Gerüst auf der Basis von allogenen Knochen die Gelenkfläche stabil. Die Ergebnisse von Schleicher et al. (2013) untermauern, dass die Materialwahl der Knochenphase entscheidend für die Integration des Knochens und damit für die Stabilität des gesamten Implantats sowie den Erhalt der Gelenkfläche ist (Schleicher et al. 2013). Dabei ist es von größter Bedeutung, dass das Implantat nicht degradiert, bevor die knöcherne Konsolidierung der Osteophase abgeschlossen ist. Ausschlaggebend dafür ist die Degradationsgeschwindigkeit des Materials. Diese war in der vorliegenden Arbeit über das Caprolacton bestimmbar. Sie wurde so gewählt, dass sich vor dem Abbau eine stabile Knochenphase als Grundlage für eine stufenlose Gelenkfläche bilden sollte.

Ein weiterer entscheidender Parameter des Materials ist das Elastizitätsmodul. Dieses ist eine materialspezifische Angabe für den Widerstand eines Materials gegen elastische Verformung und quantifiziert dessen Steifigkeit (Jepsen et al. 2015). Das Versagen eines Implantats kann auf ein Missverhältnis des Elastizitätsmoduls zum umgebenden Knochen zurückgeführt werden. Dadurch kann es zu Mikrobewegungen zwischen dem Implantat und dem Knochen kommen, welche die Osseointegration negativ beeinflussen.

Die monolithischen 3D-gedruckten Implantate in der aktuell vorliegenden Arbeit wurden unter anderem anhand der damaligen Ergebnisse weiterentwickelt und explizit an die jeweilige Gelenkzone angepasst. So wurden verschiedene Phasengeometrien mit entsprechend angepasstem Elastizitätsmodul verwendet. Insbesondere im Randbereich der Implantate wurde die Schwarz-P-Struktur verdickt und das Elastizitätsmodul erhöht, was die biomechanische Stabilität erhöhte und dem Ausgleich mechanischer Belastungen dient. Im zentralen Bereich des Gerüsts ist das Elastizitätsmodul hingegen dem spongiösen Knochen angepasst worden und fällt daher geringer aus. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Phasengeometrie sind die interkonnektierenden Poren mit gewebspezifischer Porengröße, um eine optimale Zellintegration zu gewährleisten. Die Poren im randständigen Bereich weisen dabei eine geringere Größe auf als die zentral liegenden Poren.

Diese gewebspezifische Abstimmung resultierte in einer guten mechanischen Primärstabilität. Nach drei Monaten war in der makroskopischen Gesamtschau kein starkes Einsinken der Implantate zu beobachten.

Maßgeblichen Anteil daran hatte der innovative Produktionsprozess. Die verwendete Zwei-Photonen-Polymerisation bietet entscheidende Vorteile gegenüber traditionellen Herstellungsmethoden. Kernparameter der Mikroarchitektur wie Porengröße, Porosität und Interkonnektivität der Poren sind präzise kontrollier- und adjustierbar. So ist die Produktion biomimetischer Gerüste mit graduierten mechanischen Eigenschaften möglich, die den Übergang des steifen subchondralen Knochen zum elastischeren Gelenkknorpel optimal imitieren. Diese Graduierung der Strukturen minimiert Stress-Shielding-Phänomene und Spannungsspitzen, welche vor allem im Bereich der Interface-Zone bei schichtweise zusammengesetzten Implantaten zur Delaminierung führen können. Stress-Shielding ist in diesem Kontext ein bedeutsamer Prozess, welcher auch im Rahmen anderer Implantate wie beispielsweise Endoprothesen beobachtet wird. Entsprechend dem Wolffschen Gesetz passt sich das Knochengewebe an die einwirkende Belastung an. Wird die Belastung auf den Knochen reduziert, weil ein steiferes Material die Kraft abschirmt und nicht angemessen überträgt, bleibt der Belastungsreiz für den Knochenumbau aus. Die Knochendichte nimmt folglich ab, wodurch die suffiziente Verankerung des Implantats im Knochen beeinträchtigt wird (Zhang et al. 2022; Wik et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die hergestellten Polymergerüste in zwei Gruppen um ein kollagenhaltiges Hydrogel ergänzt. Der alleinige Einsatz von Hydrogelen war bisher nicht erfolgreich. Problematisch gestaltete sich auch hier die knöcherne Regeneration als Basis der stabilen Verankerung. Filardo et al. (2018) untersuchten die Eignung eines biphasischen Alginat-Gerüsts im Schafmodell. Nach sechs Monaten stellten sie zwar eine gute Biokompatibilität in der Knorpelphase fest, eine vollständige Knochenneubildung und zügige Resorption des Implantatgerüsts in der Knochenphase blieb allerdings aus (Filardo et al. 2018). Weiche Materialien wie Alginat besitzen nicht die notwendige Oberflächenchemie und mechanische Steifigkeit, um eine schnelle, robuste Osseointegration in einem hochbelasteten Gelenk zu erzielen. Ähnliches geht aus einer Arbeit von Jiang et al. (2007) hervor. Diese beschrieben die Einheilung eines PLGA-basierten Kompositgerüsts in einem porcinen Großtiermodell. Auch in dieser Arbeit blieb die knöcherne Integration nach sechs Monaten noch unvollständig (Jiang et al. 2007). Beide Studien

verdeutlichen die generelle Herausforderung eine zügige, robuste Osseointegration mithilfe rein synthetischer Werkstoffe zu erzielen. Die geschaffene mechanisch-stabile Basis durch die in unserer Arbeit verwendeten 3D-gedruckten Polymere ist somit eine essenzielle und nicht-triviale Voraussetzung, ohne welche die darauffolgende, noch komplexere Knorpelregeneration nicht zielführend ist.

Einen entscheidenden Vergleichsmaßstab für die knöchernen Integration von LCM-Scaffolds liefern die Ergebnisse von Kamleitner et al. (2020) in ihrem murinen Kalvarien-Defektmodell. Dort zeigte sich nach 12 Wochen noch keine signifikante Knochenneubildung innerhalb der LCM-Poren. Stattdessen konnte primär eine Infiltration mit lockerem Bindegewebe und Entzündungszellen beobachtet werden (Kamleitner et al. 2020). Dies deutet darauf hin, dass die Osseointegration in Polymermaterialien auch in weniger komplexen Defektmodellen einen längeren Zeitraum als drei Monate beansprucht. Besonders relevant erscheint die Beobachtung, dass die Degradationsrate des LCM-Copolymers ein kritischer Parameter für das Outcome ist. Die am schnellsten degradierende Variante induzierte im Vergleich zu den langsamer abbaubenden Varianten eine stärkere Entzündungsreaktion und führte zu einer schlechteren Knochenheilung. Es scheint also ein optimales Degradationsfenster zu existieren. Ein Scaffold muss langsam genug degradieren, um die mechanische Stabilität gewährleisten und eine starke Entzündungsreaktion durch saure Abbauprodukte verhindern zu können. Gleichzeitig muss es sich schnell genug abbauen, um Raum für die einwachsende Knochenmatrix zu schaffen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, tendenziell bessere makroskopische Integration der ACM-Implantate, deren Degradation zu keiner lokalen Azidose führt, stützt diese Hypothese (Hauptmann et al. 2022). Zudem unterstreicht sie die Bedeutung eines physiologisch neutralen Abbauprofiles für eine störungsfreie Osseointegration.

Dazu bieten Yilmaz et al. (2025) mit ihrer Studie einen weiteren wichtigen Kontext, indem sie Materialien mit inhärenter Osteoinduktivität untersuchten. Die Knochenphase ihrer Scaffolds bestand dabei aus einem Komposit aus PLGA und HA. Die Integration des HA ist eine bereits etablierte Strategie zur Verbesserung der osteoinduktiven Eigenschaften von Biomaterialien (Yilmaz et al. 2025). Im Vergleich zum reinen Polymeransatz der vorliegenden Arbeit könnte die Beimischung einer keramischen Phase die Anlagerung und Differenzierung von Osteoblasten an der Implantatoberfläche beschleunigen und die Mineralisierung der Matrix fördern. Zukünftige Entwicklungen könnten daher

auf die Integration von nano-HA-Partikeln in die Knochenphase der Scaffolds abzielen, um die osteoinduktiven Eigenschaften zu verbessern und gleichzeitig die Osseointegration zu beschleunigen. Dieser Ansatz konnte bereits erfolgreich für Hydrogele demonstriert werden und könnte die biologische Qualität der untersuchten Implantate weiter steigern (Felfel et al. 2018).

4.5 Der Einfluss biologischer Faktoren

Das in dieser Arbeit gewählte Konzept der Defektreparatur fußt auf einer In-situ-Regeneration. Dieses Prinzip zielt darauf ab, körpereigene regenerative Prozesse zu fördern. Die zellfreien Implantatgerüste besitzen die benötigten biochemischen und topografischen Eigenschaften, um endogene MSC aus dem eröffneten Knochenmark zu rekrutieren, deren Anheftung zu fördern und ihre chondrogene Differenzierung einzuleiten. Zentraler Bestandteil dieses Ansatzes ist die bioaktive Füllung des Implantatlumens mit einem Kollagengel.

Die Daten unserer molekularbiologischen Analyse der Defekte nach drei Monaten lassen einen entsprechenden Effekt des Kollagen-Hydrogels erkennen. Im direkten Vergleich der Gruppe L-B mit Kollagengel und L-OB ohne Kollagenfüllung stellt sich eine signifikant gedämpfte Expression des Osteoklastenaktivitätsmarkers CtsK dar. Gleichzeitig ist die Expression der osteogenen Marker wie Runx2 und ALP tendenziell erhöht. Die Ergebnisse legen nahe, dass durch die Anwendung des Hydrogels ein anaboles Milieu geschaffen wird, welches eine Knochenneubildung begünstigt und den Knochenabbau hemmt. Das Kollagen nimmt dabei keine passive Platzhalterrolle ein, sondern fungiert als bioaktive Matrix. Es imitiert die EZM und stellt Bindungsstellen für die MSC bereit. Bei diesen spezifischen Bindungsstellen handelt es sich um Sequenzen, wie die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD-Sequenz), welche als Bindungspartner für die Integrinrezeptoren auf der Oberfläche der MSC dienen. Kommt es zur Interaktion einer RGD-Sequenz mit einem Integrinrezeptor einer MSC stellt dies ein aktives Signal für die Adhäsion, die Differenzierung und das Überleben der Zelle dar, wie eine Übersichtsarbeit von Wang et al. (2025) anschaulich darstellt (Wang et al. 2025). Bereits 2010 konnten Re'em et al. (2010) die zentrale Rolle der RGD-Sequenzen bei der Stimulation der Chondrogenese von MSC auf Kollagengerüsten nachweisen (Re'em et al. 2010). Auch Parmar et al. (2017) konnten eine signifikant erhöhte Col2-Expression durch den Einfluss

der RGD-Sequenzen belegen (Parmar et al. 2017). Die hochhydratisierte Gelstruktur kann bei diesem Prozess zusätzlich als Reservoir für endogene Wachstumsfaktoren dienen und diese lokal konzentrieren, wodurch die regenerative Kaskade verstärkt wird. Bei den endogenen Wachstumsfaktoren handelt es sich unter anderem um TGF- β und PDGF, welche aus dem initial gebildeten Blutkoagulum freigesetzt werden (Re'em et al. 2010; Parmar et al. 2017).

Alternative Strategien sind der Einsatz von bioinstruktiven Gerüsten, welche nicht nur eine optimale strukturelle Grundlage für das Einwandern von Wachstumsfaktoren bieten, sondern bereits mit potenten Wachstumsfaktoren und -zellen vorbeladen sind. Diese Strategie verfolgten beispielsweise Dai et al. (2023) mit einem 3D-gedruckten Hydrogel aus Hyaluronsäure und Gelatine, das an die EZM angelehnt war. Beladen wurde das Hydrogel gezielt mit knorpel- und knochenspezifischen Stimulanzen sowie adipogenen Stammzellen. Konkret wurde das Hydrogel mit Kartogenin und dem Bone Morphogenetic Protein-2 beladen. Damit zeigte sich im Kaninchenmodell nach 12 Wochen eine sehr gute Defektregeneration mit qualitativ hochwertigem hyalinem Knorpel (Dai et al. 2023).

