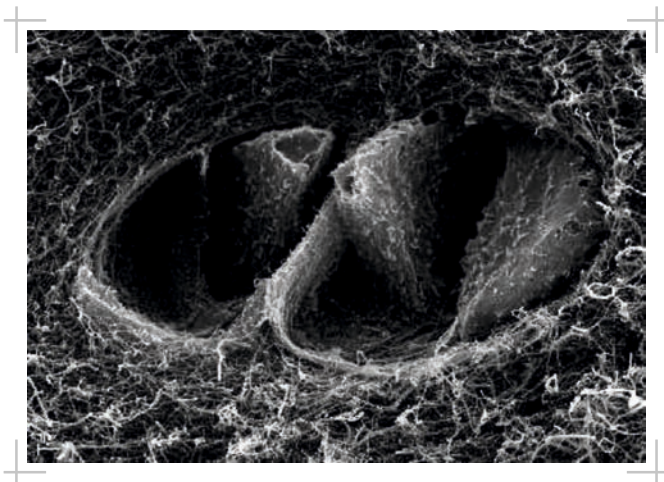


Vergleichende in-vitro-Untersuchung von humanem und tierischem Knorpelgewebe im Rahmen der Entwicklung eines idealen Tiermodells in der Knorpelforschung

Kai Thomas Unzeitig



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



edition vom 1. August
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Vergleichende in-vitro-Untersuchung von humanem und
tierischem Knorpelgewebe im Rahmen der Entwicklung
eines idealen Tiermodells in der Knorpelforschung**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Kai Thomas Unzeitig

aus Herborn

Gießen 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Direktor: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler

Gutachter: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Melzer

Tag der Disputation: 10.03.2015

**Für meine geliebte Frau
und
meine Eltern**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung

1.1	Einleitung	1
-----	------------	---

2. Grundlagen 3

2.1	Aufbau und Struktur des Knorpels	3
2.1.1	Funktion und Eigenschaften	5
2.1.2	Extrazelluläre Matrix	6
2.1.3	Proteoglykane	7
2.1.4	Kollagene	8
2.1.5	Struktur hyalinen Gelenkknorpels	10
2.1.6	Elastischer Knorpel	12
2.1.7	Faserknorpel	13
2.2	Biomechanische Eigenschaften des Knorpels	14
2.3	Knorpelschäden	15
2.3.1	Diagnostik und Klassifikation von Knorpelläsionen	16
2.4	Möglichkeiten des Knorpelersatzes	19
2.4.1	Mikrofrakturierung	20
2.4.2	Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT)	21
2.4.3	Autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT)	24
2.5	Tissue-engineering	26

3. Material und Methodik	28	
3.1	Probengewinnung	28
3.2	Biomechanische Messungen	31
3.2.1	Aufbau der Messvorrichtung	32
3.2.2	Biomechanische Testung	34
3.2.3	Biomechanische Vorversuche	35
3.3	Bestimmung der Knorpeldicke	41
3.4	Histologische Untersuchungen	43
3.4.1	Fixierung und Paraffineinbettung	43
3.4.2	Technovit 9100neu® – Einbettung	43
3.4.3	Eponeinbettung	44
3.4.4	Haematoxylin-Eosin-Färbung	44
3.4.5	Alcianblau-Färbung	45
3.4.6	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	45
3.5	Chondrozytenzählung	46
3.6	Datenerfassung und Statistik	47
3.6.1	ANOVA-Test	47
3.6.2	Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test)	48
3.6.3	Scheffé Test	48
4. Ergebnisse	49	
4.1	Knorpeldickemessung innerhalb der einzelnen Spezies	49

4.2	Knorpeldickemessung zwischen den verschiedenen Spezies	51
4.3	Chondrozytenzählung	55
4.4	Biomechanik	56
4.4.1	Auswertung der Kompressionsversuche	56
4.4.1.1	Kompressionsversuche lateraler dorsaler Kondylus	57
4.4.1.2	Kompressionsversuche laterales Patellagleitlager	61
4.4.1.3	Kompressionsversuche medialer Kondylus	63
4.4.2	Auswertung der Relaxationsversuche	65
4.4.2.1	Relaxationsversuche lateraler dorsaler Kondylus	66
4.4.2.2	Relaxationsversuche laterales Patellagleitlager	68
4.4.2.3	Relaxationsversuche medialer Kondylus	69
4.5	Histologische Untersuchungen	70
4.5.1	Einteilung der Knorpelzonen	70
4.5.2	Verteilung der Alcianblau-positiven Glycosaminoglycane	73
4.5.3	Struktur und Verteilung der Chondrozyten	74
4.5.4	Rasterelektronenmikroskopie	77
	5. Diskussion	81
	6. Zusammenfassung	99
	7. Summary	101

8. Abbildungsverzeichnis	103
9. Tabellenverzeichnis	107
10. Literaturverzeichnis	109
11. Ehrenwörtliche Erklärung	123
12. Danksagung	124
13. Tabellarischer Lebenslauf	126

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Die eingeschränkte Heilungsfähigkeit von Gelenkknorpel ist ein zentrales Problem bei der Behandlung von Knorpelschäden.

Der Knorpel selbst hat wegen seiner Avaskularität und der verminderten Proliferationsmöglichkeit adulter Chondrozyten keine Möglichkeit, Defekte mit neuem hyalinem Knorpel aufzubauen. Die Vernetzung der Chondrozyten mit Kollagenfasern und Proteoglykanen verhindert, dass sie zu den Defekten gelangen [Mankin 1982], [Buckwalter und Mankin 1997].

Daher führen Schädigungen des Knorpels, insbesondere von mehr als 3mm Größe, zu einem bleibenden Defekt [Convery et al. 1972].

Durch Auffaserungen und azelluläre Bezirke droht eine fortschreitende Arthrose, die zur Notwendigkeit der Implantation eines endoprothetischen Gelenkersatzes führen kann. Dies sollte jedoch insbesondere bei jungen Patienten u.a. wegen der eingeschränkten Haltbarkeit der Prothesen vermieden werden. Zum anderen werden Unfallchirurgen und Orthopäden immer häufiger mit dem Problem des Knorpelschadens gerade beim jungen Sportler konfrontiert, einem Bereich, in dem ein sehr hoher funktioneller Anspruch besteht.

Ziel der Therapie von Gelenkflächendefekten sollte eine Wiederherstellung der Gelenkoberfläche mit hyalinem Knorpel und eine danach uneingeschränkte und schmerzlose Beweglichkeit der Gelenke sein.

Die bisher verwendeten operativen Verfahren wie Gelenklavage, Debridement, Shaving, subchondrale Bohrungen, Mikrofrakturierung oder die Abrasionsarthroplastik resultieren nicht in der Wiederherstellung von normalem hyalinem Knorpel, sondern führen zur Ausbildung von Faserknorpel. Diese Auffüllung des Defektes führt zwar zu einer vorübergehenden Schmerzfreiheit, doch das Reparationsgewebe ist mechanisch nicht ausreichend belastbar [Hunziker und Rosenberg 1996, Knutsen et al. 2004].

Ein alternativer Ansatz zur Regeneration von Gelenkknorpel ist die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT), die wir bei unseren Versuchen verwendeten.

Dabei werden körpereigene Knorpelzellen entnommen, in einem Zelllabor vermehrt und anschließend wieder in das Gelenk replantiert.

Bislang kann jedoch auch mit dieser Methode das Ziel der Wiederherstellung des hyalinen Knorpels nicht erreicht werden.

Bestenfalls entsteht ein hyalin-ähnlicher Regeneratknorpel. [Horas und Schnettler 2003].

Zur wissenschaftlichen Überprüfung und Weiterentwicklung dieser Behandlungsmethode ist es erforderlich, je nach konkreter Fragestellung, über geeignete Tiermodelle zu verfügen, die die Situation des humanen Knorpelschadens widerspiegeln.

Die Durchsicht der verfügbaren Literatur zeigt, dass tierexperimentelle Untersuchungen, auch der weiterentwickelten Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation, in der Regel als Kleintierversuche durchgeführt wurden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei Kleintieren um andere Größen- und Belastungsverhältnisse und somit auch um eine veränderte Gelenkmorphologie als beim Menschen handelt.

Nach unserem besten Wissen wurde eine solche vergleichende Studie bisher noch nicht durchgeführt.

Ziel der hier vorgestellten Studie ist es, ein zuverlässiges Großtiermodell zu entwickeln, um die klinische Anwendung der ACT überprüfen zu können.

Hierzu wurden vergleichend biomechanische, biochemische und histologische Untersuchungen an den in der Knorpelforschung regelmäßig verwendeten Versuchstieren Kaninchen, Hund, Schaf und Pferd im Vergleich zum Menschen vorgenommen. Die Untersuchungen erfolgten am Knorpel des Kniegelenkes der jeweiligen Spezies.

2. Grundlagen

2.1 Aufbau und Struktur des Knorpels

Knorpelgewebe ist ein festes, sowohl druck- als auch biegungselastisches, gefäßarmes Stützgewebe, das aus Zellen und Interzellulärsubstanz besteht. Das Grundgerüst des Knorpels wird von der kugelig geformten Knorpelzelle, dem Chondrozyt gebildet (Abb. 1).

Die Zellen des Knorpels leiten sich von Mesenchymzellen ab. Anfangs sind die Mesenchymzellen miteinander verbunden, doch mit Beginn der Abscheidung der Zwischenzellsubstanz verlieren sie ihre Fortsätze und differenzieren sich zu rundlichen Vorknorpelzellen. Aus den Vorknorpelzellen entstehen anschließend die kugeligen Chondroblasten. Während der weiteren Differenzierung drängen die Chondroblasten durch ihre starke Sekretion von Interzellulärsubstanz auseinander und werden zu Chondrozyten.

Im ausdifferenzierten Knorpel liegen die Chondrozyten in sogenannten Zellhöhlen (Lakunen) teils isoliert, teils dicht gedrängt aneinander.

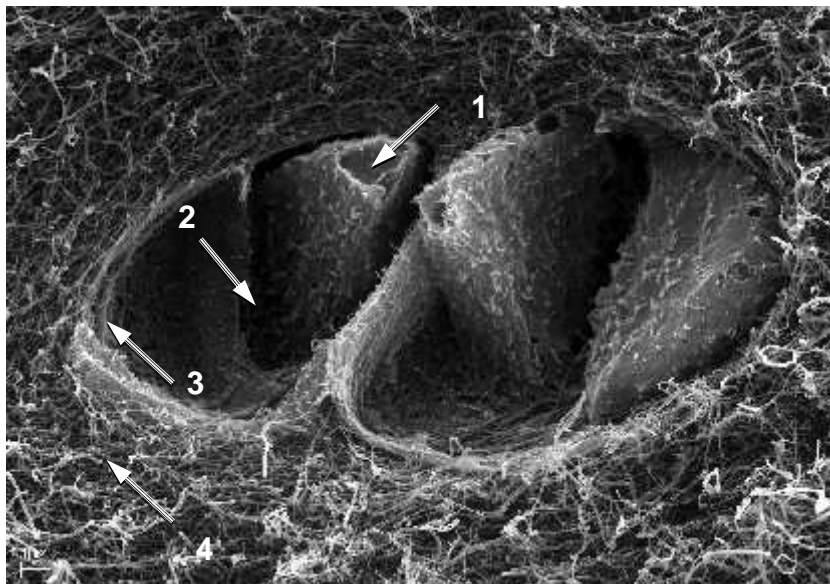


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopisches Bild eines Säulenchondrons aus der Radiärzone des Pferdeknorpels. Die dreidimensionale Darstellung lässt die Ultrastruktur von Chondrozyten-Oberfläche (1), perizellulärer Matrix (2) und der perizellulärer Kapsel (3) ebenso wie die Unterschiede im Kollagengerüst von perizellulärer (2) und territorialer Matrix (4) gut erkennen. Equines Knorpelpräparat, Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen.

Chondrozyten enthalten viel raues endoplasmatisches Retikulum und große Golgi-Komplexe. In den Chondrozyten ist Fett und Glykogen abgelagert. Die Knorpelbildung wird hormonell durch STH (Wachstumshormon), Thyroxin und Testosteron gefördert und durch Kortison, Hydrokortison und Östradiol gehemmt [Putz 1994].

Im Vergleich zu anderen Gewebetypen des menschlichen Gewebes ist der Wassergehalt im hyalinen Gelenkknorpel mit 70-80% sehr hoch.

Der zelluläre Anteil am Gewebevolumen beträgt lediglich 1-10%. Der faserige Anteil, welcher vor allem aus Kollagenen vom Typ II, IX, XI besteht, macht 12-14% aus. Ein weiterer Bestandteil von 7-9% sind die Proteoglykane. Mineralisierte Bestandteile sind mit ca. 4% im Knorpel enthalten (Abb. 2) [Buckwalter 1998, Erggelet und Steinwachs 2001, Metz 2001, Poole et al. 1997].

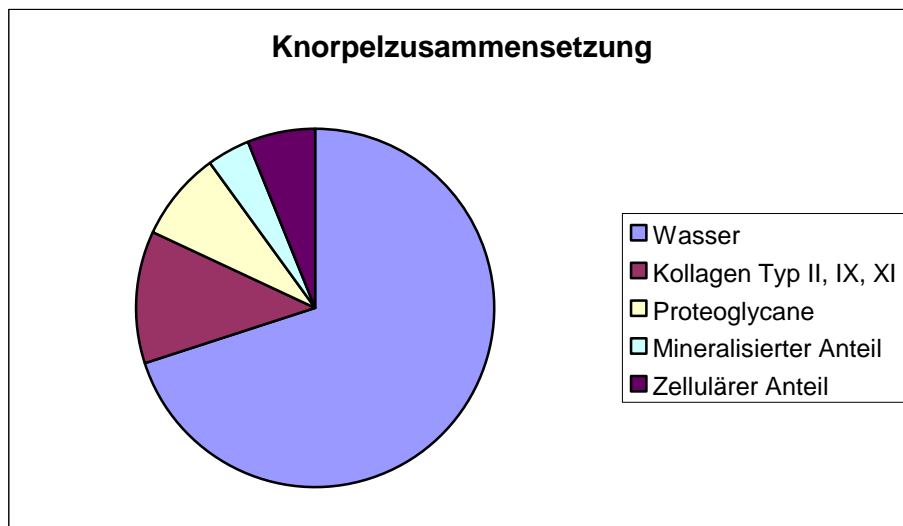


Abb.2: Darstellung der Knorpelzusammensetzung

Knorpel ist damit nur in sehr geringem Ausmaß mineralisiert und besitzt eine hohe Druck- sowie Zugelastizität. Er nimmt daher nach Deformierung seine ursprüngliche Form wieder an.

Der Knorpel wird von einer festen, faserigen Bindegewebsschicht umhüllt, dem Perichondrium. Dieses enthält sensible Nervenendigungen und ist damit schmerzempfindlich. Das Perichondrium gliedert sich in eine innere, zellreiche Schicht, das Stratum cellulare, und eine äußere, faserreiche Schicht, das Stratum fibrosum, das aus kollagenen und elastischen Fasern besteht. Die Aufgabe des Perichondriums ist zum einen die Ernährung des Knorpels sowie zum anderen im Kindesalter den noch

regenerationsfähigen Knorpel zu bilden. Der Gelenkknorpel kann nicht erneuert werden, da er kein Perichondrium besitzt [Drenckhahn 1994].

2.1.1 Funktion und Eigenschaften

Der in dieser experimentellen Arbeit interessierende hyaline Knorpel findet sich an den artikulierenden Knochenenden synovialer Gelenke. Er überzieht in einer mehr oder weniger dünnen Schicht die Gelenkoberflächen und besitzt unterschiedliche Funktionen. Gesunder hyaliner Knorpel weist eine erhebliche Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung auf. Er ermöglicht die schmerzfreie Übertragung von Druck- und Scherbelastung auf die subchondralen Knochen trabekel. Ebenso sichert er die Kongruenz zwischen den verschiedenen Gelenkflächen und gewährleistet zusammen mit der Synovialflüssigkeit ein möglichst reibungsarmes Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen mit einem niedrigen Reibungskoeffizienten [Swann und Radin 1972, Swann et al. 1974, Swann et al. 1981]. Diese Eigenschaften werden durch die spezielle Zusammensetzung und das Zusammenwirken der einzelnen Bestandteile ermöglicht [Wong und Hunziker 2001].

Die dünnsten Knorpelschichten finden sich beim Menschen an den wenig druckbelasteten Fingergelenken. Der dickste Knorpelüberzug findet sich dagegen an den mechanisch stark belasteten Gelenkflächen des Patellofemoralgelenks [Wong und Hunziker 2001, Minas und Peterson 1999].

Die Ernährung der Zellen erfolgt ausnahmslos durch Diffusion der Nahrungsbestandteile aus der Synovialflüssigkeit durch die extrazelluläre Matrix [Fischer et al. 1995]. Die Diffusionsstrecke ist je nach Lage der Zelle sehr lang. Da aufgrund des Diffusionssystems den Knorpelzellen im Vergleich zu Zellen perfundierter Gewebe des Körpers nur wenig Sauerstoff zur Verfügung steht, weisen sie einen größtenteils anaeroben Metabolismus auf [Buckwalter und Mankin 1997].

Die Definition des hyalinen Knorpels als bradytrophes Gewebe basiert auf der geringen Zelldichte dieses Gewebes, und nicht etwa auf einer geringen metabolischen Aktivität

der einzelnen Zelle. Hyaline Knorpelzellen scheinen nicht nur ausreichende Mengen an extrazellulären Matrixbestandteilen zu synthetisieren, sondern diese darüber hinaus auch in einer einzigartigen Anordnung zusammenzustellen [Rudert et al. 2000].

Chondrozyten müssen den Bedarf an Matrixbestandteilen, der durch den Abbau von Fasern und Makromolekülen an der Knorpeloberfläche entsteht, erkennen und darauf mit einer angepassten Synthese verlorener Bestandteile reagieren [Buckwalter und Mankin 1997].

Sowohl eine länger andauernde Immobilisation, als auch eine anhaltende physiologische Mehrbelastung eines synovialen Gelenks resultiert in einer angepassten Aktivität der Chondrozyten [Martin und Buckwalter 2000].

Im ersteren Fall kann eine fortschreitende Abnahme des Proteoglykangehalts der Matrix sogar bis zum Verlust der Knorpelfunktion führen [Guilak et al. 1999]. Inwieweit die Anpassungsfähigkeit im Alter verloren geht, ist noch nicht abschließend geklärt [Buckwalter 1995]. Bekannt ist jedoch, dass Chondrozyten im Alter auf bestimmte Stimuli, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, nicht mehr im selben Maß reagieren wie in jungen Jahren [Martin et al 1997].

Die Reparationsfähigkeit des Gelenkknorpels ist jedoch nach Schädigung sehr limitiert [Metz 2001]. Hierfür wird unter anderem die Abwesenheit von Blut- und Lymphgefäßen sowie von Nerven verantwortlich gemacht. [Poole et al 1997, Metz 2001, Buckwalter und Mankin 1997].

2.1.2 Extrazelluläre Matrix

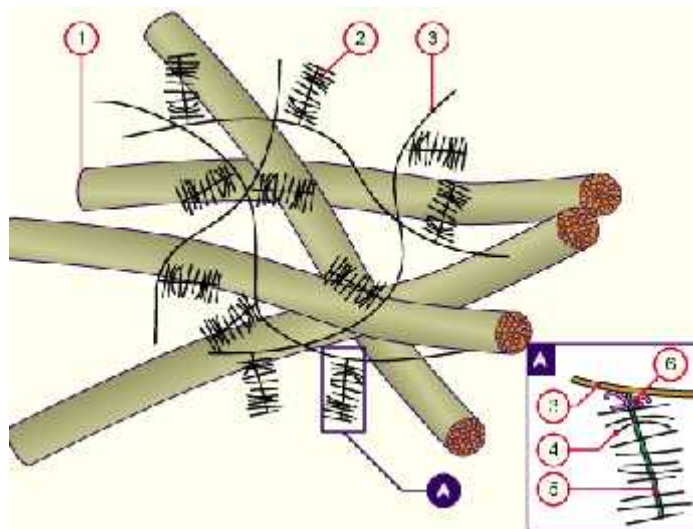
Die Extrazelluläre Matrix (EZM) besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: einem wässrigen Anteil und einem strukturellen Anteil aus geometrisch angeordneten Makromolekülen. Form und Stabilität des Knorpels beruhen hauptsächlich auf dem dichten Netzwerk der Makromoleküle. Das Zusammenspiel von wässrigem Matrixanteil mit dem makromolekularen Netzwerk bewirkt hauptsächlich die mechanischen Eigenschaften wie Festigkeit und Elastizität des hyalinen Knorpels [Buckwalter und Mankin 1997, Dijkgraaf et al. 1995, Guilak et al 1999].

2.1.3 Proteoglykane

Ein Hauptbestandteil der Grundsubstanz sind Proteoglykan- Hyaluronsäure- Aggregate (Abb. 3). Sie machen circa 25 - 35% der Trockenmasse des Knorpels aus. Hyaluronsäuren bilden dabei den zentralen Bestandteil, das „Rückgrat“ der flaschenbürstenartigen Makromolekül-Aggregate.

Glykosaminoglykanketten, bestehend aus einem zentralen Polypeptid mit Anlagerung von Chondroitin-, Dermatan- und Keratansulfaten, sind kovalent daran gebunden [Buckwalter und Rosenberg 1982]. Die negativ geladenen Sulfat- und Carboxylatgruppen bedingen die hohe Wasserbindungskapazität, da sich an die negativen Partialladungen bipolare Wassermoleküle anlagern können [Buckwalter und Mankin 1997, Metz 2001]. Der Gehalt dieser Moleküle variiert zwischen den einzelnen Schichten des Knorpels. Auch ändert sich der Anteil der Makromoleküle an der Matrix während des Alterungsprozesses, nach Knorpeltraumen oder degenerativen Gelenkerkrankungen [Roughley und Lee 1994].

Die sehr hohe Wasserbindungskapazität der Proteoglykanaggregate ist maßgeblich für die Elastizität des hyalinen Gelenkknorpels verantwortlich.



- | | | | |
|----|---------------------|----|-------------------|
| 1. | Kollagene Fibrillen | 4. | Glykosaminglykane |
| 2. | Proteoglykane | 5. | Core-Protein |
| 3. | Hyaluronsäure | 6. | Link-Proteine |

Abb. 3: Die Hyaluronsäure- Moleküle (HA) bilden lineare Aggregate mit vielen Proteoglykanen, welche mit kollagenen Fibrillen ein Netzwerk bilden. Im Ausschnitt A sieht man, wie die Glykosaminoglykane mit den HA durch Link- Proteine verbunden sind. (Abbildung aus der Abteilung für Anatomie, 2004-2005 Département de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg, Pérolles, CH-1705 Fribourg, Suisse).

2.1.4 Kollagene

Kollagene sind ein weiterer Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix (EZM). Sie machen bis zu 60% der Knorpeltrockenmasse aus. In den tieferen Knorpelzonen sind sie relativ homogen verteilt. Besonders groß ist ihr Anteil in der Tangentialzone. Das Kollagennetzwerk ist maßgeblich für die Zugfestigkeit und auch für die Form des Knorpels verantwortlich [Buckwalter und Mankin 1997, Metz 2001].

Der hyaline Gelenkknorpel besteht aus fünf verschiedenen Kollagentypen: II, VI, IX, X, XI.

Davon macht Kollagen Typ II ca. 90 % aus. Im elektronenmikroskopischen Bild imponiert es in Form quer gebänderter Fibrillen. Das dichte Kollagennetzwerk, dessen Lücken mit Proteoglykanen ausgefüllt sind, wird größtenteils aus Kollagen Typ II aufgebaut (Abb. 4) [Buckwalter und Mankin 1997, Burgeson und Nimni 1992, Dijkgraaf et al 1995].

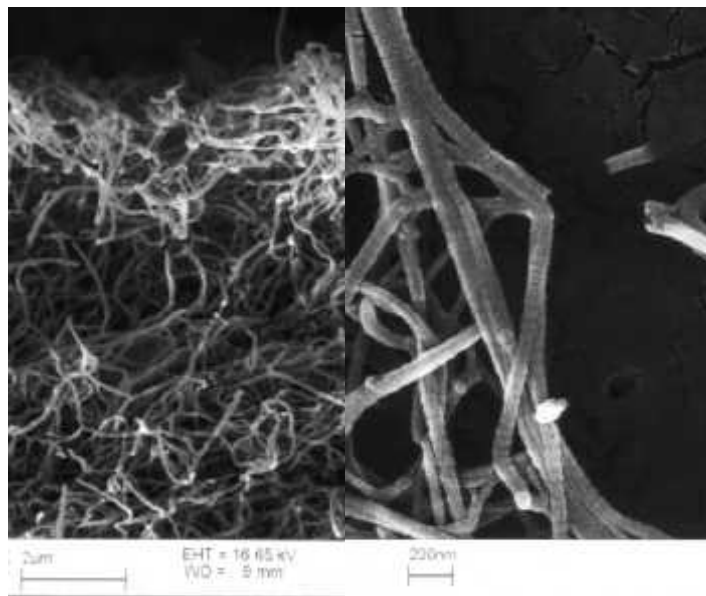


Abb. 4: Darstellung Kollagennetzwerk, Kollagen Typ II. Horas U., Schnettler R. et al. JBJS-A 85, 2003. Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen.

Kollagen Typ VI scheint an der Stabilisierung der perizellulären Matrix beteiligt zu sein. Insbesondere spielt es eine Rolle bei dem Zusammenhalt eines Chondrons und dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung (Tab. 1) [Poole et al 1992].

Kollagen Typ IX und Typ X binden kovalent an die quer gebänderten Kollagen-Typ II-Fibrillen. Sie stabilisieren so das gesamte Netzwerk (Tab. 1) [Bruckner et al. 1988].

Die Funktion von Kollagen Typ XI ist nicht genau bekannt. Vermutlich unterstützt es ebenfalls die Stabilisierung des Kollagen Typ II-Netzwerks (Tab. 1) [Buckwalter und Mankin 1997]. Der Rest der EZM wird von nicht-kollagenartigen Proteinen, den Matrixproteinen, und Glykoproteinen gebildet. Ihr Anteil an der gesamten Knorpelmasse macht nur ungefähr 1% aus. In der Trockenmasse beträgt der Anteil ungefähr 5 - 15% [Dijkgraaf et al. 1995].

Glykoproteine bestehen aus einem Proteinkern mit daran gebundenen Mono- oder Oligosacchariden. Die Funktion ist bisher ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. Anchorin CII bindet vermutlich Chondrozyten an die Kollagenfibrillen der EZM [Mollenhauer et al. 1984, Reid et al. 2000].

Die Funktion einiger Matrixproteine, wie beispielsweise Tenascin und Fibronectin, welche auch in der EZM vieler anderer Gewebe zu finden sind, werden unterschiedlich diskutiert. Vermutlich sind sie am Zusammenspiel von Zellen und Matrix beteiligt. Zusätzlich scheinen sie an der Gewebsreaktion entzündlicher Gelenkerkrankungen beteiligt zu sein [Hayashi et al 1996].

Molekül	Anteil in %	Eigenschaften	Funktion
Kollagen II	85-95	Hauptkomponente der Makro-Fibrillen	Nimmt Zugkräfte auf
Kollagen VI	1-2	Formt perizelluläre Mikro-Fibrillen	Sicherung der Chondrone
Kollagen IX	1-2	Verbunden mit der Oberfläche von Makromolekülen	Nimmt Zugkräfte auf, Fibrillenvernetzung
Kollagen X	1-2	Durch hypertrophe Chondrozyten, in kalzifizierter Zone	Strukturelle Stabilisierung
Kollagen XI	3	In und auf Makrofibrillen	Unterstützt Fibrillenformation, reguliert Fibrillendicke

Tab. 1: Hauptkollagene des hyalinen Knorpels und deren Funktionen (nach Poole 2001).

2.1.5 Struktur hyalinen Gelenkknorpels

Im gesunden Gelenkknorpel lassen sich verschiedene Zonen abgrenzen (Abb. 5):

1. Tangentialzone
2. Übergangszone
3. Radiärzone
4. Mineralisierungszone.
5. Subchondraler Knochen

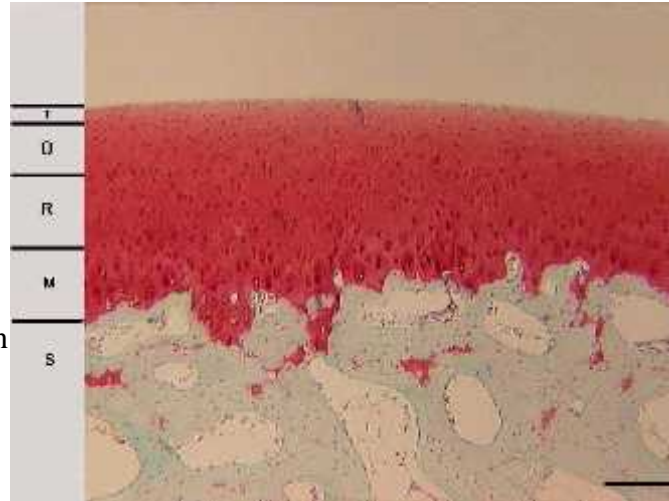


Abb. 5: Humaner hyaliner Gelenkknorpel (medialer Femurkondylus); Zoneneinteilung am linken Bildrand (T = Tangentialzone, Ü = Übergangszone, R = Radiärzone, M = Mineralisierungszone, S = subchondraler Knochen). (Safranin-O Färbung; Originalvergrößerung 20fach; Skalierung: 1mm). (Menschliches Knorpelpräparat, Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

Die oberflächliche Zone I ist die dünnste Zone. Ihr liegt eine Schicht feiner Kollagenfibrillen auf, welche als Lamina splendens bezeichnet wird. Chondrozyten dieser Zone zeigen im mikroskopischen Bild eine stark abgeflachte und diskoide Form. Sie dient als Gleitschicht und macht beim Menschen ca. 10-15% der Gesamtdicke aus.

In der Übergangszone (Zone II) sind die Zellen mehr sphärisch und in kleinen Gruppen angeordnet. Sie stellt mit 40-60% die dickste Zone der Knorpelschicht. Die Zellen enthalten viele Organellen zur Matrix-Synthese, wie Golgi- Membranen und raues Endoplasmatisches Retikulum (rER). Sie synthetisieren wesentlich mehr Proteoglykane als die Zellen der Tangentialzone und zudem dickere Kollagenfibrillen [Aydelotte et al. 1992, Buckwalter und Mankin 1997].

In der Radiär- und Mineralisierungszone gruppieren sich Chondrozyten (Abb. 7) zu Chondronen. Diese so genannte tiefe Zone nimmt 30-40% der Knorpelaufgabe ein. Außerdem zeigt sich eine säulenförmige Anordnung der Chondrozyten in der Radiärzone. Jedes Chondron kann als „metabolische Einheit“ aufgefasst werden [Winter et al. 1998]. Sie synthetisieren die dicksten Kollagenfibrillen [Keene et al. 1995]. In der Radiärzone findet sich außerdem der höchste Proteoglykangehalt.

Die Zellen dieser Zone haben die höchste metabolische Aktivität aller Chondrozyten (Abb. 6). Die Mineralisierungszone ist sehr dünn. Sie trennt den nicht kalzifizierten Knorpel vom subchondralen Knochen. Die Zellen dieser Zone sind kleiner als die der Radiärzone. Sie besitzen zudem weniger rER und weniger Golgi-Membranen. Ihre metabolische Aktivität ist äußerst gering [Buckwalter und Mankin 1997, Metz 2001].

Zwischen der Radiär- und der Mineralisierungszone befindet sich die sogenannte „Tidemark“. Sie stellt eine Grenzlinie zwischen nicht-kalzifiziertem und kalzifiziertem Knorpel dar. Lichtmikroskopisch ist sie in dekalzifizierten Knorpelpräparaten zu sehen. Ob diese Grenzlinie nur durch Fixierungstechniken entsteht, oder tatsächlich ein morphologisches Korrelat hat, wird unterschiedlich diskutiert [Redler et al. 1975].

Unterschiede bezüglich der Zelldichte lassen sich in den verschiedenen Knorpelzonen feststellen. Ebenso differiert die Zelldichte zwischen Knorpel aus stark mechanisch belasteten und wenig belasteten Arealen. In stark beanspruchten Gelenkarealen nimmt die Zelldichte ab, die Zellgröße aber zu. Der Organellengehalt sowie der Glykogengehalt dieses ständigen Druck ausgesetzten Chondrozyten nehmen zu. Damit scheint der aus der erhöhten Matrixdegeneration resultierende erhöhte Synthesebedarf von Matrixbestandteilen trotz niedrigerer Zelldichte ausgeglichen zu werden [Eggl et al. 1988].

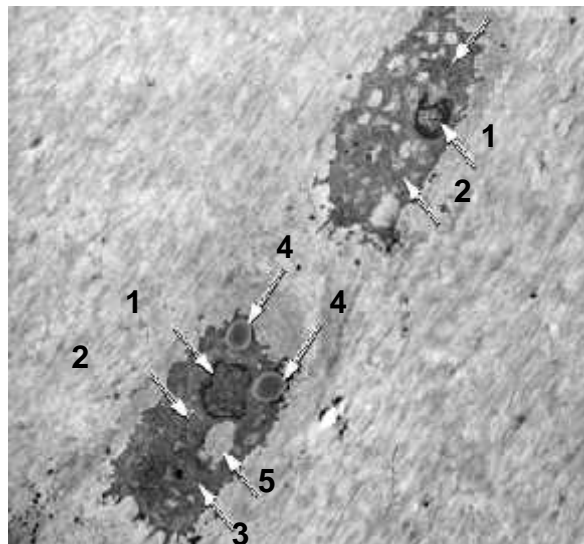


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Darstellung zweier Chondrozyten aus der Radiärzone des gesunden hyalinen Knorpels. Der Zellkern (1) liegt exzentrisch, das Zytoplasma zeigt zahlreiche freie Ribosomen, ein ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum (rER) (2) und einen gut erkennbaren Golgi-Apparat (3). Lipidtropfen (4) und Glykogeneinschlüsse (5) belegen die hohe Stoffwechselaktivität. Mehrere kurze Zilien reichen in die perizelluläre Matrix. (Menschliches Knorpelpräparat, Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

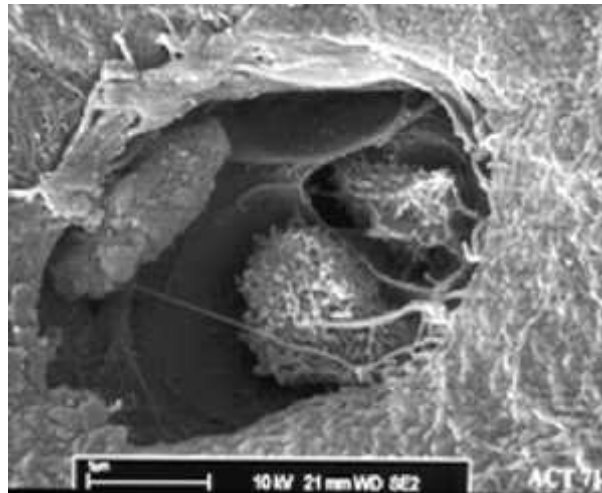


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopie von hyalinem Knorpel (Menschliches Knorpelpräparat, Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

2.1.6 Elastischer Knorpel

Elastischer Knorpel (Abb. 8) kommt im äußeren Gehörgang, in der Ohrmuschel, der Tuba auditiva, der Epiglottis und im Larynx vor. Er ist dem hyalinen Knorpel sehr ähnlich, aber neben den Fibrillen aus Kollagen II besitzt dieser ein reichhaltiges Netzwerk aus elastischen Fasern. Die gelbliche Farbe des Knorpels kommt durch das Elastin zu Stande, welches sich gut durch Orceiin oder Resorcinfuchsin anfärben lässt und somit nicht maskiert ist. Gleichfalls wird der elastische Knorpel von einem Perichondrium überzogen. Die Zellen selbst unterscheiden sich morphologisch nicht von denen des hyalinen Knorpels. Jedoch liegen sie häufiger einzeln in ihren Zellhöfen [Putz 1994].