Zwar offenbart dieses Beispiel das enorme Potenzial der gezielten Funktionalisierung von Scaffolds, allerdings birgt dieser Ansatz erhebliche translationale Hürden. Mit der Verwendung exogener Zellen und rekombinanter Wachstumsfaktoren wird eine Klassifizierung als „Arzneimittel für neuartige Therapien“ nötig. Dies bedingt wiederum immense regulatorische Auflagen und Kosten. Folglich ist ein zellfreier In-situ-Ansatz, welcher als reines Medizinprodukt klassifiziert werden kann, klinisch schlichtweg deutlich schneller und einfacher realisierbar.

Auch Yilmaz et al. (2025) verglichen den Einsatz zellbesiedelter und zellfreier Scaffolds miteinander. Ihre Ergebnisse sind für die klinische Translation von großer Bedeutung. Während zellbesiedelte Scaffolds in der frühen Heilungsphase nach vier und acht Wochen tendenziell bessere morphologische Ergebnisse zeigten, wiesen zellfreie, einschichtige Scaffolds in der späten Heilungsphase nach 12 Wochen eine signifikante Überlegenheit hinsichtlich der angewendeten Scores auf (Yilmaz et al. 2025). Dies legt nahe, dass die Rekrutierung endogener Stammzellen eine robustere, nachhaltigere Regenerationsstrategie darstellen könnte als die Verwendung von in-vitro-kultivierten, nachträglich auf das Scaffold aufgebrachten Zellen. Die kontinuierliche Einwanderung von Wirtszellen ermöglicht einen langanhaltenden regenerativen Prozess, wohingegen die Vitalität sowie

Funktionalität von laborgezüchteten Zellen nach der Implantation im In-vivo-Milieu abnehmen können. Aus diesem Ergebnis lässt sich die klinische Relevanz von einzeitig und standardisiert-produzierten, zellfreien Implantaten ableiten, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Perez-Carro et al. (2021) konnten die Umsetzbarkeit und den Erfolg solcher zellfreien Ansätze bereits klinisch nachweisen. Sie beschrieben den erfolgreichen Einsatz eines zellfreien Kollagen-I-Gels, dem ChondroFiller, zur Behandlung von Knorpeldefekten des Hüftgelenks. Das Gel fungierte dabei als Stabilisator des durch die Defektpräparation entstehenden, stammzellreichen Blutkoagulums und förderte die organisierte Zelleinwanderung sowie -differenzierung (Perez-Carro et al. 2021). Dieses Prinzip ist direkt auf die Funktion des Kollagenfillers der vorliegenden Studie übertragbar. Die Weiterentwicklung solcher Füllmaterialien bis hin zu bioaktiven Hydrogelen stellt eine vielversprechende Perspektive dar. So konnten Poly-D,L-lactide-co- ϵ -caprolacton-Scaffolds (PLDL) bereits mit einem Seide-Elastin-ähnlichen Rekombinamer-Hydrogel imprägniert werden, welches als Matrix dient und zusätzlich mit osteoinduktiven Faktoren wie nano-HA beladen werden kann (Felfel et al. 2018). Die Kombination der vorliegenden hochpräzisen Scaffoldarchitektur mit solch einem bioinstruktiven Hydrogel könnte die Rekrutierung und Differenzierung endogener Zellen weiter verbessern. Gleichzeitig könnten die regenerativen Ergebnisse weiter optimiert werden, ohne die Vorteile des zellfreien Ansatzes aufzugeben.

4.6 Chondroinduktives saures Milieu?

Eine weitere zentrale Erkenntnis dieser Arbeit ist das Ergebnis des Polymervergleichs. Die ursprüngliche Hypothese beinhaltete, dass die ACM-Implantate den LCM-Implantaten überlegen sein müssten. Dies ging auf die potenziell gewebefreundlichere Degradation der ACM-Implantate über Aminosäuren statt über Milchsäure wie bei den LCM-Implantaten zurück. Jedoch konnte diese These weder durch die makroskopischen noch durch die molekularbiologischen Daten belegt werden. Stattdessen wies die LCM-Gruppe sogar eine signifikant höhere Expression der für die Bildung von hyalinem Knorpel relevanten Schlüsselmarker Col2 und Sox9 auf.

Auf den ersten Blick erscheint dieses Ergebnis paradox. Allerdings gibt es wissenschaftliche Ansätze, die eine neue Sichtweise auf die Rolle des Lactats erlauben. Ursprünglich wurde Lactat als reines Stoffwechselprodukt angesehen, welches in der Muskulatur im Rahmen der anaeroben Glykolyse entsteht (Brooks 2018; Robergs et al. 2004). Heutzutage wird das Lactat zunehmend als aktives Signalmolekül verstanden. Hyaliner Gelenkknorpel existiert physiologischerweise in einem leicht sauren, hypoxischen Milieu. Der Energiebedarf wird über die anaerobe Glykolyse gedeckt. Die Zellen des hyalinen Knorpels sind somit ideal an die sauren Bedingungen angepasst. Außerdem konnte eine Arbeit von Markway et al. (2010) bestätigen, dass ein hypoxisches Milieu die hypertrophe Differenzierung hemmen kann (Brooks 2018; Markway et al. 2010; Zhang et al, 2016). Dabei ist insbesondere die Hemmung der hypertrophen Differenzierung ein entscheidender Aspekt, da die Hypertrophie häufig zu einer Ossifizierung und damit im Verlauf zu einem Versagen des Regenerats führt.

Es erscheint daher plausibel, dass die Freisetzung des Lactats beim Abbau des LCM-Gerüsts zur Nachahmung dieses spezifischen Mikromilieus des Knorpels beiträgt. Für einwandernde MSC könnte daraus ein Stimulus für die chondrogene Differenzierung resultieren. Maßgeblich an diesem Prozess beteiligt ist der Hypoxie-induzierbare Faktor 1-alpha (HIF-1 α). HIF-1 α wird unter hypoxischen Bedingungen, wie sie bei hoher Lactatkonzentration entstehen, stabilisiert und agiert als Transkriptionsfaktor. Dabei ist er unter anderem für die Aktivierung der chondrogenen Schlüsselmoleküle wie Sox9 verantwortlich. HIF-1 α fungiert somit als wichtiger Regulator der Knorpelhomöostase und ist essenziell für das Überleben der Knorpelzellen sowie die Aufrechterhaltung der Matrixproduktion (Pfander et al. 2006; Zhang et al. 2016).

Experimentelle Arbeiten stützen diese Hypothese zusätzlich. So konnten Zhang et al. (2016) beispielsweise zeigen, dass freigesetztes Lactat aus dem Abbau von PLLA-Scaffolds die Knorpelmatrixsynthese in Chondrozyten über eine Hochregulation von HIF-1 α fördern kann (Zhang et al. 2016).

Die guten makroskopischen Scores der ACM-Implantate könnten in diesem Kontext auf die beschleunigte Bildung eines glatten, aber qualitativ minderwertigen Faserknorpels hindeuten. Im Gegensatz dazu produzierte die LCM-Gruppe qualitativ hochwertigeren, aber nach drei Monaten noch unreifen hyalinen Knorpel.

Eine entscheidende externe Validierung für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten, molekularbiologischen Unterschiede zwischen den Polymeren LCM und ACM liefert die In-vitro-Studie von Wunderer et al. (2025). In dem genutzten Kultursystem wurden MSC chondrogen differenziert. Dabei induzierte der Kontakt mit LCM-Plättchen eine signifikant höhere Expression des Schlüsseltranskriptionsfaktors Sox9 im Vergleich zu den ACM-Plättchen. Zudem war die Konzentration von Col2 nach 20 Tagen in den Kulturen mit LCM signifikant höher (Wunderer et al. 2025). Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass LCM auf zellulärer Ebene ein inhärent stärkeres chondroinduktives Potenzial als ACM besitzt. Gleichzeitig konnte eine signifikant reduzierte Zellviabilität und metabolische Aktivität auf den ACM-Plättchen nachgewiesen werden, was in einem statischen In-vitro-System auf eine potenziell höhere Zytotoxizität des ACM oder dessen initialen Abbauprodukten schließen lässt.

Ein Erklärungsansatz für die Diskrepanz der hohen In-vitro-Chondroinduktivität des LCM gegenüber der besseren makroskopischen In-vivo-Performance des ACM sind die unterschiedlichen Degradationskinetiken unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Kontext die Arbeit von Felfel et al. (2016), welche die Degradation von PLCL-Scaffolds in Medien mit unterschiedlichem pH-Wert untersuchte, um ein entzündliches Wundmilieu zu simulieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Degradation im sauren Milieu mit einem pH-Wert zwischen 4,5–6,5 massiv beschleunigt wird. Darüber hinaus konnte nach 56 Tagen im sauren Milieu ein zwei- bis sechsfach höherer Verlust der mechanischen Eigenschaften und der Masse im Vergleich zum neutralen, gepufferten Milieu nachgewiesen werden (Felfel et al. 2016). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die im postoperativ entzündlich-sauren Gelenkmilieu stattfindende Degradation von LCM in vivo weitaus aggressiver abläuft als in gepufferten Zellkulturmedien. Während eine langsame Freisetzung von Lactat ein chondroinduktives, hypoxieähnliches Milieu schafft, führt eine schnelle, entzündungsgeförderte Degradation vermutlich zu einer nachteiligen lokalen Azidose (Wunderer et al. 2025). Kampleitner et al. (2020) stützen diese These und konnten feststellen, dass ihre am schnellsten degradierende LCM-Variante diejenige mit der stärksten Entzündungsreaktion und schlechtesten Knochenheilung war (Kampleitner et al. 2020). Dieses Problem tritt bei der Verwendung des ACM aufgrund des physiologisch neutralen Abbauprofiles nicht auf. Es bietet somit trotz geringerer initialer Bioaktivität ein stabileres und langfristig günstigeres Umfeld für die Gewebereifung in vivo.

4.7 Zeitlicher Verlauf der Knorpelreifung

Der zeitliche Rahmen des Untersuchungszeitraums von drei Monaten ist ein wesentlicher Faktor bei der Interpretation der Ergebnisse. Die Knorpelregeneration ist ein langwieriger Prozess, welcher viele Monate bis Jahre andauern kann und sich in verschiedene Phasen gliedert. Das Remodeling eines Defekts beginnt zunächst mit einer Entzündungs- und Proliferationsphase. In dieser Phase bildet sich ein Fibringerinnsel, das den Defekt initial auffüllt. Außerdem wandern undifferenzierte Zellen ein. Anschließend wird dieses provisorische Reparaturgewebe zu Faserknorpel umgebaut, welcher im weiteren Verlauf degeneriert. Bereits 1993 wurde dieser natürliche Heilungsverlauf von Shapiro et al. (1993) beschrieben (Shapiro et al. 1993). Nach drei Monaten befinden wir uns mit den vorliegenden Daten in dieser reparativen Phase.

Entscheidend für die finale biochemische Zusammensetzung und die damit verbundenen biomechanischen Eigenschaften ist die sich anschließende Phase der Gewebereifung. Diese Phase dauert jedoch deutlich länger und kann mehrere Monate bis Jahre in Anspruch nehmen. Levingstone et al. (2016) demonstrierten diese Dynamik eindrücklich in einer Langzeitstudie am Ziegenmodell. Dort zeigte sich nach sechs Monaten noch unreifes, fibrinöses Reparaturgewebe. Nach 12 Monaten hingegen konnte die Differenzierung zu einem signifikant hyalinähnlicherem Knorpel mit Restauration der Tidenlinie nachgewiesen werden (Levingstone et al. 2016). Aus diesem Verlauf kann abgeleitet werden, dass es sich bei unseren Drei-Monats-Daten womöglich lediglich um Momentaufnahmen einer unreifen und noch anhaltenden Heilungsphase handelt. Die Dauer dieser Phase ist abhängig von diversen Faktoren. Die Reifung scheint unter anderem von individuellen Eigenschaften und bestimmten Verhaltensmustern abhängig zu sein.

Langzeitstudien zu etablierten Therapien bestätigen, dass sich die vollständige Reifung und Regeneration des hyalinen Knorpelgewebes über Jahre erstreckt. Teilweise zeigte sich in randomisierten Studien, dass das Reparaturgewebe nach einer Mikrofrakturierung selbst zwei Jahre postoperativ noch überwiegend aus Faserknorpel besteht. Im Rahmen von postoperativen Analysen nach ACT-Therapie konnte erst fünf Jahre postoperativ mit 86 % ein signifikant höherer Anteil an hyalinähnlichem Knorpel in Biopsien nachgewiesen werden. Im Zeitraum zwischen zwei und fünf Jahren lag der Anteil an hyalinähnlichem Knorpel in den Biopsien bei 57 % (Knutsen et al. 2004; Peterson et al. 2010).