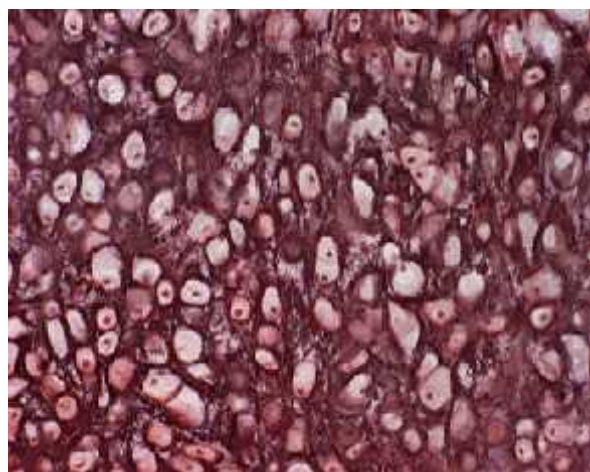


Abb. 8: Elastischer Knorpel. (Institut für Anatomie und Zellbiologie II der Universität Gießen, 2006–2013).

2.1.7 Faserknorpel

Faserknorpel (Abb. 9 und 10) kommt natürlicherweise in der Symphysis pubica und in den Disci intervertebrales vor. Von seiner morphologischen Beschaffenheit steht er zwischen hyalinem Knorpel und straffem Bindegewebe. Die Kollagenfasern sind im Gegensatz zu hyalinem und elastischem Knorpel gut anfärbbar. Im Unterschied zum straffen Bindegewebe finden sich spärlich Knorpelzellen zwischengelagert, oft in einer Reihe gelegen. Grundsubstanz umgibt die Zelle nur in unmittelbarer Umgebung. Deren Fasern sind wie die des hyalinen Knorpels unsichtbar [Putz 1994].

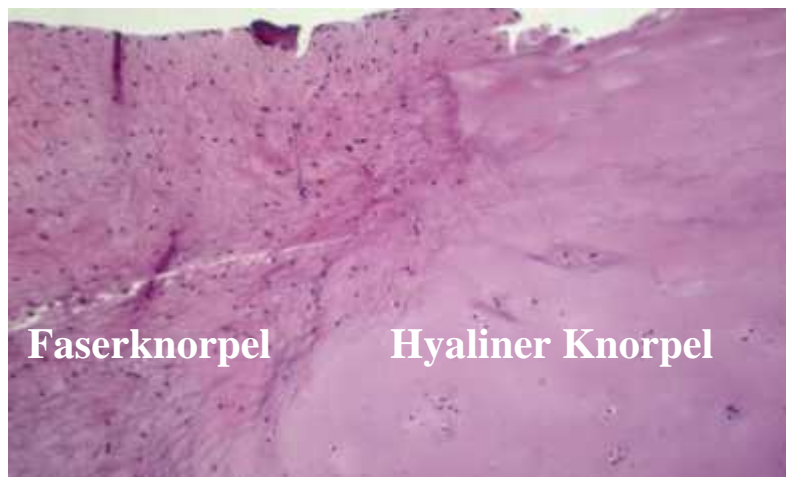


Abb. 9: Faserknorpel und Hyaliner Knorpel. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

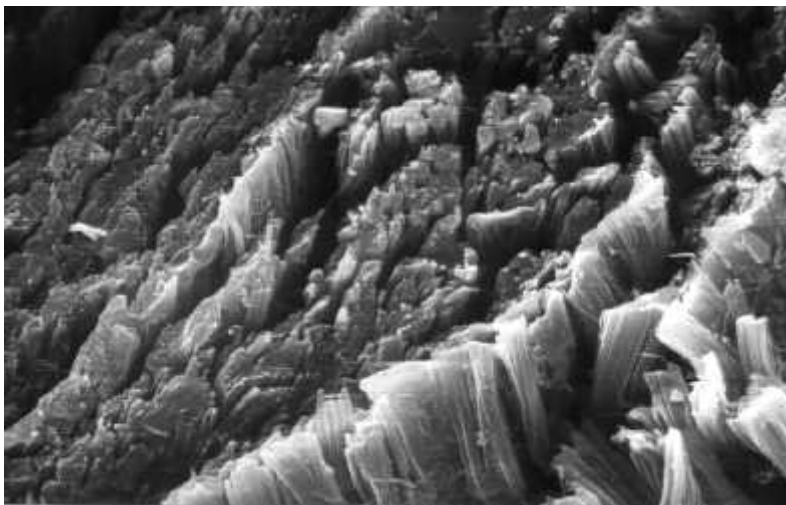


Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopie von Faserknorpel (Menschliches Knorpelpräparat, Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

2.2 Biomechanische Eigenschaften des Knorpels

Entscheidend für die physikalischen Eigenschaften des Knorpels ist sein ultrastruktureller Aufbau. Die Vernetzung der Fibrillen mit den Proteoglykanen der Grundsubstanz bildet die Grundlage für die gewebstypische Verformbarkeit und Elastizität [Drenckhahn 1994].

Einerseits üben die negativ geladenen Proteoglykane durch die Anziehung von Gegenionen aus dem synovialen Milieu einen osmotischen Effekt aus. Durch die Wasseraffinität der Aggrekane andererseits entsteht ein anhaltender Expansionsdruck. Hierdurch entsteht eine Interaktion des Kollagenfasengerüsts mit den Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, hauptsächlich dem Aggrekan, und dem hierin gebundenen Wasser. Das Wirkprinzip der Visko-Elastizität besteht im osmotisch erzeugten Quellungsdruck und dem vom dehnungsresistenten Fasernetz entgegengesetzten Widerstand. Da der bei Belastung auftretende Kompressionsdruck den beschriebenen osmotischen Quelldruck überschreitet, kommt es zur Verdrängung von Wasser aus dem Knorpel. Dieses muss beim kompressionsbedingten Abstrom einen Widerstand überwinden, der bei der Passage durch die Poren zwischen den eng vernetzten Makromolekülen der extrazellulären Matrix entsteht. [Athanasίου et al. 1991, Maroudas et al. 1992, Mow et al. 1991].

In Abhängigkeit von der Belastung verringert sich die Porengröße durch die unter Druck eintretende Verdichtung der makromolekularen Strukturen. Auf diese Weise wird der Flüssigkeitsstrom begrenzt. Es entsteht ein Gleichgewichtszustand, in dem eine weitergehende Druckdeformierung dann nicht mehr möglich ist.

Die elastische Eigenschaft beruht auf dem Rückstrom des Wassers und einer elektrostatischen Komponente: die an den Seitenketten der Proteoglykane sitzenden Ladungen mit gleichnamigem Vorzeichen stoßen sich gegenseitig ab. Mit ihren Repulsionskräften beteiligen sie sich an der intramolekularen Entfaltung und wirken synergetisch mit den osmotischen Kräften. Im Zustand der Kompression werden die Ladungen gegen den elektrostatischen Widerstand verdichtet. Proportional mit der Verdichtung steigt die Intensität der Abstoßung mit einem Effekt, auf den die Definition des elastischen Elements zutrifft [Buschman 1995].

2.3 Knorpelschäden

Die eingeschränkte Heilungsfähigkeit von Gelenkknorpel ist nach wie vor ein großes Problem bei der Behandlung von Knorpelschäden.

Der Knorpel hat keine Regenerationsfähigkeit. Dies liegt an seiner Avaskularität und der verminderten Proliferationsmöglichkeit adulter Chondrozyten. Durch die Vernetzung der Chondrozyten mit Kollagenfasern und Proteoglykanen ist es ihnen nicht möglich, zu den Defekten zu gelangen [Drenckhahn 1994].

Daher führen Schädigungen des Knorpels, insbesondere von mehr als 3 mm Größe, zu einem bleibenden Defekt [Aydelotte et al. 1992]. Bei Verletzungen die bis in die vaskularisierte subchondrale Zone reichen, kommt es zu einer Einschwemmung von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Innerhalb von 6-12 Monaten bildet sich ein mechanisch und biochemisch minderwertiger Faserknorpel [Aydelotte et al 1996].

Durch weitere Auffaserungen an den defekten Knorpelstellen droht eine fortschreitende Arthrose.

Eine andere Art von Knorpelschäden entsteht durch unphysiologische Belastung eines Gelenkes, wie zum Beispiel bei stark übergewichtigen Patienten [Puhl 1997]. Durch übermäßige mechanische Beanspruchung kann sich der Knorpel der Belastung nicht ausreichend anpassen, dies tritt sowohl bei kurz aufeinanderfolgenden als auch Langzeitbelastungen auf [Buckwalter 1995, Buckwalter und Mankin 1998]. Hierbei kommt es zu einer Mikrotraumatisierung des Gelenkknorpels, welche regional eine Degeneration des Knorpels und eine Proliferation von Chondrozyten hervorruft. An den betroffenen Stellen bildet sich zunächst ein biomechanisch minderwertiger Faserknorpel, der den ursprünglichen Knorpel jedoch nicht ersetzen kann. Es kommt zu einem Verlust von funktionsfähigem, hyalinen Gelenkknorpel [Metz 2001].

Auch Achsenfehlstellungen, wie Genu varum (O- Beine) oder Genu valgum (X- Beine), können durch chronische Fehlbelastungen degenerative Knorpelschäden frühzeitig und bei physiologischer Belastung verursachen.

Bestehende Kniebinnenschäden, wie Bandinstabilitäten oder Meniskusschäden können ebenfalls zu früher Knorpeldegeneration führen [Elmer et al. 1977, Puhl 1997, Davis 1973, Moskowitz 1972, Moskowitz et al. 1973].

Des Weiteren können Knochen- und Knorpelerkrankungen, wie zum Beispiel die Osteochondrosis dissecans zu frühzeitiger Knorpel- und damit Gelenkschädigung führen [Buckwalter et al. 1999, Hangody et al. 1998]. Bei dieser Erkrankung lösen sich ganze Knorpel-Knochen-Fragmente aus dem Gewebeverband und können als freie Gelenkkörper Beschwerden verursachen.

Darüber hinaus können rheumatische Erkrankungen durch entzündliche Prozesse Knorpeldestruktionen hervorrufen. Diese Krankheiten können bis zu einer völligen Gelenkdestruktion mit entsprechendem Funktionsverlust des betroffenen Gelenkes führen [Buckwalter et al. 2000].

2.3.1 Diagnostik und Klassifikation von Knorpelläsionen

Besteht in der klinischen Untersuchung der Verdacht auf einen Knorpelschaden, so kann dieser mittels einer Magnetresonanztomographie (MRT) dargestellt werden. Sie ist ein bildgebendes Verfahren, das vor allem in der medizinischen Diagnostik zur Darstellung von Struktur und Funktion der Weichteilgewebe eingesetzt wird. Mit der MRT-Untersuchung können Schnittbilder des menschlichen Körpers erzeugt werden, die eine Beurteilung der Organe und vieler krankhafter Organveränderungen erlauben.

Die Magnetresonanztomographie basiert auf sehr starken Magnetfeldern sowie elektromagnetischen Wechselfeldern im Radiofrequenzbereich, mit denen bestimmte Atomkerne im Körper angeregt werden. Empfangen werden extrem schwache elektromagnetische Felder, die in der Folge von den angeregten Atomkernen ausgesendet werden. Im Gerät wird keine Röntgenstrahlung oder andere ionisierende Strahlung erzeugt oder genutzt. Eine wesentliche Grundlage für den Bildkontrast sind unterschiedliche Relaxationszeiten verschiedener Gewebearten. Daneben trägt auch der unterschiedliche Gehalt an Wasserstoff-Atomen in verschiedenen Geweben (z. B. Muskeln, Knochen) zum Bildkontrast bei. Die Magnetresonanztomographie besitzt jedoch bislang nicht immer eine ausreichende Sensitivität und Spezifität [Stegen et al. 2001, Hash 2013, Crema et al. 2014].


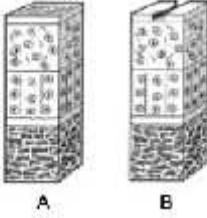

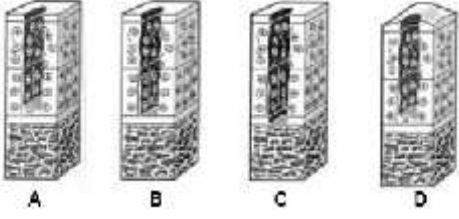
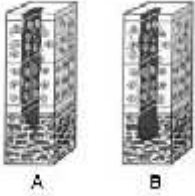
Zur weiterführenden Diagnostik und zur eventuellen Einleitung einer gezielten Therapie ist die diagnostische Arthroskopie das Verfahren der Wahl [Fritz et al. 2006, Marlovits und Vécsei 2000]. Das Arthroskop wird nach Auffüllen des Gelenks mit Flüssigkeit

(Ringer-Lösung, Purisole-Lösung, NaCl-Lösung), selten auch Gas (CO₂), über eine Stichinzision in aller Regel lateral und/oder medial des distalen Patellapols eingeführt, notwendiges Instrumentarium über ein oder ggf. auch weitere Stichinzisionen kontralateral. Knorpelläsionen, Meniskusverletzungen oder Kreuzbandschäden können arthroskopisch direkt therapiert werden. Die Einteilung der Knorpelschäden erfolgt nach der Klassifikation von Outerbridge [Outerbridge 1961]. Dabei werden vier schwere Grade unterschieden (Tab. 2).

Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge		
Schweregrad 0	Normaler Gelenkknorpel	
Schweregrad I	Leichte Knorpelerweichung und -verdickung	
Schweregrad II	Oberflächliche Rissbildung, Länge <1,77cm (0,5 inch)	
Schweregrad III	Tiefe Rissbildung, bis zum subchondralen Knochen reichend, Länge >1,77cm (0,5 inch)	
Schweregrad IV	Freiliegender subchondraler Knochen	

Tab. 2: Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge (1961). (Die Bilder wurden im OP der Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen aufgenommen).

Eine weitere Möglichkeit der Klassifikation zur Stadieneinteilung ist der ICRS-Score (Int. Cartilage Repair Society) (Tab. 3) [Behrens et al. 2004, Outerbridge 1961].

ICRS-Score (Makroskopie)		
Schweregrad 0		normal
Schweregrad 1		Oberflächliche Läsion, Knorpelerweichung (A) und/oder oberflächliche Einrisse und Aufbrüche (B)
Schweregrad 2		Läsionen, deren Tiefe weniger als 50% der Dicke der Knorpelschicht erreicht
Schweregrad 3		Läsionen, deren Tiefe mehr als 50% der Dicke der Knorpelschicht erreicht (A), die bis zur kalzifizierten Knorpelschicht reichen (B), die bis zum subchondralen Knochen reichen (C), Knorpelaufreibungen (D)
Schweregrad 4		Schwere Knorpelläsionen

Tab. 3: ICRS-Score zur Beurteilung der Schwere des Knorpelschadens [Brittberg et al 2003].

2.4 Möglichkeiten des Knorpelersatzes

Im klinischen Alltag stehen zur Therapie von Knorpelläsionen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Die wissenschaftliche Beurteilung dieser Behandlungsverfahren zur Knorpelreparatur ist äußerst schwierig, da die Knorpeldefekte nicht einheitlich sind und mit den unterschiedlichsten Therapiekonzepten und uneinheitlichen Bewertungskriterien analysiert werden. [Marlovits und Vécsei 2000, Harris et al. 2010, Negrin et al. 2013].

Konservative Maßnahmen wie Krankengymnastik, physikalische Maßnahmen und orthopädische Hilfsmittel wie z.B. Einlagen oder Orthesen zielen darauf ab, die Belastungsverteilung im betroffenen Gelenk zu verändern und hierdurch zu einer Beschwerdeverbesserung zu führen.

Durch eine konservative Therapie kann teilweise eine vorübergehende Schmerzreduktion und eine Funktionsverbesserung des Gelenkes nachgewiesen werden, jedoch ist durch diese Behandlungsweise keine Möglichkeit der Heilung der Knorpeldefekte gegeben [Salk et al. 2006].

Die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie von Knorpelläsionen umfassen die systemische Verabreichung antiphlogistischer Präparate sowie die intraartikuläre Applikation sogenannter Chondroprotektiva. Häufig wird die Kombination von Glucosamin mit Chondroitin verwendet.

Glucosamin ist ein wichtiger Baustein des Knorpels und der Gelenkinnenhaut und sorgt für eine ausreichende ``Gelenkschmierung`` und damit für eine reibungslose Gelenkfunktion. Bei Gelenkerkrankungen kann die Einnahme von Glucosamin zur Schmerzlinderung und Verbesserung der Gelenkfunktion beitragen. Bei der Substanz Glucosamin, die im Organismus aus Glukose hergestellt wird, handelt es sich chemisch gesehen um einen Aminosucker. Dieser ist Bestandteil der so genannten ``Gelenkschmiere`` und sorgt für deren Zähflüssigkeit. Sie wirkt wie ein Puffer zwischen den Knorpelflächen und gewährleistet damit eine reibungslose Gelenkfunktion. Darüber hinaus versorgt sie das Knorpelgewebe mit Nährstoffen und transportiert Abfallstoffe ab. Diese Wirkung ist jedoch zeitbegrenzt.

Des Weiteren wird bei der chondroprotektiven Therapie Chondroitin eingesetzt. Es gehört chemisch gesehen zur Gruppe der Mucopolysaccharide und kommt neben

Knorpelgewebe auch in Bindegewebe, Sehnen und Haut vor. Aufgrund seines hohen Wasserbindungsvermögens sorgt Chondroitin für die Elastizität der Gelenkstrukturen.

In der operativen Behandlung stehen zum einen Verfahren zur Verfügung, die darauf abzielen, durch Eröffnung des subchondralen Knochens die natürlichen Reparationsmechanismen des Gelenks zu stimulieren. Bei dieser Methode wandern pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark aus, haften sich in einem Blutkoagel dem Defektgrund an, differenzieren unter den physiologischen Verhältnissen des Gelenks zu Knorpelzellen und bilden ein faserknorpeliges Ersatzgewebe [Hunziker und Rosenberg 1996].

Verschiedene Verfahren werden unter dem Sammelbegriff der „Knochenmarkstimulation“ zusammengefasst. Hier sind exemplarisch das Drilling (Pridie-Bohrung) [Pridie 1959], die Abrasionschondroplastik [Johnson 1991], die Spongiolisation [Ficat et al. 1979] oder die Mikrofrakturierung [Steadman et al. 1999] zu nennen.

Zum anderen kann die Wiederherstellung der Knorpeloberfläche durch die Transplantation von Knorpelgewebe erfolgen. Beim Verfahren der Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT) werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus einer weniger belasteten Region des Gelenks in das Areal des Knorpelschadens transferiert und pressfit eingebracht [Wagner 1964, Hangody et al. 1997, Horas und Schnettler 2000]. Als Knorpelzelltransplantation wird eine von der Arbeitsgruppe um Brittberg (1994) vorgestellte Methode bezeichnet, bei der zunächst ein Knorpelchip arthroskopisch aus dem Gelenk entnommen wird, um nach Knorpelzellzüchtung im Labor in einem zweiten operativen Eingriff in den Knorpeldefekt retransplantiert zu werden. Dieses Verfahren wird als Autologe Chondrocyten Transplantation (ACT) bezeichnet. [Brittberg et al. 1994, Erggelet et al. 2000, Schnettler et al. 2008].

2.4.1 Mikrofrakturierung

Bei dieser Technik wird der Knorpelschaden zuerst mit einem Shaver von allen Knorpelresten befreit, so dass die subchondrale Knochenschicht frei liegt. Der an den Defekt angrenzende Knorpel sollte möglichst vital sein. Anschließend werden arthroskopisch eng aneinander angrenzende Löcher angelegt, die bis in den

subchondralen Bereich reichen müssen (Abb. 11). Es werden etwa 3-4 Löcher pro Quadratcentimeter erzeugt. Die so geschaffene raue Oberfläche soll die Anheftung des sich bildenden Fibrin- Clots gewährleisten. Postoperativ sollte eine Teilbelastung für 6-8 Wochen erfolgen. Steadman et al. konnten bei 1200 Patienten mit einem Follow-up von 2 bis mehr als 7 Jahren eine deutliche Schmerzbesserung nach dieser Behandlung beobachten. Nach 3 und 5 Jahren waren 75% der Beschwerden der Patienten gebessert, 20% blieben unverändert und 5% verschlechterten sich. Auch zeigte sich eine deutliche Besserung in der Alltagsbelastung bei 67% und der Sportfähigkeit bei 65% [Steadman et al. 2003].



Abb.11: Durch die oberflächliche Frakturierung werden Mikroblutungen mit nachfolgender Zellmigration von Fibroblasten erreicht, wodurch eine Ausbildung einer Narbenplatte erzielt werden kann. (Aus dem unfallchirurgischen OP der Universität Giessen)

2.4.2 Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT)

Bei der Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT) werden mit Hilfe von Hohlfräsen unterschiedlichen Durchmessers osteochondrale Zylinder entnommen und anschließend in vorher eng aneinandergelegte Bohrlöcher im Bereich des zu behandelnden Knorpeldefektes transplantiert (Abb. 12 a-c).

Das Operationsverfahren der Knorpel-Knochen-Transplantation basiert auf der Beobachtung, dass der knöcherne Anteil eines transferierten osteochondralen Dübels im spongiösen Lager schnell und zuverlässig einheilt [Makino et al. 2002, Horas und Schnettler et al. 2003]. Zur Entnahme werden innengespülte diamantbeschichtete

Hohlschleifer verwendet, da es hierdurch zu keiner Hitzeschädigung oder Frakturierung des Transplantates kommt. Auch Verletzungen des Transplantatlagers bleiben in der Regel aus. Im so genannten Nassschleifverfahren lassen sich diese Zylinder sehr exakt mit hoher Primärstabilität pressfit implantieren [Horas und Schnettler 2002]. Es konnte neben einer hohen Präzision für die Pressfit-Verankerung (Abb. 12 c) eine frühzeitige Einheilung im spongiösen Knochen nachgewiesen werden. Es hat sich gezeigt, dass die Primärstabilität mit der Größe des Transplantates signifikant zunimmt [Draenert 1988, Duchow et al. 2000, Laprell und Petersen 2001].

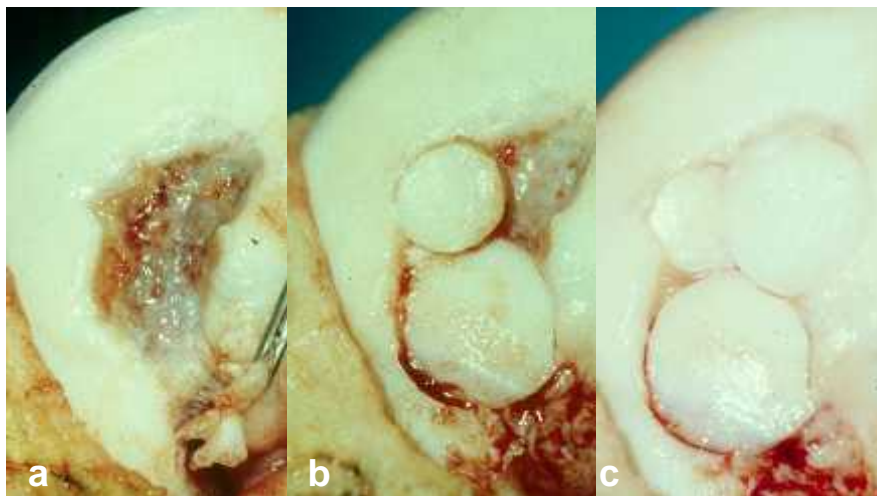


Abb.12: Knorpel-Knochen-Transplantation zur Behandlung von Knorpelläsionen

Abb.12 a: Knorpeldefekt med. Femurkondylus

Abb.12 b: Einbringen der Knorpel-Knochen-Zylinder

Abb.12 c: Pressfit eingebrachte Knorpel-Knochen-Zylinder

(aus dem unfallchirurgischen OP der Justus Liebig Universität Giessen)

Die Knorpel-Knochen-Zylinder werden aus minderbelasteten Gelenkarealen entnommen. Am häufigsten werden die medialen oder lateralen kranialen Anteile des Patellagleitlagers verwendet. Auch der dorsale inferiore Anteil des medialen und lateralen Femurkondylus kann als Spenderareal genutzt werden [Ahmad et al. 2002, Horas und Schnettler 2002].

Das Verfahren ist aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Knorpel-Knochen-Zylinder auf eine Defektgröße von 3 bis 4cm² beschränkt [Bobic 1999, Bugbee 2004, Schnettler et al. 2008].

Kernspintomographische und arthroskopische Kontrolluntersuchungen haben im Verlauf eine knöcherne Integration des Transplantates gezeigt [Bobic 1999, Hangody und Fules 2003].

Horas et al und Makino haben in Studien festgestellt, dass der transplantierte Knorpel auch nach fünf Jahren nachweisbar ist. In dem Bereich zwischen Transplantat und ortsständigem Gewebe zeigte sich jedoch kein hyalines Knorpelgewebe. Hier entsteht vorwiegend Faserknorpel [Horas et al. 2003, Makino 2001]. Langzeitstudien über 2–5 Jahre zeigten bei über 70% gute klinische Ergebnisse [Wagner 1972].

Seit einigen Jahren besteht auch die Möglichkeit der Verwendung von Allografts [Bugbee 2004, Kish 1999]. Vorteil dieses Verfahrens ist neben der unbeschränkten Verfügbarkeit die Möglichkeit der Implantatwahl aus der gleichen Region des Knorpeldefektes. Hierdurch kann ein Zylinder mit vergleichbarer Knorpelhöhe und Oberflächenkrümmung verwendet werden. Neben der Problematik der potentiellen Gefahr der Übertragung viraler Erkrankungen, scheint der Knorpel des Allograftzylinders dauerhaft mit einer relevanten Verminderung der Vitalität der Chondrozyten behaftet zu sein. So berichten Czitrom et al. 1990 von einer Rate von lediglich 37% vitaler Zellen nach einer Zeit von 6 Jahren nach Implantationen. Dagegen zeigen publizierte klinische Verläufe jedoch zu ca. 95% gute und sehr gute Ergebnisse nach 5 Jahren und noch immerhin zu ca. 70% nach 10 Jahren [Ghazavi et al. 1997, Salai et al. 1997].

Eine Behandlung isolierter Knorpelschäden durch einen künstlichen Knorpelersatz aus Polyvinylalkohol wurde wieder verlassen. Es zeigten sich vermehrt sekundäre Dislokationen und Hinweise auf fehlende dauerhafte Stabilität des Implantates [Meyer und Schnettler 2005].

Derzeit beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen innerhalb der Knorpelforschung mit der Entwicklung von Implantaten, die im Sinne eines Knorpel-Knochen-Implantates autologe Knorpeltransplantate mit einem Dübel aus Knochenersatzmaterial kombinieren. Hierdurch könnten die Probleme der begrenzten Verfügbarkeit, der Spendermorbidity und auch der passenden Oberflächenkongruenz gelöst werden [Petersen et al. 2008].

2.4.3 Autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT)

Ein alternativer Ansatz zur Regeneration des Knorpels ist die Technik der Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT).

Die klassische Periostlappen- assoziierte Technik der ACT (Abb. 13) wurde von der Arbeitsgruppe um Brittberg und Peterson (Göteborg, Schweden) 1994 vorgestellt.

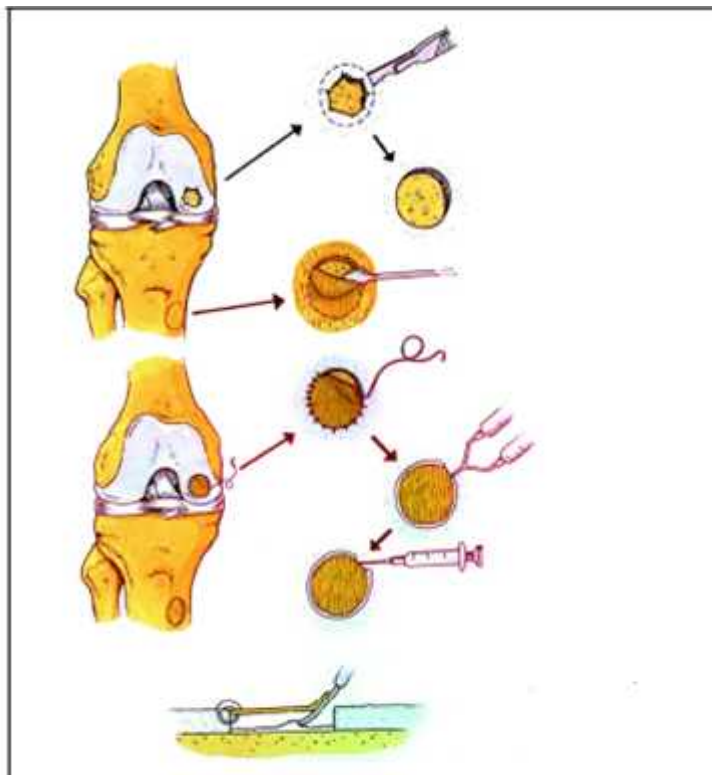


Abb. 13: Schematische Darstellung der klassischen ACT [Brittberg et al. 2003]

Bei der klassischen Periostlappen- assoziierten Knorpelzelltransplantation wird zunächst eine reiskorngroße Knorpelbiopsie arthroskopisch von einem minderbelasteten Gelenkareal gewonnen. Daraus werden Chondrozyten enzymatisch isoliert. Unter Zugabe von Nährlösung im so genannten Monolayerverfahren werden die Zellen angezüchtet, was zur Dedifferenzierung führt [Benya und Schaffer 1982, Finer et al. 1985, Schnabel et al. 2002, Sittinger et al. 1997]. Hieraus resultiert die Vorstellung, dass die Chondrozyten in ein „Fetales Entwicklungsstadium“ zurückgeführt werden [Brittberg et al. 1994, Brittberg et al. 2003].

Die kultivierten Chondrozyten werden dann als Suspension über eine Arthroskopie in einer zweiten Operation unter einen auf den Knorpeldefekt aufgenähten Periostlappen injiziert (Abb. 14 a-c). Die Präparation des Transplantatbetts muss sorgfältig durchgeführt werden (Abb. 14 a). Die subchondrale Knochenplatte sollte nicht eröffnet werden, muss jedoch von darüber liegendem Faserknorpel befreit werden. Es wird eine ausreichende stabile Knorpelgrenze um den Defekt gefordert [Steinwachs et al. 1999]. Der Periostlappen wird im Allgemeinen von den Seiten der Femurkondylen oder unterhalb des Tibiakopfes entnommen [Brittberg et al. 1994].



Abb. 14 a: Intraoperative Schritte der klassischen ACT. Bei der ursprünglichen Operationstechnik der Periostlappen-assoziierten ACT wird der zunächst das Transplantatbett präpariert.

Abb. 14 b: Deckung des Knorpeldefektes mit einem Periostlappen.

Abb. 14 c: Anschließend wird die Zellsuspension unter den Periostlappen eingebracht (aus dem unfallchirurgischen OP der JLU Gießen)

Folgende Grundvoraussetzungen sollten erfüllt werden, um einen Behandlungserfolg zu erzielen: Die Knorpelschulter sollte erhalten sein. Der Umgebungsknorpel, der Meniskus und die korrespondierende Gelenkfläche müssen intakt sein und die Bandführung sollte keine pathologischen Veränderungen aufweisen. Das Gelenk sollte nicht mehr als 2 unabhängige Defekte aufweisen. Außerdem sollte die Beinachse unverändert und das Bein frei beweglich sein. Zurzeit wird die Knorpelzelltransplantation nur bei Personen unter 50 Jahren empfohlen, da eine negative Korrelation zwischen Knorpelzellvitalität und Lebensalter besteht. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Defektgröße zwischen 3 und 10 cm² und einer Defektlokalisation im medialen und lateralen Femurkondylus erreicht. Die ACT kann nur bei intakter subchondraler Knochenlamelle am Defektgrund durchgeführt werden [Krettek et al. 2005]. Außerdem sollten die Patienten keine entzündlichen Gelenkerkrankungen aufweisen. Bei implantierten Carbonstiften ist von einer ACT abzuraten. Sowohl Band-, als auch Meniskusverletzungen, sowie Fehlstellungen der Beinachse müssen bei der Behandlung beachtet und vorher saniert werden. Hierbei wurden jedoch verschiedene Probleme beobachtet. Die Kambiumschicht des Lappens

enthält zahlreiche mesenchymale Stammzellen, die sich während der Einheilung zu Fibrozyten differenzieren und vermehrt Kollagen I produzieren, was zur Hemmung der gewünschten chondrozytären Kollagen-II-Synthese führen kann [Steinwachs 2005]. Des Weiteren wurde häufig eine Hypertrophie des Periostlappens oder eine erhebliche Narbeninduktion bis zur Ausbildung von Arthrofibrosen beobachtet, so dass bei bis zu einem Viertel der mittels klassischer Form der ACT behandelten Patienten in der Folge aufgrund einer „Transplantathypertrophie“ mittels arthroskopischer „Lappenausdünnung“ operativ behandelt werden muss [Minas 2001]. Die von Brittberg und Peterson 1994 entwickelte klassische Periostlappen- assoziierte Knorpelzelltransplantation konnte durch den Einsatz von Trägermaterialien für die Chondrozyten weiterentwickelt werden. Derzeit stehen neben der klassischen ACT eine Reihe von matrixgekoppelten Chondrozytentransplantaten zur Verfügung, deren Wertigkeit noch nicht ausreichend untersucht ist. Das Prinzip des Tissue Engineering wurde in der klinischen Anwendung umgesetzt und hat zu einer Verbesserung und Vereinfachung der operativen Technik im Vergleich zur klassischen Periostlappen-assozierten Knorpelzelltransplantation geführt [Fritz et al. 2006, Nehrer et al. 2005, Marlovits et al. 2004, Barlett et al. 2005, Barlett et al. 2006].

2.5 Tissue Engineering

Die Methode des Tissue Engineering (Gewebezüchtung) beruht darauf, lebende Zellen eines Organismus außerhalb des Zielgewebes zu kultivieren, um diese dann meist in den selben Organismus zu implantieren und so eine Gewebefunktion zu erhalten oder wiederherzustellen.

Das Tissue Engineering beinhaltet verschiedene Elemente. Dazu gehören ein strukturelles Gerüst (oft Scaffold genannt), lebende Zellen oder Gewebe sowie Wachstumsfaktoren zur Kontrolle der Signaltransduktion und ein Medium bzw. Organismus.

Für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe werden verschiedene Trägermaterialien verwendet. Ihre dreidimensionale Struktur sollte die Zelladhäsion, das Zellwachstum und die Matrixbildung sowie den Transport von Nährstoffen und metabolischen Abfallstoffen ermöglichen. Sie sollten biokompatibel und bioresorbierbar sein und einem kontrollierten Degradationsprozess mit definierter Resorptionsrate unterliegen,

die einen ausreichenden Zeitraum für das Zell- und Gewebewachstum *in vitro* und *in vivo* bieten. Ihre chemische Zusammensetzung muss die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung ermöglichen. Während des Degradationsprozesses dürfen keine toxischen Substanzen freigesetzt, Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen ausgelöst werden. Die Trägermaterialien müssen im Defekt sicher zu fixieren sein und auch während der Degradationsphase ausreichend stabil bleiben. Ihre mechanischen Eigenschaften sollten denen des hyalinen Knorpels ähnlich sein [Babensee et al. 1998, Coutts et al. 2001, Hunziker 1999, Hutmacher 2000, Lu und Mikos 1999, Lu et al. 2001, Nehrer et al. 2005].

In der medizinischen Knorpelforschung bedeutet dies die Zusammenführung biologischer, ingenieurtechnischer, materialwissenschaftlicher und medizinisch-chirurgischer Erkenntnisse zur künstlichen Herstellung neuer funktioneller Gewebsstrukturen.