Die Dynamik der osteochondralen Heilung wird zudem durch eine aktuelle Untersuchung von Yilmaz et al. (2025) belegt. Die Ergebnisse wurden nach vier, acht und zwölf Wochen erhoben und unterstreichen, dass die relative Wirksamkeit verschiedener Scaffold-Designs zeitabhängig ist. So erzielten die zellbesiedelten, zweischichtigen Scaffolds in der frühen Heilungsphase bessere Ergebnisse, während sich erst im späten Beobachtungszeitraum nach zwölf Wochen eine Tendenz zur Überlegenheit der zellfreien, einschichtigen Scaffolds zeigte (Yilmaz et al. 2025). Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die Ergebnisse nach drei Monaten lediglich eine Momentaufnahme darstellen und keine definitiven Rückschlüsse auf die langfristigen Resultate zulassen. Die ablaufenden Heilungsprozesse, insbesondere die Reifung der extrazellulären Matrix und die vollständige Implantatintegration, erstrecken sich über weitaus längere Zeiträume.

Quantitative Degradationsstudien bekräftigen diese Hypothese mittels materialwissenschaftlicher Analysen. So wiesen LCM-Scaffolds nach 83 Tagen, also knapp drei Monaten, bei 37 °C in PBS nur einen sehr geringen Masseverlust auf (Felfel et al. 2016). Dies deutet darauf hin, dass der vollständige Polymerabbau einen weitaus längeren Untersuchungszeitraum als den in der vorliegenden Arbeit benötigt. Dabei können Rückschlüsse auf die tatsächliche Geweberegeneration erst nach vollständigem Abbau der Polymere gezogen werden. Auch in einer Folgestudie besaßen die Scaffolds nach 112 Tagen noch etwa 60 % ihres ursprünglichen Gewichts (Felfel et al. 2018). Bei einem Untersuchungszeitpunkt von drei Monaten ist folglich davon auszugehen, dass die Polymerimplantate strukturell weitgehend intakt sind und weiterhin ihre Funktion als Gerüst für neu einwachsendes Gewebe erfüllen. Entscheidende biologische Prozesse, welche während des wesentlichen Polymerabbaus und der damit verbundenen Freisetzung von Degradationsprodukten ablaufen, werden dabei nicht erfasst. Selbst für den vergleichsweise schnell heilenden Knochen sind drei Monate zur vollständigen Gewebematuration nicht ausreichend, wie Kampleitner et al. (2020) in einem zwölfwöchigen Kalvarien-Defektmodell mit LCM-Scaffolds zeigen konnten (Kampleitner et al. 2020).

4.8 Patellae

Die Knorpelbeschaffenheit der Patella und des femoralen Patellagleitlagers ist ein bedeutender Indikator für die globale Gelenkfunktion. In der vorliegenden Studie waren mitunter ausgeprägte degenerative Veränderungen an den Gelenkflächen der Patella auf der operierten Seite zu erkennen. Dies zeigt die Limitationen der reinen Defektfüllung auf und beweist, dass selbst ein makroskopisch gutes Regenerat die hochkomplexen biomechanischen Eigenschaften von nativem Gelenkknorpel nicht zwangsläufig wiederherstellt. Bereits minimale Inkongruenzen oder Abweichungen in der Steifigkeit genügen, um zu einer veränderten Gelenkkinematik und einer pathologischen Belastungsverteilung zu führen. Außerdem besitzt Faserknorpel einen höheren Reibungskoeffizienten als hyaliner Knorpel. Dies führt an der Gelenkoberfläche der Patella zu erhöhten Scherkräften und einem erhöhten Abrieb (Andriacchi et al. 2004; Krakowski et al. 2024; Thomeer et al. 2017). Auf diese veränderte Biomechanik reagiert die Patella als direkter Gelenkpartner hochempfindlich (Besier et al. 2015). So genügte der Untersuchungszeitraum von drei Monaten für die Bildung von irreversiblen, sekundär-arthrotischen Gelenkveränderungen. Die Befundung der Patellarückflächen verdeutlicht somit einmal mehr die Notwendigkeit, osteochondrale Defekte nicht nur morphologisch zu reparieren, sondern insbesondere die gesamte Gelenkhomöostase samt den funktionellen Eigenschaften wiederherzustellen.

Die biomechanische Inkompatibilität des Regeneratgewebes ist die wahrscheinlichste Ursache für die beobachteten degenerativen Veränderungen an der Patella. So ist die reine Wiederherstellung der Form eines Defektes nur der Beginn einer funktionellen Regeneration. Insbesondere die Wiederherstellung der komplexen viskoelastischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels ist die weitaus größere Herausforderung. Die mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellten Scaffolds besitzen definierte mechanische Eigenschaften, die durch die Wahl des Polymers und die Architektur der Porenstruktur gesteuert werden können (Hauptmann et al. 2022). Felfel et al. (2016) bestimmten beispielsweise das initiale Kompressionsmodul für ihre LCM-Scaffolds. Dies lag je nach genauer Zusammensetzung zwischen ca. 0,3 bis 4 MPa (Felfel et al. 2016). Zwar liegen diese Werte in der Größenordnung von Knorpelgewebe, dennoch weichen sie unweigerlich von den spezifischen, ortsabhängigen Eigenschaften des nativen Gelenkknorpels ab. Dabei führt jede kleinste Abweichung der Regeneratsteifigkeit im Vergleich zum umgebenden

Knorpel zu einer veränderten Kontaktmechanik und einer unphysiologischen Lastverteilung im Gelenk. Die veränderte Biomechanik manifestiert sich als erhöhter Stress auf der gegenüberliegenden Gelenkfläche und induziert dort sekundäre degenerative Prozesse. Somit ist die Beschaffenheit der Patella ein relevanter funktioneller Indikator. Sie zeigt, dass eine makroskopisch zufriedenstellende Defektfüllung nicht zwangsläufig mit einer vollständigen funktionellen Regeneration gleichzusetzen ist. Daraus leitet sich die Notwendigkeit ab, zukünftige Studien um eine detaillierte biomechanische Testung der Implantate zu ergänzen und so die funktionelle Qualität der Heilung zu quantifizieren.

4.9 Limitationen der Studie

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Studie am Großtiermodell. Dabei wurden keine Zuchtstämme mit nahezu identischem Genpool herangezogen. Es handelte sich um Schafe, die zwar identisch in Rasse und Geschlecht waren, darüber hinaus jedoch genetisch verschiedene Individuen waren. Zudem wurden keine Jungtiere inkludiert, sondern ausschließlich ausgewachsene Schafe mit eigenen, unterschiedlichen Erfahrungen, welche sie im Laufen des Lebens gesammelt haben. Dies wirkt sich auf das Verhalten des jeweiligen Schafes, die Konstitution und letztlich auf die Einheilung der Implantate aus. Bei Tiermodellen sind postoperative Nachbehandlungsschemata, wie sie in der klinischen Praxis üblich sind, ohnehin nicht adäquat umsetzbar. Die aktive Mitarbeit des Patienten in der postoperativen Phase mit beispielsweise Entlastung und Bewegungslimitierung entfällt. Stattdessen können sich die verschiedenen Verhaltensweisen und Charaktereigenschaften etwa durch schreckhafte, abrupte Bewegungen oder Inaktivität direkt auf den jeweiligen Heilungsverlauf auswirken. Auch die unterschiedliche Potenz und Anzahl der körpereigenen MSC, welche entscheidend an der Defektregeneration beteiligt sind und im Alter abnehmen, führen zu einer Variabilität in der Heilungsantwort. Diese hohe biologische Varianz bei der Verwendung eines Großtiermodells mit genetisch-individuellen Tieren ist einerseits eine große Stärke der vorliegenden Arbeit für die klinische Relevanz, gleichzeitig aber auch eine wichtige Limitation für die statistische Auswertung.

Die naturgegebene Heterogenität hat zwangsläufig eine größere Streuung der Messwerte zur Folge. In Kombination mit der aus Tierschutzgründen notwendigen, kleinen Gruppengröße von je $n = 5$ ist das Erreichen statistischer Signifikanz bereits von Beginn an erschwert. Im Gegenzug spiegeln diese Varianz und Heterogenität jedoch die klinische

Realität wider. Auch die humane Patientenpopulation ist von einer enormen genetischen, konstitutionellen und altersbedingten Vielfalt geprägt. Ergebnisse, die außerhalb idealer Laborbedingungen und artifiziellen, homogenen Kleintiermodellen erzielt werden, besitzen daher eine potenziell höhere prädiktive Aussagekraft für die perspektivische klinische Anwendung.

Limitationen des Tiermodells

Eine weitere wesentliche Limitation dieser Studie liegt in der Wahl des Tiermodells selbst. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, ist das Schaf aufgrund seiner Größe, der Gelenkbelastung und seiner Etablierung in der orthopädischen Forschung ein valides Modell. Dennoch gibt es spezifische Unterschiede zum Menschen, die insbesondere bei der Translation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen und die Wahl anderer Modelle, wie z. B. dem Schwein, potenziell überlegen erscheinen lassen können.

Ein entscheidender Parameter ist etwa die Knorpeldicke. Diese ist mit 0,7–1,7 mm beim Schaf deutlich dünner als beim Menschen. Dort beträgt sie 2,4–2,6 mm. Das Schwein weist hier mit 1,5–2,0 mm eine größere Ähnlichkeit zur humanen Anatomie auf, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse zur Knorpelregeneration tendenziell positiv beeinflusst (Moran et al. 2016). Zudem bestehen physiologische Unterschiede. Im Hinblick auf das gastrointestinale System besitzen Schafe als Wiederkäuer beispielsweise einen fundamental anderen Stoffwechsel als der monogastrische Mensch. Auch in diesem Kontext wäre das Schwein dem Menschen ähnlicher, was vor allem bei der Untersuchung von systemischen Einflüssen auf die Heilung oder die Degradation von Biomaterialien relevant sein könnte.

Trotz dieser Unterschiede fiel die Wahl bewusst auf das Schafmodell. Es ist in der orthopädisch-unfallchirurgischen Forschung, insbesondere für Kniegelenkstudien, sehr gut etabliert und führt somit zu einer exzellenten Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer großen Anzahl bereits publizierter Studien. Darüber hinaus sind die Haltung und das postoperative Management von Schafen in der Regel weniger aufwendig und kostengünstiger als bei Schweinen, was die praktische Umsetzung des Projekts maßgeblich unterstützte.

Die Entscheidung für das Schaf stellt somit einen wissenschaftlich begründeten Kompromiss zwischen größtmöglicher physiologischer Ähnlichkeit, praktischer Validität und der wichtigen Vergleichbarkeit innerhalb des Forschungsfeldes dar.

Limitationen des Untersuchungszeitraums

Darüber hinaus stellt der gewählte Untersuchungszeitraum von drei Monaten eine Limitation der Studie dar. Die osteochondrale Defektregeneration ist hochdynamisch und biologisch komplex. Studien belegen die Dynamik und Langwierigkeit dieses Reifungsverlaufs (Levingstone et al. 2016; Peterson et al. 2010). Die vorliegenden Ergebnisse stellen vermutlich lediglich eine Momentaufnahme eines nicht abgeschlossenen Heilungsprozesses dar. Zu diesem Zeitpunkt der Regeneration lässt sich zwar bereits eine zelluläre Auffüllung des Defekts erkennen, das neu gebildete Gewebe ist jedoch weder hinsichtlich seiner biochemischen Zusammensetzung noch seiner biomechanischen Kompetenz vollständig ausgereift. Folglich ist eine abschließende Beurteilung der Qualität des gebildeten Regenerats auf Basis der vorliegenden Daten nicht final möglich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die makroskopischen und molekularbiologischen Resultate erst zu einem späteren Zeitpunkt in eine messbare Überlegenheit einer Implantatvariante transferieren lassen. Außerdem ist der Zeitraum womöglich nicht ausreichend, um den vollständigen Abbau der Polymerimplantate und die damit verbundene Gewebereaktion auf die entstehenden Degradationsprodukte zu bewerten.