In der Knorpelchirurgie erfolgt somit die Kultivierung der Chondrozyten unter Verwendung von dreidimensionalen Kultursystemen oder Trägermaterialien [Coutts et al. 2001, Freed et al. 1998, Solchaga et al. 2001]. Dies dient dem Erhalt der phänotypischen Stabilität der Zellen. Bei der Kultivierung im Monolayer-Verfahren kommt es zur zeitabhängigen, zunehmenden Entdifferenzierung mit Verlust der knorpelspezifischen morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften [Benya und Schaffer 1982]. Die Trägergerüste bewirken darüber hinaus eine Optimierung der Verteilung und der Fixierung der Chondrozyten im Knorpeldefekt und sollen ihnen für die Produktion der extrazellulären Matrix ein verbessertes Umfeld geben [Coutts et al 2001, Grande et al. 1999, Marlovits et al 2004, Nehrer et al. 1998, Nehrer et al. 2005]. Die Knorpelzellen werden anschließend an das Trägermaterial gebunden (Matrix-assoziiert) und in den Knorpeldefekt transplantiert.

3. Material und Methodik

In unserer Arbeit zeigen wir vergleichende Untersuchungen des Knorpels am Kniegelenk von Kaninchen, Schaf, Hund, Pferd und Mensch. Im Folgenden werden wir die Herkunft der unterschiedlichen Materialien sowie den eigens für unsere Arbeit entwickelten Testaufbau und die Anfärbe- und bildgebenden Verfahren näher erläutern.

3.1 Probengewinnung

Vor Untersuchungsbeginn wurden je 10 Knorpelproben aus den Femurcondylen von ausgewachsenen Tieren der Spezies Kaninchen, Hund, Schaf und Pferd organisiert und präpariert. Bei den Tieren wurde jeweils ein Teil des medialen Kondylus, des dorso-lateralen Kondylus und des lateralen Patellagleitlagers (Abb. 15 und 16) entnommen. Als humanes Präparat konnten 10 Proben des dorso-lateralen Kondylus für die Testungen verwendet werden. Die beschriebene Gewinnung humaner Knorpelproben wurde am 10.08.2006 bei der Ethikkommission am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen beantragt und mit Schreiben vom 17.08.2006 von dieser befürwortet (AZ 92/06).

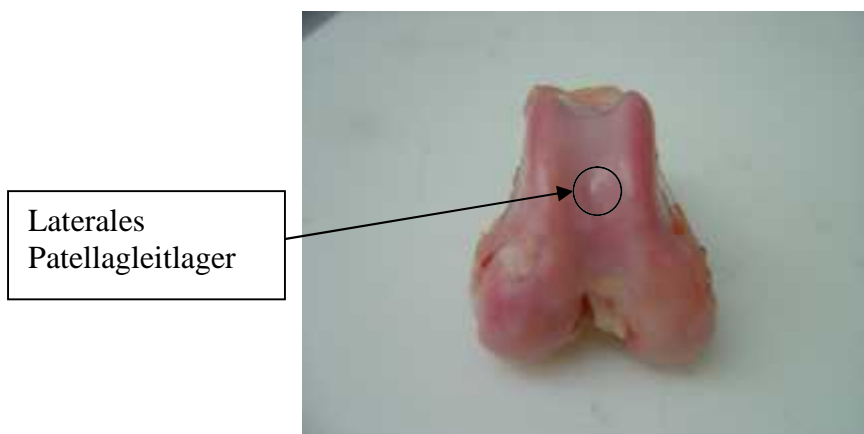


Abb. 15: Präparat des distalen Femurs vom Hund von ventral, Markierung der Entnahmestelle am lateralen Patellagleitlager.

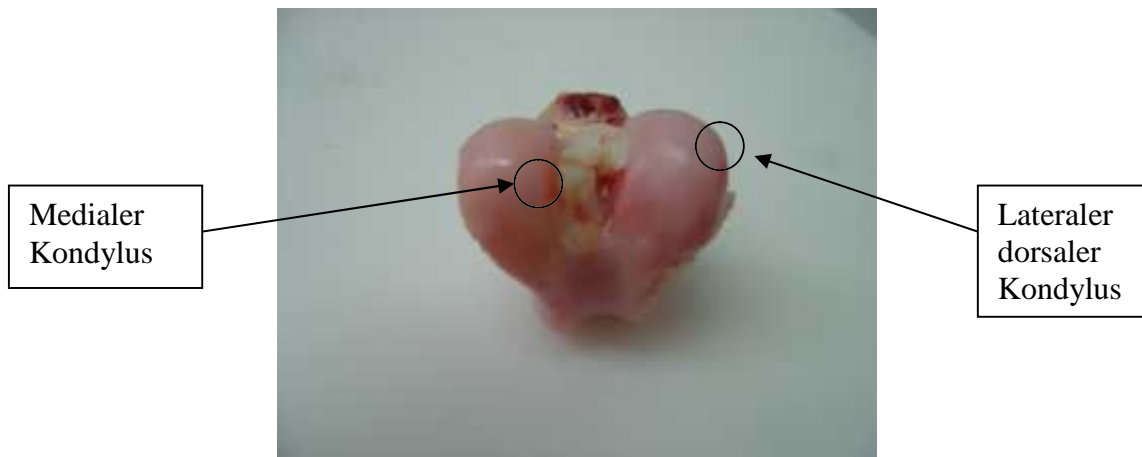


Abb. 16: Präparat des distalen Femurs vom Hund von distal, Markierung der Entnahmestelle am medialen und am dorso-lateralen Kondylus.

Die 10 menschlichen Knorpelproben stammen von Resektaten (Abb. 17), welche im Rahmen der Knieendoprothetik anfallen und mit Zustimmung der Patienten für diese Untersuchung verwendet werden konnten. Diese Areale des Kniegelenks sind in der Regel wenig von der Arthrose betroffen und können daher als aussagekräftige Humanpräparate genutzt werden. Es wurden ausschließlich Präparate gewählt, die inspektorisch nur geringe Hinweise auf degenerative Veränderungen aufwiesen.

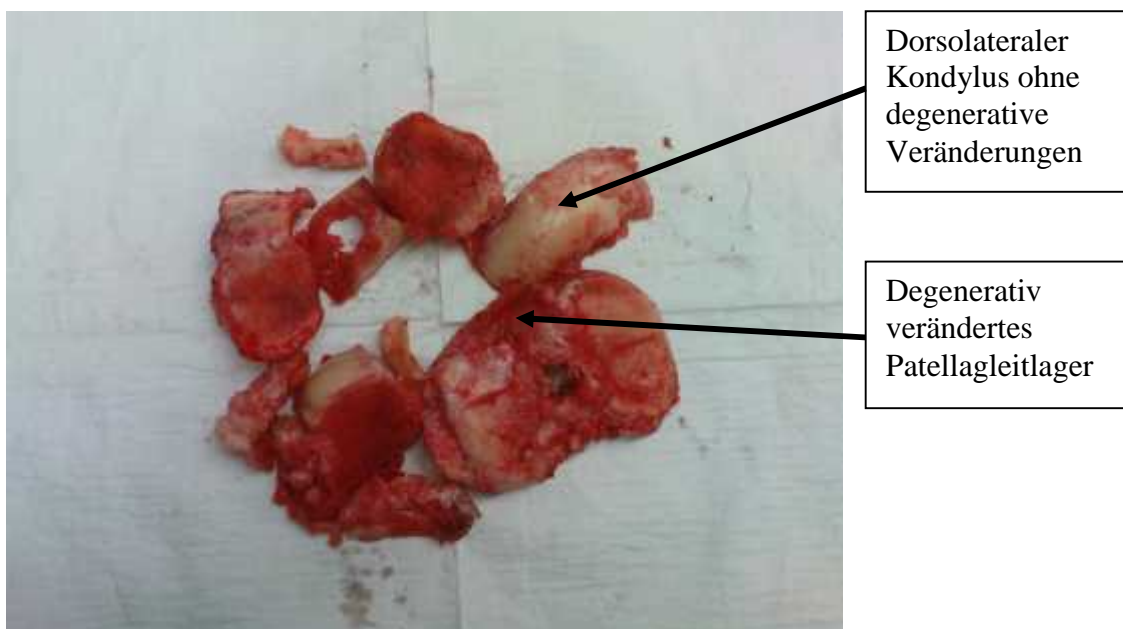


Abb. 17: Im Rahmen eines operativen Kniegelenkersatzes gewonnene Resektate der Knorpelflächen eines menschlichen Kniegelenks (aus dem OP der Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

Alle Knorpelproben wurden direkt nach der Entnahme mit NaCl-Lösung feucht gehalten und innerhalb von einer Stunde im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Giessen bei – 81 °C eingefroren.

Bei den Pferden handelte es sich um ausgewachsene Haflingerstuten. Das Alter betrug durchschnittlich 7 Jahre (2-12 Jahre), das Gewicht ca. 440 kg (400-480kg). Die Pferde stammten aus dem Haflingergestüt Meura, Thüringen (Ortsstraße 116, 98744 Meura) und wurden zuletzt in den Stallungen sowie den Weiden der Großtierklinik des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie (Fzmb), Bad Langensalza (Leiter der Abteilung Großtierklinik: Herr Dr. vet. med. Dirk Barnewitz, Bad Langensalza) untergebracht. Die Euthanasie der Pferde erfolgte im Rahmen eines Tierversuchs [Meyer et al 2008]. Die Tierversuche waren gemäß §8a Absatz 1 und 2 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17. Februar 1993, BGBl I, 254 vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Abteilung 2, Dezernat 22, Weimarplatz 4, 99423 Weimar (jetzt: Tennstedter Straße 8/9, 99947 Bad Langensalza) am 08.10.2004 genehmigt worden (Nr.: 14-04/04) und wurden entsprechend der Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. durchgeführt. Vorerkrankungen des Bewegungsapparates bestanden nicht.

Die Schafproben entstammen von Tieren aus Freilandhaltung. Es handelte sich um ausgewachsene Fuchs- und Schwarzkopfschafe, die von Privatzüchtern geschlachtet wurden. Das Alter betrug durchschnittlich ca. 4,5 Jahre (2,5-7 Jahre), das Gewicht ca. 35 kg (30-40 kg).

Die Hundeproben erhielten wir aus der Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Kramer). Es waren jeweils ausgewachsene Hunde unterschiedlicher Rassen. (Schäferhund, Mischling, Berner Sennen, Riesenschnauzer, Golden Retriever und Border Collie). Die Entnahme der Knorpelproben erfolgte jeweils kurz nachdem die Tiere eingeschlafert worden waren. Erkrankungen des Bewegungsapparates waren zuvor anamnestisch ausgeschlossen worden. Das Alter betrug durchschnittlich 7,5 Jahre (2-13 Jahre), das Gewicht ca. 26,5 kg (18-35 kg).

Die Kaninchenproben entstammten ausgewachsenen Stallkaninchen der Rasse Blaue Wiener, die von Privatbesitzern geschlachtet wurden. Das Durchschnittsgewicht dieser mittelgroßen Rasse lag zwischen 4 und 4,5 kg, das Alter zwischen 1,5 und 3 Jahre.

Bei allen Tieren wurden die Femurkondylen in einem Stück mit einer oszillierenden Säge (Proxxon, Niersbach) entnommen und danach im Labor mit einer Bandsäge (Exakt, Norderstedt) auf eine Probendicke von 0,5 cm zugeschnitten (Abb. 18). Danach wurden die Proben bis zu ihrer Testung bei -81°C eingefroren.



Abb. 18: Hundeknie mit Bandsäge (Exakt, Norderstedt), Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen.

3.2 Biomechanische Messungen

Die biomechanischen Messungen wurden mit fachlicher und apparativer Unterstützung des Instituts für Werkstofftechnik der Universität Siegen durchgeführt.

Die Proben wurden vor ihrer Testung bei Raumtemperatur in physiologischer Kochsalzlösung aufgetaut.

3.2.1 Aufbau der Messvorrichtung

Zur biomechanischen Messung stand eine elektromechanische Universalprüfmaschine vom Typ Inspect 100 (Fa. Hegewald und Peschke, Meß- und Prüftechnik GmbH) zur Verfügung (Abb. 19). Die Kraftmessung erfolgt bei dieser Maschine durch einen Dehnmessstreifen-Kraftaufnehmer, die Messelektronik gewährleistet im Bereich von 0,4 bis 100% Nennlast eine Messgenauigkeit Klasse 1 (optional 0,5) nach DIN EN ISO 7500.



Abb. 19: Elektromechanische Universalprüfmaschine vom Typ Inspect 100, Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen.

Die Steuerung der Universalprüfmaschine erfolgte mittels PC, der mit der Software LABMASTER ausgestattet war.

Die Probenprüfkörper (Indentor), bestehend aus Kraftaufnehmer vom Typ KD 24 S (ME) und dem Prüfstempel mit Kugelspitze, wurden in den Probenhalter 647 Hydraulic Wedge Grip (MTS Systems Corporation, USA) mit Hilfe von hydraulischen Spannbacken eingespannt. Die Kugelspitze aus rostfreiem Edelstahl hatte einen Durchmesser von 3mm. Da die Gewebetraumatisierung durch kugelförmige Prüfkörper relativ gering ist, wird diese Form für die Testung von dünnen Knorpelproben empfohlen (<2mm) [Lyyra et al. 1999] (Abb. 20).

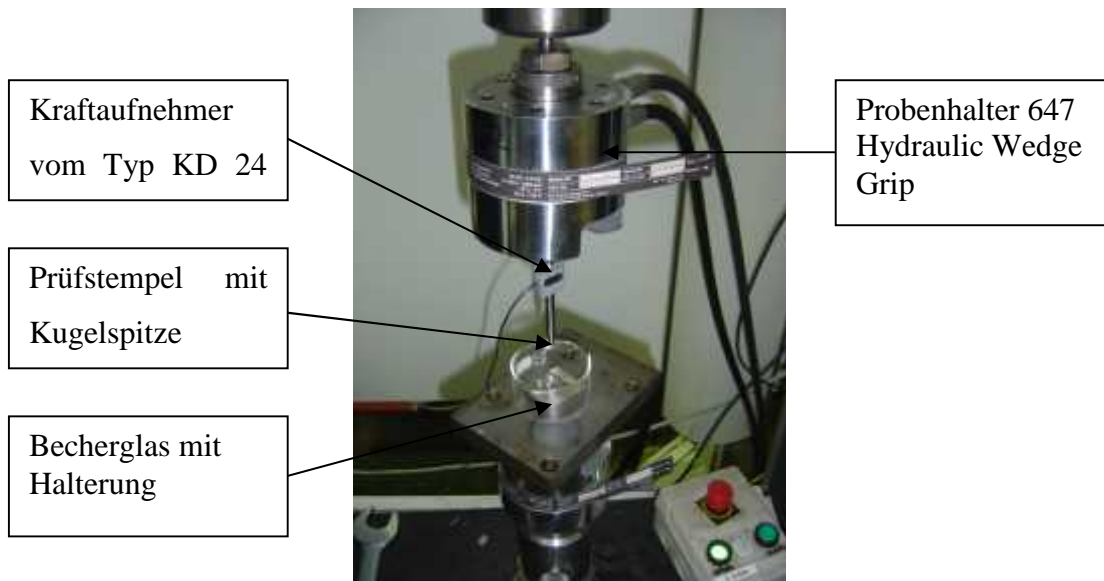


Abb. 20: Probenhalter, Prüfkörper und Halterung, Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen.

Der Kraftaufnehmer war mit einem Messverstärker vom Typ Spider 8 (HBM, Darmstadt) verbunden, der wiederum an ein Notebook mit der Standardsoftware DIAdem 8.1 von National Instruments für die technische Datenverarbeitung angeschlossen war. Zugeschnitten auf Techniker und Ingenieure bietet DIAdem in seiner Oberfläche sämtliche Werkzeuge zur PC-basierten interaktiven Datenverwaltung, Erfassung und Analyse von Messdaten (Abb. 21).

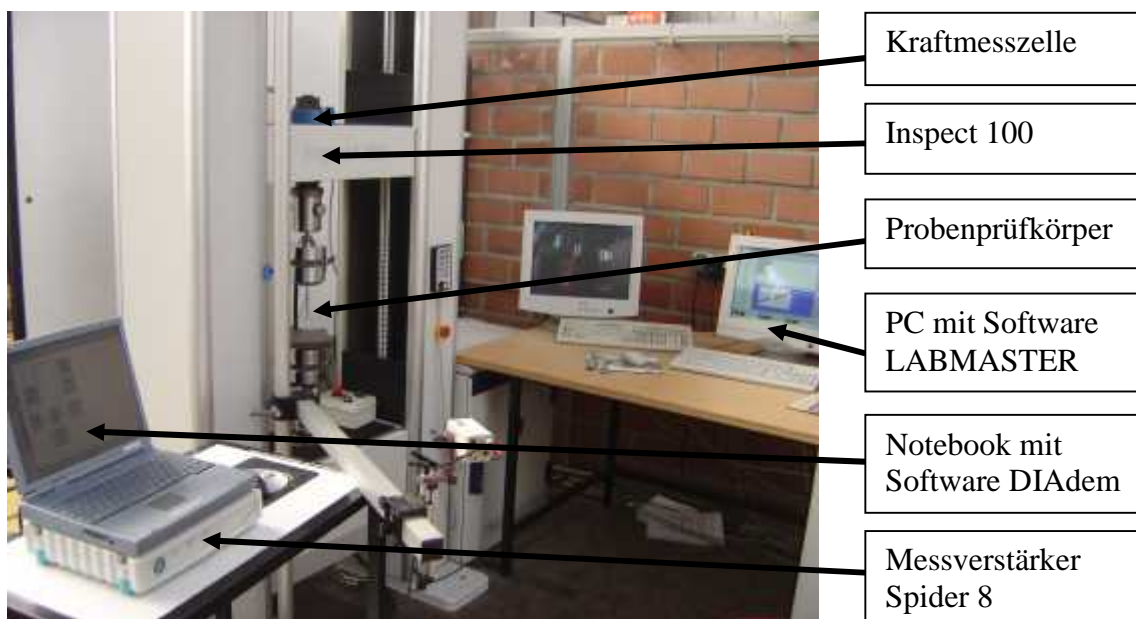


Abb. 21: Kompletter Versuchsaufbau, Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen.

3.2.2 Biomechanische Testung

Die Knorpel-Knochen-Blöcke wurden jeweils in einer verstellbaren Klemmvorrichtung an einer stabilen Halterung fixiert und anschließend in einem Becherglas mit NaCl-Lösung vor Austrocknung während des Versuches geschützt.

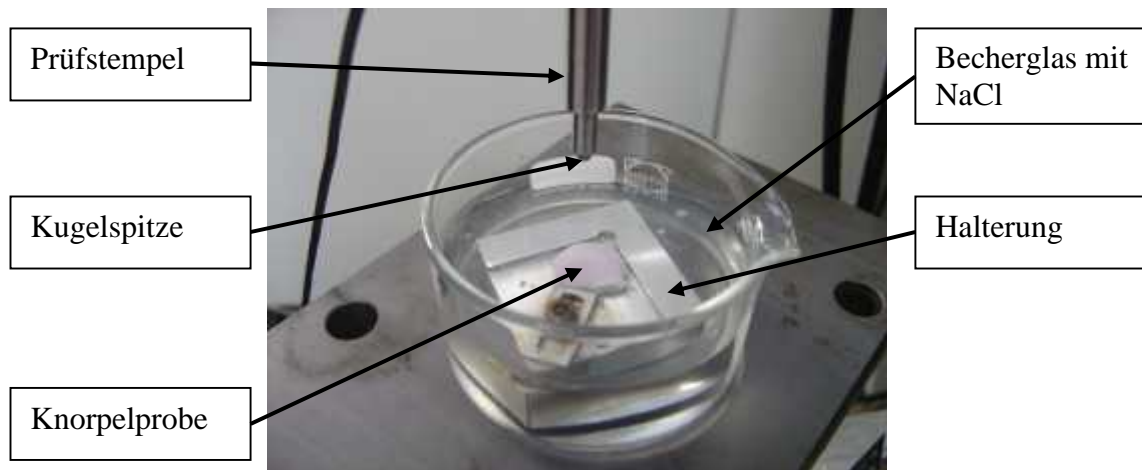


Abb. 22: Halterung mit Probe im Becherglas, Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen.

Die Probe wurde nun zentral in den Standardprüfraum gestellt und senkrecht zum Indentor in Position gebracht. Ein Kontakt des Indentors mit dem Knorpel vor der Messung war zu vermeiden, damit es zu keiner undefinierten Vorlast kommen konnte (Abb. 22).

Die Versuche wurden durch das Anfahren des Indentors gestartet. Bei den Kompressionsversuchen tauchte nun die Kugelspitze mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,5mm/min in den Knorpel. Während dieser Zeit wurde die Kraft mit Hilfe des Kraftaufnehmers (KD 24 S, ME) mittels des Messdatenerfassungssystems (DIAdem, National Instruments, Texas, USA) registriert.

Bei den Relaxationsversuchen erfolgte das Eindringen der Kugel mit einer konstanten Eindringgeschwindigkeit von 1mm/min in den Knorpel. Bei einer Impressionskraft von 15N wurde die Kugelspitze angehalten und die auf die Kugelspitze einwirkende Kraft weiterhin gemessen.

Zum Ausschluss eines durch den Prüfaufbau bedingten Messfehlers wurde zunächst die Kennlinie des Kraftaufnehmers aufgenommen (Abb. 23). Der Sensor hat einen Messbereich von 0 bis 200N. Eine Kennlinie bis ca. 50 N wurde gemessen, dazu wurde

der vorhandene Prüfaufbau verwendet. Somit sind neben dem reinen Messweg des Aufnehmers auch sämtliche elastischen Verformungen des Prüfsystems berücksichtigt. Der Messweg lag bei einer maximalen Kraft von 50N unter 0,05mm und ist somit vernachlässigbar.

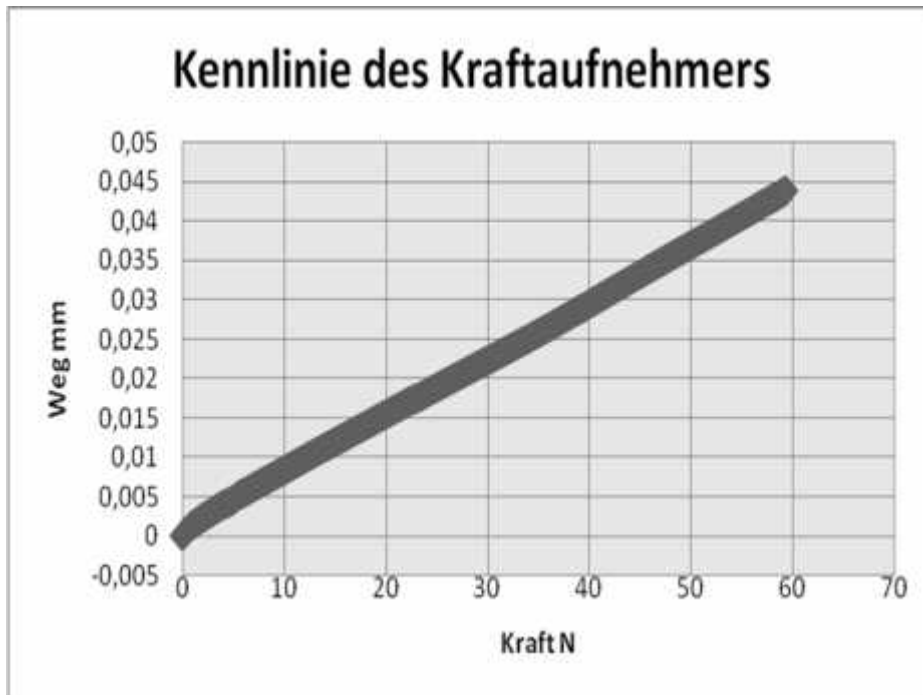


Abb. 23: Kennlinie des Kraftaufnehmers

3.2.3 Biomechanische Vorversuche

Das Ziel der Vorversuche war es, eine Möglichkeit zu finden, die Knorpelproben sowohl auf ihr Kompressions-, als auch auf ihr Relaxationsverhalten zu testen. In einer ersten Probestung wurde ein 5mm dickes Knorpelknochenpräparat aus dem lateralen Kondylus eines Hundeknies untersucht. Die Knorpelhöhe betrug ca. 2mm. Die Probestung diente der Überprüfung der Versuchsanordnung für die geplante Knorpeltestung, der Feststellung der notwendigen Probendicke und der Praktikabilität der Halterung. Im Anschluss wurden unterschiedliche Eindringgeschwindigkeiten ausgetestet sowie die auf die 3mm große Kugelspitze einwirkende Kraft gemessen. Bei der ersten Messung betrug die Eindringgeschwindigkeit 0,1mm/min bei einer maximalen Eindringtiefe von 1,5mm (Abb. 24). Bei der zweiten Messung wurde auf

0,3mm/min und bei der dritten Messung auf eine Eindringgeschwindigkeit von 0,5mm/min beschleunigt (Abb. 25). Zur Erholung des Knorpels zwischen den Messungen wurden jeweils 15 Minuten Pause eingehalten. Alle Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tab. 4) (Abb. 26). Somit konnten die Testungen schließlich mit einer Eindringgeschwindigkeit von 0,5mm/min durchführt werden.

Weg in mm	Kraft (N) bei 0,1mm/min			Kraft (N) bei 0,5mm/min		
	Ort 1	Ort 2	Ort 2	Ort 1	Ort 2	Ort 3
0,1	0,168	0,171	0,140	0,048	0,081	0,069
0,2	0,612	0,634	0,588	0,288	0,291	0,257
0,3	1,290	1,314	1,262	0,720	0,811	0,697
0,4	2,147	2,169	2,118	1,296	1,313	1,271
0,5	3,217	3,231	3,183	2,160	2,186	2,128
0,6	4,624	4,640	4,599	3,312	3,329	3,285
0,7	6,443	6,449	6,415	4,896	4,909	4,866
0,8	8,832	8,827	8,800	7,104	7,111	7,080
0,9	11,880	11,872	11,853	10,032	10,029	9,997
1,0	15,818	15,802	15,790	13,728	13,726	13,699
1,1	20,670	20,659	20,658	18,240	18,228	18,202
1,2	26,690	26,674	26,675	23,664	23,652	23,628
1,3	34,011	33,997	33,995	30,288	30,261	30,273

Tab. 4: Darstellung der jeweils erforderlichen Kraft in N zur Impression einer 3mm durchmessenden Kugelspitze im hyalinen Knorpel des Hundes bei unterschiedlichen Eindringgeschwindigkeiten an drei verschiedenen Lokalisationen

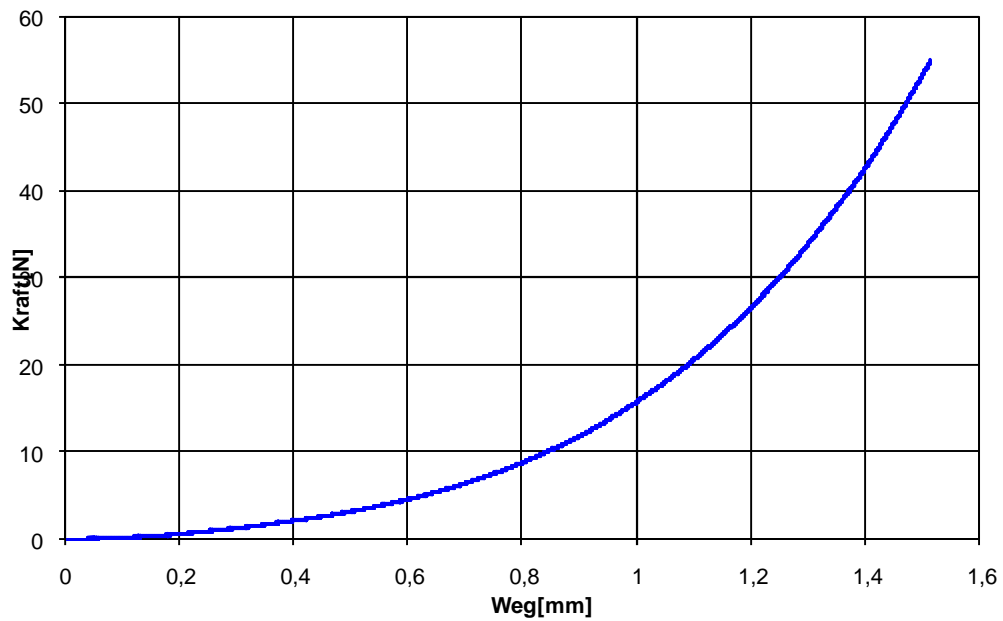


Abb. 24: Exemplarische graphische Darstellung der erforderlichen Kraft in N zur Impression einer 3mm durchmessenden Kugelspitze im hyalinen Knorpel des Hundes bei einer Eindringgeschwindigkeit von 0,1mm/min (Versuch 1).

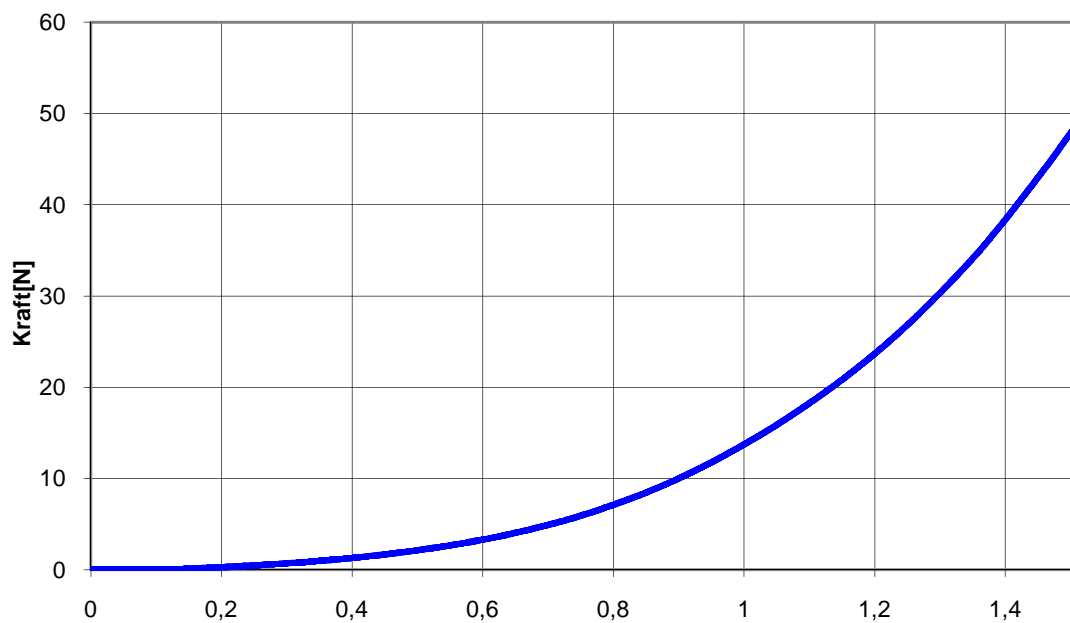


Abb. 25: Exemplarische graphische Darstellung der erforderlichen Kraft in N zur Impression einer 3mm durchmessenden Kugelspitze im hyalinen Knorpel des Hundes bei einer Eindringgeschwindigkeit von 0,5mm/min (Versuch 2).

Vergleich Knorpel Versuch 1&2, Hub: 0,1/0,5mm/min

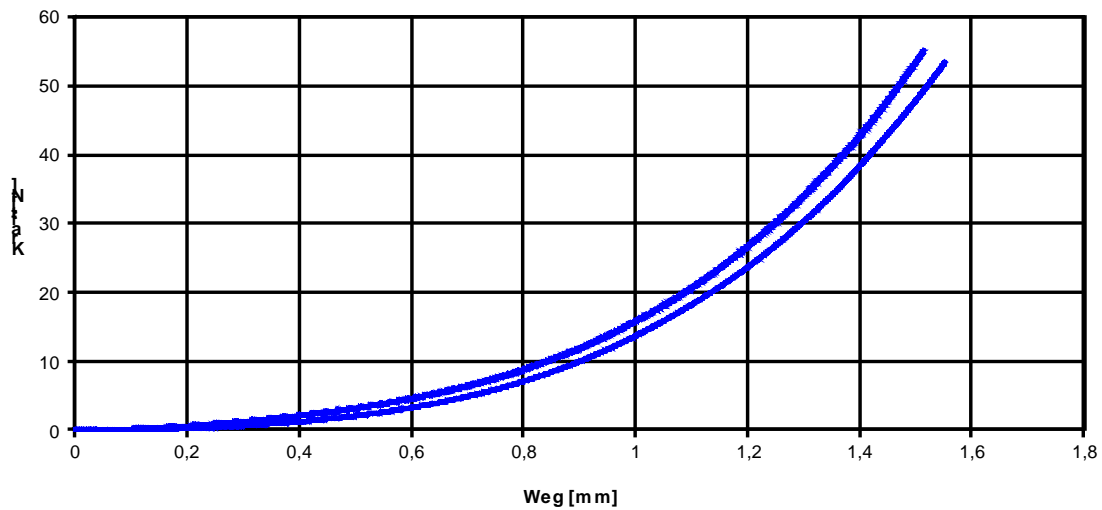


Abb. 26: Vergleichende graphische Darstellung der erhobenen Kräfte zur Impression einer 3mm durchmessenden Kugelspitze im hyalinen Knorpel des Hundes bei einer Eindringgeschwindigkeit von 0,1 bzw. 0,5mm/min.

Um das Kriechverhalten des Knorpels zu testen, wurde die Kugel relativ schnell auf eine definierte Tiefe eingefahren und anschließend die Abnahme der auf sie einwirkenden Kraft erfasst. Bei diesem Versuch musste die Eindringgeschwindigkeit höher sein als bei den Kompressionsversuchen, um das Kriechverhalten während der Eindringphase gering zu halten. Es wurde eine Eindringgeschwindigkeit von 1mm/min gewählt. Da die exakte Knorpeldicke vor dem Versuch nicht zu bestimmen war, wurde die Kugelspitze soweit in den Knorpel gedrückt, bis eine Kraft von 15N auf die Kugelspitze einwirkte (Abb. 27).

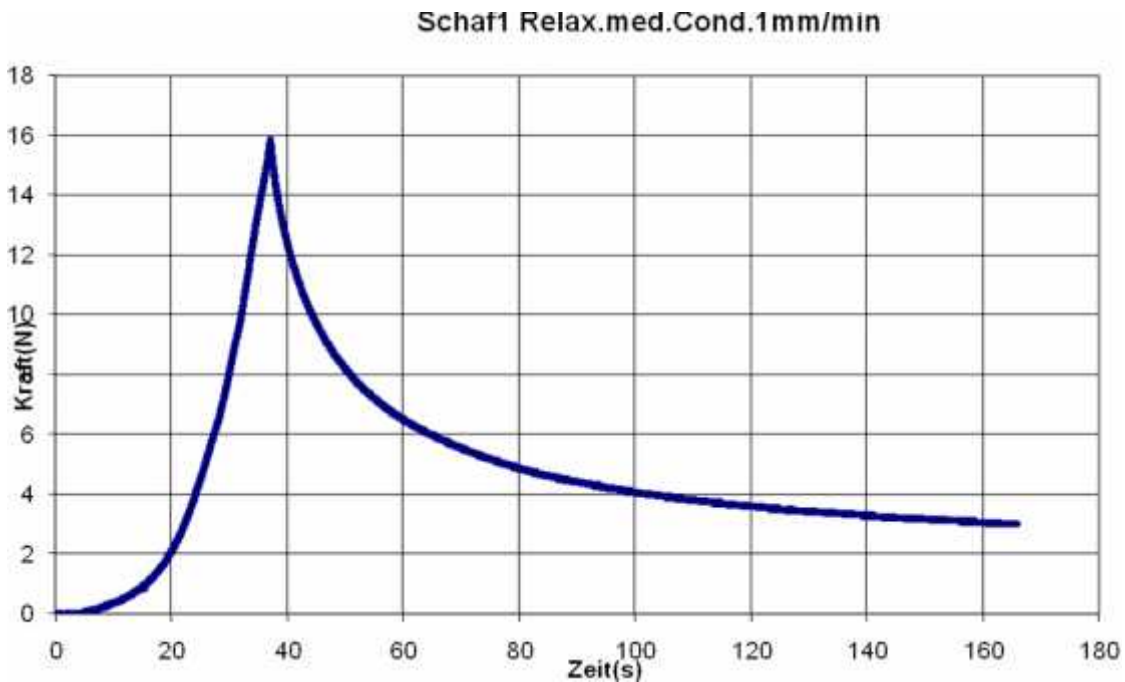


Abb. 27: Beispiel für die Testung der Relaxation. Das Eindringen der Kugelspitze wurde bei einer Kompressionskraft von 15N gestoppt.