Dennoch wurde der Untersuchungszeitraum von drei Monaten bewusst gewählt, um Differenzen zwischen den Materialien im aktiven Heilungsverlauf zu detektieren. Der Grundgedanke war, dass sich materialspezifische Unterschiede in der regenerativen Potenz im frühen Heilungsprozess am deutlichsten manifestieren. In späteren Heilungsphasen minimieren sich solche Unterschiede häufig und die Ergebnisse zwischen den Gruppen könnten sich tendenziell selbst bei unvollständiger Regeneration wieder angleichen. Eine Studie mit mehreren Versuchsgruppen für verschiedene Messzeitpunkte wäre daher ideal gewesen, um die gesamte Reifungsdynamik abzubilden. Dies war jedoch aufgrund der hohen Kosten des Großtiermodells und der zeitlichen Begrenzung als Drittmittelprojekt nicht realisierbar.

Methodische Limitationen

Um die makroskopischen Ergebnisse Daten mess- und vergleichbar zu machen, wurden makroskopische Scores verwendet. Die verwendeten Scores sind etabliert und ein notwendiges Verfahren zur objektiven Beurteilung der Defektreparatur. Ihre Aussagekraft bezüglich der Gewebequalität ist allerdings stark limitiert. Eine sichere Differenzierung der gebildeten Knorpel-/Gewebetypen ist visuell nicht möglich. Ein glattes, faserknorpeliges Regenerat kann beispielsweise einen ebenso hohen Score erhalten wie ein Regenerat mit hochwertigem aber noch unreifem, unebenem hyalinen Knorpel. Zudem sind die Scores trotz sorgfältiger Verblindung der Untersucher subjektiv und unterliegen einer Inter- und Intra-Observer-Variabilität, was die statistische Aussagekraft einschränkt und mitunter zu größeren Abweichungen der Scores für die gleichen Defekte führt.

Für die molekularbiologische Analyse der Proben wurde das Verfahren der real-time RT-PCR genutzt. Die real-time RT-PCR erlaubt auf mRNA-Ebene hochsensitive Rückschlüsse auf die zelluläre Aktivität im Rahmen der Genexpression und lässt darauf schließen, welchen Phänotyp die Zellen im Verlauf annehmen könnten. Die Limitation der real-time RT-PCR besteht in der möglichen Diskrepanz zwischen Transkription und finaler Proteinfunktion. Eine hohe mRNA-Expression garantiert nicht automatisch eine hohe Konzentration des funktionstüchtigen Proteins in der extrazellulären Matrix. Prozesse der Translation, posttranslationale Modifikationen, der Proteintransport und die korrekte Einlagerung in die Matrix können nicht abgebildet werden.

Die methodischen Limitationen der Arbeit spiegeln sich zudem im Vergleich mit aktuellen Studien wider. Ein zentraler Punkt ist die histologische Analyse zur Beurteilung der Qualität von Knorpelregeneraten. Beispielsweise stützt die Studie von Yilmaz et al. (2025) beinahe ihre gesamten Schlussfolgerungen auf einer histologischen Auswertung mittels Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Trichrom-Färbung sowie der Anwendung etablierter histologischer Scoring-Systeme (Yilmaz et al. 2025). Dadurch wird eine differenzierte Unterscheidung zwischen unreifem Bindegewebe, Faserknorpel und hyalinem Knorpel möglich. Außerdem ermöglicht die histologische Auswertung die Beurteilung der zellulären Morphologie und die Analyse der Integration an der Grenzfläche der Defektzone. Die molekularbiologischen Daten, die auf ein Mischgewebe hindeuten, können ohne histologische Validierung nicht abschließend interpretiert werden. Für die Beantwortung der zentralen Frage nach der Qualität des gebildeten Regeneratgewebes sind die

Histologie und Immunhistochemie mit Messungen auf Proteinlevel daher unerlässlich. In weiteren Untersuchungen sollten folglich histologische Färbungen und immunhistochemische Nachweise Anwendung finden, sodass unter anderem die Zellmorphologie, die Gewebearchitektur und die Zusammensetzung der Matrix bewertet werden können.

Darüber hinaus wurde die immunologische In-vivo-Kompatibilität der verwendeten Materialien in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. Kamleitner et al. (2020) etwa führten eine umfassende immunologische Bewertung ihrer LCM-Scaffolds durch, die sowohl In-vitro-Tests mit Splenozyten als auch In-vivo-Implantationsmodelle zur Untersuchung von Entzündungsreaktionen und Fibrose umfasste. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die am schnellsten degradierende LCM-Komposition eine signifikant stärkere Entzündungsreaktion hervorrief (Kamleitner et al. 2020). Dies stellt eine wesentliche Erkenntnis für die Bedeutung der Immunogenität von Degradationsprodukten dar. Während eine akute, kurzzeitige Entzündungsreaktion Teil des normalen Heilungsprozesses ist, kann eine chronische, materialinduzierte Entzündung die Regeneration erheblich stören. Eine systematische immunologische Analyse sollte deshalb zwingend in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden, um eine langfristige Sicherheit und Biokompatibilität der Polymere zu gewährleisten.

4.10 Ausblick und translationale Perspektive

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bilden einen wichtigen Grundstein für die gezielte Weiterentwicklung der Polymerimplantate mit dem klaren Ziel der klinischen Anwendung.

Der zwingend nächste Schritt zur präklinischen Validierung ist eine aussagekräftige Langzeitstudie im etablierten Schafmodell, idealerweise über einen Zeitraum von 12 bis 24 Monaten. Sinnvoll erscheint zudem ein direkter Vergleich gegen ein klinisch bereits weitverbreitetes Therapieverfahren wie beispielsweise der OATS-Plastik. Die Endpunkte müssen eine umfassende histologische, immunhistochemische und biomechanische Auswertung umfassen.

Parallel dazu sollte die Implantatoptimierung vorangetrieben werden. Dabei könnte insbesondere die Entwicklung eines hybriden Implantats von zentraler Bedeutung sein, welches die jeweiligen Vorteile der getesteten Polymere kombiniert. So wäre eine Kombination der scheinbar chondroinduktiven LCM-Formulierung in der Knorpelphase und der vermeintlich knochenfreundlicheren ACM-Formulierung in der Knochenphase denkbar.

Nach erfolgreicher präklinischer Validierung wird der Weg in die klinische Anwendung dann mit initialen Sicherheits- und Machbarkeitsstudien am Menschen eingeleitet. Bei guten Resultaten würden prospektive, randomisierte, kontrollierte Multicenter-Studien folgen, um die Wirksamkeit im Vergleich zu etablierten Standardtherapien nachzuweisen.

Langfristig soll eine effektive, einzeitige Therapie osteochondraler Defekte etabliert werden, welche die Schwächen bisheriger Verfahren adressiert. Im Optimalfall könnte die bekannte Entnahmemorbidität der Autotransplantation vollständig vermieden werden, während gleichzeitig ein biologisch und funktionell hochwertigeres Gewebe regeneriert wird als bei den existierenden knochenmarkstimulierenden Verfahren. Messen ließe sich der Erfolg idealerweise an patientenrelevanten Endpunkten wie nachhaltiger Schmerzreduktion, verbesserter Gelenkfunktion samt Funktionsscores und der fehlenden oder verzögerten Notwendigkeit zur Implantation einer Gelenkprothese.

5 Zusammenfassung

Die Behandlung osteochondraler Läsionen ist eine große klinische Herausforderung. Etablierte Verfahren führen häufig lediglich zur Bildung von minderwertigem Faserknorpel. Im Rahmen dieses BMBF-geförderten Projekts wurden daher mittels eines laserassistierten 3D-Druckverfahrens biphasische Polymerimplantate entwickelt. Diese Implantate imitieren mit ihren interkonnektierenden Poren die osteochondrale Zone. Als Polymere kamen LCM3 (Abbau über Milchsäure) und ACM (Abbau über Aminosäuren) zum Einsatz. Um die Zellbesiedlung zu fördern, wurden zwei Implantatgruppen zusätzlich mit einem kollagenbasierten Biogel versehen.

Ziel dieser Studie war die makroskopische und molekularbiologische Analyse der Defektheilung in einem Großtiermodell. Dazu wurden je zwei zylindrische Implantate (7 mm Durchmesser, 10 mm Höhe) in das distale Femur von adulten, weiblichen Schafen ($n = 5$ pro Gruppe; Gewicht $66,28 \pm 1,72$ kg) eingesetzt. Ein Implantat wurde in der medialen Femurkondyle platziert und das zweite proximal davon. Die Versuchsgruppen erhielten entweder LCM-Implantate ohne Biogel (L-OB), LCM-Implantate mit Biogel (L-B) oder ACM-Implantate mit Biogel (A-B). Nach drei Monaten erfolgte die makroskopische und molekularbiologische Evaluation der Defektzonen.

Makroskopisch zeigten die meisten Defekte eine gute Implantatintegration (Grad II nach ICRS), jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die molekularbiologische Analyse hingegen, welche für die qualitative Beurteilung der Gewebeheilung entscheidend war, offenbarte signifikante Effekte: Die Gruppe L-B induzierte die stärkste Chondrogenese, was durch eine signifikant erhöhte Expression der hyalinen Knorpelmarker Sox9 und Col2 belegt wurde. Im Gegensatz dazu deutete eine erhöhte Col1-Expression in der Gruppe L-OB auf eine fibröse Regeneration hin. Darüber hinaus war der Knochenresorptionsmarker CtsK in der Gruppe L-OB erhöht, woraus ein stabilisierender Effekt des Biogels auf die Knochenphase abgeleitet werden kann.

Die Studie belegt somit die molekularbiologische Überlegenheit der LCM-Biogel-Kombination hinsichtlich der Bildung von qualitativ hochwertigem, hyalinähnlichem Knorpel. Obwohl die Implantate vielversprechend erscheinen, sind für eine abschließende Bewertung weitere immunhistochemische und histologische Analysen erforderlich.

6 Summary

The treatment of osteochondral lesions is a major clinical challenge. Established procedures often only lead to the formation of inferior fibrocartilage. As part of this BMBF-funded project, biphasic polymer implants were therefore developed using a laser-assisted 3D printing process. With their interconnected pores, these implants mimic the osteochondral zone. LCM3 (degradation via lactic acid) and ACM (degradation via amino acids) were used as polymers. To promote cell colonization, two implant groups were additionally coated with a collagen-based biogel. The aim of this study was to perform a macroscopic and molecular biological analysis of defect healing in a large animal model.

For this purpose, two cylindrical implants (7 mm diameter, 10 mm height) were inserted into the distal femur of adult female sheep ($n = 5$ per group; weight 66.28 ± 1.72 kg). One implant was placed in the medial femoral condyle and the second proximally. The experimental groups received either LCM implants without biogel (L-OB), LCM implants with biogel (L-B), or ACM implants with biogel (A-B). After three months, macroscopic and molecular biological evaluation of the defect zones was performed.

Macroscopically, most defects showed good implant integration (Grade II according to ICRS), but without significant differences between the groups. Molecular biological analysis, on the other hand, which was decisive for the qualitative assessment of tissue healing, revealed significant effects: The L-B group induced the strongest chondrogenesis, as evidenced by a significantly increased expression of the hyaline cartilage markers Sox9 and Col2. In contrast, increased Col1 expression in the L-OB group indicated fibrous regeneration. In addition, the bone resorption marker CtsK was elevated in the L-OB group, suggesting a stabilizing effect of the biogel on the bone phase.

The study demonstrates the molecular biological superiority of the LCM-biogel combination in terms of the formation of high-quality, hyaline-like cartilage. Although the implants appear promising, further immunohistochemical and histological analyses are required for a final evaluation.

7 Abkürzungsverzeichnis

A-B – ACM-Polymere mit kollagenhaltigem Biogel

ACM – Poly-(Alanin-co- ϵ -Caprolacton)-Methacrylat

ACT – Autologe Chondrozyten Transplantation

ALP – Alkalische Phosphatase

AMIC – Matrixassoziierte autologe Chondrogenese

B2M – Beta-2-Mikroglobulin

BMBF – Bundesministerium für Bildung und Forschung

BMP – Bone morphogenetic proteins

C – Chondrophase

cDNA – komplementäre DNA

Col1 – Kollagen Typ 1

Col2 – Kollagen Typ 2

Col2a1 – Kollagen Typ 2, Alpha 1 Kette

CP – crossing point

CtsK – Cathepsin K

D – distal

E-Modul – Elastizitätsmodul

EZM – extrazelluläre Matrix

F – forward (Primer)

g – relative centrifugal force

HA – Hydroxylapatit

HIF-1 α – Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha

i.v. – intravenös

IBA – Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V.