Die folgende Testreihe diente der Überprüfung, ob das Verfahren für die unterschiedlichen Knorpeldicken der Präparate geeignet ist. Dazu wurden Knorpelproben von Pferden, Schafen und Kaninchen getestet. Es handelte sich um jeweils 5mm dicke Knorpel-Knochen-Proben aus dem lateralen dorsalen Kondylus, medialen Kondylus und dem lateralen Patellagleitlager der verschiedenen Spezies.

Die Kompressionsversuche am Schaf- und Pferdeknorpel wurden mit einer Eindringgeschwindigkeit von 0,5mm/min, die Relaxationsversuche mit einer Eindringgeschwindigkeit von 1,0mm/min durchgeführt und bei einer Kraft von 15N angehalten.

Bei Kompressions- und Relaxationsversuchen der Kaninchenproben wählten wir zunächst eine geringere Eindringgeschwindigkeit von 0,1, 0,2, 0,3 und 0,5mm/min (Abb. 28 und 29), da es fraglich war, ob es durch die sehr geringe Knorpeldicke zu Problemen während der Testung kommen könnte. Trotz der geringen Knorpeldicken zeigten sich auch beim Kaninchen keine Unterschiede in den Messkurven, so dass die Kompressionsversuche bzw. Relaxationsversuche ebenfalls mit einer

Eindringgeschwindigkeit von 0,5mm/min bzw. 1,0mm/min durchgeführt werden konnten (Abb. 30).

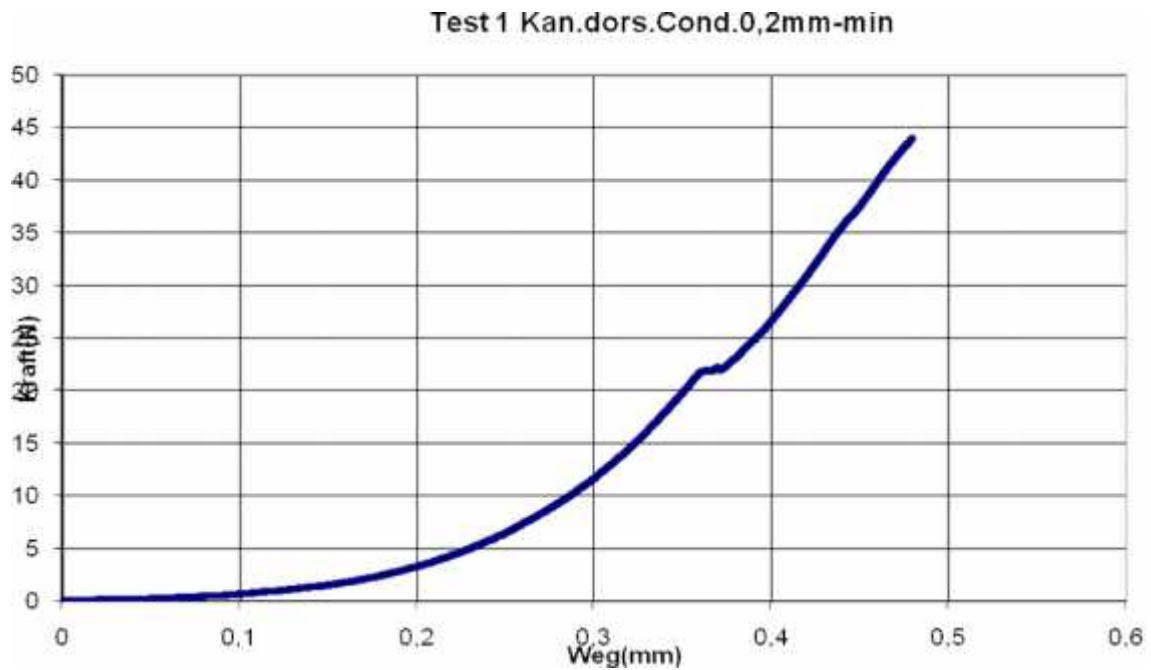


Abb. 28: Testung der Eindringgeschwindigkeit mit 0,2mm/min bei einem Kaninchen.

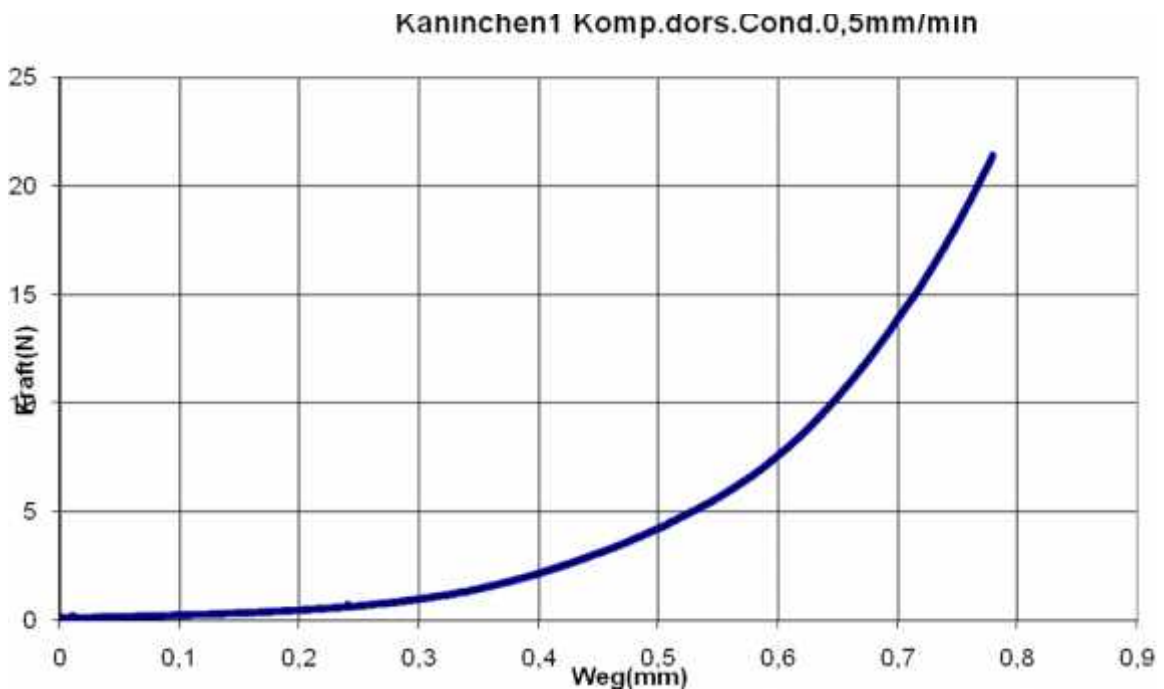


Abb. 29: Testung der Eindringgeschwindigkeit mit 0,5mm/min bei einem Kaninchen.

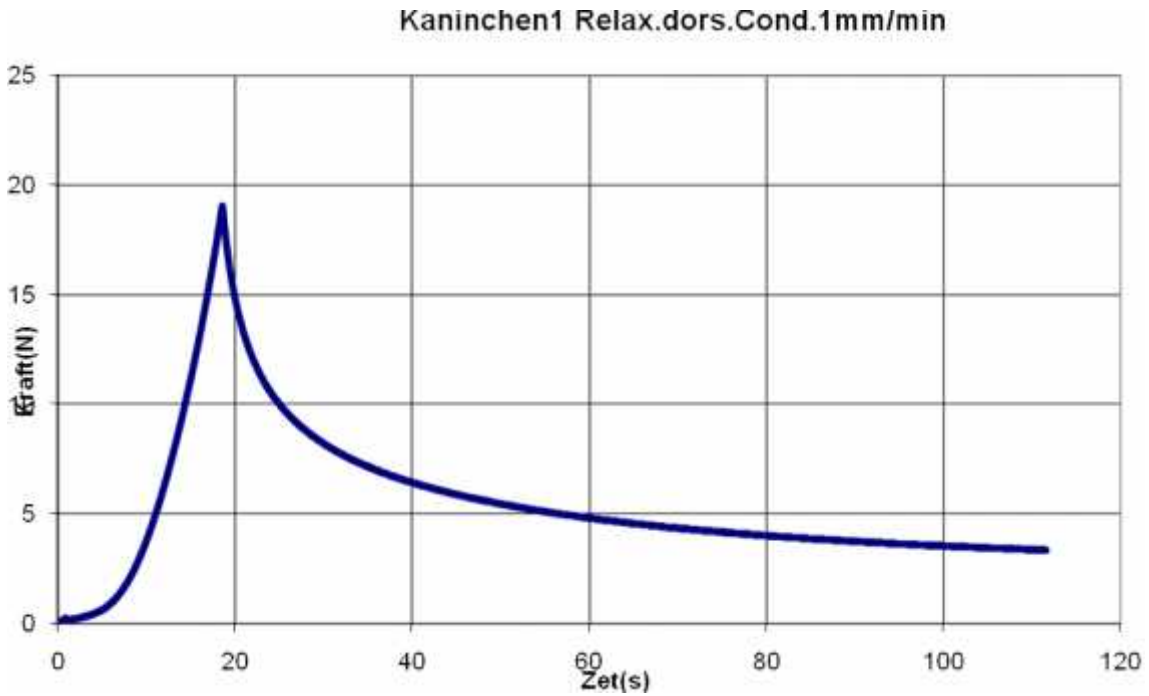


Abb. 30: Relaxationsversuch beim Kaninchen mit einer Eindringgeschwindigkeit von 1mm/min.

3.3 Bestimmung der Knorpeldicke

Zur Bestimmung der Knorpeldicke wurden die Knorpelproben der biomechanischen Testung verwendet. Die Proben wurden im Labor mit einer Bandsäge (Exakt, Norderstedt) an den Messpunkten durchtrennt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnittflächen senkrecht verliefen (Abb. 31).

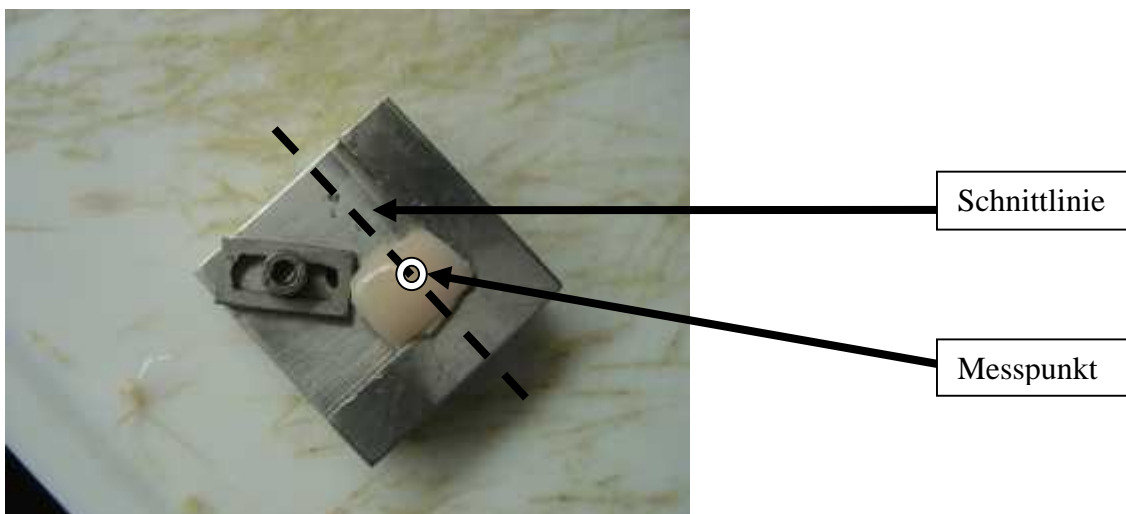


Abb. 31: Schnittführung zur Bestimmung der Knorpeldicke.

Die Proben wurden anschließend in mit einer speziell entwickelten Halterung befestigt. Danach wurden sie mit Hilfe einer Kamera vom Typ Kappa DX 30 unter einem Mikroskop Zeiss Stemi SV 11 digitalisiert und mit der Software Image Pro Plus vermessen (Abb. 32 und 33).

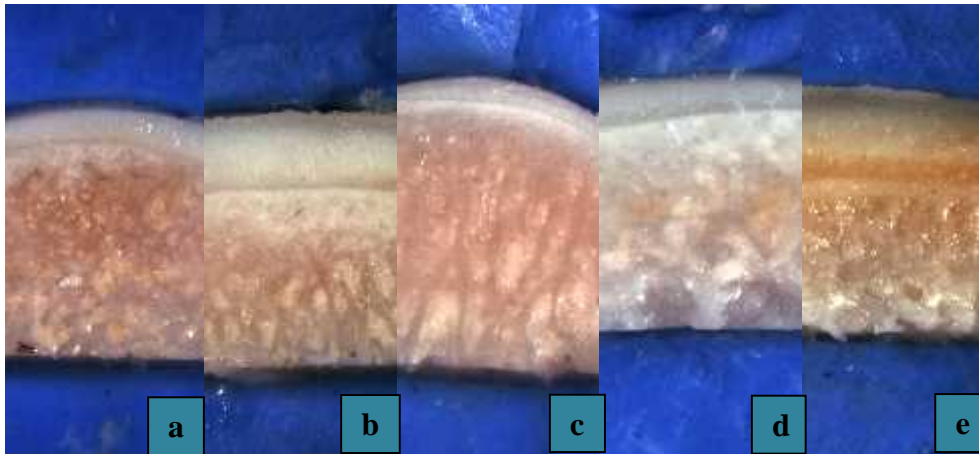


Abb. 32: Beispiel für eine Knorpelprobe vom Hund (a), Pferd (b), Kaninchen (c), Schaf (d) und Mensch (e) (med. Kond. 1,0x0,6)

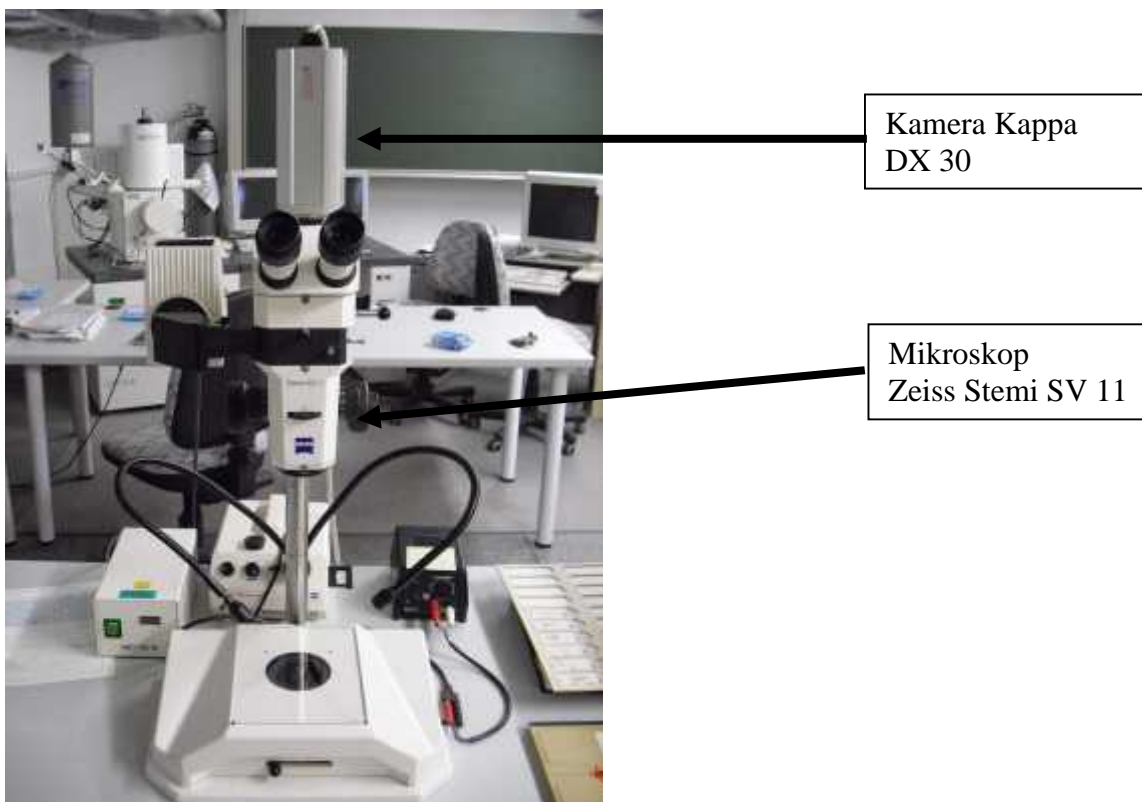


Abb. 33: Aufbau Kamera vom Typ Kappa DX 30 und Mikroskop Zeiss Stemi SV 11, Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen.

3.4 Histologische Untersuchungen

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Proben der unterschiedlichen Spezies mit Hilfe einer wassergekühlten Bandsäge mit feinem Sägeblatt in 1-1,5mm dicke Scheiben geschnitten.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme für 4 Stunden bei 4°C mit 4%igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und zur weiterführenden Aufarbeitung in das Labor für experimentelle Unfallchirurgie JLU Gießen gebracht.

3.4.1 Fixierung und Paraffineinbettung

Nach der Fixation erfolgte die Spülung der Proben mit 0,1m Na-Phosphat-Puffer (pH 7,2 bis 7,4). Anschließend konnten sie je nach Größe für ca. 4-6 Wochen unter ständiger Bewegung und einem Wechsel des Mediums alle 2 Tage in EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) entkalkt werden. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol erfolgte die Einbettung in Paraffin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Aus den Paraffinblöcken wurden mit dem Rotationsmikrotom (Leica RM2155) 3-5µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht.

3.4.2 Technovit 9100neu[®] – Einbettung

Nach 4 Stunden Fixation in 4% Paraformaldehyd bei 4°C wurden die Präparate 6 mal in 0,1M Na-Ph-Puffer gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 96% und 100%) bis zum Xylol entwässert. Die Einbettung in Technovit 9100neu[®] (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) erfolgte nach Herstellerprotokoll bei -4°C für 48 Stunden.

Anschließend wurden 3-5µm dicke Schnitte mit dem Rotationsmikrotom Leica RM 2155 sowie Schliffe nach der Trenn-Dünnschliff-Technik angefertigt [Donath 1988].

3.4.3 Eponeinbettung

Die Fixierung der Präparate für die Einbettung in Epon erfolgte in Yellow-Fix für 4 Stunden. Anschließend wurden sie zehnmal in 0,1M Na-Ph-Puffer gespült und auf eine Größe von 2 mm³ verkleinert.

Der Nachfixierung mit 1%iger Osmiumsäure in 0,1m Cacodylat-Puffer (pH 7,4) für 1½ Stunden folgte ein sechsmaliges Spülen in Cacodylat-Puffer.

Nun konnten die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 96% und 100%) entwässert werden.

Für die Einbettung wurde Epon aus einer Mischung von 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP; Serva, Heidelberg, Deutschland), Glycidether 100, 2-Dodeceny succinic-acid anhydride (DDSSA) und Methyl nadic anhydride (MNA) hergestellt. Die Einbettung selbst erfolgte bei einer Polymerisationsdauer von 20 Stunden bei 60°C. Mit einem Ultracut der Firma Jung wurden 0,5-1µm dicke Semidünnschnitte angefertigt.

3.4.4 Haematoxylin-Eosin-Färbung

Vor der HE-Färbung wurden die Präparate zur Entplastung in MMA oder MEA (MEA; Merck, Hohenbrunn, D), reinem Aceton (Merck, Hohenbrunn, D) und in Aceton mit Aqua dest. eingelegt und anschliessend mit Aqua dest. gespült. Zunächst wurden die Präparate mit frisch gefilterter Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, D) für 25-30 Sek. gefärbt, um nach Spülung mit Aqua dest. unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten zu bläuen.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit wasserlöslichem Eosin G (Merck, Darmstadt, D) für 13-15 Sek. gefärbt. Anschließend erfolgte wieder eine Spülung mit Aqua dest.

Zur Entwässerung durchliefen die Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96% und 100%) und Xylol (Merck, Darmstadt, D). Abschließend wurden die Präparate nun mit DePex (VWR, Poole, GB) eingedeckelt.

3.4.5 Alcianblau-Färbung

Vor der Färbung mit Alcianblau wurden die Präparate mit MEA, Aceton und Aqua dest. entplastet bzw. entparaffiniert – siehe oben. Nach 3-minütiger Spülung in 3%iger Essigsäure erfolgte die Färbung mit Alcianblau (Division Chroma, Münster) für 30 Min. Im Anschluss wurden die Präparate zunächst für 2 Min. mit Aqua dest. und anschließend für 10 Min. mit 1%iger Perjodsäure (Merck, Darmstadt) gespült. Nun wurden die Präparate 10 Minuten in Schiff's Reagenz (Merck, Darmstadt) inkubiert und anschließend 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun für 3 Minuten. Nach dem Bläuen mit fließendem Leitungswasser über 10 Minuten wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96% und 100%) und 2 Xylolbädern entwässert und anschließend mit DePex (VWR, Poole, GB) eingedeckelt.

3.4.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Fixierung der Präparate für die rasterelektronenmikroskopische Auswertung erfolgte in Yellow-Fix (2% Paraformaldehyd, 2% Glutaraldehyd, 0,2% Pikrinsäure) für 3-4 Stunden. Anschließend wurden sie 6-mal in 0,1M Na-Phosphat-Puffer (pH 7,2 bis 7,4) gespült und auf ca. 2mm³ große Stücke zerkleinert. Mit 1%iger Osmiumsäure wurden sie für 1½ Stunden nachfixiert und erneut 6-mal in 0,1M Na-Ph-Puffer-Lösung gespült. Nun konnten sie in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 96% und 100%) entwässert werden. Jetzt wurde das Präparat einmal für 20 Minuten und zweimal für 30 Minuten in Xylol-Epon[®]-Gemischen infiltriert. Das Einbetten der Präparate erfolgte schließlich in reinem Epon[®] (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Die Anfertigung von zunächst Semi-, dann Ultradünnschnitten (0,5 bzw. 0,1µm) nahmen wir mittels Ultracut[®] (Fa. Reichert-Jung, Nußloch) vor. Die mit Toluidinblau bzw. Toluidinblau/Safranin-O gefärbten Semidünnschnitte dienten zur Orientierung bei der Herstellung der Ultradünnschnitte. Beide wurden zur Beurteilung des Übergangs zwischen Knorpeldefekt bzw. -regenerat und angrenzendem nativem Knorpel herangezogen.

Zur Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop wurden die Präparate nach steriler Entnahme in 3% Glutaraldehyd und 1% Saccharose für 3-4 Stunden bei 4°C fixiert und anschließend zuerst mit 0,1M Na-Phosphat-Puffer (pH 7,2-7,4), dann mit 70%igem Alkohol gespült. Größere Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Klinge und Hammer gebrochen, um eine natürliche Oberfläche zu erreichen. Es folgten die Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe (70%, 90%, 96%, 100%) und die Kritische-Punkt-Trocknung im Polaron CPD7501 (Fa. Thermo VG Scientific, East Grinstead, West Sussex, England). Die Bedampfung mit Gold-Palladium unter Zuhilfenahme des Sputter Coaters Polaron SC7640 (Fa. VG Microtech, Uckfield, East Sussex, England) sorgte für die elektrische Leitfähigkeit der Proben.

3.5 Chondrozytenzählung

Um die unterschiedlichen Knorpelzonen noch besser vergleichen zu können, wurden die Chondrozyten in den vorher definierten Zonen in der Übergangs- und Radiärzone gezählt. Dazu wurden von jeder Spezies jeweils histologische Präparate in HE Färbung in zehnfacher Vergrößerung gewählt. In den vorher definierten Zonen wurde jeweils 1 Zählfeld in den äußeren, mittleren und unteren Bereich der Übergangs- und Radiärzone gelegt (Abb. 34). Jedes Zählfeld hat eine Größe von 0,1mm x 0,2mm und damit eine Fläche von 0,02mm². Die Zellzählung erfolgte automatisch mit der Software Image Pro Plus.

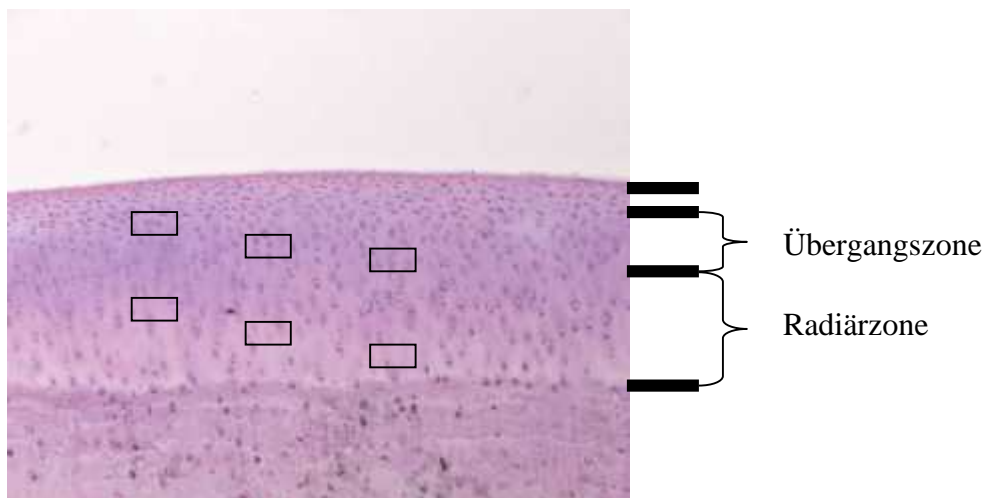


Abb. 34: Bsp. zur Lage der Zählfelder beim Gelenkknorpel vom Schaf 152/07 T9100 HE Originalvergrößerung x10 (Zählfelder zur Darstellung stark vergrößert).

3.6 Datenerfassung und Statistik

Die Erfassung der erhobenen Daten erfolgte mittels Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel™ (Fa. Microsoft, Seattle, USA). Die weitere statistische Datenauswertung wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows 11.5™ (SPSS Software München) vorgenommen.

Zur Varianzanalyse wurden der One Way ANOVA-Test, der Chi-Quadrat-Test mit der Berechnung der jeweiligen Kreuztabellen durchgeführt [Hartung 1999, Fahrmeier et al. 1996, Backhaus et al. 2006].

Die Varianzanalyse drückt die Irrtumswahrscheinlichkeit aus, wenn ein angetroffener Unterschied auf die Grundgesamtheit, aus der die Stichprobe stammt, verallgemeinert wird.

3.6.1 ANOVA-Test

Mit den Prüfgrößen der „einfachen Varianzanalyse“ wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht.

Bei einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) untersucht man den Einfluss verschiedener Ausprägungen einer unabhängigen Variablen (Faktor) auf eine abhängige Variable.

Bei der Berechnung der Varianzanalyse ermittelt man zunächst den Gesamtmittelwert und die Gesamtvarianz.

Um nun auszurechnen, welche Varianz allein auf die Ausprägungen des Faktors zurückgeht, stellt man seine Daten für einen Moment gewissermaßen „ideal“ um. Man weist allen Messwerten innerhalb einer Faktorstufe den jeweiligen Mittelwert zu. Teilt man die Einzelvarianz durch die Gesamtvarianz, erhält man den relativen Anteil der auf den Faktor zurückzuführenden Varianz.

Die Nullhypothese einer einfaktoriellen Varianzanalyse besagt, dass zwischen den Mittelwerten der Gruppen kein Unterschied besteht. Die Alternativhypothese besagt, dass zwischen mindestens zwei Mittelwerten ein Unterschied besteht. Wird die Nullhypothese verworfen, bedeutet dies, dass mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit

mindestens zwei Ausprägungen einen bedeutsamen Unterschied aufweisen [Fahrmeir et al. 1996], [Backhaus et al. 2006].

3.6.2 Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test)

Der Chi-Quadrat-Test wird zum Vergleich von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt. Er ist abhängig davon, was als unabhängige und was als abhängige Variable angesehen wird.

Vereinfacht kann das Vorgehen folgendermaßen beschrieben werden: Aus zwei Merkmalen mit je zwei Kategorien resultieren vier Teilgruppen, für die man die beobachteten Häufigkeiten in eine Kreuztabelle einträgt. Dann wird die Häufigkeit bestimmt, die zu erwarten wäre, wenn die beiden Merkmale völlig unabhängig voneinander wären.

Für jedes der vier Felder wird die Differenz aus beobachteten und erwarteten Häufigkeiten gebildet, quadriert und durch die erwartete Häufigkeit geteilt. Der Chi-Quadrat-Wert wird dann durch die Summe der entsprechenden Werte für alle vier Zellen gebildet.

Für jeden Chi-Quadrat-Wert kann die entsprechende Signifikanz p abgeleitet werden ($\chi^2 = 3,841$ entspricht $p = 0,05$; $\chi^2 = 6,63$ entspricht $p=0,01$).

Zum Nachweis eines signifikanten Unterschiedes wird ein p -Wert von weniger als 0,05 als "signifikant" und von weniger als 0,01 mit "hoch signifikant" festgelegt [Hartung 1999].

3.6.3 Scheffé Test

Post-hoc-Tests sind Signifikanztests aus der mathematischen Statistik. Die Post-hoc-Tests geben entweder mit paarweisen Mittelwertvergleichen oder mit Teilgruppenvergleichen Auskunft, welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden. Scheffé ist der „strengste“ Post-hoc Test, gibt aber die am leichtesten zu interpretierenden Ergebnisse aus. Er überprüft, ob sich die Versuchsgruppen in den Mittelwerten signifikant unterscheiden. Die mittlere Differenz ist auf der Stufe 0.05 signifikant [Rönz 2001].

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Knorpeldickemessung innerhalb der einzelnen Spezies

Die Kaninchen haben am lateralen dorsalen Kondylus den dicksten Knorpel mit 0,386mm, am medialen Kondylus beträgt die Knorpeldicke 0,380mm und 0,375mm am lateralen Patellagleitlager. Die durchschnittliche Knorpeldicke beim Kaninchen beträgt somit 0,380mm (Abb. 35).

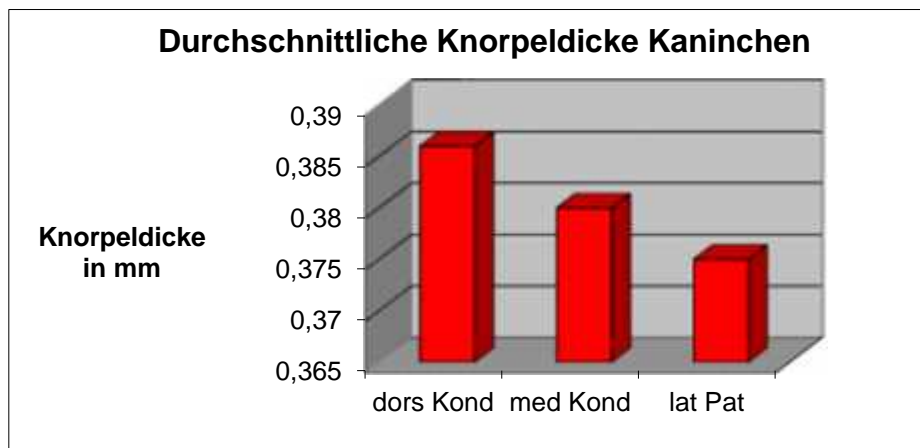


Abb. 35: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Kaninchen.

Die Schafe haben am medialen Kondylus den dicksten Knorpel mit 0,914mm. Wesentlich dünner ist der Knorpel am lateralen Patellagleitlager mit im Durchschnitt 0,585mm, am lateralen dorsalen Kondylus ist er 0,538mm dick. Die durchschnittliche Gesamtknorpeldicke beträgt beim Schaf 0,679mm (Abb. 36).

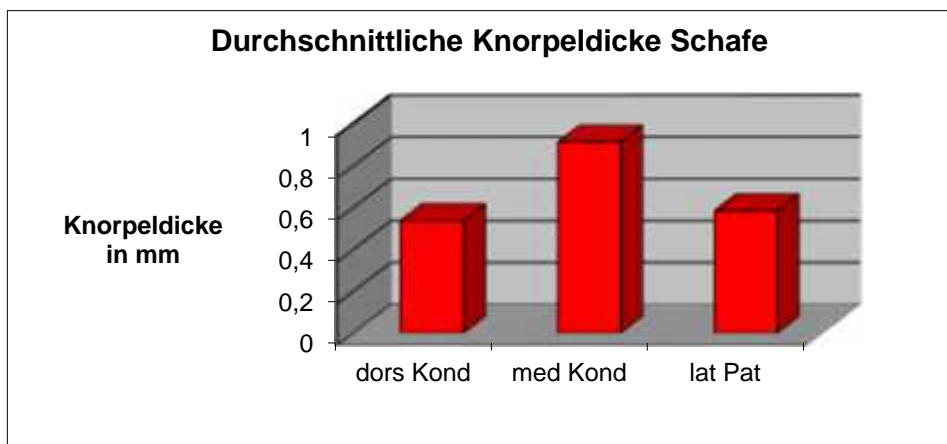


Abb. 36: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Schaf.

Bei den Hunden ist die Knorpelschicht am medialen Kondylus mit durchschnittlich 1,074mm am dicksten, gefolgt vom lateralen dorsalen Kondylus mit 0,705mm und dem lateralen Patellagleitlager mit einer Dicke von 0,621mm. Insgesamt haben die Hunde eine durchschnittliche Knorpelauflage von 0,800mm (Abb. 37).

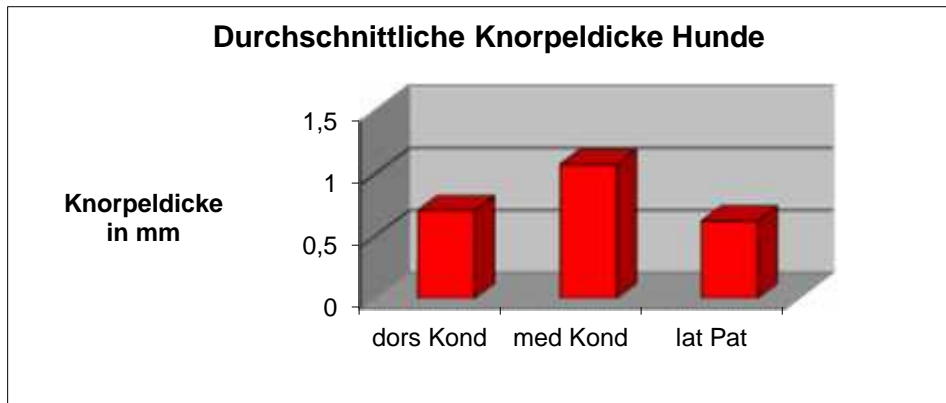


Abb. 37: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Hund.

Die Pferde haben am lateralen Patellagleitlager mit 1,965mm und am medialen Kondylus mit 1,947mm den dicksten Knorpel. Am lateralen dorsalen Kondylus ist der er im Durchschnitt 1,647mm dick. Die Pferde haben eine durchschnittliche Knorpelauflage von 1,853mm (Abb. 38).

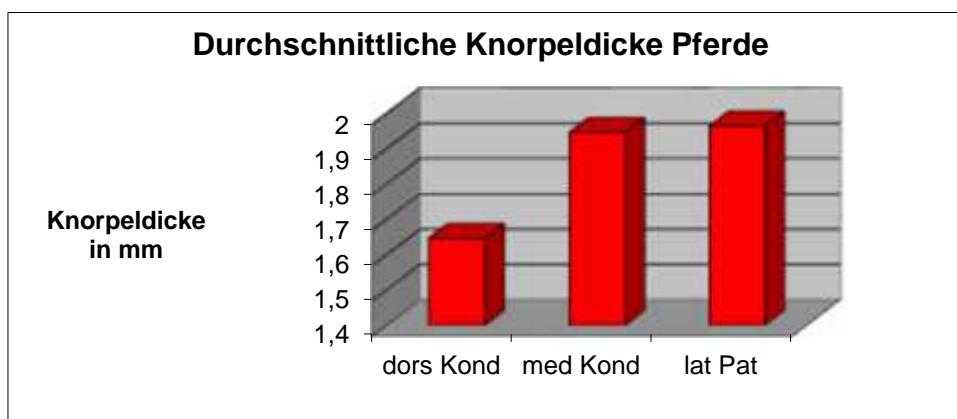


Abb. 38: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Pferd.

Ein Vergleich der Knorpeldicke der drei unterschiedlichen Messstellen (medialer Kondylus, dorsaler Kondylus und laterales Patellagleitlager) innerhalb einer Spezies zeigt leichte speziesspezifische Abstufungen der Knorpeldicke. So ist die Knorpeldicke beim Kaninchen an allen drei Messstellen sehr ähnlich. Bei den Hunden dagegen ist der mediale Kondylus am dicksten, danach folgt der laterale dorsale Kondylus, die dünnste Knorpelschicht liegt am lateralen Patellagleitlager. Die Schafe besitzen am medialen Kondylus den dicksten Knorpel. Der Knorpel am lateralen Patellagleitlager und am lateralen dorsalen Kondylus ist ähnlich dick. Pferde haben am lateralen Patellagleitlager und am medialen Kondylus vergleichbare Knorpeldicken. Der Knorpel am lateralen dorsalen Kondylus ist dagegen etwas dünner.

4.2 Ergebnisse der Knorpeldickemessung zwischen den verschiedenen Spezies

Die Messung der Knorpeldicke an den festgelegten Messpunkten zeigt beträchtliche Unterschiede zwischen den Spezies. Zentral in der Hauptbelastungszone des medialen Femurkondylus ist die Knorpeldicke beim Pferd etwa doppelt so dick wie bei Hund oder Schaf und etwa fünffach dicker als beim Kaninchen (Abb. 39) (Tab. 5).

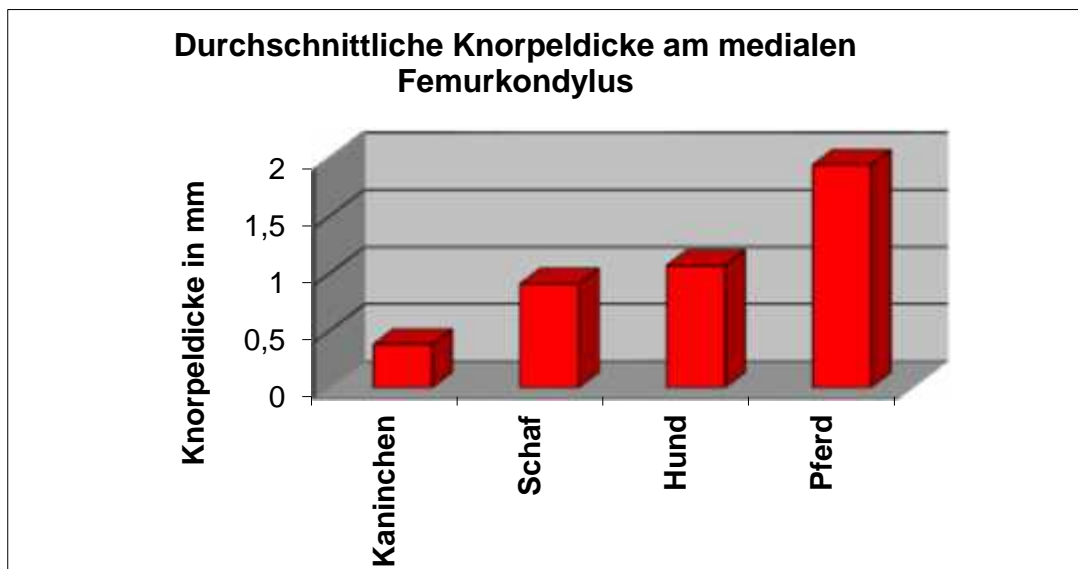


Abb. 39: Vergleich der durchschnittlichen Knorpelhöhen im Bereich des medialen Femurkondylus der Spezies Kaninchen, Schaf, Hund und Pferd (Humanes Präparat nicht verfügbar).

	Kaninchen	Schafe	Hunde	Pferde
Probe Nr				
1	0,47	0,85	1,27	1,83
2	0,41	1,15	1,00	2,08
3	0,40	0,78	1,03	2,10
4	0,29	0,70	1,49	2,11
5	0,31	0,78	1,35	2,00
6	0,44	1,00	1,32	1,97
7	0,35	1,25	0,90	2,00
8	0,38	1,20	0,87	1,97
9	0,43	0,74	0,73	1,65
10	0,32	0,69	0,78	1,76
Durchschnitt	0,38	0,91	1,07	1,95

Tab. 5: Knorpeldicken am medialen Femurkondylus.

Die Unterschiede der Knorpeldicken im Bereich des zentralen lateralen Patellagleitlagers sind zwischen Kaninchen, Schaf und Hund weniger stark ausgeprägt, während das Pferd auch hier eine wesentlich stärkere hyaline Knorpelschicht aufweist. Das Kaninchen hat wieder die geringste Knorpeldicke. Die Knorpelhöhe beim Pferd ist mit der Knorpeldicke des Menschen am zentralen medialen Femurkondylus vergleichbar (Abb. 40) (Tab. 6).

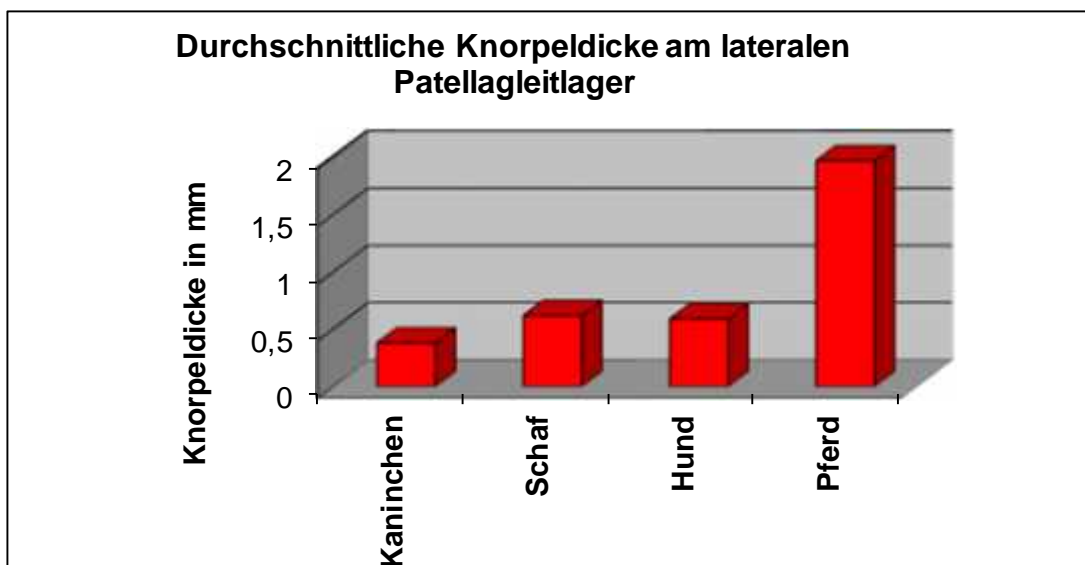


Abb. 40: Vergleich der durchschnittlichen Knorpelhöhen im Bereich des lateralen Patellagleitlagers der Spezies Kaninchen, Schaf, Hund und Pferd.

	Kaninchen	Schaf	Hund	Pferd
Probe Nr				
1	0,40	0,46	0,63	2,30
2	0,34	0,67	0,61	1,84
3	0,47	0,72	0,65	1,78
4	0,36	0,68	0,67	1,56
5	0,31	0,49	0,78	1,54
6	0,53	0,67	0,76	2,30
7	0,41	0,58	0,65	2,43
8	0,31	0,47	0,52	2,20
9	0,33	0,38	0,45	1,72
10	0,29	0,73	0,49	1,98
Durchschnitt	0,38	0,59	0,62	1,97

Tab. 6: Knorpeldicken am lateralen Patellagleitlager.

Die Knorpeldickemessungen am lateralen dorsalen Femurkondylus konnten an allen in der Arbeit beschriebenen Spezies durchgeführt werden.

Der Mensch zeigt dabei die höchste Knorpelaufgabe. Die verfügbaren Vergleichspräparate des Menschen haben eine durchschnittliche Knorpelhöhe von 2,17mm am dorsalen lateralen Femurkondylus, die Pferde eine Knorpeldicke von durchschnittlich 1,65mm. Die Kaninchen zeigen mit durchschnittlich 0,39mm eine ähnliche Knorpelhöhe wie an den bereits beschriebenen Messstellen. Die Hunde bieten mit durchschnittlich 0,7mm eine größere Knorpeldicke als die Schafe mit durchschnittlich 0,54mm (Tab. 7), (Abb. 41)

In Prozentwerten umgerechnet kommt so das Pferd mit einer Knorpeldicke von 76,5% der des humanen Präparates (100%) am nächsten. Die Spezies Hund 30,4%, Schaf 26,3% und Kaninchen 18,0% weisen am zentralen dorsalen Femurkondylus eine deutlich geringere Knorpeldicke auf.

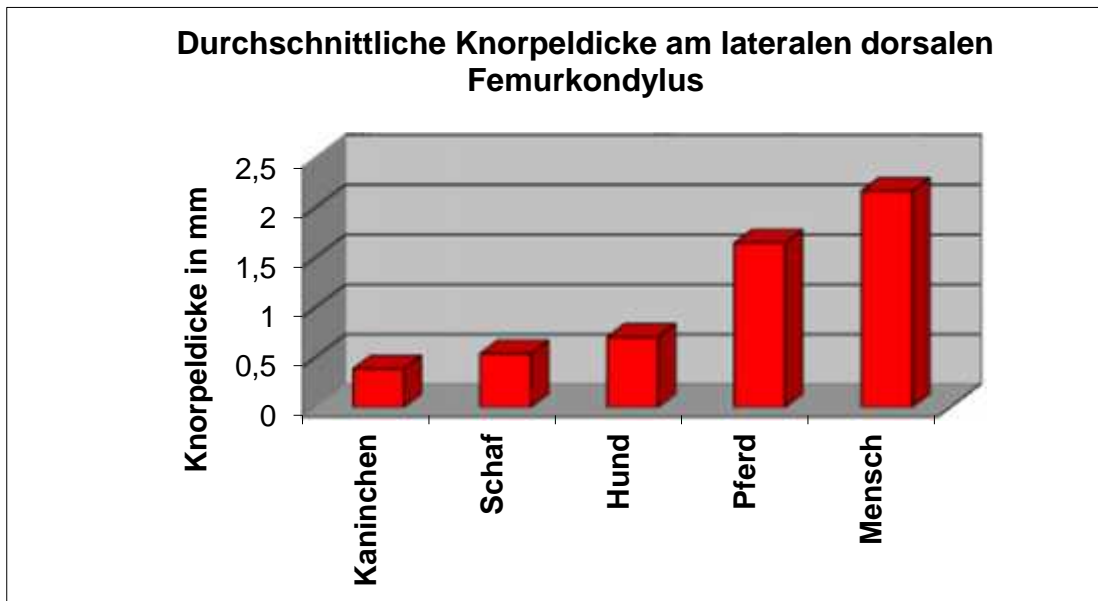


Abb. 41: Vergleich der durchschnittlichen Knorpelhöhen im Bereich des lateralen dorsalen Femurkondylus der Spezies Kaninchen, Schaf, Hund, Pferd und Mensch.

Knorpeldicken lateraler dorsaler Femurkondylus					
	Kaninchen	Schaf	Hund	Pferd	Mensch
Probe Nr					
1	0,40	0,3	0,86	1,93	1,97
2	0,36	0,65	0,76	1,92	2,30
3	0,48	0,48	0,7	1,85	2,21
4	0,38	0,58	0,72	1,73	2,13
5	0,33	0,45	0,85	0,82	2,40
6	0,48	0,40	0,8	2,22	1,83
7	0,45	0,55	0,73	1,1	2,20
8	0,35	0,65	0,65	1,85	2,24
9	0,35	0,60	0,46	1,50	2,30
10	0,28	0,72	0,52	1,55	2,10
Durchschnitt	0,39	0,54	0,70	1,65	2,17

Tab. 7: Knorpeldicken am lateralen dorsalen Femurkondylus.

4.3 Ergebnisse Chondrozytenzählung

In der Zellzählung zeigen sich bei den Pferden in der Übergangszone durchschnittlich 29 Chondrozyten pro 0,02mm². Kaninchen besitzen durchschnittlich 26 Chondrozyten, Schafe durchschnittlich 25 Chondrozyten pro 0,02 mm². Die Hunde haben durchschnittlich 17 Chondrozyten pro 0,02mm². Die wenigsten Chondrozyten finden wir beim Menschen mit durchschnittlich 7 Chondrozyten pro 0,02mm² (Tab. 8).

Spezies	Knorpelzone	Durchschnittliche Chondrozytenanzahl
Schaf	Übergangszone	25
	Radiärzone	22
Hund	Übergangszone	17
	Radiärzone	20
Mensch	Übergangszone	7
	Radiärzone	6
Pferd	Übergangszone	29
	Radiärzone	15
Kaninchen	Übergangszone	26
	Radiärzone	27

Tab. 8: Durchschnittliche Chondrozytenanzahl in der Übergangs- und Radiärzone.

In der Radiärzone haben Kaninchen die meisten Zellen mit durchschnittlich 27 Chondrozyten pro 0,02mm². Die Schafe besitzen 22 Chondrozyten, die Hunde durchschnittlich 20 Chondrozyten pro 0,02mm². Die Pferde zeigen durchschnittlich 15 Chondrozyten pro 0,02mm², während die geringste durchschnittliche Zellzahl die Menschen mit 6 Chondrozyten haben (Abb. 42).

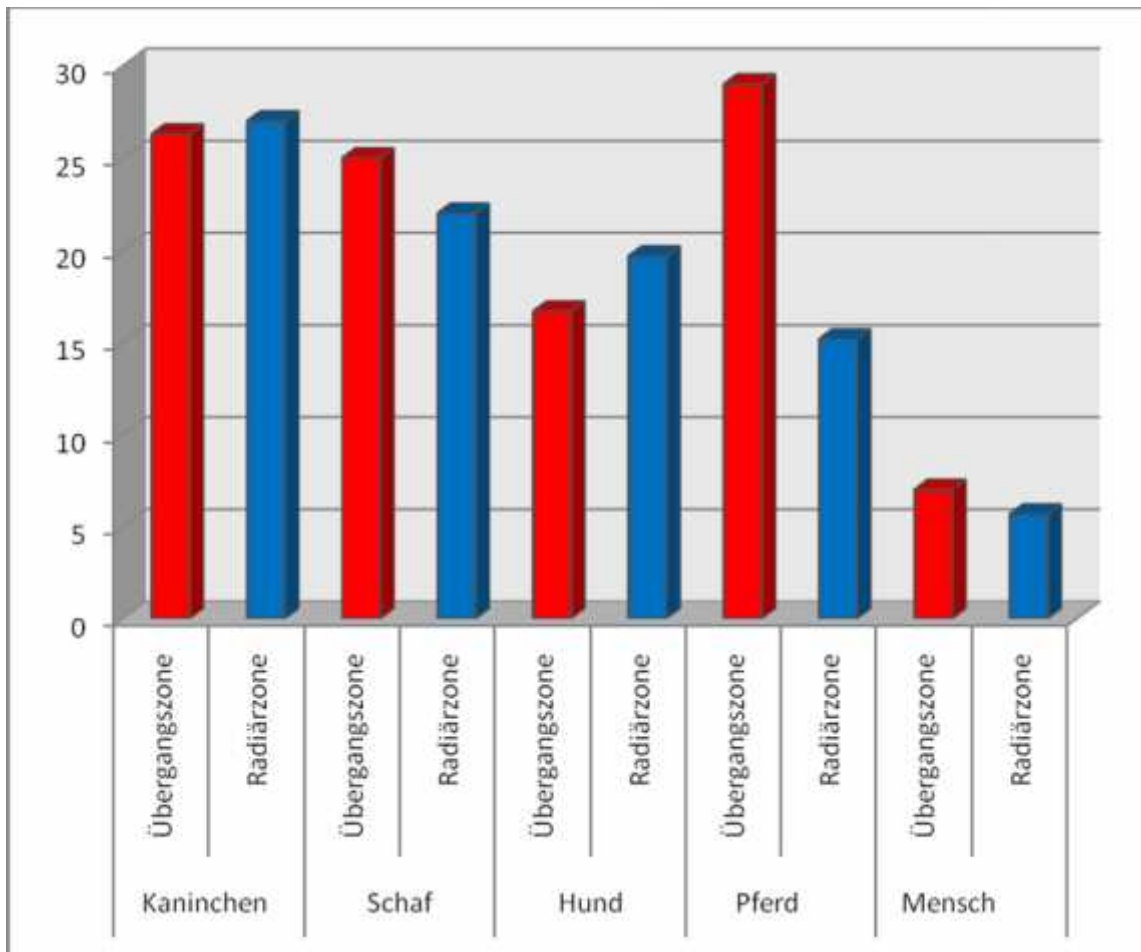


Abb. 42: Durchschnittliche Chondrozytenanzahl der verschiedenen Spezies in der Übergangs- und Radiärzone pro 0,02mm².

4.4 Ergebnisse Biomechanik

4.4.1 Auswertung der Kompressionsversuche

Für die statistische Auswertung der Kompressionsversuche wurden für jede Spezies und für jede Messstelle (medialer Kondylus, lateraler dorsaler Kondylus, laterales Patellagleitlager) jeweils die gemessenen Kraftwerte in Newton (N) erhoben, die bei einer Eindringtiefe von 10%, 20% und 30% von der gesamten Knorpelhöhe auf die Kugelspitze einwirkten (Abb. 43).

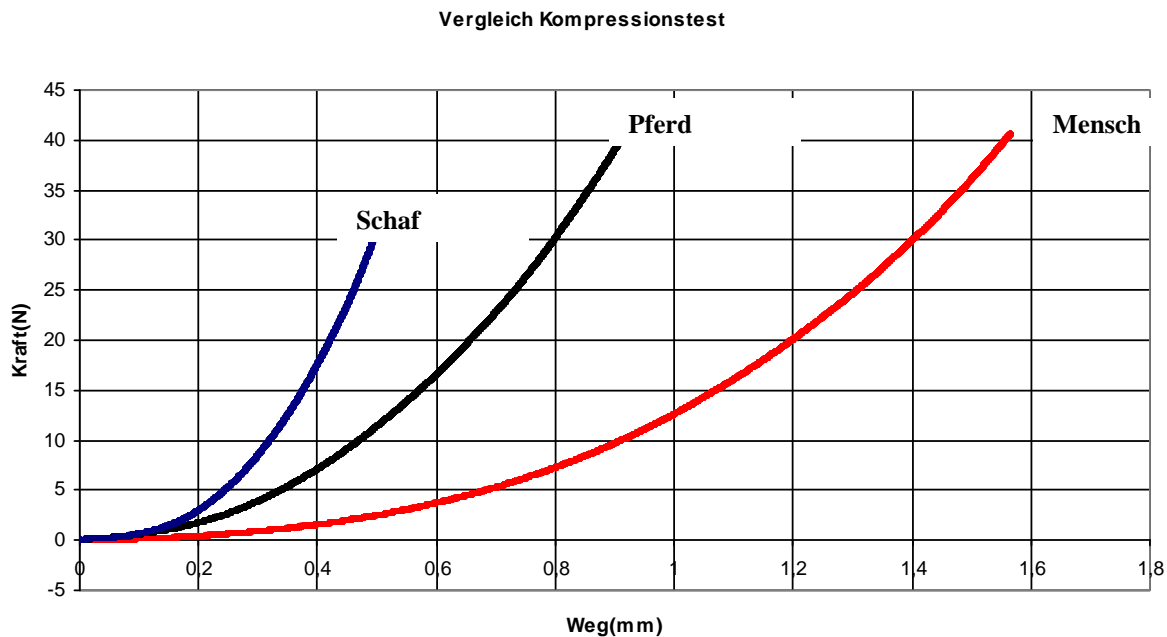


Abb. 43: Vergleichende exemplarische Darstellung des Kurvenverlaufs der Kompressionsuntersuchung einer Schafprobe (Schaf Nr. 9, blau), einer Pferdeprobe (Pferd Nr. 7, schwarz) und einer humanen Knorpelprobe (Humanprobe Nr. 1, rot).

4.4.1.1 Kompressionsversuche lateraler dorsaler Kondylus

10% Eindringtiefe:

Bei den Schafen wurde am lateralen dorsalen Kondylus bei einer Eindringtiefe von 10% der geringste Kraftwert ermittelt. Die nächst höheren, jedoch sehr ähnlichen Kraftwerte, zeigten die Spezies Hund und Kaninchen.

Beim Menschen war die Krafteinwirkung auf die Kugelspitze zusätzlich etwas höher. Die höchsten Werte zeigten sich bei den Pferden (Tab. 9), (Abb. 44).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Komprimierte Knorpelhöhe	10%				
Mittelwert (N)	0,40	0,44	0,21	1,12	0,73
Standardabweichung	0,27	0,29	0,1	1,12	0,44
95%-Konfidenzintervall (N)	0,20-0,60	0,23-0,64	0,14-0,28	0,27-2,0	0,41-1,05

Tab. 9: Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 10% der Knorpelhöhe.

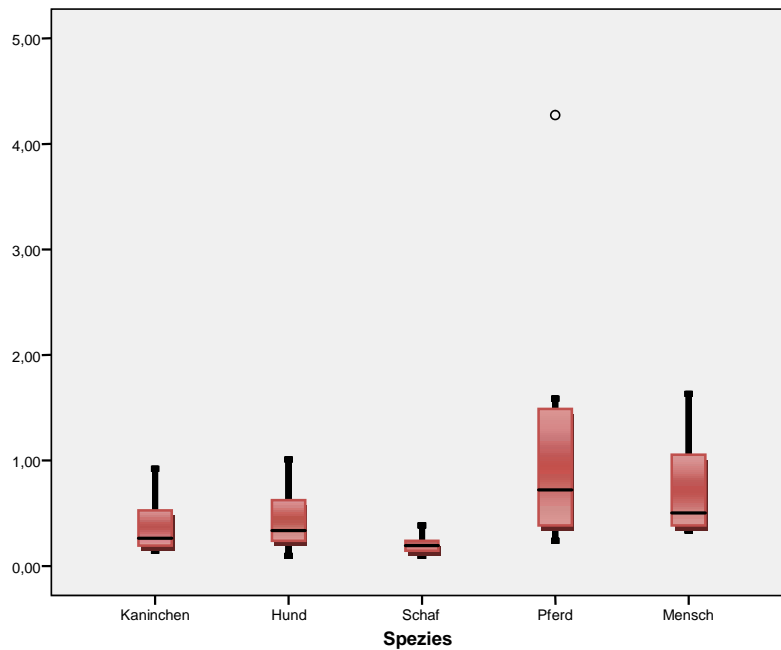


Abb.44: Graphische Darstellung der Kompressionskräfte zur Impression des Indentors zu 10% der Knorpelhöhe, sowie des Mittelwertes und des 95% Konfidenzintervalls.

20% Eindringtiefe:

Bei einer Eindringtiefe von 20% am lateralen dorsalen Kondylus hatten wiederum die Schafe die kleinsten Kraftwerte. Wie bereits bei 10% Eindringtiefe folgten darauf die Proben der Kaninchen und der Hunde. Im Vergleich hohe Werte besitzen die menschlichen Proben und die höchsten Werte lieferten die Pferde (Tab.10) (Abb. 45).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Komprimierte Knorpelhöhe	20%				
Mittelwert (N)	1,12	1,44	0,5	4,11	2,34
Standardabweichung	1,03	0,98	0,3	4,85	1,5
95%-Konfidenzintervall (N)	0,39-1,85	0,74-2,14	0,28-0,70	0,64-7,58	1,27-3,42

Tab. 10: Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 20% der Knorpelhöhe.

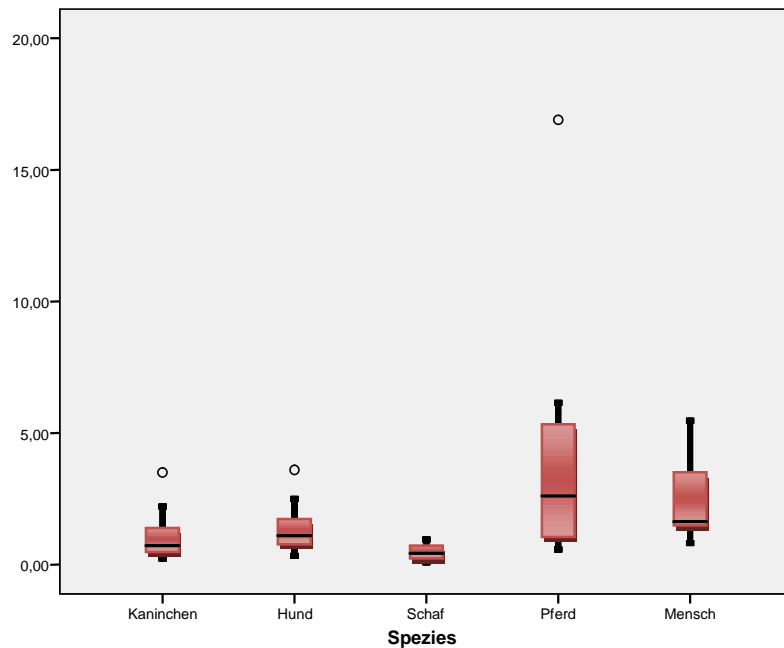


Abb. 45: Graphische Darstellung der Kompressionskräfte zur Impression des Indentors zu 20% der Knorpelhöhe, sowie des Mittelwertes und des 95% Konfidenzintervalls.

30% Eindringtiefe:

Bei einer Eindringtiefe von 30% am lateralen dorsalen Kondylus zeigte sich die gleiche Reihenfolge der Spezies wie bei 10% und 20% Eindringtiefe. Die geringsten Kraftwerte zeigten sich bei den Schafen, es folgten die Spezies Kaninchen, Hund und Mensch. Die Pferde waren die Spezies mit den deutlich höchsten Kraftwerten. Auffallend hierbei war, dass die Kraftwerte der Pferde die Kraftwerte der Spezies Mensch um das doppelte überschritten (Tab.11), (Abb. 46).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Komprimierte Knorpelhöhe	30%				
Mittelwert (N)	2,71	3,87	1,18	10,69	5,42
Standardabweichung	2,61	2,96	0,71	11,99	3,59
95%-Konfidenzintervall (N)	0,85-4,58	1,75-5,99	0,67-1,68	2,11-19,27	2,86-7,99

Tab. 11: Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 30% der Knorpelhöhe.

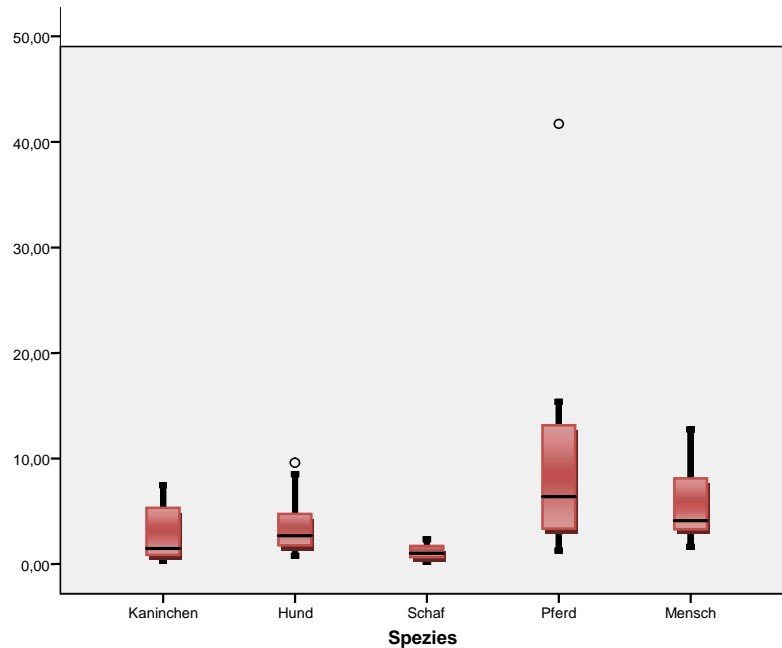


Abb. 46: Graphische Darstellung der Kompressionskräfte zur Impression des Indentors zu 30% der Knorpelhöhe, sowie des Mittelwertes und des 95% Konfidenzintervalls.

Im Vergleich der Gruppen untereinander bei 10%, 20% und 30% Eindringtiefe mittels dem Oneway Anova Test [Fahrmeir et al. 1996, Backhaus et al. 2006] zeigt sich innerhalb der Gruppen jeweils eine leichte Divergenz, zwischen den Gruppen eine größere Divergenz, die mit höheren Kraftwerten deutlich zunimmt (Tab. 12).

	Quadrat- summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
lat dors Kond 10 %					
Zwischen den Gruppen	5,116	4	1,279	3,568	0,013
Innerhalb der Gruppen	16,132	45	0,358		
Gesamt	21,248	49			
lat dors Kond 20 %					
Zwischen den Gruppen	79,075	4	19,769	3,544	0,013
Innerhalb der Gruppen	250,983	45	5,577		
Gesamt	330,057	49			
lat dors Kond 30 %					
Zwischen den Gruppen	534,889	4	133,722	3,869	0,009
Innerhalb der Gruppen	1555,131	45	34,558		
Gesamt	2090,020	49			

Tab.12: Vergleich der Gruppen untereinander am dorsalen Femurkondylus mit dem Oneway Anova Test.

Mit Post- Hoc- Tests wurden Mehrfachvergleiche zwischen den einzelnen Spezies mit Hilfe der Scheffé- Prozedur dargestellt [Scheffé 1959]. Dabei zeigt sich, dass der Mensch im Kompressionsverhalten im Zufallsabstand zu den übrigen Spezies liegt. Der größte Unterschied wurde durchgehend bei 10%, 20% und 30% zwischen den Spezies Schaf und Pferd gemessen.

4.4.1.2 Kompressionsversuche laterales Patellagleitlager

Bei den Kompressionsversuchen am lateralen Patellagleitlager zeigte sich bei einer Eindringtiefe von 10, 20 und 30% eine einheitliche Reihenfolge der Spezies in Bezug auf die auf die Kugelspitze einwirkenden Kräfte. Die geringsten Werte wurden bei den Schafen gemessen, die nächsthöheren Werte zeigten die Kaninchen. Hunde, und Pferde lieferten die höchsten Messwerte (Tab.13), (Abb. 47).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Komprimierte Knorpelhöhe	10%			
Mittelwert (N)	0,34	0,48	0,17	0,91
Standardabweichung	0,28	0,33	0,09	0,34
95%-Konfidenzintervall (N)	0,06- 0,61	0,24-0,71	0,11-0,24	0,66-1,15
Komprimierte Knorpelhöhe	20%			
Mittelwert (N)	1,02	1,64	0,42	2,46
Standardabweichung	1,18	0,79	0,23	0,97
95%-Konfidenzintervall (N)	0,18- 1,87	1,07-2,2	0,26-0,58	1,77-3,15
Komprimierte Knorpelhöhe	30%			
Mittelwert (N)	2,21	4,59	1,09	5,49
Standardabweichung	2,29	1,88	0,65	2,53
95%-Konfidenzintervall (N)	0,58- 3,85	3,25-5,94	0,63-1,56	2,54-4,16

Tab. 13: Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 10%, 20% und 30% der Knorpelhöhe.

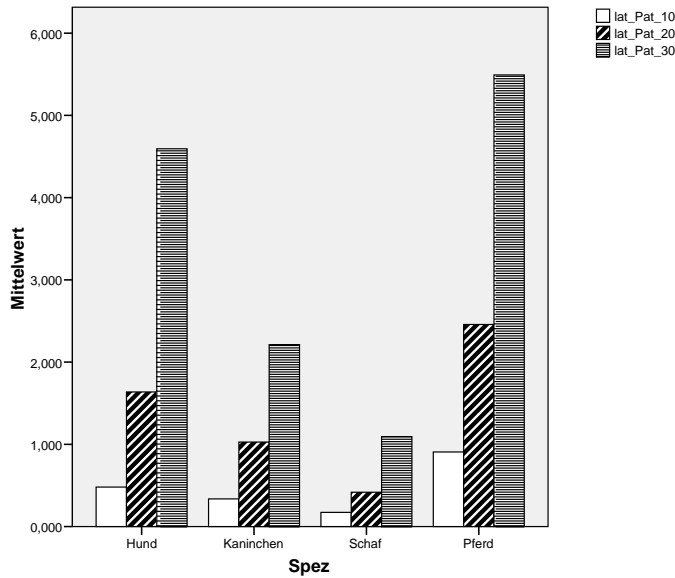


Abb. 47: Vergleich der Kompressionsversuche am lateralen Patellagleitlager.

Im Vergleich der Gruppen untereinander bei 10%, 20% und 30% Eindringtiefe mittels dem Oneway Anova Test zeigen sich sowohl zwischen als auch innerhalb der Gruppen deutliche Unterschiede (Tab.14).

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
lat_Pat_10	Zwischen den Gruppen	2,975	3	,992	10,573	,000
	Innerhalb der Gruppen	3,376	36	,094		
	Gesamt	6,351	39			
lat_Pat_20	Zwischen den Gruppen	22,778	3	7,593	10,108	,000
	Innerhalb der Gruppen	27,042	36	,751		
	Gesamt	49,820	39			
lat_Pat_30	Zwischen den Gruppen	125,144	3	41,715	12,066	,000
	Innerhalb der Gruppen	124,458	36	3,457		
	Gesamt	249,602	39			

Tab. 14: Vergleich der Gruppen untereinander am lateralen Patellagleitlager mit dem Oneway Anova Test.

Im Mehrfachvergleich zwischen den einzelnen Spezies mit Hilfe der Scheffé- Prozedur fällt auf, dass die größten Unterschiede bei allen Eindringtiefen zwischen den Schafen und Pferden bestehen.

4.4.1.3 Kompressionsversuche medialer Femurkondylus

Am medialen Kondylus zeigte sich bei den Kompressionsversuchen bei allen drei Eindringtiefen eine einheitliche Reihenfolge der Spezies. Diesmal lieferten die Kaninchen die kleinsten Kraftwerte, in aufsteigender Reihenfolge folgten die Spezies Schafe, Hunde und Pferde (Tab.15), (Abb. 48).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Komprimierte Knorpelhöhe	10%			
Mittelwert (N)	0,23	0,58	0,24	0,65
Standardabweichung	0,13	0,24	0,11	0,16
95%-Konfidenzintervall (N)	0,13- 0,32	0,4-0,74	0,16-0,32	0,53-0,77
Komprimierte Knorpelhöhe	20%			
Mittelwert (N)	0,64	1,69	0,7	1,83
Standardabweichung	0,53	0,74	0,61	0,57
95%-Konfidenzintervall (N)	0,26- 1,03	1,16-2,22	0,54-2,96	1,42-2,24
Komprimierte Knorpelhöhe	30%			
Mittelwert (N)	1,65	4,06	1,75	4,29
Standardabweichung	2,02	1,84	1,69	1,78
95%-Konfidenzintervall (N)	0,2- 3,09	2,75-5,38	0,54-2,96	3,02-5,56

Tab.15: Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 10%, 20% und 30% der Knorpelhöhe.