IC – Interface-Chondrophase

ICRS – International Cartilage Repair Society

IO – Interface-Osteophase

L-B – Gruppe mit Implantaten aus LCM3 mit Kollagenfüllung

L-OB – Gruppe mit Implantaten aus LCM3 ohne Biogel

LCM – Poly-((D,L)-Laktid-co-ε-Caprolacton)-Methacrylat

LCM3 – Poly-((D,L)-Laktid-co-ε-Caprolacton)-Methacrylat (Mischverhältnis 16:4)

MACT – matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation

M-CSF – macrophage colony-stimulating factor

MFx – Mikrofrakturierung

mg/kg KG – Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht

mod. – modifizierter

MPa – Megapascal

MSC – mesenchymale Stammzellen

MW ± SD – Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung

NFx – Nanofrakturierung

NO – Stickstoffoxid

OAT – Osteochondrale autologe Transplantation

OATS – Osteochondrales autologes Transplantationssystem

OD – Osteochondrosis dissecans

OPG – Osteoprotegerin

P – proximal

PBS – Phosphate-buffered saline

PDGF – Platelet-derived growth factor

PLGA – Poly-D,L-lactid-co-glycolid

PLDL – Poly-D,L-lactide-co-ε-caprolacton

PLLA – Poly-L-Milchsäure

PTH – Parathormon

R – reverse (Primer)

RANK – rezeptor activator of NF-κB

RANKL – rezeptor activator of NF-κB ligand

RGD – Arginin-Glycin-Asparaginsäure

rpm – revolutions per minute

real-time RT-PCR – Real-time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Runx2 – run-related transcription factor 2

Sox9 – Sry-related high-mobility-group box gene 9

TGF-β – Transforming Growth Factor β

VEGF – vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

μl – Mikroliter

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Histologischer Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels	15
Abb. 2: Haltungsform der Schafe	28
Abb. 3: Zeitlicher Ablauf des Projekts	29
Abb. 4: Schematischer Aufbau der industriellen Zwei-Photonen- Polymerisationsanlage	32
Abb. 5: Struktureller Aufbau der verwendeten Polymerimplantate	34
Abb. 6: Schematische Darstellung der Implantationsschritte mit dem neu entwickelten Instrumentarium der Firma Mathys Orthopädie GmbH	37
Abb. 7: Intraoperative Röntgenaufnahme zur Kontrolle der korrekten Implantatpositionierung	37
Abb. 8: Präparation und makroskopische Ansicht des Defektbereichs	40
Abb. 9: Beispielaufnahme zur makroskopischen Bewertung der Defektzonen	41
Abb. 10: Standardkurve Primer Runx2	49
Abb. 11: Schmelzpunktkurven	50
Abb. 12: Amplifikationskurven	51
Abb. 13: Makroskopische Befunde der Defektregeneration in der Gruppe L-OB	54
Abb. 14: Makroskopische Befunde der Defektregeneration in der Gruppe L-B	56
Abb. 15: Makroskopische Befunde der Defektregeneration in der Gruppe A-B	58
Abb. 16: Vergleich mod. ICRS-Scores abhängig von Implantattyp und -position	60
Abb. 17: Vergleich mod. Wayne-Scores abhängig von Implantattyp und -position	60
Abb. 18: Vergleich des neu entwickelten Scores für das Einsinken der Implantate in Abhängigkeit von Implantattyp und -lokalisation	61
Abb. 19: Makroskopische Ansicht der Patellarrückflächen	62
Abb. 20: Relative ALP-Genexpression in der Osteophase	64
Abb. 21: ALP-Genexpression in der Interface-Osteophase der Gruppe L-B	64

Abb. 22: Relative CtsK-Genexpression in der Osteophase	66
Abb. 23: Relative CtsK-Genexpression in der Interface-Osteophase	66
Abb. 24: Relative Runx2-Genexpression in der Osteophase der Gruppe L-B	68
Abb. 25: Runx2-Expression im Gruppenvergleich in der Osteophase	68
Abb. 26: Relative Col1-Genexpression in der Osteophase	70
Abb. 27: Relative Col1-Genexpression in der Chondrophase	70
Abb. 28: Relative Col1-Genexpression in der Interface-Chondrophase der Gruppe L-OB	71
Abb. 29: Relative Col2-Genexpression in der Chondrophase	72
Abb. 30: Relative Col2-Genexpression in der Interface-Chondrophase	73
Abb. 31: Relative Sox9-Genexpression in der Chondrophase	75
Abb. 32: Relative Sox9-Genexpression in der Interface-Chondrophase (L-B/A-B)	75
Abb. 33: Relative Sox9-Genexpression in der Interface-Chondrophase (L-OB/L-B)	76
Abb. 34: Sox9-Expression in der Interface-Chondrophase innerhalb der Gruppe L-B	76

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge	2
Tab. 2: Klassifikation von Knorpelschäden nach den Kriterien der ICRS	2
Tab. 3: Darstellung der Versuchs- und zugehörigen Kontrollgruppen	30
Tab. 4: Übersicht der Porenstrukturen	34
Tab. 5: Mod. ICRS-Score zur makroskopischen Evaluation osteochondraler Defekte	42
Tab. 6: Mod. Score nach Wayne et al. zur makroskopischen Evaluation osteochondraler Defekte	43
Tab. 7: Score zur Beurteilung der Höhendifferenz des Implantats im Sagittalschnitt	43
Tab. 8: Primer-Übersicht	47
Tab. 9: Makroskopische Scores im Gruppenvergleich	59
Tab. 10: Signifikanzen der osteogenen Marker	77
Tab. 11: Signifikanzen der chondrogenen Marker	78

10 Literaturverzeichnis

Aaboe, M., Pinholt, E. M., Hjørtting-Hansen, E. (1995): Healing of experimentally created defects: a review. In: *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 33 (5), S. 312–318. DOI: 10.1016/0266-4356(95)90045-4.

Adams, M., Cottrell, J. (2024): Development and characterization of an in vitro fluorescently tagged 3D bone-cartilage interface model. In: *Frontiers in Endocrinology* 15, S. 1484912. DOI: 10.3389/fendo.2024.1484912.

Akiyama, H. (2008): Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. In: *Modern Rheumatology* 18 (3), S. 213–219. DOI: 10.1007/s10165-008-0048-x.

Albrecht, F. H. (1983): Der Verschluss von Gelenkknorpel-Defekten mittels Knorpelfragmenten und Fibrinkleber. In: *Fortschritte der Medizin* 101 (37), S. 1650–1652.

Amarasekara, D. S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., Rho, J. (2018): Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. In: *Immune Network* 18 (1), e8. DOI: 10.4110/in.2018.18.e8.

Amr, M., Mallah, A., Yasmeen, S., van Wie, B., Gozen, A., Mendenhall, J., Abu-Lail, N. I. (2022): From Chondrocytes to Chondrons, Maintenance of Phenotype and Matrix Production in a Composite 3D Hydrogel Scaffold. In: *Gels (Basel, Switzerland)* 8 (2). DOI: 10.3390/gels8020090.

Andriacchi, T. P., Mündermann, A., Smith, R. L., Alexander, E. J., Dyrby, C. O., Koo, S. (2004): A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. In: *Annals of Biomedical Engineering* 32 (3), S. 447–457. DOI: 10.1023/b:abme.0000017541.82498.37.

Arana-Chavez, V. E., Bradaschia-Correa, V. (2009): Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (3), S. 446–450. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.09.007.

Bae, D. K., Yoon, K. H., Song, S. J. (2006): Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 22 (4), S. 367–374. DOI: 10.1016/j.arthro.2006.01.015.

Baker, M. (2009): Stem cells: Fast and furious. In: *Nature* 458 (7241), S. 962–965. DOI: 10.1038/458962a.

Barbaret, A., Wein, F., Jacquet, C., Ollivier, M. (2025): One-stage minced cartilage autograft with platelet-rich plasma improves early clinical outcomes: A multicentric retrospective study. In: *Journal of Experimental Orthopaedics* 12 (1), e70162. DOI: 10.1002/jeo2.70162.

Behrens, P. (2005): Matrixgekoppelte Mikrofrakturierung. In: *Arthroskopie* 18 (3), S. 193–197. DOI: 10.1007/s00142-005-0316-0.

Bellido, T., Plotkin, L. I., Bruzzaniti, A. (2019): Bone Cells. In: Burr, D. B., Allen, M. R. (Hg.): Basic and Applied Bone Biology. 2. Aufl. London: Elsevier, S. 37–55. DOI: 10.1016/B978-0-12-813259-3.00003-8.

Benjamin, M., Ralphs, J. R. (2004): Biology of fibrocartilage cells. In: International Review of Cytology 233, S. 1–45. DOI: 10.1016/S0074-7696(04)33001-9.

Besier, T. F., Pal, S., Draper, C. E., Fredericson, M., Gold, G. E., Delp, S. L., Beaupré, G. S. (2015): The Role of Cartilage Stress in Patellofemoral Pain. In: Medicine and Science in Sports and Exercise 47 (11), S. 2416–2422. DOI: 10.1249/MSS.0000000000000685.

Bleß, H.-H., Kip, M. (2017): Weißbuch Gelenkersatz. Versorgungssituation bei endoprothetischen Hüft- und Knieoperationen in Deutschland. Berlin, Heidelberg: Springer.

Bobić, V. (1996): Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. In: Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy 3 (4), S. 262–264. DOI: 10.1007/BF01466630.

Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L. (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. In: The New England Journal of Medicine 331 (14), S. 889–895. DOI: 10.1056/NEJM199410063311401.

Brittberg, M., Winalski, C. S. (2003): Evaluation of cartilage injuries and repair. In: The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume 85-A Suppl 2, S. 58–69. DOI: 10.2106/00004623-200300002-00008.

Brooks, G. A. (2018): The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. In: Cell Metabolism 27 (4), S. 757–785. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.008.

Brucker, P. U., Braun, S., Imhoff, A. B. (2008): Mega-OATS-Technik--autogene Knorpel-Knochen-Transplantation als Salvage-Verfahren bei grossen osteochondralen Defekten am Femurkondylus. In: Operative Orthopädie und Traumatologie 20 (3), S. 188–198. DOI: 10.1007/s00064-008-1301-3.

Bruns, J., Steinhagen, J. (1999): Transplantation chondrogener Gewebe zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. In: Der Orthopäde 28 (1), S. 52–60. DOI: 10.1007/s001320050321.

Buckwalter, J. A. (2002): Articular cartilage injuries. In: Clinical Orthopaedics and Related Research (402), S. 21–37. DOI: 10.1097/00003086-200209000-00004.

Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., Recker, R. (1996): Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. In: Instructional Course Lectures 45, S. 371–386.

Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. (1998a): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. In: Instructional Course Lectures 47, S. 487–504.

- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. (1998b): Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. In: *Instructional Course Lectures* 47, S. 477–486.
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., Grodzinsky, A. J. (2005): Articular cartilage and osteoarthritis. In: *Instructional Course Lectures* 54, S. 465–480.
- Burr, D. B., Akkus, O. (2013): Bone Morphology and Organization. In: Burr, D. B., Allen, M. R. (Hg.): *Basic and Applied Bone Biology*. 1. Aufl. London: Elsevier, S. 3–25.
- Chen, H., Senda, T., Kubo, K. (2015): The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. In: *Medical Molecular Morphology* 48 (2), S. 61–68. DOI: 10.1007/s00795-015-0099-y.
- Chevalier, X. (1993): Fibronectin, cartilage, and osteoarthritis. In: *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 22 (5), S. 307–318. DOI: 10.1016/s0049-0172(05)80010-1.
- Christensen, B. B., Foldager, C. B., Jensen, J., Lind, M. (2015): Autologous Dual-Tissue Transplantation for Osteochondral Repair: Early Clinical and Radiological Results. In: *Cartilage* 6 (3), S. 166–173. DOI: 10.1177/1947603515580983.
- Claes, L.; Kirschner, P.; Perka, C.; Rudert, M. (Hrsg.) (2012): *AE-Manual der Endoprothetik: Hüfte und Hüftrevision*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Clarke, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3 (Suppl 3), S. S131–S139. DOI: 10.2215/CJN.04151206.
- Cole, B. J., Farr, J., Winalski, C. S., Hosea, T., Richmond, J., Mandelbaum, B., Deyne, P. G. de (2011): Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. In: *The American Journal of Sports Medicine* 39 (6), S. 1170–1179. DOI: 10.1177/0363546511399382.
- Curl, W. W., Krome, J., Gordon, E. S., Rushing, J., Smith, B. P., Poehling, G. G. (1997): Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 13 (4), S. 456–460. DOI: 10.1016/s0749-8063(97)90124-9.
- Dai, W., Cheng, J., Yan, W., Cao, C., Zhao, F., Li, Q. et al. (2023): Enhanced osteochondral repair with hyaline cartilage formation using an extracellular matrix-inspired natural scaffold. In: *Science Bulletin* 68 (17), S. 1904–1917. DOI: 10.1016/j.scib.2023.07.050.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., Varanasi, S. S. (2008): The cell biology of bone metabolism. In: *Journal of Clinical Pathology* 61 (5), S. 577–587. DOI: 10.1136/jcp.2007.048868.
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P. V. (2005): Current concepts of molecular aspects of bone healing. In: *Injury* 36 (12), S. 1392–1404. DOI: 10.1016/j.injury.2005.07.019.

Dresing, K., Slongo, T. (2023): Chirurgisches Nahtmaterial – Grundlagen. In: Operative Orthopädie und Traumatologie 35 (5), S. 298–316. DOI: 10.1007/s00064-023-00812-y.

Eldracher, M., Orth, P., Cucchiaroni, M., Pape, D., Madry, H. (2014): Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. In: The American Journal of Sports Medicine 42 (11), S. 2741–2750. DOI: 10.1177/0363546514547029.

Eyre, D. R. (1995): Collagen structure and function in articular cartilage. In: Kuettner, K. E., Goldberg, V. M. (Hrsg.): Osteoarthritic Disorders. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, S. 219–229.

Felfel, R. M., Poocha, L., Gimeno-Fabra, M., Milde, T., Hildebrand, G., Ahmed, I. et al. (2016): In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. In: Biomedical Materials (Bristol, England) 11 (1), S. 15011. DOI: 10.1088/1748-6041/11/1/015011.

Felfel, R. M., Gupta, D., Zabidi, A. Z., Prosser, A., Scotchford, C. A., Sottile, V., Grant, D. M. (2018): Performance of multiphase scaffolds for bone repair based on two-photon polymerized poly(d,l-lactide-co- ϵ -caprolactone), recombinant hydrogel and nano-HA. In: Materials & Design 160, S. 455–467. DOI: 10.1016/j.matdes.2018.09.035.

Filardo, G., Perdisa, F., Gelinsky, M., Despang, F., Fini, M., Marcacci, M. et al. (2018): Novel alginate biphasic scaffold for osteochondral regeneration: an in vivo evaluation in rabbit and sheep models. In: Journal of Materials Science. Materials in Medicine 29 (6), S. 74. DOI: 10.1007/s10856-018-6074-0.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. d. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., Cerri, P. S. (2015): Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. In: BioMed Research International 2015, S. 421746. DOI: 10.1155/2015/421746.

Fraser, A., Fearon, U., Billingham, R. C., Ionescu, M., Reece, R., Barwick, T. et al. (2003): Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation. In: Arthritis and Rheumatism 48 (11), S. 3085–3095. DOI: 10.1002/art.11331.

Fuchs, J., Kuhnert, R., Scheidt-Nave, C. (2017): 12-month prevalence of osteoarthritis in Germany. In: Journal of Health Monitoring 2 (3), S. 51–56. DOI: 10.17886/RKI-GBE-2017-066.

Gaissmaier, C., Fritz, J., Schewe, B., Weise, K., Mollenhauer, J., Aicher, W. (2006): Cartilage Defects: Epidemiology and Natural History. In: Osteo Trauma Care 14 (3), S. 188–194. DOI: 10.1055/s-2006-942234.

Gille, J., Meisner, U., Ehlers, E. M., Müller, A., Russlies, M., Behrens, P. (2005): Migration pattern, morphology and viability of cells suspended in or sealed with fibrin glue: a histomorphologic study. In: Tissue & Cell 37 (5), S. 339–348. DOI: 10.1016/j.tice.2005.05.004.

Gille, J., Schuseil, E., Wimmer, J., Gellissen, J., Schulz, A. P., Behrens, P. (2010): Mid-term results of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. In: *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18 (11), S. 1456–1464. DOI: 10.1007/s00167-010-1042-3.

Grande, D. A., Pitman, M. I., Peterson, L., Menche, D., Klein, M. (1989): The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. In: *Journal Orthopaedic Research* 7 (2), S. 208–218. DOI: 10.1002/jor.1100070208.

Gratz, K. R., Wong, B. L., Bae, W. C., Sah, R. L. (2009): The effects of focal articular defects on cartilage contact mechanics. In: *Journal of Orthopaedic Research* 27 (5), S. 584–592. DOI: 10.1002/jor.20762.

Gray, M. L., Pizzanelli, A. M., Grodzinsky, A. J., Lee, R. C. (1988): Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. In: *Journal of Orthopaedic Research* 6 (6), S. 777–792. DOI: 10.1002/jor.1100060602.

Gundberg, C. M. (2003): Matrix proteins. In: *Osteoporosis International* 14 (Suppl 5), S. S37–S42. DOI: 10.1007/s00198-003-1471-7.

Hadjidakis, D. J., Androulakis, I. I. (2006): Bone remodeling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092, S. 385–396. DOI: 10.1196/annals.1365.035.

Häger, C., Biernot, S., Buettner, M., Glage, S., Keubler, L. M., Held, N. et al. (2017): The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. In: *PloS One* 12 (4), e0175839. DOI: 10.1371/journal.pone.0175839.

Hangody, L., Kish, G., Kárpáti, Z., Szerb, I., Udvarhelyi, I. (1997): Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. In: *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 5 (4), S. 262–267. DOI: 10.1007/s001670050061.

Hauptmann, N., Lian, Q., Ludolph, J., Rothe, H., Hildebrand, G., Liefelth, K. (2019): Biomimetic Designer Scaffolds Made of D,L-Lactide- ϵ -Caprolactone Polymers by 2-Photon Polymerization. In: *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 25 (3), S. 167–186. DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0284.

Hauptmann, N., Ludolph, J., Rothe, H., Rost, J., Krupp, A., Lechner, J. et al. (2022): Poly-Alanine- ϵ -Caprolacton-Methacrylate as Scaffold Material with Tuneable Biomechanical Properties for Osteochondral Implants. In: *International Journal of Molecular Sciences* 23 (6). DOI: 10.3390/ijms23063115.

Healy, W. L., Iorio, R., Clair, A. J., Pellegrini, V. D., Della Valle, C. J., Berend, K. R. (2016): Complications of Total Hip Arthroplasty: Standardized List, Definitions, and Stratification Developed by The Hip Society. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 474 (2), S. 357–364. DOI: 10.1007/s11999-015-4341-7.

Heath, V. (2009): Vitamin D deficiency implicated in bone mineralization defects. In: *Nat Rev Endocrinol* 5 (11), S. 583. DOI: 10.1038/nrendo.2009.183.

Heir, S., Nerhus, T. K., Røtterud, J. H., Løken, S., Ekeland, A., Engebretsen, L., Arøen, A. (2010): Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery. In: *The American Journal of Sports Medicine* 38 (2), S. 231–237. DOI: 10.1177/0363546509352157.

Hochedlinger, K., Plath, K. (2009): Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. In: *Development (Cambridge, England)* 136 (4), S. 509–523. DOI: 10.1242/dev.020867.

Hunter, D. J., Felson, D. T. (2006): Osteoarthritis. In: *BMJ (Clinical Research ed.)* 332 (7542), S. 639–642. DOI: 10.1136/bmj.332.7542.639.

Hunter, W. (1995): Of the structure and disease of articulating cartilages. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* (317), S. 3–6.

Jepsen, K. J. (2009): Systems analysis of bone. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 1 (1), S. 73–88. DOI: 10.1002/wsbm.15.

Jepsen, K. J., Silva, M. J., Vashishth, D., Guo, X. E., van der Meulen, M. C. H. (2015): Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 30 (6), S. 951–966. DOI: 10.1002/jbmr.2539.

Jiang, C.-C., Chiang, H., Liao, C.-J., Lin, Y.-J., Kuo, T.-F., Shieh, C.-S. et al. (2007): Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. In: *Journal of Orthopaedic Research* 25 (10), S. 1277–1290. DOI: 10.1002/jor.20442.

Kakaiya, R., Miller, W. V., Gudino, M. D. (1991): Tissue transplant-transmitted infections. In: *Transfusion* 31 (3), S. 277–284. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1991.31391165182.x.

Kamleitner, C., Changi, K., Felfel, R. M., Scotchford, C. A., Sottile, V., Kluger, R. et al. (2020): Preclinical biological and physicochemical evaluation of two-photon engineered 3D biomimetic copolymer scaffolds for bone healing. In: *Biomaterials Science* 8 (6), S. 1683–1694. DOI: 10.1039/c9bm01827a.

Khan, S. N., Cammisa, F. P., Sandhu, H. S., Diwan, A. D., Girardi, F. P., Lane, J. M. (2005): The biology of bone grafting. In: *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 13 (1), S. 77–86.

Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., Yang, B. B. (2002): Structure and function of aggrecan. In: *Cell Research* 12 (1), S. 19–32. DOI: 10.1038/sj.cr.7290106.

Klein, T. J., Malda, J., Sah, R. L., Hutmacher, D. W. (2009): Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones. In: *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 15 (2), S. 143–157. DOI: 10.1089/ten.TEB.2008.0563.

- Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T. C., Drogset, J. O., Grøntvedt, T., Solheim, E. et al. (2004): Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery*. American Volume 86 (3), S. 455–464. DOI: 10.2106/00004623-200403000-00001.
- Kock, N. B., van Susante, J. L. C., Buma, P., van Kampen, A., Verdonschot, N. (2006): Press-fit stability of an osteochondral autograft: Influence of different plug length and perfect depth alignment. In: *Acta Orthopaedica* 77 (3), S. 422–428. DOI: 10.1080/17453670610046352.
- Krakowski, P., Rejniak, A., Sobczyk, J., Karpiński, R. (2024): Cartilage Integrity: A Review of Mechanical and Frictional Properties and Repair Approaches in Osteoarthritis. In: *Healthcare (Basel, Switzerland)* 12 (16). DOI: 10.3390/healthcare12161648.
- Kramer, J., Böhrnsen, F., Lindner, U., Behrens, P., Schlenke, P., Rohwedel, J. (2006): In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (5), S. 616–626. DOI: 10.1007/s00018-005-5527-z.
- Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M., Südkamp, N. (2006a): Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 14 (11), S. 1119–1125. DOI: 10.1016/j.joca.2006.05.003.
- Kreuz, P. C., Erggelet, C., Steinwachs, M. R., Krause, S. J., Lahm, A., Niemeyer, P. et al. (2006b): Is Microfracture of Chondral Defects in the Knee Associated With Different Results in Patients Aged 40 Years or Younger? In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 22 (11), S. 1180–1186. DOI: 10.1016/j.arthro.2006.06.020.
- Kuettner, K. E., Cole, A. A. (2005): Cartilage degeneration in different human joints. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (2), S. 93–103. DOI: 10.1016/j.joca.2004.11.006.
- Labanca, L., Ciardulli, F., Bonsanto, F., Sommella, N., Di Martino, A., Benedetti, M. G. (2021): Balance and proprioception impairment, assessment tools, and rehabilitation training in patients with total hip arthroplasty: a systematic review. In: *BMC Musculoskeletal Disorders* 22 (1), S. 1055. DOI: 10.1186/s12891-021-04919-w.
- Langer, R., Vacanti, J. P. (1993): Tissue engineering. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5110), S. 920–926. DOI: 10.1126/science.8493529.
- Learmonth, I. D., Young, C., Rorabeck, C. (2007): The operation of the century: total hip replacement. In: *Lancet (London, England)* 370 (9597), S. 1508–1519. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60457-7.
- Levingstone, T. J., Ramesh, A., Brady, R. T., Brama, P. A. J., Kearney, C., Gleeson, J. P., O'Brien, F. J. (2016): Cell-free multi-layered collagen-based scaffolds demonstrate layer specific regeneration of functional osteochondral tissue in caprine joints. In: *Biomaterials* 87, S. 69–81. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.006.