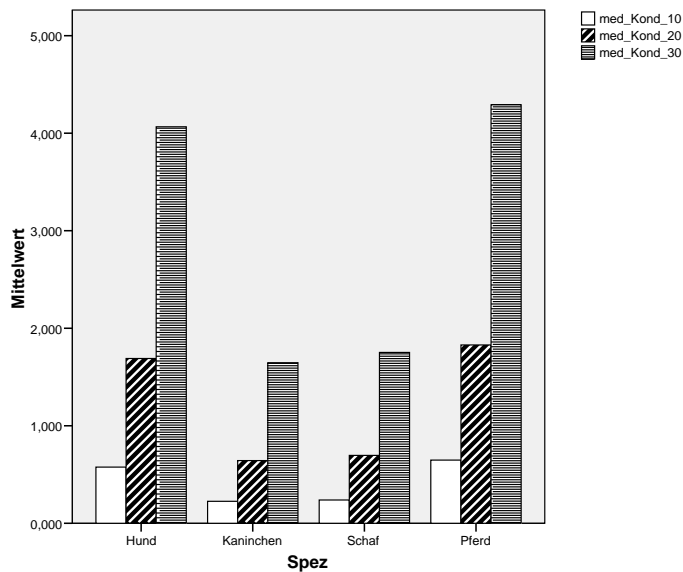


Abb. 48: Vergleich der Kompressionsversuche am medialen Kondylus.

Im Vergleich der Gruppen untereinander bei 10%, 20% und 30% Eindringtiefe mittels des Oneway Anova Test zeigt sich sowohl zwischen als auch innerhalb der Gruppen ein gewisser Unterschied. Die Unterschiede sind bei einer Eindringtiefe von 10% und 20% am ausgeprägtesten (Tab. 16).

ONEWAY ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
med_Kond_10	Zwischen den Gruppen	1,468	3	,489	17,256	,000
	Innerhalb der Gruppen	1,021	36	,028		
	Gesamt	2,489	39			
med_Kond_20	Zwischen den Gruppen	11,983	3	3,994	10,529	,000
	Innerhalb der Gruppen	13,657	36	,379		
	Gesamt	25,640	39			
med_Kond_30	Zwischen den Gruppen	61,772	3	20,591	6,106	,002
	Innerhalb der Gruppen	121,393	36	3,372		
	Gesamt	183,165	39			

Tab. 16: Vergleich der Gruppen untereinander am medialen Kondylus mit dem Oneway Anova Test.

Im Mehrfachvergleich zwischen den einzelnen Spezies mit Hilfe der Scheffé- Prozedur zeigen sich die größten Unterschiede zwischen der Spezies Kaninchen und Pferd und zwischen Schaf und Pferd. Bei einer Eindringtiefe von 10% sind die Unterschiede am größten. Der Unterschied wird mit zunehmender Eindringtiefe geringer.

4.4.2 Auswertung der Relaxationsversuche

Bei den Relaxationsversuchen wurde die Kugelspitze mit konstanter Geschwindigkeit so weit in den Knorpel eingefahren, bis eine Kraft von 15 Newton auf die Kugelspitze einwirkte. Daraufhin wurde die Kugelspitze gestoppt und die Kraft, die auf die Kugelspitze einwirkte, gemessen. Für die statistische Auswertung wurde die Relaxationsfähigkeit des Knorpels nach 10, 20, 30 und 40 Sekunden gemessen.

Während zwischen den verschiedenen Tierarten kein signifikanter ($p > 0,335$) Unterschied festzustellen ist, zeigt der menschliche Knorpel eine signifikant ($p < 0,01$) geringere Relaxationsfähigkeit.

Im Gegensatz zu den relativ heterogenen Befunden der Kompressionsuntersuchung stellen sich die Ergebnisse der Relaxationsuntersuchung homogen dar (maximale Standardabweichung von 1,794), (Abb. 49).

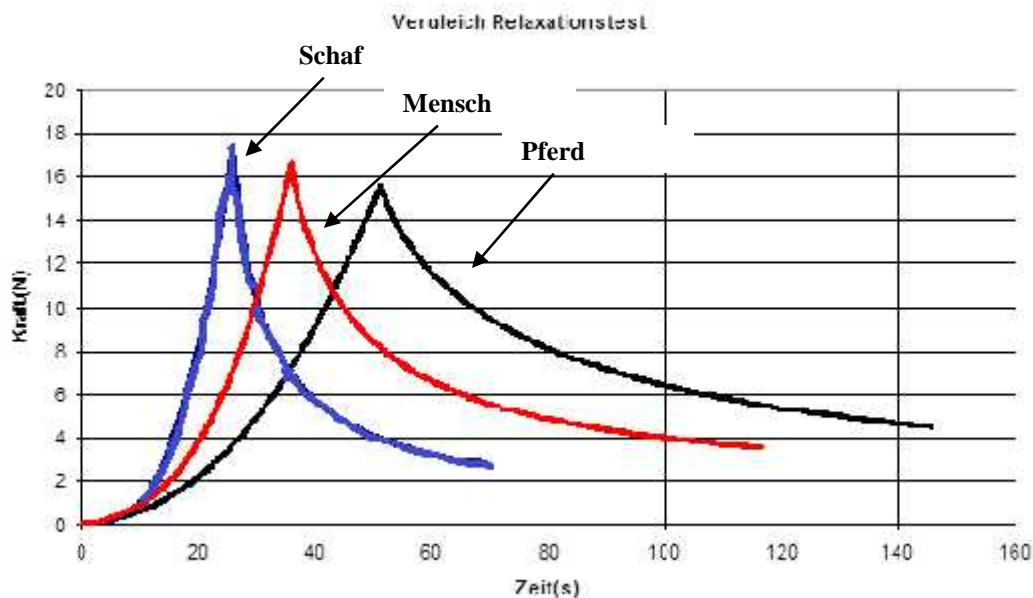


Abb. 49: Vergleichende exemplarische Darstellung des Kurvenverlaufs der Relaxationsuntersuchung einer Schafprobe (Schaf Nr. 9, blau), einer Pferdeprobe (Pferd Nr. 7, schwarz) und einer humanen Knorpelprobe (Humanprobe Nr. 1, rot).

4.4.2.1 Relaxationsversuche lateraler dorsaler Kondylus

10 Sekunden:

Nach 10 Sekunden Relaxationszeit war bei den Kaninchenproben der geringste Kraftwert zu ermitteln. Die Spezies Hund, Schaf und Pferd zeigten ähnliche Mittelwerte. Die menschlichen Proben lieferten dagegen jedoch wesentlich höhere Mittelwerte und zeigen somit die schlechteste Relaxationsfähigkeit.

(Tab. 17).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Relaxationszeit (sec)	10				
Mittelwert (N)	7,43	8,76	8,15	8,59	11,87
Standardabweichung	0,83	1,69	1,5	1,52	1,16
95%-Konfidezintervall (N)	6,83-8,02	7,55-9,97	7,07-9,22	7,50-9,67	11,04-12,70

Tab. 17: Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 10 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N.

20 Sekunden:

Nach 20 Sekunden Relaxationszeit zeigte der Kaninchenknorpel die beste Relaxationsfähigkeit. Ähnlich gute Werte konnten bei den Spezies Schaf, Pferd und Hund gefunden werden. Die Werte der Spezies Hund und Pferd lagen geringfügig über denen der Schafe. Die Kraftwerte bei den humanen Proben waren fast doppelt so hoch wie bei den Kaninchen und zeigen damit eine nur geringe Relaxationsfähigkeit (Tab. 18).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Relaxationszeit (sec)	20				
Mittelwert (N)	5,54	6,55	5,86	6,29	10,10
Standardabweichung	0,82	1,7	1,51	1,5	1,55
95%-Konfidezintervall (N)	4,95-6,12	5,33-7,77	4,78-6,94	5,21-7,36	8,99-11,21

Tab. 18: Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 20 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N.

30 Sekunden:

Nach 30 Sekunden zeigten wiederum die Kaninchen die geringsten Kraftwerte und damit die beste Relaxationsfähigkeit. Die nachfolgenden Spezies entsprechen in aufsteigender Reihenfolge den Werten bei 30 Sekunden Relaxationszeit mit Schaf, Pferd, Hund und Mensch (Tab.19). Wiederum liegt die Relaxationsfähigkeit der menschlichen Proben deutlich unter denen der anderen untersuchten Spezies.

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Relaxationszeit (sec)	30				
Mittelwert (N)	4,64	5,44	4,75	5,09	9,05
Standardabweichung	0,81	1,57	1,43	1,38	1,71
95%-Konfidenzintervall (N)	4,06-5,22	4,31-6,56	3,72-5,77	4,11-6,08	7,83-10,27

Tab. 19: Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 30 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N.

40 Sekunden:

Nach 40 Sekunden hatten die Kaninchen erneut die größte Relaxationsfähigkeit. Im Gegensatz zu den vorherigen Messzeiten zeigten nach 40 Sekunden die Hunde geringere Kraftwerte und damit bessere Relaxationsfähigkeit als die Spezies Schaf, Pferd und Mensch. Die Menschen lieferten wiederum die höchsten Kraftwerte und somit die schlechteste Relaxationsfähigkeit (Tab. 20).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd	Mensch
Relaxationszeit (sec)	40				
Mittelwert (N)	4,08	4,12	4,37	4,75	8,10
Standardabweichung	1,31	0,79	1,25	1,47	1,79
95%-Konfidenzintervall (N)	3,14-5,01	3,55-4,68	3,47-5,26	3,70-5,80	6,81-9,38

Tab. 20: Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 40 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N.

4.4.2.2 Relaxationsversuche laterales Patellagleitlager

Am lateralen Patellagleitlager zeigten die Spezies nach allen Messzeiten eine einheitliche Reihenfolge. Die Kaninchen besaßen die beste Relaxationsfähigkeit. Etwas höhere Werte lieferten die Schafe und Hunde. Die geringste Relaxationsfähigkeit boten die Pferde mit doppelt so großen Messwerten wie die Kaninchen (Tab.21).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	10			
Mittelwert (N)	7,03	8,47	7,79	12,17
Standardabweichung	1,05	0,97	1,03	0,83
95%- Konfidenzintervall (N)	6,28-7,78	7,77-9,19	7,05-8,53	12,17- 13,36
	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	20			
Mittelwert (N)	5,02	6,03	5,44	11,09
Standardabweichung	0,98	0,88	0,97	1,17
95%- Konfidenzintervall (N)	4,32-5,73	5,4-6,66	4,75-6,14	10,25- 11,93
	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	30			
Mittelwert (N)	4,08	4,84	4,34	9,98
Standardabweichung	0,9	0,75	0,9	2,64
95%- Konfidenzintervall (N)	3,44-4,72	4,3-5,37	3,7-4,99	9,01-10,96
	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	40			
Mittelwert (N)	3,53	4,14	3,63	9,17
Standardabweichung	0,83	0,65	0,85	1,48
95%- Konfidenzintervall (N)	2,93-4,12	3,68-4,6	3,02-4,23	8,11-10,22

Tab. 21: Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft bei 10, 20, 30 und 40 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N.

4.4.2.3 Relaxationsversuche medialer Kondylus

Die Relaxationsversuche am medialen Kondylus ergaben ähnliche Ergebnisse wie die Messungen am lateralen Patellagleitlager. Die Kaninchen hatten während aller Messungen die beste Relaxationsfähigkeit, gefolgt von den Spezies Schaf und Hund. Die Pferde hatten auch hier die geringste Relaxationsfähigkeit (Tab.22).

	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	10			
Mittelwert (N)	6,56	10,27	8,7	11,98
Standardabweichung	0,83	1,19	1,43	1,52
95%- Konfidenzintervall (N)	5,97-7,15	9,42-11,13	7,67-9,72	10,9-13,07
	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	20			
Mittelwert (N)	4,68	8,04	6,38	10,24
Standardabweichung	0,74	1,35	0,44	1,86
95%- Konfidenzintervall (N)	4,16-5,21	7,07-9,0	4,38-7,38	8,89-11,59
	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	30			
Mittelwert (N)	3,88	6,78	5,19	10,24
Standardabweichung	0,61	1,35	1,3	2,06
95%- Konfidenzintervall (N)	3,44-4,32	5,81-7,74	4,26-6,12	7,72-10,66
	Kaninchen	Hund	Schaf	Pferd
Relaxationszeit (sec)	40			
Mittelwert (N)	3,38	5,96	4,48	8,37
Standardabweichung	0,6	1,31	1,22	2,03
95%- Konfidenzintervall (N)	2,96-3,82	5,02-6,9	3,6-5,35	6,92-9,82

Tab. 22: Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft bei 10, 20, 30 und 40 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N.

4.5 Histologische Untersuchungen

Beim Vergleich von hyalinem Gelenknorpel vom Menschen mit dem von Versuchstieren fallen die größten Unterschiede vor allem in der Knorpeldicke, der Höhe der einzelnen Zonen sowie der Verteilung der Alcianblaupositiven Glycosaminoglycane und der Zellzahl auf.

4.5.1 Einteilung der Knorpelzonen

Die einzelnen Knorpelzonen verhalten sich beim Mensch und den Versuchstieren unterschiedlich (Abb. 56).

Die Tangentialzone hat bei allen untersuchten Spezies einen prozentualen Anteil von ca.10-20% der totalen Knorpeldicke. Sie ist damit die einzige Zone, die bei allen Spezies einen einheitlichen Anteil besitzt.

Die Übergangszone des Menschen und des Kaninchens (Abb. 51 und 55) sind am stärksten ausgeprägt. Die Übergangszone des Menschen beträgt 40-60% und die des Kaninchens 50-60% der Knorpelhöhe. Einen nicht ganz so hohen Anteil hat die Übergangszone vom Schaf (Abb. 53) mit 40-50% und einen noch geringeren, aber ähnlichen Anteil an der Gesamtknorpeldicke hat der Hund mit 30-40% sowie das Pferd mit 20-30%.

Die Radiärzone ist beim Pferd (Abb. 52) und Hund (Abb. 54) mit jeweils 40-60% im Vergleich zu den anderen Zonen am dicksten. Die Radiärzone des Schafes beträgt 40-50%, die des Menschen 30-40% und die des Kaninchens liegt bei 20-30%. In der Radiärzone ist damit der Unterschied zwischen Mensch, Schaf, Hund und Pferd weniger groß.

Weitere Abweichungen zeigen sich in der Struktur der Mineralisierungszone, die bei Mensch und Pferd im Vergleich zu den anderen Spezies sehr dünn ist. Sie beträgt beim Menschen lediglich 1-2% und beim Pferd 5-10%. Die Mineralisierungszone beim Schaf macht 30-40% und beim Hund 20-30% aus.

Das Kaninchen weist dagegen mit 80% eine deutlich dickere Mineralisierungszone auf, die dazu noch stark mit dem subchondralen Knochen verzahnt ist (Abb. 55).

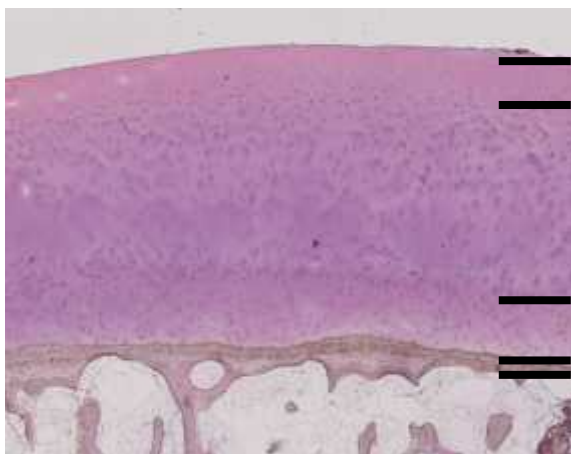


Nicht kalzifizierte
Knorpelschicht

Mineralisierungszone

Abb. 50: Vergleich von Knorpeldicke mit Mineralisierungszone, Gelenkknorpel Kaninchen (140/07) T9100 AB Originalvergrößerung x5. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

Der subchondrale Knochen ist beim Menschen im Vergleich zur Gesamtknorpeldicke sehr dünn, er beträgt ungefähr 5-10%. Der subchondrale Knochen von Pferden und Hunden ist mit ca. 20% beim Pferd und mit ungefähr 30% beim Hund etwas dicker. Das Schaf erreicht eine subchondrale Knochendicke von ca. 70%. Der subchondrale Knochen des Kaninchens ist dagegen genauso dick wie der Knorpel (Abb. 50), (Tab. 23).



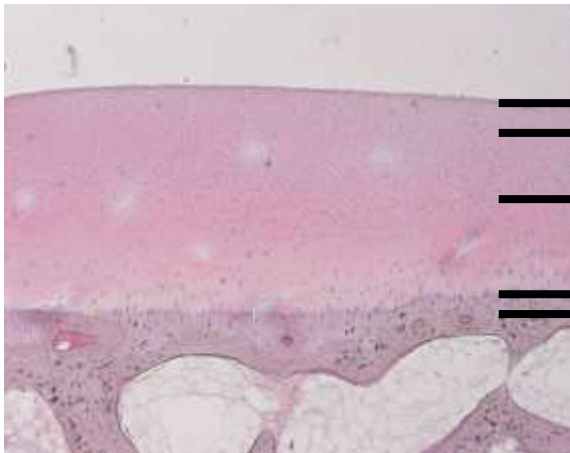
Tangentialzone 10–20%

Übergangszone 40-60%

Radiärzone 30-40%

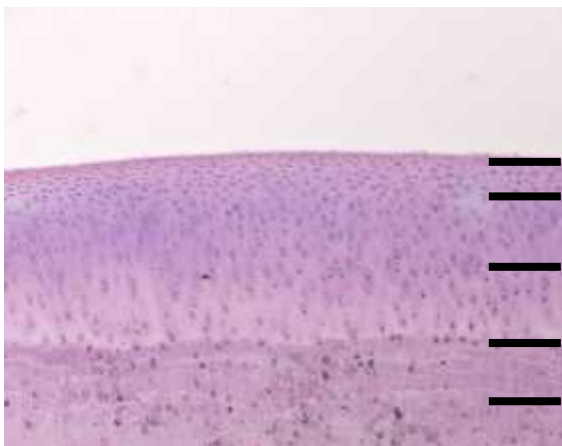
Mineralisierungszone 1-2%

Abb. 51: Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel des Menschen 178/07 T9100 HE Originalvergrößerung x2,5. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).



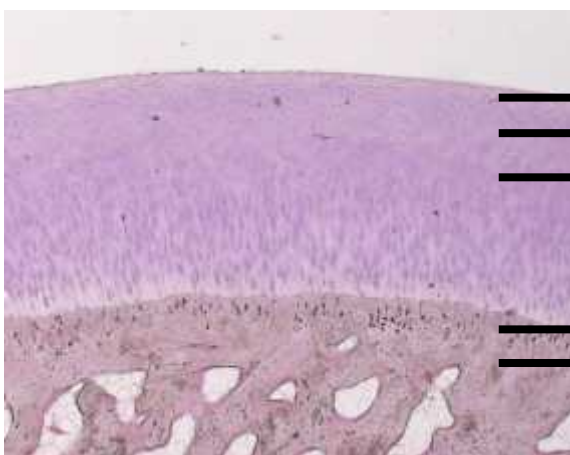
Tangentialzone 10-20%
 Übergangszone 20-30%
 Radiärzone 40-60%
 Mineralisierungszone 5-10%

Abb. 52: Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Pferd 168/07 T9100 HE
 Originalvergrößerung x5. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).



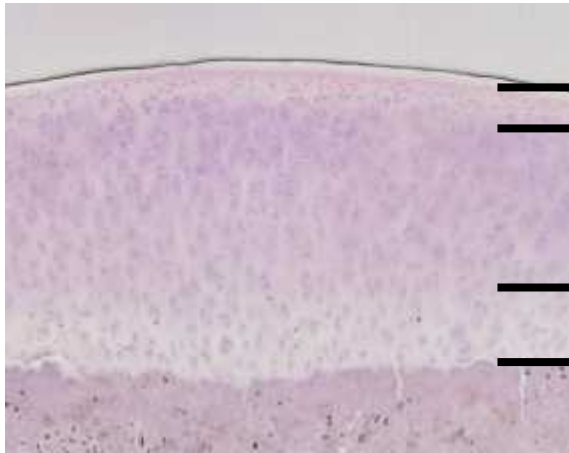
Tangentialzone 10-20%
 Übergangszone 40-50%
 Radiärzone 40-50%
 Mineralisierungszone 30-40%

Abb. 53: Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Schaf 152/07 T9100 HE
 Originalvergrößerung x10. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).



Tangentialzone 10-20%
 Übergangszone 30-40%
 Radiärzone 40-60%
 Mineralisierungszone 20-30%

Abb. 54: Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Hund 158/07 T9100 HE
 Originalvergrößerung x5. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).



Tangentialzone 10-20%

Übergangszzone 50-60%

Radiärzone 20-30%

Mineralisierungszone 80%

Abb. 55: Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Kaninchen 140/07 T9100 HE
Originalvergrößerung x10. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

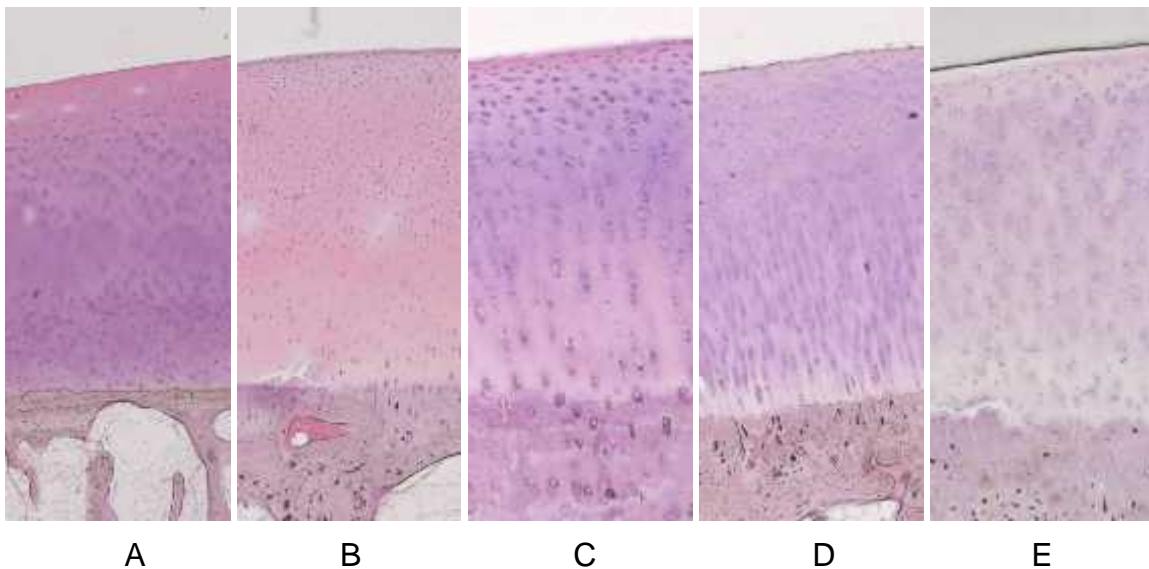


Abb. 56: Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zonenverteilung innerhalb des hyalinen Knorpels bei Mensch (A), Pferd (B), Schaf (C), Hund (D) und Kaninchen (E) (Vergrößerungen x2,5 bis x10). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

4.5.2 Verteilung der Alcianblau-positiven-Glycosaminoglycane

Ein Vergleich der Verteilung von Alcianblau-positiven-Glycosaminoglycanen bei ausgewachsenen Tieren der unterschiedlichen Spezies zeigt deutliche Unterschiede auf. Bei Mensch und Hund liegen die Glycosaminoglycane mehrheitlich in der Übergangszzone. Beim Pferd dagegen ist die Tangentialzone am stärksten angefärbt und

die Intensität der Färbung nimmt im Bereich der Übergangszone von apikal nach basal immer stärker ab. Bei ausgewachsenen Kaninchen und Schafen dagegen liegen die Alcianblau positiven Glycosaminoglycane relativ gleichmäßig über alle Knorpelzonen verteilt (Abb. 57).

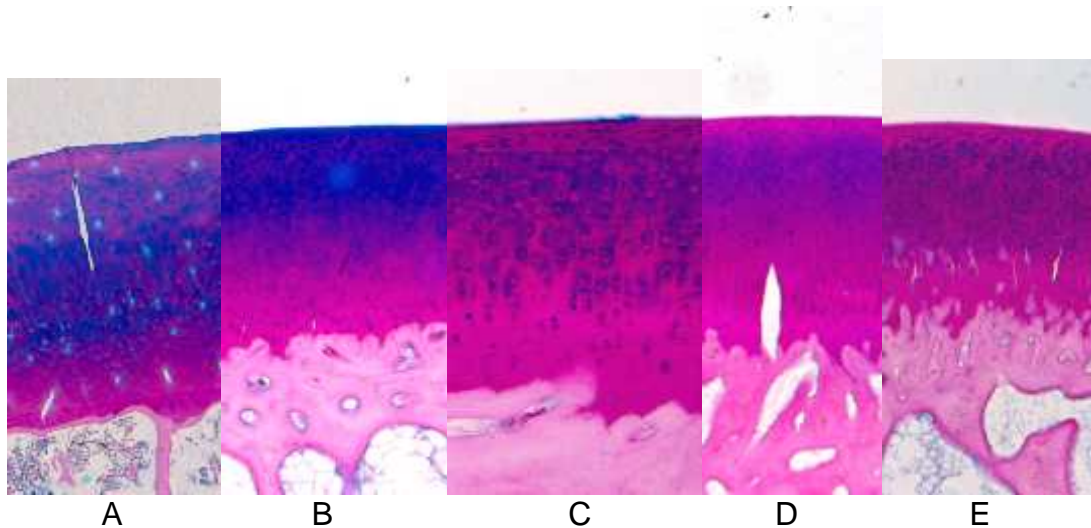


Abb. 57: Vergleichende Darstellung der Glucosaminoglykan-Verteilung innerhalb des hyalinen Knorpels bei Mensch (A), Pferd (B), Schaf (C), Hund (D) und Kaninchen (E) (T9100, Vergrößerungen x2,5 bis x10). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

4.5.3 Struktur und Verteilung der Chondrozyten

Beim Vergleich der Struktur und der Verteilung der Chondrozyten bei ausgewachsenen Menschen und den Versuchstieren stellt man keine relevanten Unterschiede fest.

Die Zellen der Tangentialzone bestehen bei fast allen Spezies überwiegend aus flachen spindelförmigen oder ellipsoiden Chondrozyten (Abb. 58), die von einem Netzwerk aus feinen Kollagenfibrillen umgeben sind. Bei Hunden ist jedoch eine eher rundliche Form der Chondrozyten zu erkennen (Abb. 59).

In der Übergangszone sind die Zellen eher sphärisch geformt und zeigen bei allen Spezies außer beim Schaf den größten Durchmesser. Ausgewachsene Schafe dagegen zeigen in der Radiärzone die größeren Zellen (Abb. 60).

Kaninchen weisen im Vergleich zum Menschen eine gleichmäßigere Verteilung der Chondrozyten (Abb. 61) über alle Knorpelzonen auf. Bedingt dadurch ergibt sich eine vergleichsweise hohe Gesamtzellzahl der Chondrozyten im Vergleich zur extrazellulären Matrix bei dieser Spezies.

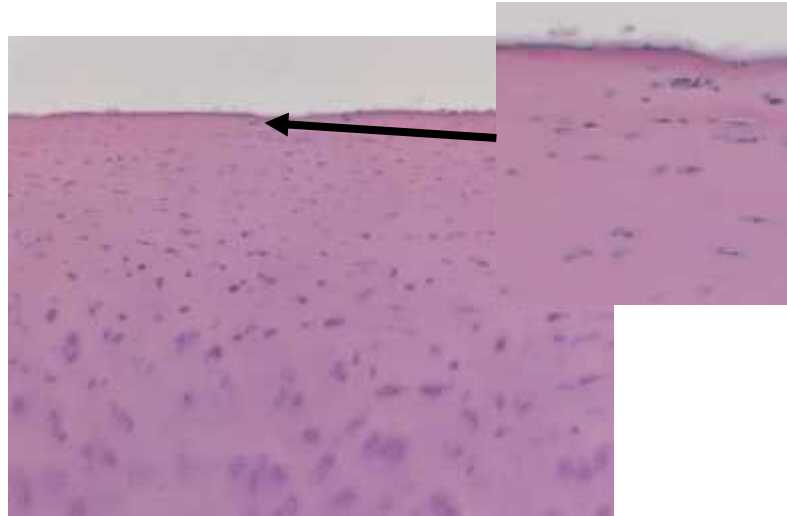


Abb. 58: HE Färbung T9100, zeigt einen Ausschnitt aus der Tangentialzone vom Menschen. Der Pfeil markiert einen ellipsoiden Chondrozyten. Originalvergrößerung x10. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

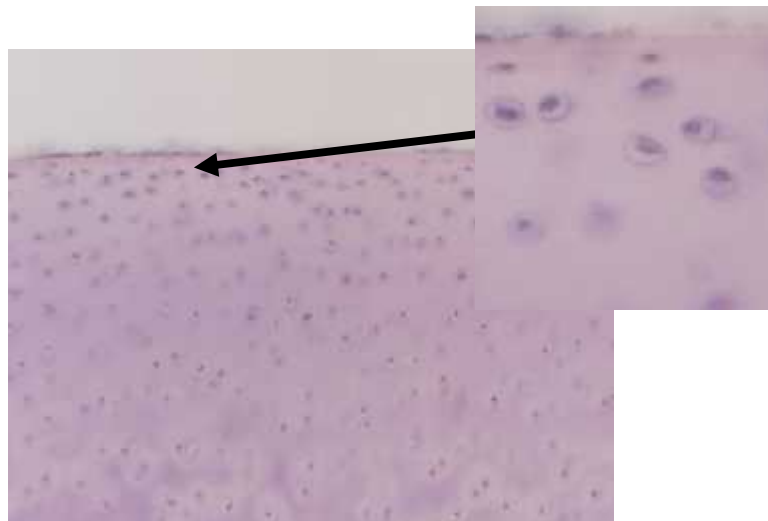


Abb. 59: HE Färbung T9100, zeigt einen Ausschnitt aus der Tangentialzone vom Hund. Der Pfeil markiert einen rundlich geformten Chondrozyten. Originalvergrößerung x20. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

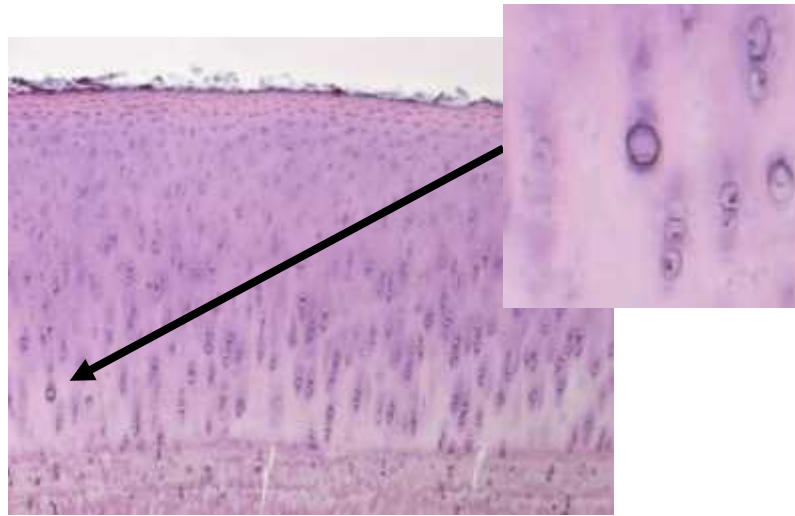


Abb. 60: HE Färbung T9100. Das Schaf hat in der Radiärzone die größten Zellen.(Pfeil)
 Originalvergrößerung x10. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

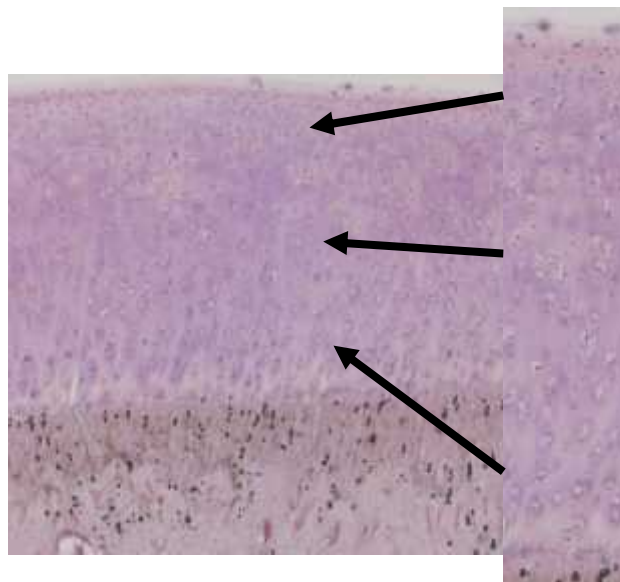


Abb. 61: HE Färbung T9100. Darstellung der gleichmäßigen Chondrozytenverteilung beim Kaninchen
 Originalvergrößerung x10. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

4.5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe des REM und dessen hoch aufgelöster Tiefenschärfe lassen sich die extrazellulären Fasern in den verschiedenen Knorpelabschnitten besonders gut beurteilen.

Der Verlauf der Kollagenfibrillen ist bei allen Spezies identisch. Die vertikale Ausrichtung der Kollagenfibrillen beginnt am Übergang zwischen subchondralem Knochen und Mineralisierungszone und bleibt in der Mineralisierungszone und in der Radiärzone erhalten. (Abb. 62-66).

Erst in der Übergangszone beginnen die Fibrillen sich zu winden und nehmen schließlich in der Tangentialzone eine tangentiale Ausrichtung an. Die Architektur der Kollagenfibrillen ist im interterritorialen Matrixabschnitt relativ unorganisiert.

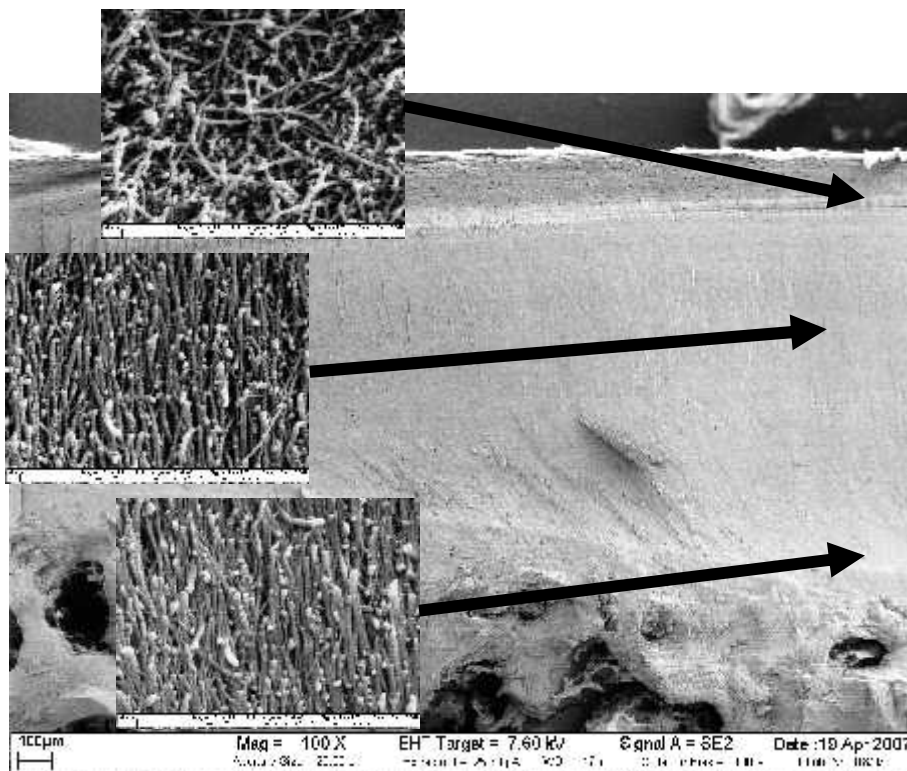


Abb. 62: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Pferdeknorpels. Die Detailaufnahmen zeigen die jeweilige Anordnung der Kollagenfibrillen in der Tangentialzone sowie in der oberflächlichen und der tiefen Radiärzone (x100). . (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

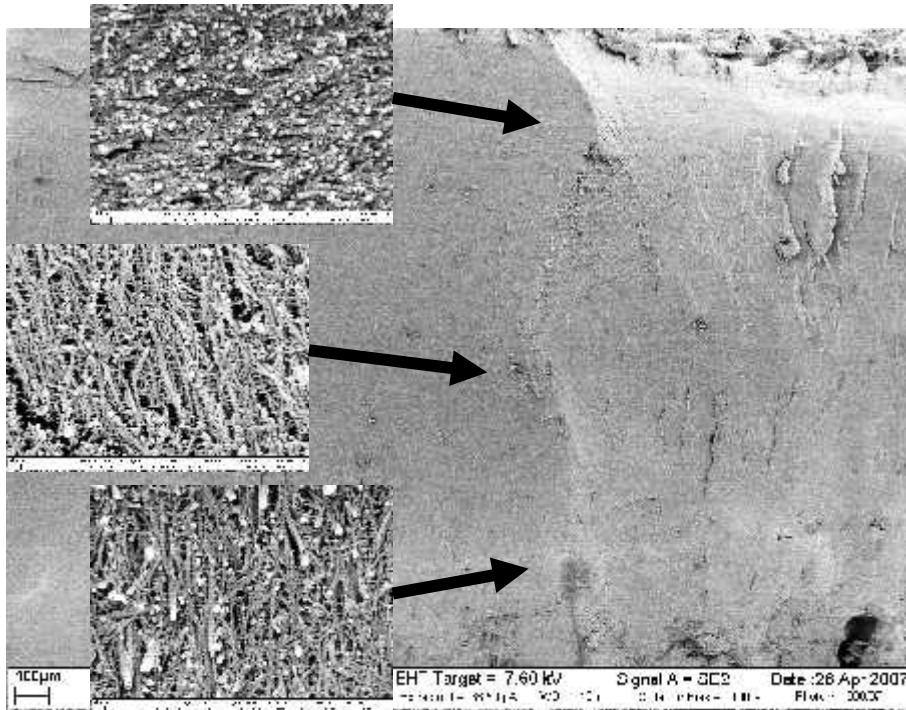


Abb. 63: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen menschlichen Knorpels. Die Detailaufnahmen zeigen die jeweilige Anordnung der Kollagenfibrillen in der Tangentialzone sowie in der oberflächlichen und der tiefen Radiärzone (x100). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

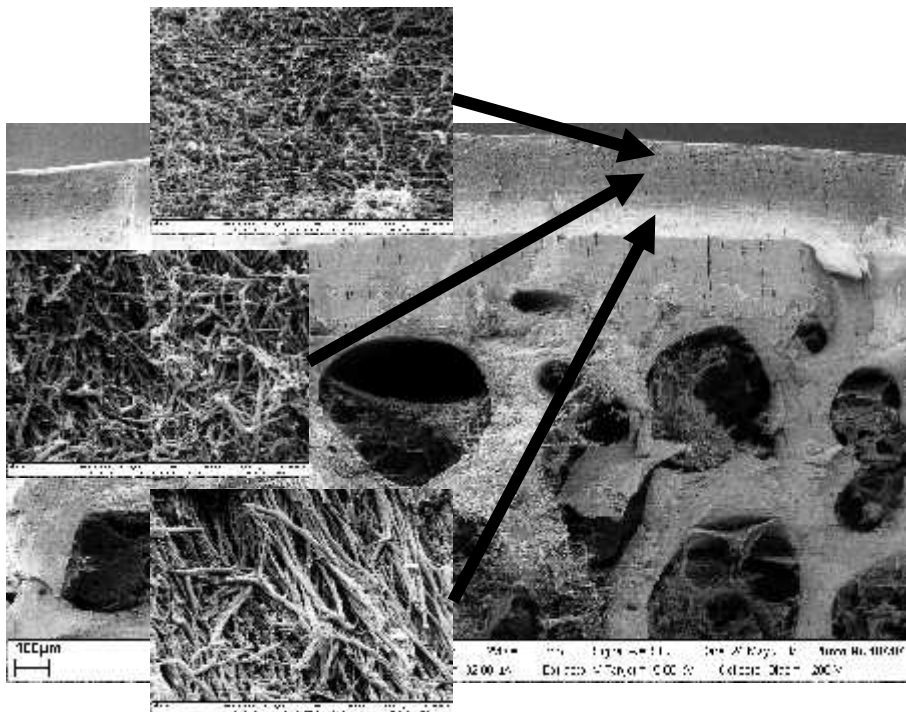


Abb. 64: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Schafknorpels. Die Detailaufnahmen zeigen die jeweilige Anordnung der Kollagenfibrillen in der Tangentialzone sowie in der oberflächlichen und der tiefen Radiärzone (x100). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen)

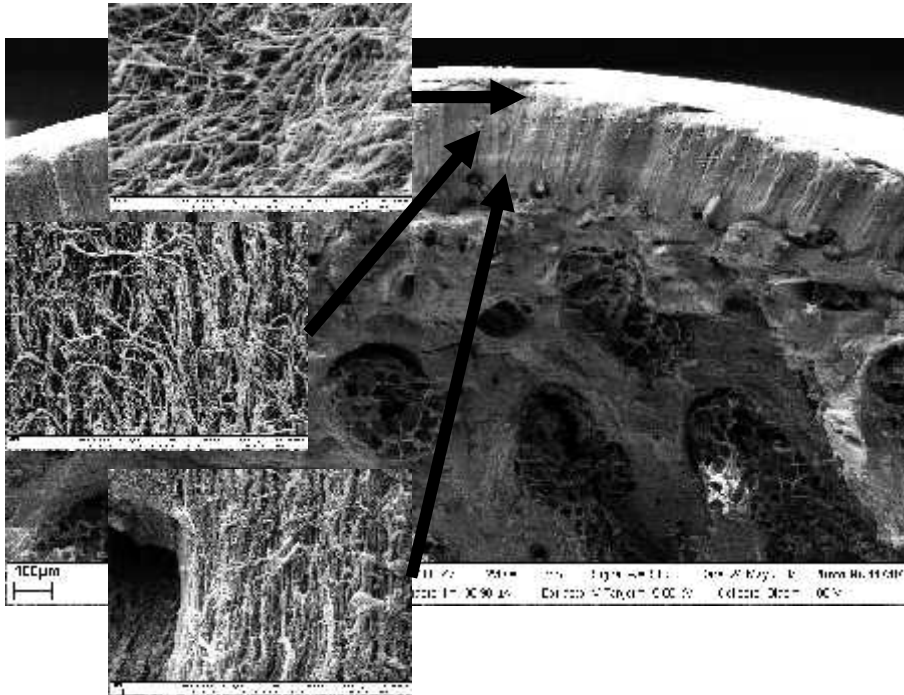


Abb. 65: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Kaninchenknorpels. Die Detailaufnahmen zeigen die jeweilige Anordnung der Kollagenfibrillen in der Tangentialzone sowie in der oberflächlichen und der tiefen Radiärzone (x100). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

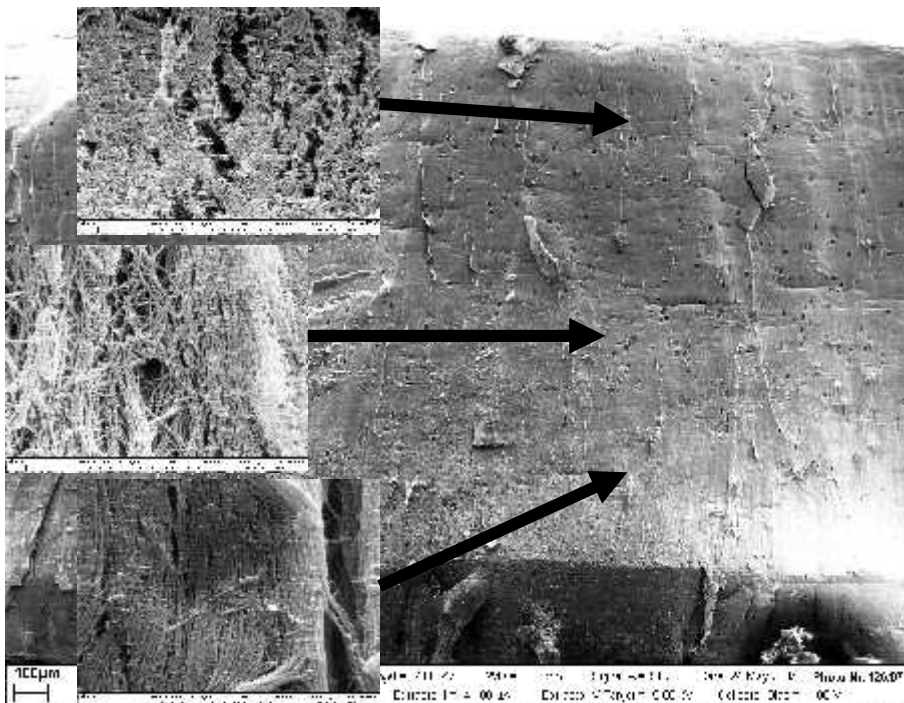


Abb. 66: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Hundeknorpels. Die Detailaufnahmen zeigen die jeweilige Anordnung der Kollagenfibrillen in der Tangentialzone sowie in der oberflächlichen und der tiefen Radiärzone (x100). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

Die Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Chondrozyten zeigt in Abb. 67 den Übergang von Tangential- zu Übergangszone. Hier sind die unterschiedlichen Ausrichtungen der Chondrozyten zu erkennen. In der Tangentialzone ist die Ausrichtung der Chondrozyten eher horizontal. Sie besitzen eine diskoide Form. In der Übergangszone ist die Form eher spährisch.

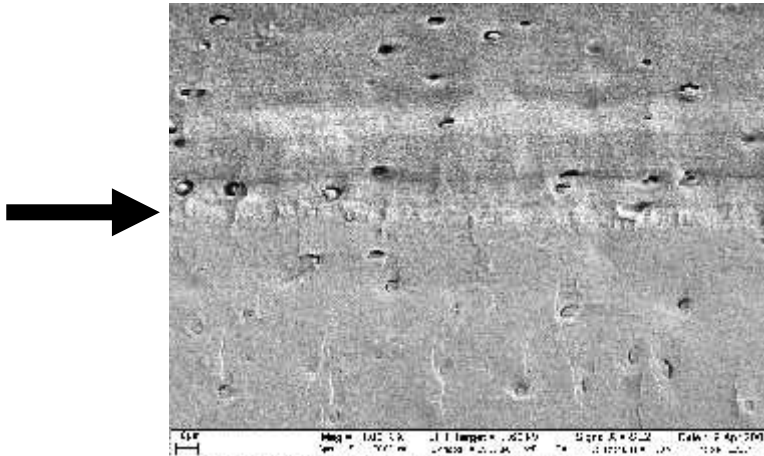


Abb. 67: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom Pferdeknorpel. Übersicht und Darstellung des Überganges von Tangentialzone zu Übergangszone (x1,00K.). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

In der Radiärzone ist die Ausrichtung eher vertikal (Abb. 68), die Chondrozyten gruppieren sich zu Chondronen, die säulenförmige Anordnungen zeigen.

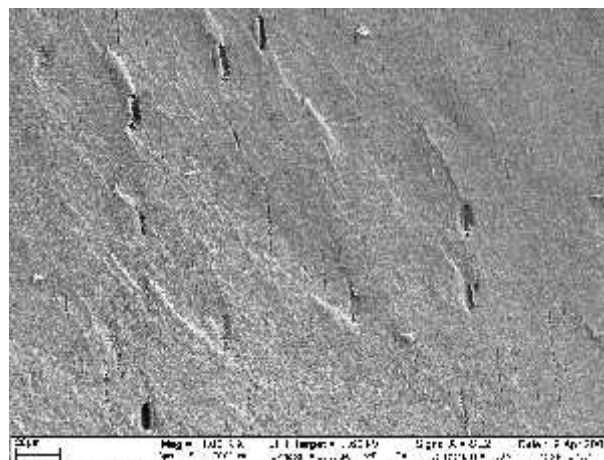


Abb. 68: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom Pferdeknorpel. Ausschnitt aus der Radiärzone (x1,00K.). (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

5. Diskussion

Einleitung

Diese experimentelle Arbeit befasst sich mit der Frage nach dem optimalen Tiermodell für die Erforschung des Gelenkknorpels. Die Knorpelforschung ist hinsichtlich der Prävalenz und deutlichen Beeinträchtigung der Patienten mit Knorpelschäden ein wichtiges Forschungsfeld.

Knorpeldegenerative Prozesse beruhen auf einer Störung des cartilaginären Stoffwechselgleichgewichts (Homöostase) [Malemud und Goldberg 1999]. Doch auch bei traumatischen Ereignissen können ähnliche Reaktionen des Knorpels in Form des Knorpelabbaus wie z.B. bei der Osteoarthritis auftreten. Gerade bei jungen Patienten kommt es öfters bei Sportverletzungen zur direkten Schädigung des Knorpels. Vor allem in den Hauptbelastungszonen von Knie- und Sprunggelenk sind sehr häufig große isolierte Knorpeldefekte zu finden.

Das gesunde Synovialgelenk befindet sich normalerweise in einem Gleichgewichtszustand. Dabei wird die Hyaluronsäure im Gelenkspalt fortlaufend ersetzt, damit ihre Konzentration und das Molekulargewichtprofil konstant bleiben. Bei der Arthrose ist diese Homöostase jedoch gestört. Es kommt zu einer Depolymerisierung der Hyaluronsäure. Dadurch wird die Viskosität der Synovialflüssigkeit stark erniedrigt. Dies hat zur Folge, dass sich die schmierende und stoßdämpfende Eigenschaft der Synovialflüssigkeit vermindert und ihre Molekularfiltereigenschaften deutlich verschlechtert. Die hyaluronsäurereiche Schutzschicht der Knorpeloberfläche löst sich auf. Dadurch sind die Knorpeloberfläche und die Synovialmembran verstärkt mechanischen und entzündlichen Einflüssen ausgesetzt. Die Synovialmembran entzündet sich. Als Folge wird sie durchlässig für Entzündungsmoleküle, welche in das Gelenk eindringen können.

Die Zerstörung des Gelenkknorpels erfolgt überwiegend durch den Abbau von extrazellulären Matrix-Molekülen, wie der Proteoglykane und Kollagene, die für die Aufrechterhaltung des physiologischen und funktionsfähigen Zustands von Gelenkknorpel verantwortlich sind.

Die gestörte Homöostase des Synovialgelenkes führt dann zu einem übermäßigen Gewebeabbau. Wird in Folge dieses Prozesses der Kollagen- und Proteoglykanverbund zerstört, kommt es zu Gewebequellungen und damit zu irreparablen Schäden des Knorpels bis hin zur sogenannten Glatzenbildung der Gelenkoberfläche. Der Gelenkknorpel wird schrittweise abgebaut.

Wenn das Stoffwechselgleichgewicht nicht wieder hergestellt wird, resultiert hieraus nach nur wenigen Jahren eine Arthrose des betroffenen Gelenkes mit dem klinischen Bild einer Belastungsschmerzhaftigkeit und einer Bewegungsstörung. Langwierige kostenintensive Behandlungsmaßnahmen sind die Folge, wie z. B. die Notwendigkeit der Implantation eines künstlichen Kniegelenkes, die hiermit verbundene Arbeitsunfähigkeit und Invalidität [Von der Mark und Gluckert 1990, Dieppe 1995].

Die Therapiemöglichkeiten bei durch Arthrose geschädigten Gelenken sind immer noch sehr unzureichend. Die Behandlung besteht meistens darin, die Schmerzen, die durch die Arthrose entstehen, analgetisch und antiphlogistisch zu behandeln.

Bei kleinen Knorpeldefekten kommen arthroskopische Verfahren mit Knorpelglättung und ggf. neue Verfahren wie die autologe Chondrozytentransplantation mit Mikrotransplantationen von herangezüchtetem Knorpelgewebe auf unterschiedlichen Trägermaterialien zum Einsatz. Der Erfolg dieser Behandlungen hält sich jedoch in Grenzen, so dass eine fortgeschrittene, schmerzhaft Arthrose sehr häufig die Indikation einer Gelenkendoprothese nach sich zieht.

Um in dem Bereich der neueren arthroskopischen Verfahren bessere Ergebnisse liefern zu können, ist man in der Knorpelforschung auf Tiermodelle angewiesen.

Eine der Hauptfragestellungen ist, ob und unter welchen Voraussetzungen es möglich ist, hyalinen Knorpel operativ wieder herzustellen. Da diese Versuche nicht am Menschen durchführbar sind, gibt es im Bereich der Knorpelforschung eine weite Spanne verschiedener Tiermodelle. Diese werden vor allem dazu verwendet, die unterschiedlichen Behandlungsmethoden zur Behebung von Knorpelschäden zu validieren und sie weiter zu entwickeln. Hierzu sind Tiermodelle erforderlich, anhand derer spezielle klinische Aspekte so gut wie möglich reproduzierbar sind [Solchaga 2001, Chu et al. 2010].

Aufgrund physiologischer, biomechanischer und anatomischer Unterschiede ist jedoch für die wissenschaftliche Erforschung der Behandlung von Knorpelschäden kein Tiermodell direkt auf den Menschen übertragbar.

Jedes Modell hat spezifische Vor- und Nachteile, welche bei der Wahl des Versuchstieres berücksichtigt werden müssen und welche in unserer Arbeit herausgehoben werden.

Um die Arbeit übersichtlicher und damit aussagekräftiger zu gestalten, beschränkten wir uns in unserer Arbeit auf diejenigen Spezies, die bereits in vorherigen Studien verwendet wurden und aktuell in der Knorpelforschung benutzt werden. Es finden sich beispielsweise Untersuchungen an Kaninchen [Gomar-Sancho und Orguin 1987, Brenner et al. 2014, Jing et al. 2014], Hunden [Breinan et al. 2000, Duan et al. 2013], Schafen [Jubel et al. 2008, Schleicher et al. 2013] oder auch Pferden [Litzke et al. 2004, Nixon et al. 2011, Malda et al. 2012].

Knorpeldicke

Das ideale Tiermodell sollte zur besseren Vergleichbarkeit mit humanem Knorpel eine ähnliche Knorpeldicke aufweisen. Daher verglichen wir in unserer Studie die Knorpeldicken am lateralen dorsalen Femurkondylus von Kaninchen, Hunden, Schafen und Pferden mit der des Menschen. Der Mensch zeigt dabei die höchste Knorpeldicke. In Prozentwerten umgerechnet kommt das Pferd mit einer Knorpeldicke von 76,5% der des humanen Präparates (100%) am nächsten, während Hund (30,4%), Schaf (26,3%) und Kaninchen (18,0%) eine deutlich geringere Gelenkknorpelhöhe des dorsalen Femurkondylus aufweisen. Die Spezies mit hoher Knorpeldicke haben vor allem bei der Durchführung von operativen Techniken, wie zum Beispiel der autologen Chondrozytentransplantation, entscheidende Vorteile, da die Implantate ähnliche Dimensionen besitzen [Malda et al. 2012].

Chondrozytenzählung und Knorpelzonen

Des Weiteren bestimmten wir die Anzahl der Chondrozyten in den unterschiedlichen Knorpelzonen der jeweiligen Spezies, um die Unterschiede im Aufbau und der Struktur der verschiedenen Spezies aufzuzeigen.

Die Anzahl der Chondrozyten ist relevant, da sie die extrazelluläre Matrix synthetisieren, welche sich aus Gewebeflüssigkeit und Makromolekülen wie Kollagen, [Eyre et al. 2002, Garnero et al. 2000] vor allem dem knorpelspezifischen Kollagen Typ II, aber auch Typ IX, XI, XXVII, Proteoglycanen (v.a. Aggrecan), sowie Biglycan, Decorin, Fibromodulin und COMP (cartilage oligomeric matrix protein) [Goldring und Marcu 2009, Harrison et al. 2000] zusammensetzt. Dank dem Zusammenspiel der Matrixkomponenten ist hyaliner Knorpel trotz seiner festen Konsistenz durch Druck verformbar und kehrt nach Entlastung in seine ursprüngliche Form zurück.

Diese Eigenschaft wird als Druckelastizität bezeichnet und wurde in unserer Arbeit durch die Relaxationsversuche aufgezeigt.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der Chondrozytenzählung in der Übergangs- und Radiärzone des lateralen dorsalen Femurkondylus, dass der Mensch im Vergleich zu den anderen Spezies eine nur geringe Chondrozytenzahl aufweist. Alle anderen Spezies haben deutlich höhere Chondrozytenzahlen.

Diese Eigenschaft scheint auch die deutlich geringere Relaxationsfähigkeit der menschlichen Proben gegenüber den Spezies Kaninchen, Hund, Schaf und Pferd zu erklären. Ob die divergierenden Chondrozytenzahlen auf die unterschiedlichen Belastungen im Rahmen der verschiedenen Fortbewegungsmuster der jeweiligen Spezies zurückzuführen ist, wäre Inhalt weiterer Forschungen.

Ein weiterer Grund für die geringe Anzahl von Chondrozyten bei den in unserer Arbeit untersuchten menschlichen Proben könnte ihre Herkunft sein. Diese wurden aus Operationspräparaten gewonnen, bei denen meist älteren Patienten aufgrund einer fortgeschrittenen Arthrose eine Knie- Endoprothese implantiert wurde. Dies bedeutet, dass der untersuchte menschliche Knorpel bereits durch Alterungsprozesse geschädigt war.

Im klinischen Alltag wird es jedoch kaum möglich sein, Proben gesunden menschlichen Knorpels für die Forschung zu gewinnen. Um genaue Ergebnisse zu liefern, müsste man Knorpelproben aus präparierten Leichen, die sich der Forschung zur Verfügung gestellt haben, entnehmen. Diese sind jedoch in Formalin eingebettet, was wiederum nicht dem lebenden Präparat entspricht.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und der Chondrozytenzählung zeigen, dass auch der Aufbau und die Struktur des Knorpels zwischen den untersuchten Spezies deutliche Unterschiede aufweist. Dies lässt sich ebenfalls auf die unterschiedlichen Belastungsmuster im Rahmen der Fortbewegung zurückführen, da sich Knorpelgewebe auf mechanische Stimuli wie z.B. Kompression oder Scherung aufgrund seiner biomechanischen Eigenschaften der Reibungsverringering, Lastabsorbtion und Lastenverteilung hin verändert. [Eckstein et al. 2005, Nebelung et al. 2011].

Dass eine mechanische Belastung von den Chondrozyten nicht nur toleriert wird, sondern sogar auf deren Stoffwechsel und Synthese einwirkt, zeigten bereits Anfang der 1990er Jahre mehrere in vivo Versuche [Urban 1994]. So konnte an immobilisierten Hasen beobachtet werden, dass die Synthese von Proteoglycanen reduziert wird, wenn das Knorpelgewebe keiner mechanischen Stimulation unterliegt.

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung die metabolische Aktivität [Guilak et al. 1999], Proliferation und Syntheseleistung der Chondrozyten sowie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinflussen kann [Elder et al. 2009, Nebelung et al. 2011].

Interessanterweise zeigt eine kürzlich veröffentlichte Studie [Pedersen et al. 2013], dass es auch bei normaler Belastungssituation im jeweiligen Knorpel der Spezies Kaninchen, Schwein und Mensch zu Unterschieden in der Knorpeldicke und Zellzahl kommen kann. Auch dies sollte bei weiteren Studien in Betracht gezogen und gegebenenfalls anhand vorheriger histologischer digitaler Bildgebung die exakt zu vergleichende Stelle aufgezeigt werden.

Unterschiede zeigen sich ebenfalls bei der Bestimmung der einzelnen Knorpelzonen. Die Zonen des Knorpels sind beim Mensch und den Versuchstieren unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Tangentialzone hat jedoch bei allen Spezies einen einheitlichen Anteil von ca. 10-20%.

Die Chondrozyten dieser Zone werden von einem gut ausgebildeten Maschenwerk aus relativ dünnen, tangential angeordneten, parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen umgeben [Buckwalter et al.1998, Vanderploeg et al. 2008, Wu et al. 2008, Goldring et al. 2012].

Diesem Kollagennetzwerk hat die tangentielle Zone die innerhalb der vier Zonen am besten entwickelte Zugfestigkeit zu verdanken, durch deren Hilfe sie besonders geeignet ist, den während der Gelenkbewegung einwirkenden Zug-, Scher- und Druckkräften standzuhalten. Mit ihrem hohen Wasseranteil von bis zu 80% und ihrer geringen Permeabilität hat diese Zone zudem große Bedeutung für die Kontrolle des Flüssigkeitsaustausches. [Buckwalter et al. 1998, Höchsmann et al. 2013].

Da diese Zone bei allen Spezies den prozentual gleichen Anteil besitzt, scheint sie wenig Relevanz hinsichtlich der Kompressions- und Relaxationsfähigkeit des Gesamtknorpels zu haben, obwohl sie der Gelenkfläche am nächsten ist. Sie scheint vor allem für die Ernährung des Knorpels eine Rolle zu spielen. Bei der Auswahl des optimalen Tiermodells scheint diese Zone wenig Bedeutung zu besitzen.

Die Übergangs- und Radiärzonen stellen bei allen Spezies den größten Anteil am Knorpel dar. Interessant ist jedoch, dass es auch hier wieder Unterschiede im Aufbau des Knorpels zwischen den einzelnen Spezies gibt.

In der Übergangszone, die beim Menschen und dem Kaninchen den größten Anteil der Knorpeldicke besitzt, zeigt sich das typische Bild des hyalinen Gelenkknorpels. Hier befinden sich aktive Chondrozyten, eingelagertes Fett und Glykogen, weniger Kollagen, jedoch viele Proteoglykane. Aufgrund der Zusammensetzung der Matrix dieser Zone weist sie eine verminderte Widerstandskraft gegenüber Zug- und Scherbewegungen auf, während sie Druckkräften besser standhält. [Buckwalter et al. 1998, Goldring et al. 2012, Höchsmann et al. 2013].

Bei Pferden und Hunden hingegen ist die Radiärzone, die Zone mit dem höchsten Proteoglykangehalt, am ausgeprägtesten. Es finden sich weniger Chondrozyten als in der Übergangszone und wenige, jedoch dicke Kollagenfibrillen, die von der Oberfläche zu den tiefen Anteilen der Radiärzone abnehmen. Dies bedingt eine hohe Zugfestigkeit an der Oberfläche, in den tiefen Anteilen aber auch eine starke Drucksteifigkeit.

Diese Unterschiede im Knorpelaufbau bedingen jedoch die Eigenschaften des jeweiligen Knorpels und sind daher nur schwer untereinander vergleichbar. Anscheinend ist die Anzahl der Chondrozyten für die Knorpel­eigenschaften nicht

alleine entscheidend, eher die Anordnung der Kollagenfibrillen und der Proteoglykane. [Buckwalter et al. 1998, Goldring et al. 2012, Höchsmann et al. 2013].

Weitere Abweichungen zeigen sich in der Struktur der Mineralisierungszone, die bei Mensch und Pferd im Vergleich zu den anderen Spezies eher dünn ist. Das Kaninchen weist dagegen eine recht dicke Mineralisierungszone auf, die dazu noch stark mit dem subchondralen Knochen verzahnt ist. Aufgrund der exponierten Lage direkt oberhalb des subchondralen Knochengewebes besitzt diese mineralisierte Zone eine Pufferfunktion mit mittlerer mechanischer Festigkeit [Buckwalter et al. 1998].

Die Ergebnisse der Knorpelzoneneinteilung zeigen deutlich, dass der strukturelle Knorpelaufbau jeder Spezies unterschiedlich ist und wahrscheinlich stark von der Belastungs- und Bewegungsweise der jeweiligen Spezies abhängig ist. Bedingt hierdurch zeigen die verschiedenen Spezies bei unseren Versuchen teils gänzlich unterschiedliches Verhalten bei den Kompressions- bzw. Relaxationsversuchen.

Dies zeigt die große Problematik bei der Suche nach dem optimalen Tiermodell für die Knorpelforschung.

Der Aufbau des Knorpels scheint bei der Suche nach dem optimalen Tiermodell jedoch nicht allein der ausschlaggebende Aspekt zu sein.

Wichtiger erscheinen uns die Untersuchungen und Vergleiche der Kompressions- und Relaxationsfähigkeit der Knorpelproben der einzelnen Spezies, die in unserer Arbeit jedoch nicht mit der prozentualen Aufteilung der unterschiedlichen Zonen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Höchstwahrscheinlich spielt hier eine multifaktorielle Genese der Kompressions- und Relaxationsfähigkeit (Aufbau des Knorpels, Dicke des Knorpels, Zellzahl, Belastungszonen, Proteoglykangehalt) der einzelnen Spezies eine große Rolle, die es durchaus noch weiter zu untersuchen gilt.

Im Hinblick auf die Komplexität dieser Problematik stellt sich die Frage, ob bei weiteren Tiermodellen zunächst durch histologische Untersuchungen und digitale Bildgebung in Vorversuchen die optimalen Stellen im Knorpel der dafür geeigneten Spezies für die jeweilige Fragestellung gefunden werden können [Pedersen et al. 2013].

Je nach Fragestellung und Testablauf wird es daher Unterschiede im optimalen Tiermodell geben, jedoch zeigt sich bei unseren Testungen hinsichtlich Aufbau, Kompressions- und Relaxationsverhalten, dass Hunde und Pferde den menschlichen Proben am nächsten kommen.

Bei der Auswahl jeglicher Spezies sind die Unterschiede der einzelnen Rassen (z.B. zwischen Dackel und Bernhardiner) und der damit verbundenen Größe der Tiere ebenfalls ausschlaggebend. Wenn ein entsprechendes Tiermodell ausgewählt wird, sollte darauf geachtet werden, dass die untersuchten Tiere möglichst einer Rasse angehören und ähnlich in Alter und Größe sind [Chu et al. 2010, Proffen et al. 2012, Xye et al.2013].

Hunziker et al. bestätigt 1992, dass beträchtliche Unterschiede in der Struktur des Knorpels bestehen. Er zeigte auf, dass nicht nur die Knorpeldicke und das unterschiedliches Regenerationsverhalten auf „Full thickness defects“ bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich ist, sondern dass teilweise auch erhebliche Differenzen in der Knorpelstruktur bestehen. So sind die Zelldichte und auch der schichtweise Aufbau des Knorpels gemäß der unterschiedlichen biomechanischen Belastung für die einzelnen Spezies charakteristisch, so dass auch Diffusions- und Nutritionsverhältnisse nicht vergleichbar sind. Während ein Chondrozyt eines ausgewachsenen Kaninchen in der mittleren radialen Zone ein metabolisches Umfeld von $30.000\mu\text{m}^3$ hat, so umfasst es beim erwachsenen Menschen ein Volumen von $180.000\mu\text{m}^3$ [Hunziker 1992]. Dies bestätigen auch unsere Daten zu den Zellzahlen, wo der menschliche Knorpel eine deutlich geringere Chondrozytenzahl aufweist als alle anderen getesteten Spezies. Durch die geringe Zellzahl scheint der menschliche Knorpel ein Regenerationsdefizit zu anderen Spezies aufzuweisen.

Deutlich geringer sind die Unterschiede zwischen der Chondrozytengröße, den Zell-Phänotypen und der extrazellulären Matrix verschiedener Spezies [Hunziker 1999].

Es war uns aufgrund der begrenzten Anzahl und schwierigen Beschaffung der Hundeproben allerdings nicht möglich, auf die oben genannte Problematik der unterschiedlichen Größe und Alter der Versuchstiere einzugehen. Daher zeigen die Hundeproben in unserer Studie keine homogenen Ergebnisse. Dies gestaltete sich bei den anderen Spezies einfacher. Es gibt jedoch aktuelle Studien, die sich auf eine Hunderasse beschränken und damit eine geringere Divergenz der Ergebnisse haben [Duan et al. 2013].

Verteilung von alcianblaupositiven Glycosaminoglycanen

Um weitere Informationen über die Struktur und die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels der getesteten Spezies zu bekommen, bestimmten wir die Verteilung von alcianblaupositiven Glycosaminoglycanen. Glycosaminoglykane bilden das Gerüst faserbildender Stoffe und besitzen durch ihre Fähigkeit, Wasser aufzunehmen eine hohe Elastizität. Die Verteilung der Glycosaminoglycane gibt damit einen Hinweis auf die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels. Der Vergleich der Verteilung von alcianblaupositiven Glycosaminoglycanen bei ausgewachsenen Tieren der unterschiedlichen Spezies zeigt deutliche Unterschiede auf. Bei Mensch und Hund liegen die alcianblaupositiven Glycosaminoglycane hauptsächlich in der Übergangszone.

Beim Pferd dagegen ist die Tangentialzone am stärksten angefärbt und die Intensität der Färbung nimmt im Bereich der Übergangszone von apikal nach basal immer stärker ab. Bei ausgewachsenen Kaninchen und Schafen dagegen liegen die alcianblaupositiven Glycosaminoglycane relativ gleichmäßig über alle Knorpelzonen verteilt.

Bezüglich der Verteilung von alcianblaupositiven Glycosaminoglycanen und damit verbundenen biomechanischen Eigenschaften zeigt damit das Hundemodell im Vergleich zum Mensch die größte Ähnlichkeit.

Dies bestätigten auch unsere Kompressionsversuche, hierbei reagierte sowohl der Hundeknorpel als auch Pferdekknorpel dem humanen Knorpel am ähnlichsten.

Biomechanische Messungen

Um die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels der verschiedenen Spezies zu testen, erstellten wir mit fachlicher und apparativer Unterstützung des Instituts für Werkstofftechnik der Universität Siegen eine eigene Messvorrichtung.

Bevor wir jedoch mit den eigentlichen Testungen beginnen konnten, mussten wir umfangreiche Testläufe durchführen. Ziel der Vorversuche war es, eine Möglichkeit zu finden, die Knorpelproben sowohl auf ihr Kompressions-, als auch auf ihr Relaxationsverhalten zu testen. Die ersten Probetestungen dienten der Überprüfung der Versuchsanordnung für die geplante Knorpeltestung, der Feststellung der notwendigen Probendicke und der Praktikabilität der Halterung. Im Anschluss wurden unterschiedliche Eindringgeschwindigkeiten ausgetestet. Um das Kriechverhalten des

Knorpels zu testen (Relaxationsfähigkeit), wurde die Kugel relativ schnell auf eine definierte Tiefe eingefahren und anschließend die Abnahme der auf sie einwirkenden Kraft erfasst.

Bereits bei den Vorversuchen zeigte sich die Schwierigkeit der Handhabung der teils sehr kleinen Kaninchenknorpelproben.

Kompressionsversuche

Unsere Kompressionsversuche am lateralen dorsalen Kondylus wurden an den Spezies Kaninchen, Hund, Pferd und Mensch durchgeführt. Diese zeigen, dass der Pferde- und auch der Hundeknorpel bei Kompressionsversuchen ähnlich reagieren wie der humane Knorpel. Je höher der Druck wurde, desto mehr Unterschied zeigte sich zwischen den Menschen- und Pferdeproben. Die Proben der Pferde brauchten deutlich höhere Kraftwerte bei der größten Eindringtiefe, was für eine hohe Drucksteifigkeit der Pferdeproben spricht, die jedoch auch mit dem auf dem Knorpel lastenden Gewicht korrelieren könnte.

Der größte Unterschied wurde durchgehend zwischen den Spezies Schaf und Pferd gemessen. Schafe scheinen einen deutlich weicheren Knorpel zu besitzen als Pferde oder auch Menschen. Aufgrund unserer Untersuchungen wird jedoch nicht ganz klar, warum dies so ist. Bei den Zellzahlen und den alcianblaupositiven Glykosaminoglykanen liegen die Schafproben im mittleren Bereich, auch hinsichtlich der Dicke der Knorpelzonen ergibt sich kein Grund für die deutlich leichtere Kompressionsfähigkeit des Schafknorpels. Interessanterweise liegt das Schaf bei den Relaxationsversuchen wiederum im Mittelfeld und hat dabei bessere Werte als das Kaninchen.