- Liu, B., Gao, X., Sun, Z., Fang, Q., Geng, X., Zhang, H. et al. (2018): Biomimetic porous silk fibroin/biphasic calcium phosphate scaffold for bone tissue regeneration. In: *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 30 (1), S. 4. DOI: 10.1007/s10856-018-6208-4.
- Marder, R. A., Hopkins, G., Timmerman, L. A. (2005): Arthroscopic microfracture of chondral defects of the knee: a comparison of two postoperative treatments. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 21 (2), S. 152–158. DOI: 10.1016/j.arthro.2004.10.009.
- Markway, B. D., Tan, G.-K., Brooke, G., Hudson, J. E., Cooper-White, J. J., Doran, M. R. (2010): Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. In: *Cell Transplantation* 19 (1), S. 29–42. DOI: 10.3727/096368909X478560.
- Martin, R., Jakob, R. P. (2022): Review of K.H. Pridie (1959) on "A method of resurfacing osteoarthritic knee joints". In: *Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine* 7 (1), S. 39–46. DOI: 10.1016/j.jisako.2021.11.001.
- Martinek, V. (2003): Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (6), S. 166–170.
- Massen, F. K., Inauen, C. R., Harder, L. P., Runer, A., Preiss, S., Salzmänn, G. M. (2019): One-Step Autologous Minced Cartilage Procedure for the Treatment of Knee Joint Chondral and Osteochondral Lesions: A Series of 27 Patients With 2-Year Follow-up. In: *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 7 (6), 2325967119853773. DOI: 10.1177/2325967119853773.
- Matos, M. A., Araújo, F. P., Paixão, F. B. (2008): Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. In: *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 3, S. 4. DOI: 10.1186/1749-799X-3-4.
- Melsen, F., Steiniche, T. (1993): Bone histomorphometry. In: *Osteoporosis International* 3 (Suppl 1), S. 98–99. DOI: 10.1007/BF01621876.
- Meng, X., Ziadlou, R., Grad, S., Alini, M., Wen, C., Lai, Y. et al. (2020): Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. In: *Biochemistry Research International* 2020, S. 9659412. DOI: 10.1155/2020/9659412.
- Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R. J., Kreuz, P. C., Mandelbaum, B. R. (2009): Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. In: *The American Journal of Sports Medicine* 37 (10), S. 2053–2063. DOI: 10.1177/0363546508328414.
- Moran, C. J., Ramesh, A., Brama, P. A. J., O'Byrne, J. M., O'Brien, F. J., Levingstone, T. J. (2016): The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. In: *Journal of Experimental Orthopaedics* 3 (1), S. 1. DOI: 10.1186/s40634-015-0037-x.

Moreira, C. A., Dempster, D. W., Baron, R. (2000): Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling. In: Feingold, K. R., Anawalt, B., Blackman, M. R., Boyce, A., Chrousos, G., Corpas, E., et al. (Hg.), Endotext. South Dartmouth (MA).

Mow, V. C., Holmes, M. H., Lai, W. M. (1984): Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. In: *Journal of Biomechanics* 17 (5), S. 377–394. DOI: 10.1016/0021-9290(84)90031-9.

Muir, H. (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. In: *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17 (12), S. 1039–1048. DOI: 10.1002/bies.950171208.

Muller, S., Breederveld, R. S., Tuinebreijer, W. E. (2010): Results of osteochondral autologous transplantation in the knee. In: *The Open Orthopaedics Journal* 4, S. 111–114. DOI: 10.2174/1874325001004020111.

Mundi, R., Bedi, A., Chow, L., Crouch, S., Simunovic, N., Sibilsky Enselman, E., Ayeni, O. R. (2016): Cartilage Restoration of the Knee: A Systematic Review and Meta-analysis of Level 1 Studies. In: *The American Journal of Sports Medicine* 44 (7), S. 1888–1895. DOI: 10.1177/0363546515589167.

Naomi, R., Ridzuan, P. M., Bahari, H. (2021): Current Insights into Collagen Type I. In: *Polymers* 13 (16). DOI: 10.3390/polym13162642.

Nather, A. (2005): *Bone Grafts and Bone Substitutes*. Singapur: World Scientific.

Nehrer, S., Neubauer, M. (2023): Knorpelschaden und Arthrose des Kniegelenkes. In: Engelhardt, M., Raschke, M. (Hg.): *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 1–17. DOI: 10.1007/978-3-642-54673-0_311-1.

Netter, F. H., Böttcher, T. (2001): *Netters Orthopädie mit Farbtafeln von Frank H. Netter*. Stuttgart: Thieme.

Nguyen-Thanh, T., Nguyen-Tran, B.-S., Cruciani, S., Dang-Cong, T., Maioli, M. (2022): A rabbit femoral trochlear defect model for chondral and osteochondral regeneration. In: *Acta Vet. Brno* 91 (3), S. 293–301. DOI: 10.2754/avb202291030293.

Niemeyer, P., Albrecht, D., Aurich, M., Becher, C., Behrens, P., Bichmann, P. et al. (2023): Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden am Kniegelenk. In: *Z Orthop Unfall* 161 (01), S. 57–64. DOI: 10.1055/a-1663-6807.

Niu, X., Li, N., Du, Z., Li, X. (2023): Integrated gradient tissue-engineered osteochondral scaffolds: Challenges, current efforts and future perspectives. In: *Bioactive Materials* 20, S. 574–597. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.06.011.

O'Brien, F. J. (2011): Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. In: *Materials Today* 14 (3), S. 88–95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.

O'Connell, G. D., Lima, E. G., Bian, L., Chahine, N. O., Albro, M. B., Cook, J. L. et al. (2012): Toward engineering a biological joint replacement. In: *The Journal of Knee Surgery* 25 (3), S. 187–196. DOI: 10.1055/s-0032-1319783.

Olive, M., Boyer, C., Lesoeur, J., Thorin, C., Weiss, P., Fusellier, M., Gauthier, O. (2020): Preliminary evaluation of an osteochondral autograft, a prosthetic implant, and a biphasic absorbable implant for osteochondral reconstruction in a sheep model. In: *Veterinary Surgery* 49 (3), S. 570–581. DOI: 10.1111/vsu.13373.

Olsen, B. R., Reginato, A. M., Wang, W. (2000): Bone development. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, S. 191–220. DOI: 10.1146/annurev.cell-bio.16.1.191.

Ortega, N., Behonick, D. J., Werb, Z. (2004): Matrix remodeling during endochondral ossification. In: *Trends in Cell Biology* 14 (2), S. 86–93. DOI: 10.1016/j.tcb.2003.12.003.

Orvin, K., Carrie, D., Richardt, G., Desmet, W., Assali, A., Werner, G. et al. (2016): Comparison of sirolimus eluting stent with bioresorbable polymer to everolimus eluting stent with permanent polymer in bifurcation lesions: Results from CENTURY II trial. In: *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 87 (6), S. 1092–1100. DOI: 10.1002/ccd.26150.

Ossendorff, R., Walter, S. G., Schildberg, F. A., Spang, J., Obudzinski, S., Preiss, S. et al. (2023): Biologic principles of minced cartilage implantation: a narrative review. In: *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 143 (6), S. 3259–3269. DOI: 10.1007/s00402-022-04692-y.

Outerbridge, R. E. (1961): The etiology of chondromalacia patellae. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 43-B, S. 752–757. DOI: 10.1302/0301-620X.43B4.752.

Parmar, P. A., St-Pierre, J.-P., Chow, L. W., Spicer, C. D., Stoichevska, V., Peng, Y. Y. et al. (2017): Enhanced articular cartilage by human mesenchymal stem cells in enzymatically mediated transiently RGDS-functionalized collagen-mimetic hydrogels. In: *Acta Biomaterialia* 51, S. 75–88. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.028.

Pearle, A. D., Warren, R. F., Rodeo, S. A. (2005): Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. In: *Clinics in Sports Medicine* 24 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.csm.2004.08.007.

Peltonen, L., Halila, R., Ryhänen, L. (1985): Enzymes converting procollagens to collagens. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 28 (1), S. 15–21. DOI: 10.1002/jcb.240280104.

Perez-Carro, L., Mendoza Alejo, P. R., Castanedo, G. G., Solana, G. M., Fernandez Di-var, J. A., Rubin, P. G., Fernandez, A. A. (2021): Hip Chondral Defects: Arthroscopic Treatment With the Needle and Curette Technique and ChondroFiller. In: *Arthroscopy Techniques* 10 (7), e1669-e1675. DOI: 10.1016/j.eats.2021.03.011.

Perka, C., Janz, V. (2018): Endoprothetik. In: *Klinikerarzt* 47 (07), S. 308–314. DOI: 10.1055/a-0643-2328.

Petersen, W., Zantop, T. (2009): Das vordere Kreuzband. Grundlagen und aktuelle Praxis der operativen Therapie. Köln: Dt. Ärzte-Verl.

Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M., Lindahl, A. (2010): Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. In: *The American Journal of Sports Medicine* 38 (6), S. 1117–1124. DOI: 10.1177/0363546509357915.

Pfander, D., Swoboda, B., Cramer, T. (2006): The role of HIF-1alpha in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. In: *Arthritis Research & Therapy* 8 (1), S. 104. DOI: 10.1186/ar1894.

Plotkin, L. I., Stains, J. P. (2015): Connexins and pannexins in the skeleton: gap junctions, hemichannels and more. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (15), S. 2853–2867. DOI: 10.1007/s00018-015-1963-6.

Re'em, T., Tsur-Gang, O., Cohen, S. (2010): The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGFbeta1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. In: *Biomaterials* 31 (26), S. 6746–6755. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.025.

Ricard-Blum, S. (2011): The collagen family. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (1), a004978. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.

Robergs, R. A., Ghasvand, F., Parker, D. (2004): Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287 (3), R502-16. DOI: 10.1152/ajpregu.00114.2004.

Roughley, P. J., Lee, E. R. (1994): Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. In: *Microscopy Research and Technique* 28 (5), S. 385–397. DOI: 10.1002/jemt.1070280505.

Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J., Popoff, S. N. (2009): Bone Structure, Development and Bone Biology. In: Khurana, J. (Hg.): *Bone Pathology*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 1–50. DOI: 10.1007/978-1-59745-347-9_1.

Salzmann, G. M., Niemeyer, P., Vogt, S., Kreuz, P., Arnold, M., Fritz, J. et al. (2015): Practical execution of defect preparation prior to surgical cartilage intervention: results from a representative meeting survey among experts. In: *SpringerPlus* 4, S. 682. DOI: 10.1186/s40064-015-1451-3.

Sangiorgio, A., Andriolo, L., Gersoff, W., Kon, E., Nakamura, N., Nehrer, S. et al. (2024): Subchondral bone: An emerging target for the treatment of articular surface lesions of the knee. In: *Journal of Experimental Orthopaedics* 11 (3), e12098. DOI: 10.1002/jeo2.12098.

Saris, D., Price, A., Widuchowski, W., Bertrand-Marchand, M., Caron, J., Drogset, J. O. et al. (2014): Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Two-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. In: *The American Journal of Sports Medicine* 42 (6), S. 1384–1394. DOI: 10.1177/0363546514528093.

Sartori, M., Pagani, S., Ferrari, A., Costa, V., Carina, V., Figallo, E. et al. (2017): A new bi-layered scaffold for osteochondral tissue regeneration: In vitro and in vivo preclinical investigations. In: *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 70 (Pt 1), S. 101–111. DOI: 10.1016/j.msec.2016.08.027.

Schewe, B., Fritz, J., Weise, K. (2008): Knorpelverletzungen am Kniegelenk. In: *Orthopädie und Unfallchirurgie update* 3 (2), S. 77–94. DOI: 10.1055/s-2007-995662.

Schinhan, M., Gruber, M., Vavken, P., Dorotka, R., Samouh, L., Chiari, C. et al. (2012): Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. In: *Journal of Orthopaedic Research* 30 (2), S. 214–220. DOI: 10.1002/jor.21521.

Schleicher, I., Lips, K. S., Sommer, U., Schappat, I., Martin, A. P., Szalay, G. et al. (2013): Biphasic scaffolds for repair of deep osteochondral defects in a sheep model. In: *The Journal of Surgical Research* 183 (1), S. 184–192. DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.036.

Schneider, S., Ossendorff, R., Walter, S. G., Berger, M., Endler, C., Kaiser, R. et al. (2024): Arthroscopic Autologous Minced Cartilage Implantation of Cartilage Defects in the Knee: A 2-Year Follow-up of 62 Patients. In: *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 12 (12), 23259671241297970. DOI: 10.1177/23259671241297970.

Schoon, J., Rakow, A. (2023): Grundlagen des Hüftgelenkersatzes: Biologische Reaktionen auf Abrieb. In: Perka, C., Heller, K.-D. (Hg.): *AE-Manual der Endoprothetik*. Berlin, Heidelberg: Springer. DOI: 10.1007/978-3-662-55485-2_53-1.

Seo, S.-J., Mahapatra, C., Singh, R. K., Knowles, J. C., Kim, H.-W. (2014): Strategies for osteochondral repair: Focus on scaffolds. In: *Journal of Tissue Engineering* 5, 2041731414541850. DOI: 10.1177/2041731414541850.

Shapiro, F. (2008): Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. In: *European Cells & Materials* 15, S. 53–76. DOI: 10.22203/ecm.v015a05.

Shapiro, F., Koide, S., Glimcher, M. J. (1993): Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 75 (4), S. 532–553. DOI: 10.2106/00004623-199304000-00009.

Sommerfeldt, D. W., Rubin, C. T. (2001): Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. In: *European Spine Journal* 10 Suppl 2 (Suppl 2), S86–95. DOI: 10.1007/s005860100283.

Song, H., Park, K.-H. (2020): Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. In: *Seminars in Cancer Biology* 67 (Pt 1), S. 12–23. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.04.008.

Spreda, M., Hauptmann, N., Lehner, V., Biehl, C., Liefeth, K., Lips, K. S. (2021): Porous 3D Scaffolds Enhance MSC Vitality and Reduce Osteoclast Activity. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (20). DOI: 10.3390/molecules26206258.

Steinmetz, J. D., Culbreth, G. T., Haile, L. M., Rafferty, Q., Lo, J., Fukutaki, K. G. et al. (2023): Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. In: *The Lancet Rheumatology* 5 (9), S. e508–e522. DOI: 10.1016/S2665-9913(23)00163-7.

Szerb, I., Kárpáti, Z., Hangody, L. (2006): In vivo arthroscopic cartilage stiffness measurement in the knee. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 22 (6), 682.e1-2. DOI: 10.1016/j.arthro.2006.01.002.

Taichman, R. S. (2005): Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. In: *Blood* 105 (7), S. 2631–2639. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2480.

Thomeer, L. T., Sheehan, F. T., Jackson, J. N. (2017): Normalized patellofemoral joint reaction force is greater in individuals with patellofemoral pain. In: *Journal of Biomechanics* 60, S. 238–242. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.06.024.

Vago, R., Plotquin, D., Bunin, A., Sinelnikov, I., Atar, D., Itzhak, D. (2002): Hard tissue remodeling using biofabricated coralline biomaterials. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 50 (2-3), S. 253–259. DOI: 10.1016/s0165-022x(01)00235-4.

Wang, L., Chen, X., Shi, S., Yang, X., Chen, H., Xiao, J. (2025): Advanced collagen-based scaffolds for cartilage and osteochondral regeneration: A review. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 311 (Pt 4), S. 143992. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.143992.

Wayne, J. S., McDowell, C. L., Shields, K. J., Tuan, R. S. (2005): In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering. In: *Tissue Engineering* 11 (5-6), S. 953–963. DOI: 10.1089/ten.2005.11.953.

Wessinghage, D. (1991): Themistocles Gluck. 100 Jahre künstlicher Gelenkersatz. In: *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 129 (5), S. 383–388. DOI: 10.1055/s-2008-1040261.

Wik, T. S., Foss, O. A., Havik, S., Persen, L., Aamodt, A., Witsø, E. (2010): Periprosthetic fracture caused by stress shielding after implantation of a femoral condyle endoprosthesis in a transfemoral amputee—a case report. In: *Acta Orthopaedica* 81 (6), S. 765–767. DOI: 10.3109/17453674.2010.533937.

Wilson, W. J., Jacobs, J. E. (1952): Patellar graft for severely depressed comminuted fractures of the lateral tibial condyle. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 34-A (2), S. 436–442.

Wirth, C. J., Rudert, M. (1996): Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature. In: *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 12 (3), S. 300–308. DOI: 10.1016/s0749-8063(96)90062-6.

Wolff, J. (2010): The classic: on the theory of fracture healing. 1873. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468 (4), S. 1052–1055. DOI: 10.1007/s11999-010-1240-9.

Wunderer, M. S., Sparenberg, V., Biehl, C., Liefeth, K., Lips, K. S. (2025): Poly-(D,L)-Lactide- ϵ -Caprolactone-Methacrylate Is a Suitable Scaffold Material for In Vitro Cartilage Regeneration. In: *International Journal of Molecular Sciences* 26 (12). DOI: 10.3390/ijms26125837.

Xu, S., Liu, H., Xie, Y., Sang, L., Liu, J., Chen, B. (2015): Effect of mesenchymal stromal cells for articular cartilage degeneration treatment: a meta-analysis. In: *Cytherapy* 17 (10), S. 1342–1352. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.05.005.

Yilmaz, B. K.; Kaga, S.; Kaga, E.; Demirel, H. H.; Konya, M. N. (2025): Evaluation of the efficacy of a double-layered and single-layered synthetic scaffold for the treatment of knee osteochondral defects - an experimental study. In: *Journal of orthopaedic surgery and research* 20 (1), S. 744. DOI: 10.1186/s13018-025-06179-z.

Yilmaz, T.; Schagemann, J.; Kreuz, P. (2023): Anatomie und Biologie des Gelenkknorpels und subchondralen Knochens. In: Mumme, Marcus; Gille, Justus (Hrsg.): *Therapie von Knorpelschäden*. Zürich: AGA-Knie-Knorpel-Meniskus-Komitee, S. 8–12.

Zhang, J., Shen, Y., Sun, Y., Yang, J., Gong, Y., Wang, K. et al. (2022): Design and mechanical testing of porous lattice structure with independent adjustment of pore size and porosity for bone implant. In: *Journal of Materials Research and Technology* 18, S. 3240–3255. DOI: 10.1016/j.jmrt.2022.04.002.

Zhang, X., Wu, Y., Pan, Z., Sun, H., Wang, J., Yu, D. et al. (2016): The effects of lactate and acid on articular chondrocytes function: Implications for polymeric cartilage scaffold design. In: *Acta Biomaterialia* 42, S. 329–340. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.06.029.

11 Publikationsverzeichnis

Tüngler, T. L., Lehner, V., El Khassawna, T., Heiß, C., Liefeith, K., Noll, M., Ortman, C., Sommer, U., Wagner, H. W., Wiedenmann, J., Biehl, C., Lips, K. S. (2023). Makroskopische Untersuchung der Einheilung neu entwickelter Polymerimplantate bei osteochondralen Kniedefekten am Schafmodell. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2023), Berlin, 24.-27.10.2023. German Medical Science GMS Publishing House. DOI: 10.3205/23dkou488

Tüngler, T. L., Biehl, C., Heiß, C., Liefeith, K., Noll, M., Ortman, C., Rießle Fernandez-Tenllado, A., Wagner, H., Wiedenmann, J., Lips, K. (2024). Molekularbiologische Analyse der Einheilung neu entwickelter Polymerimplantate bei osteochondralen Kniedefekten am Schafmodell. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2024), Berlin, 22.-25.10.2024. German Medical Science GMS Publishing House. DOI: 10.3205/24dkou388

Tüngler, T. L., Biehl, C., El Khassawna, T., Rießle Fernandez-Tenllado, A., Wagner, H., Noll, M., Ortman, C., Liefeith, K., Wiedenmann, J., Heiss, C., Lips, K. S. (2025). Molecular biological and macroscopic analysis of the integration of newly developed polymer implants in osteochondral knee defects in a sheep model. 24th European Congress of Trauma and Emergency Surgery (ECTES 2025), Aachen, 13.-15.04.2025. Springer-Verlag GmbH Germany. DOI: 10.1007/s00068-025-02902-x

Tüngler, T. L., Sterneder, C. M., Haralambiev, L., & Boettner, F. (2025). What does the patients' perception of alignment tell us about alignment targets in total knee arthroplasty? Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 145(1). DOI: 10.1007/s00402-025-05765-4.

Tüngler, T. L., Pawelke, J., El Khassawna, T., Heiss, C., Knapp, G. (2025). Traumatic Knee Joint Dislocation in a Total Knee Arthroplasty with Rupture of the Popliteal Artery and a Subsequent Prosthesis Change: A Case Report. Journal of Orthopaedic Case Reports, 15(4), 99–103. DOI: 10.13107/jocr.2025.v15.i04.5460.

Tüngler, T. L., Schneider, M. M. (2024). Prospektive randomisierte klinische Studie zum Vergleich von arthroskopischer Rekonstruktion und Débridement bei partiellen Subskapularissehnenverletzungen [Prospective randomized clinical trial to compare arthroscopic repair and debridement for partial subscapularis tendon tears]. Obere Extremität, 19(2). DOI: 10.1007/s11678-024-00786-8.

Oettl, F. C., Tüngler, T. L., Kraus, M., Dagli, M. M., Inclan, P., Rodeo, S. A. (2024). Efficacy and Safety of Xenograft Augmentation in Rotator Cuff Repair: A Systematic Review and Meta-Analysis. JSES Reviews Reports and Techniques, 5(10). DOI: 10.1016/j.xrrt.2024.11.004.

Sterneder, C. M., Tüngler, T. L., Haralambiev, L., Boettner, C. S., & Boettner, F. (2024). Pelvic Roll Back Can Trigger Functional Psoas Impingement in Total Hip Arthroplasty. Arthroplasty Today, 27(Suppl 2). DOI: 10.1016/j.artd.2024.101375.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

An erster Stelle gilt mein aufrichtiger und tiefster Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Lips. Ich möchte mich für das Vertrauen und die Chance bedanken, mit dieser Arbeit Teil des Poly-Implant-Druck-Projekts im Labor der Experimentellen Unfallchirurgie gewesen zu sein. Darüber hinaus bin ich außerordentlich dankbar für die Möglichkeit, unsere Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen präsentiert haben zu können. Danke für all die wertvollen Impulse, die diese Arbeit maßgeblich geprägt haben. Das entgegengebrachte Vertrauen, der stetige Optimismus und das enorme Engagement waren eine unschätzbare Motivation!

Ein großes Dankeschön möchte ich zudem an Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Christian Heiß und die gesamte Arbeitsgruppe der Experimentellen Unfallchirurgie richten. Die kooperative und herzliche Atmosphäre habe ich vom ersten Tag an sehr geschätzt. Danke für die ständige Unterstützung im Laboralltag und nicht zuletzt für die vielen gemeinsamen Momente im Stall oder auf der Weide mit unseren teilweise weniger kooperativen, wolgigen Versuchspartnern.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitenden der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, insbesondere Herrn Dr. Henrik Wagner, für die professionelle sowie fürsorgliche Betreuung unserer Versuchstiere während des gesamten Zeitraums bedanken.

Außerdem gilt mein Dank allen Partnern des Verbundprojekts „Poly-Implant-Druck“. Dabei sind besonders Multiphoton Optics, Meidrix, IBA und Mathys für die Bereitstellung der Polymere, des Kollagenfillers und des OP-Instrumentariums hervorzuheben. Des Weiteren danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen: 13XP5089F) für die finanzielle Förderung dieses Projekts.

Schließlich gilt ein besonderer Dank meiner Partnerin, die mit mir seit Jahren durch alle Höhen und Tiefen geht, sowie meinem Vater, der mir stets mit unerschütterlichem Optimismus zur Seite steht. Außerdem danke ich meiner Mutter, meiner gesamten Familie und meinen Freunden. Ohne euren Rückhalt wäre diese Promotion nicht möglich gewesen. Danke für die aufmunternden Worte, für das geduldige Zuhören, für das Feiern der großen und kleinen Erfolge. Danke, dass Ihr mich auf diesem Weg begleitet habt!