Die größten Probleme bei der Durchführung der Versuche hatten wir bei den Kaninchenproben. Durch die geringe Knorpeldicke und die gravierenden Größenunterschiede der anatomischen Strukturen im Vergleich zu den übrigen Spezies ergaben sich Probleme sowohl bei der Probenhalterung, der Dicke des Indentors im Vergleich zur Teststelle, als auch bei der Präparation der Proben. Dies sollte bei weiteren Studien berücksichtigt werden. Je kleiner die Spezies ist, desto schwieriger sind die genauen Messstellen definierbar. Es gibt eine Reihe von Knorpelstudien am Kaninchen [Jing et al. 2014, Dai et al. 2014, Singh et al. 2014, Brenner et al. 2014] und sogar an Ratten, die noch wesentlich kleinere Gelenkflächen aufweisen [Naveen et al.

2013]. Diese Spezies werden wegen ihrer einfachen Haltungsbedingungen gerne als Tiermodelle verwendet, jedoch sind wir aufgrund unserer Erfahrungen in der Studie der Meinung, dass kleine Spezies nicht das optimale Tiermodell für weitere vergleichende Knorpelforschungen zum Menschen darstellen.

Die biomechanischen Messungen im Bereich des lateralen Patellagleitlagers und des medialen Femurkondylus wurden jeweils nur an den Spezies Kaninchen, Hund, Schaf und Pferd durchgeführt, da die erforderlichen humanen Proben nicht zur Verfügung standen. Um einen Gesamteindruck über die Knorpelverhältnisse im Kniegelenk der unterschiedlichen Spezies zu gewinnen, wären Folgestudien mit humanen Knorpelproben sinnvoll.

Die Kompressionsversuche im Bereich des lateralen Patellagleitlagers zeigen, dass auch hier zwischen den Spezies kein einheitliches Ergebnis vorliegt. Ansonsten weisen bei dieser Testung ebenfalls die Pferde die höchsten Mittelwerte auf. Die weitere Verteilung entspricht der Testung am lateralen dorsalen Kondylus.

Ähnliche Ergebnisse zeigen die Kompressionsversuche am medialen Femurkondylus. Auch bei dieser Testung zeigen die Pferde die größten Mittelwerte gefolgt von Hund, Schaf und Kaninchen.

Zusammenfassend sind damit die Spezies Pferd und Hund dem humanen Knorpel in Bezug auf die biomechanische Reaktion bei den Kompressionsversuchen am ähnlichsten.

Relaxationsversuche

Im Gegensatz zur den relativ heterogenen Befunden der Kompressionsuntersuchungen stellen sich die Ergebnisse der Relaxationsuntersuchungen homogen dar.

Während zwischen den verschiedenen Tierarten kein signifikanter Unterschied ($p > 0,335$) festzustellen war, zeigt der menschliche Knorpel einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) bezüglich der Relaxationsfähigkeit. Dies bedeutet, dass der menschliche Knorpel im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Spezies eine größere Steifigkeit besitzt und sich nach Einwirken eines Druckes nicht so schnell regenerieren kann.

Hier stellt sich die Frage, ob sich durch die evolutionsbiologische Veränderung des Kniegelenkknorpels des Menschen als Zweibeiner, wobei das gesamte Körpergewicht auf nur zwei anstatt vier Gelenkflächen liegt, Änderungen hinsichtlich der Relaxationsfähigkeit ergeben haben.

Eine weitere Diskussionsgrundlage ist hier auch die Zahl der Chondrozyten, die bei den menschlichen Proben deutlich geringer ausfiel als bei allen untersuchten Tiermodellen. Dies spricht dafür, dass ein geringerer Gehalt an Chondrozyten eine deutlich schlechtere Relaxationsfähigkeit bedingt. Dies wiederum bestätigt die These, dass durch eine autologe Chondrozytentransplantation eine deutliche Besserung der Relaxationsfähigkeit und somit klinisch eine Beschwerdebesserung eintreten kann.

Die Relaxationsfähigkeit des Knorpels nach 10, 20, 30 und 40 Sekunden im Bereich des lateralen dorsalen Femurkondylus zeigt für den Menschen die höchsten Mittelwerte, gefolgt von den Spezies Hund und Pferd.

Am lateralen Patellagleitlager zeigte sich nach allen Messzeiten eine einheitliche Reihenfolge der Spezies. Die Kaninchen besaßen die geringsten Mittelwerte. Etwas höhere Werte lieferten die Schafe und Hunde. Die höchsten Mittelwerte boten die Pferde mit doppelt so großen Messwerten wie die Kaninchen.

Die Relaxationsversuche am medialen Kondylus ergaben ähnliche Ergebnisse wie die Messungen am lateralen Patellagleitlager. Die Kaninchen hatten während aller Messungen die geringsten Mittelwerte, gefolgt von den Spezies Schaf und Hund. Die Pferde hatten auch hier die höchsten Mittelwerte. Durch die deutlichen Unterschiede zwischen den menschlichen Proben und den Kaninchenproben scheint das Kaninchen im Hinblick auf die autologe Chondrozytentransplantation kein geeignetes Modell zu sein.

In Bezug auf die biomechanische Relaxationsfähigkeit ist damit das Hunde- und Pferdmodell den anderen Spezies im Vergleich zum Menschen leicht überlegen. Neuere Studien belegen ebenfalls das gute Ergebnis von Hunde- [Duan et al. 2013, Yang et al. 2011] und Pferdestudien bei großen Knorpeldefekten [Malda et al. 2012, Nixon et al. 2011].

Kritische Beurteilung der Versuchstiere

Aufgrund der aufgezeigten Unterschiede sowohl im Aufbau als auch im Kompressions-

und Relaxationsverhalten des Knorpels der verschiedenen untersuchten Spezies zeigt sich die Problematik der Findung eines geeigneten Tiermodelles für die Knorpelforschung deutlich.

Wir konnten aufzeigen, dass die Ergebnisse, die mit einer Spezies erzielt wurden, nicht einfach auf eine andere Spezies übertragen werden können.

Die Vielfalt an Versuchstieren erschwert zudem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander.

In unserer Studie konzentrierten wir uns demnach an bereits existierenden Studien und den Tieren, die dort zur Verwendung kamen [Hunziker 1999, Reinholz et al. 2004, Solchaga et al. 2001, Duan et al. 2013, Yang et al. 2011, Malda et al. 2012, Nixon et al. 2011, Jing et al. 2014].

Uns war wichtig zu überprüfen, welches Tiermodell die Struktur und die physiologischen Gelenkverhältnisse des Menschen am ähnlichsten darstellt. Optimal wären ähnliche Knorpel- und Knochenverhältnisse wie die des Menschen. Dies ist jedoch bereits aufgrund der einzigartigen Fortbewegung des Menschen als Zweibeiner nur eingeschränkt möglich.

Jede Spezies hat eigene Bewegungs- und Belastungsmuster des Kniegelenkes, die sich auf den Aufbau und die Mechanik auswirken und somit zu gänzlich anderen Knorpelanforderungen führen. Eine Vergleichbarkeit zum Menschen ist daher immer nur eingeschränkt möglich.

Zum gleichen Ergebnis kommen auch Proffen et al. 2012, die eine ähnliche vergleichende Studie zum anatomischen Aufbau des Kniegelenkes verschiedener Spezies im Vergleich zum Menschen durchgeführt haben. In deren Arbeit konnten deutliche Unterschiede im Bewegungsumfang und der Größe der intraartikulären Strukturen nachgewiesen werden. Nur das menschliche Kniegelenk konnte eine vollständige Extension erreichen, was wiederum die Unterschiede in den Belastungen und dem Aufbau der unterschiedlichen Gelenkbereiche (lateralen dorsalen Kondylus, medialen Kondylus) erklärt und in Tiermodellen nur schwer nachzustellen ist.

Es sollte daher entsprechend der gezielten Fragestellung das am besten geeignete Tier ausgewählt und der Versuchsaufbau angepasst werden [Hunziker 1999, O'Driscoll 2001, Reinholz et al. 2004, Solchaga et al. 2001, Chu et al. 2010, Proffen et al. 2013].

Vorteilhaft wäre, wenn die Dimensionen der Defekte, die zum Beispiel bei der autologen Chondrozytentransplantation bei Versuchstieren gesetzt werden müssen, eine ähnliche Größe wie die Knorpeldefekte beim Menschen hätten.

Bei den von uns getesteten Spezies scheinen sowohl das Hunde- als auch das Pferdmodell die besten Voraussetzungen für vergleichende Studien zu humanem Knorpel zu haben. Zum gleichen Ergebnis kommt eine Arbeit von Chu et al. 2010, bei der unterschiedliche Spezies im Hinblick auf Knorpelregeneration und Knorpelersatz getestet wurden.

Die größten Unterschiede zum menschlichen Knorpel waren durchgehend bei den Schafen und Kaninchen zu sehen. Diese eignen sich daher nach unseren Untersuchungen nur eingeschränkt als Tiermodell für die humane Knorpelforschung.

Kaninchen

Aufgrund ihrer geringen Größe und ihren günstigen Haltungskosten im Vergleich zu anderen Spezies werden Kaninchen häufig in Studien zur autologen Chondrozytentransplantation verwendet. Hier treten aber Schwierigkeiten auf, da größere Defekte nicht nur bis in den subchondralen Knochen, sondern meistens auch bis in die Spongiosa reichen und damit nicht mit den menschlichen Defekten vergleichbar sind [Hunziker 1999, Chu et al. 2010].

Als ein weiteres Problem bei den Proben der Kaninchen stellte sich in unserer Studie die Verarbeitung der Knorpelproben dar. Durch die geringe Größe der Proben musste gerade beim Sägen sehr behutsam vorgegangen werden, um nicht zu viel Knorpel zu verletzen.

Ebenso waren die Einstellungen bei den biomechanischen Testungen sehr schwierig, da die Prüffläche (Knorpeloberfläche) an den definierten Messpunkten wesentlich geringer war und eine größere Oberflächenkrümmung als bei den übrigen Spezies aufwies.

Ein weiterer wichtiger operationstechnischer Punkt ist die schichtgenaue Platzierung von Implantaten. So ist es bei der deutlich geringeren Knorpeldicke des Kaninchens schwieriger, das Implantat so zu platzieren, dass es einen glatten Übergang zum angrenzenden Knorpel bildet, während ein solcher Eingriff auf Grund der höheren Dicke des Knorpels bei größeren Tieren deutlich einfacher durchzuführen ist.

Des Weiteren zeigt das Kaninchen bei Verletzungen der Gelenkoberfläche eine zum Menschen konträre Gelenkknorpelregeneration. Das Kaninchen ist im Gegensatz zum Menschen ein Schnellknorpelbildner. So konnte gezeigt werden, dass der Gelenkknorpel des Kaninchens zu erstaunlichen Regenerationsleistungen in der Lage ist, solange der subchondrale Knochen nicht verletzt wurde [Morris 2001]. Damit ist das Knorpelgewebe des Kaninchens in der Lage, isolierte Knorpeldefekte ohne Beteiligung des subchondralen Knochens selbst zu schließen, während menschlicher Knorpel solche Schäden nur schlecht toleriert und das Selbstheilungspotential sehr gering ist [Meachim 1963].

Beim Menschen dagegen verbessert sich die Reparaturleistung des Knorpels durch die Eröffnung des Markraums ganz erheblich, wohingegen dieses Vorgehen beim Kaninchen zu einer deutlichen Verschlechterung der Regenerationsleistung führt [Meachim 1963]. Es ist daher sehr schwierig, Ergebnisse aus Kaninchenstudien, bei denen nicht genau zu beurteilen ist, ob die Mineralisierungszone verletzt wurde oder nicht, auf den Menschen zu übertragen.

In einigen Fällen können jedoch bestimmte Fragestellungen durch das Kaninchenmodell beantwortet werden, wie solche nach dem Überleben der Spenderzellen [Ostrander 2001] oder Defekte mit einer kleineren Plaquedeckung [Makino et al. 2002]. Neuere Studien an Kaninchen beschäftigen sich mit der Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in die Knorpeldefekte [Dai et al. 2014, Singh et al. 2014].

Hund

Ausgewachsene Hunde von größeren Rassen haben eine Knorpeldicke von über 1mm. Das Hundemodell ist damit in Bezug auf die Knorpeldicke einigen vergleichbaren Spezies, wie z.B. dem Schafmodell, überlegen. Der Knorpel von ausgewachsenen Schafen ist gerade einmal halb so dick [Frisbie 2006], was unsere Ergebnisse ebenfalls bestätigen.

Gegen das Hundemodell spricht jedoch das instinktive Verhalten von Hunden auf Schmerzreize. Hunde neigen dazu, verletzte Extremitäten sehr stark zu schonen.

Trotz dieses Verhaltens gibt es eine Reihe von Versuchen an Knorpel, bei denen der Hund erfolgreich eingesetzt wurde. So bewertete zum Beispiel Breinan et al. (2000) in einer Studie die Wirkung von kultivierten autologen Chondrozyten bei der Heilung von Knorpelschäden im Hundemodell. Gerade auch bei größeren Defekten scheint das

Hundemodell aussagekräftige Ergebnisse zu liefern [Duan et al. 2013, Yang et al. 2011]. Unsere Studie zeigt, dass auch in Bezug auf die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels der Hundeknorpel zusammen mit dem Pferdekknorpel dem menschlichen Knorpel am ähnlichsten ist.

Schaf

Schafe belasten unter adäquater Analgesie das operierte Bein sofort voll. Dieses Verhalten ist besonders bei solchen Studien ein Vorteil, bei denen für die Knorpelregeneration eine gewisse Druckbelastung benötigt wird.

Große Schafstämme wie Merinoschafe haben sich als besonders robust erwiesen und ähneln dem Menschen in Bezug auf Gewicht, Knochen- und Knorpelwachstumsverhalten. Außerdem sind beide langsame Knochen- und Knorpelbildner, so dass Vergleiche mit dem menschlichen Kniegelenk realisiert werden können. Die Spezies Schaf zeigt einen weiteren Vorteil in der Beschaffung und Versorgung der Versuchstiere. Unsere biomechanischen Messungen zeigen jedoch Nachteile bezüglich der biomechanischen Eigenschaften. Hier zeigt der Pferde- und auch der Hundekknorpel bei den Kompressionsversuchen im Vergleich zum humanen Knorpel bessere Ergebnisse. In unserer Studie zeigte sich durch die Kompressionsversuche eine nur geringe Drucksteifigkeit der Schafknorpelproben, die mit menschliche Proben nicht vergleichbar war. Jedoch gibt es auch Schafstudien mit positivem Ergebnis [Schleicher et al. 2013].

Pferd

Das Pferd weist mit dem humanen Kniegelenk vergleichbare Dimensionen auf, ebenso ist die Gewichtsbelastung der Gelenkflächen ähnlich der eines menschlichen Sportlers [Convery et al. 1972, Litzke et al. 2004, Todhunter et al. 1993, Malda et al. 2012].

Doch nicht nur der Aufbau und die Zellmorphologie, sondern auch die pathologischen Veränderungen sollten vergleichbar sein.

Gerade in diesem Punkt weist das Kniegelenk des Pferdes sehr ähnliche Erkrankungen auf wie das des Menschen. So leiden Pferde zum Beispiel ebenso an Osteoarthritis mit Erosionen am Gelenkknorpel an dem medialen Femurkondylus wie der Mensch. Ebenso kommt es beim Pferd zu Osteochondritis dissecans, mit Ausmaßen, die dem Menschen

entsprechen [Riley et al. 1998].

Litzke et al. 2004 zeigte, dass die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) in einem Großtiermodell am Pferd das Potential der ACT für die Knorpel-Regeneration in menschlichen Patienten demonstriert. Diese Studie bewertete die Knorpelreparatur nach erfolgter ACT im Pferdmodell über eine Zeitdauer von 2 Jahren. Es wurde jeweils das klassische ACT-Verfahren verwendet, bei dem die autologen Chondrocyten unter einen Periostlappen eingespritzt wurden [Brittberg et al. 1994]. Die Studie zeigte, dass die mit ACT behandelten Defekte eine deutlich bessere Defektfüllung mit einem gut integrierten Neoknorpel und mit einer vergleichbaren Expression von knorpelspezifischen Markern als die Kontrollgruppe hatten.

Ebenso zeigte eine Studie von Barnewitz et al. 2006, dass der Gebrauch von dreidimensionalen autologen Knorpeltransplantaten als vielversprechende therapeutische Maßnahme für die Behandlung von Knorpeldefekten in Pferden eingesetzt werden kann. Auch aktuelle Studien zeigen ein gutes Ergebnis bei autologer Chondrozytentransplantation bei großen Defekten im Pferdmodell [Nixon et al. 2011, Malda et al. 2012].

Bei der Verwendung von Pferden ist jedoch der erheblich größere Aufwand für die Beschaffung, Haltung und Operation eines Pferdes zu beachten. Bei der Haltung sollte vor allem darauf geachtet werden, dass die Tiere von fachkompetentem Personal versorgt werden und dass ausreichend große Stallungen vorhanden sind. Ebenso sollte daran gedacht werden, dass die Lagerung vor und während der OP meistens mit Hilfe eines Kranes erfolgen muss. Diese Voraussetzungen sind meistens nur an einem dafür ausgestatteten Zentrum möglich. Ähnliche Probleme werden in weiteren Vergleichsstudien zu unterschiedlichen Tiermodellen aufgezeigt [Chu et al. 2010, Johnstone et al. 2013, Proffen et al. 2012].

Des Weiteren sind Bedenken des Tierschutzes beim Großtiermodell generell größer als beim Kleintierversuch.

Im Vergleich der Durchführbarkeit des OP-Verfahrens mit der Anwendung beim Menschen ist als wesentlicher Unterschied zu erwähnen, dass beim Pferd eine Ruhigstellung des Kniegelenks nicht möglich ist und die Tiere die operierte Extremität sofort bewegen und voll belasten.

Vorteil ist jedoch, dass sich das Pferd auch aus veterinärmedizinischer Sicht als ideales Versuchstier zur Erforschung der ACT anbietet. Durch die Haltung und Nutzung der Pferde kommt es bei ihnen oft zu degenerativen Knorpelschäden, so dass die durch

chondrale Läsionen bedingte Lahmheit ein sehr häufiges Problem in der Tiermedizin darstellt [Barnewitz et al. 2006]. Aus den gewonnenen Erkenntnissen könnten auch hier eventuell neue Therapieoptionen entstehen.

Unsere Studie zeigt, dass das Pferd von den untersuchten Spezies die größte Ähnlichkeit zum menschlichen Knorpel in Bezug auf die Gelenkknorpeldicke im Knie besitzt. Zum gleichen Ergebnis kam eine Studie von Frisbie et al. 2006. Dies hat vor allem bei der Testung von Operationsmethoden, wie der autologen Chondrozytentransplantation Vorteile, da die Implantate ähnliche Dimensionen besitzen. Auch die anatomische Lage der autologen Chondrozytentransplantation beim Pferd ist zumindest bei den medialen Femurkondylen ähnlich der des Menschen. Zusätzlich zeigen das Femoropatellargelenk und das Femorotibialgelenk große Gelenkflächen auf, die einen einfachen arthroskopischen Zugang ermöglichen. Dies ist wichtig für das Setzen von experimentellen Defekten und für das weitere Monitoring [Frisbie et al. 2006, Malda et al. 2012, Nixon et al. 2011, Chu et al. 2010].

Abschließend gilt es weiterhin, dass Für und Wider der einzelnen Spezies im Hinblick auf die Knorpelforschung und die operativen Versorgungsmöglichkeiten von Gelenkdefekten abzuwägen. Wichtig scheint hierbei vor allem die Fragestellung der Studie, bei der die Durchführbarkeit und die Unterschiede der einzelnen Spezies zum menschlichen Knorpel berücksichtigt werden sollten.

In unserer Studie stellt sich heraus, dass das Pferd sowohl im Aufbau des Knorpels als auch in der Größe des Knies und der Dicke der Knorpelschicht dem menschlichen Knie am ähnlichsten erscheint und somit in weiteren Studien die aussagefähigsten Ergebnisse liefern könnte.

6. Zusammenfassung

Diese experimentelle Arbeit befasst sich mit der Suche nach dem idealen Tiermodell für die Knorpelforschung und untersucht dabei humane und tierische Knorpelproben auf grundlegende morphologische, biomechanische, histologische und zellbiologische Unterschiede.

Arthrose und andere Knorpelschäden am Kniegelenk sind Erkrankungen, die einen großen Teil der Gesellschaft betreffen. Eine Heilung dieser Erkrankungen gibt es bisher nicht. Daher ist die Erforschung neuer Techniken, um hyalinen Knorpel wieder herzustellen und ins Gelenk einzubringen, ein Bereich, dem aktuell viel Beachtung geschenkt wird und der intensiv beforscht wird. Da es jedoch schwierig ist, solche Forschungen am Menschen durchzuführen, gibt es in der Literatur viele tierexperimentelle Studien, die vor allem an Kaninchen, Schafen, Hunden und Pferden durchgeführt werden.

Aufgrund dieser Tatsache wählten wir diese Tierarten in unserer Studie, um das ideale Tiermodell im Vergleich zum menschlichen Knorpel zu finden. Um die Daten vergleichbar zu gestalten, wurden dabei jeweils 10 Kniegelenke der oben genannten Spezies an drei verschiedenen Stellen (lateraler dorsaler Kondylus, laterales Patellagleitlager und medialer Kondylus) in unterschiedlichen Untersuchungsschritten verglichen.

Für die Knorpeldickemessungen wurden die jeweiligen Proben in eine eigens hergestellte Messvorrichtung gesetzt und unter dem Mikroskop ausgemessen. Hier zeigt sich, dass die häufig eingesetzten Versuchstiere Kaninchen, Schaf und auch Hund mit 0,2-0,6mm eine im Vergleich zum Menschen (ca. 3,0mm) deutlich geringere Auflage von hyalinem Knorpel aufweisen. Das Pferd kommt diesem Wert mit 1,5-2,0mm am nächsten.

Die Zoneneinteilungen und die Chondrozytenzählungen wurden, nachdem der Knorpel in Feinschnitttechnik fixiert, verschieden eingebettet und gefärbt wurde, unter dem Mikroskop und Rasterelektronenmikroskop untersucht und ausgewertet. Die Ergebnisse der Knorpelzoneneinteilung zeigen, dass der strukturelle Knorpelaufbau jeder hier

untersuchten Spezies unterschiedlich ist. Jedoch entspricht bezüglich der Zonenbildung innerhalb des hyalinen Knorpels der equine Knorpel am ehesten dem humanen. Bei der Chondrozytenzählung fiel auf, dass alle Spezies eine deutlich höhere Anzahl aufweisen als der Mensch.

Die biomechanischen Testungen (Kompressions- und Relaxationsmessungen), die ebenfalls in einer eigens für diese experimentelle Untersuchung aufgebauten Messvorrichtung durchgeführt wurden, ergeben deutliche Unterschiede zwischen den Spezies.

Hierbei ist die Kompressionsfähigkeit des Pferde- und Hundeknorpels von allen untersuchten Tieren am ehesten mit der des menschlichen Knorpels zu vergleichen.

Während bei den Relaxationsversuchen zwischen den verschiedenen überprüften Tierarten kein signifikanter Unterschied festzustellen war, zeigt der menschliche Knorpel einen signifikanten Unterschied bezüglich der Relaxationsfähigkeit. Dies bedeutet, dass der menschliche Knorpel im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Spezies eine größere Steifigkeit besitzt und sich nach Einwirken eines Druckes nicht so schnell regenerieren kann. Im Vergleich zum Menschen sind in Bezug auf die biomechanische Relaxationsfähigkeit jedoch wiederum das Pferde- und Hundemodell den anderen Spezies leicht überlegen.

Bei der Suche nach dem optimalen Tiermodell für weitere Knorpelforschungen gilt es jedoch auch weiterhin zu bedenken, dass es deutliche Unterschiede in der Haltung, der Verarbeitung der Knorpelproben und der anatomisch gegebenen Unterschiede hinsichtlich der Größe der jeweiligen Spezies gibt.

Daher wird es je nach Fragestellung und Testablauf Unterschiede im optimalen Tiermodell geben, die im Einzelfall geprüft und bedacht werden sollten.

Nach unseren umfangreichen Untersuchungen hinsichtlich Knorpelaufbau, Kompressions- und Relaxationsverhalten an den verschiedenen Knorpelproben zeigt sich deutlich, dass das Pferdmodell und das Hundemodell den menschlichen Proben am nächsten kommen und damit für weitere wissenschaftliche Untersuchungen die aussagefähigsten Ergebnisse liefern können.

7. Summary:

This experimental study deals with the search for the ideal animal model for research into cartilage and examines samples of human and animal cartilage for basic morphological, biomechanical, histological and cell biological differences.

Osteoarthritis and other cartilage damage in the knee joint are diseases, which affect a large part of society. Up till now there is no cure for these diseases. So the study of new techniques to reproduce hyaline cartilage and to introduce it into the joint is an area which is at present receiving a lot of attention and which is being intensively researched.

As it is difficult, however, to carry out such research on human samples, there is a lot of literature about studies involving animal research, which is being carried out above all on rabbits, sheep, dogs and horses.

Because of this, we chose these types of animal in our study in order to find the ideal animal model when compared to human cartilage. To make the data comparable, 10 knee joints of each of the above mentioned species were compared at three different positions (lateral posterior condyle, lateral patella bearing and medial condyle) in different research steps.

For measuring the thickness of the cartilage, the respective samples were placed in a measuring device specifically constructed for this purpose and measured under the microscope. Here it becomes clear that the research animals rabbits, sheep and dogs, which are often used, possess a significantly thinner layer of hyaline cartilage with 0.2 – 0.6 mm when compared to humans (about 3.0 mm). The horse comes nearest to this value with 1.5 – 2.0 mm.

After the cartilage had been fixed in precision cut technique, embedded in various ways and coloured, the zone divisions and the chondrocyte counts were examined under the microscope and the scanning electron microscope and were evaluated. The results of the cartilage zone division show that the structural composition of the cartilage is different in every one of the species examined here. Regarding the zones within the hyaline cartilage, the equine cartilage corresponds most to the human cartilage. As regards the

chondrocyte counts, it was noticeable that all the species exhibit a significantly higher number of chondrocytes than humans.

The biomechanical tests (measurements of compression and relaxation), which were also carried out using a measuring device specifically constructed for this experimental study, show clear differences between the species. However, the compressibility of horse and dog cartilage is, out of all the animals examined, best comparable with that of human cartilage.

While the various species of animals which were examined showed no significant differences in their capability to relax during relaxation experiments, the human cartilage did show a marked difference in the capability to relax. This means, that human cartilage, in contrast to all the other species examined, possesses greater stiffness and cannot regenerate itself as quickly after being set under pressure. In comparison to human cartilage, as regards the biomechanical capability to relax, the horse and dog models were slightly superior to the other species.

In the search for the optimal animal model for further cartilage research it should also be considered that there are marked differences in the keeping of animals, in the processing of the cartilage samples and the given anatomical differences with regard to the size of the respective species.

Therefore, depending on the research question and the test procedure, there will be differences in the optimal animal model, which must be taken into account and examined in every single case.

As a result of our comprehensive studies regarding the construction of cartilage and the compressibility and capability to relax of the various cartilage samples, it can be clearly demonstrated that the horse and dog models come closest to the human samples and can so provide the most reliable results for further scientific research.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 (S.3): Rasterelektronenmikroskopisches Bild eines Säulenchondrons

Abb. 2 (S.4): Darstellung der Knorpelzusammensetzung

Abb. 3 (S.7): Die Hyaluronsäure- Moleküle

Abb. 4 (S.8): Darstellung Kollagenetzwerk, Kollagen Typ II

Abb. 5 (S.10): Humaner hyaliner Gelenkknorpel

Abb. 6 (S.11): Elektronenmikroskopische Darstellung zweier Chondrozyten

Abb. 7 (S.12): Rasterelektronenmikroskopie von hyalinem Knorpel

Abb. 8 (S.12): Elastischer Knorpel

Abb. 9 (S.13): Faserknorpel und Hyaliner Knorpel

Abb. 10 (S.13): Rasterelektronenmikroskopie von Faserknorpel

Abb. 11 (S.21): Mikrofrakturierung

Abb. 12 (S.22): Knorpel-Knochen-Transplantation

Abb. 12 a (S.22): Knorpeldefekt

Abb. 12 b (S.22): Einbringen der Knorpel-Knochen-Zylinder

Abb. 12 c (S.22): Pressfit eingebrachte Knorpel-Knochen-Zylinder

Abb. 13 (S.24): Schematische Darstellung der klassischen ACT

Abb. 14 a (S.25): Intraoperative Schritte der klassischen ACT. Präparation Transplantatbett

Abb. 14 b (S.25): Deckung des Knorpeldefektes mit einem Periostlappen

Abb. 14 c (S.25): Anschließend wird die Zellsuspension unter den Periostlappen eingebracht

Abb. 15 (S.28): Präparat des distalen Femurs vom Hund

Abb. 16 (S.29): Präparat des distalen Femurs vom Hund von distal

Abb. 17 (S.29): Resektate der Knorpelflächen eines menschlichen Kniegelenks

Abb. 18 (S.31): Hundeknie mit Bandsäge

Abb. 19 (S.32): Elektromechanische Universalprüfmaschine

Abb. 20 (S.33): Probenhalter, Prüfkörper und Halterung

Abb. 21 (S.33): Kompletter Versuchsaufbau

Abb. 22 (S.34): Halterung mit Probe im Becherglas

Abb. 23 (S.35): Kennlinie des Kraftaufnehmers

Abb. 24 (S.37): Exemplarische graphische Darstellung der erforderlichen Kraft in N zur Impression im hyalinen Knorpel des Hundes bei einer Eindringgeschwindigkeit von 0,1 mm/min

Abb. 25 (S.37): Exemplarische graphische Darstellung der erforderlichen Kraft in N zur Impression im hyalinen Knorpel des Hundes bei einer Eindringgeschwindigkeit von 0,5mm/min

Abb. 26 (S.38): Vergleichende graphische Darstellung der erhobenen Kräfte zur Impression im hyalinen Knorpel des Hundes bei einer Eindringgeschwindigkeit von 0,1 bzw. 0,5mm/min.

Abb. 27 (S.39): Beispiel für die Testung der Relaxation

Abb. 28 (S.40): Testung der Eindringgeschwindigkeit mit 0,2mm/min bei einem Kaninchen.

Abb. 29 (S.40): Testung der Eindringgeschwindigkeit mit 0,5mm/min bei einem Kaninchen

Abb. 30 (S.41): Relaxationsversuch beim Kaninchen mit einer Eindringgeschwindigkeit von 1mm/min.

Abb. 31 (S.41): Schnittführung zur Bestimmung der Knorpeldicke.

Abb. 32 (S.42): Beispiel für eine Knorpelprobe vom Hund (a), Pferd (b), Kaninchen (c), Schaf (d) und Mensch (e)

Abb. 33 (S.42): Aufbau Kamera vom Typ Kappa DX 30 und Mikroskop Zeiss Stemi SV 11

Abb. 34 (S.46): Beispiele zur Lage der Zählfelder beim Gelenkknorpel vom Schaf

Abb. 35 (S.49): Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Kaninchen

Abb. 36 (S.49): Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Schaf

Abb. 37 (S.50): Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Hund.

Abb. 38 (S.50): Graphische Darstellung der durchschnittlichen Knorpeldicken beim Pferd.

Abb. 39 (S.51): Vergleich der durchschnittlichen Knorpelhöhen im Bereich des medialen Femurkondylus

Abb. 40 (S.52): Vergleich der durchschnittlichen Knorpelhöhen im Bereich des lateralen Patellagleitlagers

Abb. 41 (S.54): Vergleich der durchschnittlichen Knorpelhöhen im Bereich des lateralen dorsalen Femurkondylus

Abb. 42 (S.56): Durchschnittliche Chondrozytenanzahl der verschiedenen Spezies

Abb. 43 (S.57): Vergleichende exemplarische Darstellung des Kurvenverlaufs der Kompressionsuntersuchung

Abb. 44 (S.58): Graphische Darstellung der Kompressionskräfte zur Impression des Indentors zu 10% der Knorpelhöhe

Abb. 45 (S.59): Graphische Darstellung der Kompressionskräfte zur Impression des Indentors zu 20% der Knorpelhöhe

Abb. 46 (S.60): Graphische Darstellung der Kompressionskräfte zur Impression des Indentors zu 30% der Knorpelhöhe

Abb. 47 (S.62): Vergleich der Kompressionsversuche am lateralen Patellagleitlager

Abb. 48 (S.64): Vergleich der Kompressionsversuche am medialen Kondylus

Abb. 49 (S.65): Vergleichende exemplarische Darstellung des Kurvenverlaufs der Relaxationsuntersuchung

Abb. 50 (S.71): Vergleich von Knorpeldicke mit Mineralisierungszone

Abb. 51 (S.71): Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel des Menschen

Abb. 52 (S.72): Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Pferd

Abb. 53 (S.72): Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Schaf

Abb. 54 (S.72): Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Hund

Abb. 55 (S.73): Zoneneinteilung vom Gelenkknorpel Kaninchen

Abb. 56 (S.73): Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zonenverteilung innerhalb des hyalinen Knorpels

Abb. 57 (S.74): Vergleichende Darstellung der Glucosaminoglykan-Verteilung innerhalb des hyalinen Knorpels

Abb. 58 (S.75): HE Färbung T9100, zeigt einen Ausschnitt aus der Tangentialzone vom Menschen

Abb. 59 (S.75): HE Färbung T9100, zeigt einen Ausschnitt aus der Tangentialzone vom Hund

Abb. 60 (S.76): HE Färbung T9100. Das Schaf hat in der Radiärzone die größten Zellen.(Pfeil) Originalvergrößerung x10. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen).

Abb. 61 (S.76): HE Färbung T9100. Darstellung der gleichmäßigen Chondrozytenverteilung beim Kaninchen

Abb. 62 (S.77): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Pferdekorpels.

Abb. 63 (S.78): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen menschlichen Knorpels

Abb. 64 (S.78): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Schafknorpels

Abb. 65 (S.79): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Kaninchenknorpels

Abb. 66 (S.79): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hyalinen Hundekorpels.

Abb. 67 (S.80): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom Pferdekorpel, Tangential-uns Übergangszone

Abb. 68 (S.80): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom Pferdekorpel, Radiärzone

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 (S.9): Hauptkollagene des hyalinen Knorpels und deren Funktionen

Tab. 2 (S.17): Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge

Tab. 3 (S.18): ICRS-Score zur Beurteilung der Schwere des Knorpelschadens

Tab. 4 (S.36): Darstellung der jeweils erforderlichen Kraft in N zur Impression im hyalinen Knorpel des Hundes bei unterschiedlichen Eindringgeschwindigkeiten an drei verschiedenen Lokalisationen

Tab. 5 (S.52): Knorpeldicken am medialen Femurkondylus

Tab. 6 (S.53): Knorpeldicken am lateralen Patellagleitlager

Tab. 7 (S.54): Knorpeldicken am lateralen dorsalen Femurkondylus

Tab. 8 (S.55): Durchschnittliche Chondrozytenanzahl in der Übergangs- und Radiärzone

Tab. 9 (S.57): Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 10% der Knorpelhöhe

Tab. 10 (S.58): Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 20% der Knorpelhöhe

Tab. 11 (S.59): Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 30% der Knorpelhöhe

Tab.12 (S.60): Vergleich der Gruppen untereinander am dorsalen Femurkondylus mit dem Oneway Anova Test

Tab. 13 (S.61): Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 10%, 20% und 30% der Knorpelhöhe

Tab. 14 (S.62): Vergleich der Gruppen untereinander am lateralen Patellagleitlager mit dem Oneway Anova Test

Tab.15 (S.63): Durchschnittliche erforderliche Kompressionskraft zur Impression des Indentors um 10%, 20% und 30% der Knorpelhöhe

Tab. 16 (S.64): Vergleich der Gruppen untereinander am medialen Kondylus mit dem Oneway Anova Test

Tab. 17 (S.66): Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 10 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N

Tab. 18 (S.66): Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 20 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N

Tab. 19 (S.67): Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 30 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N

Tab. 20 (S.67): Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft 40 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N

Tab. 21 (S.68): Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft bei 10, 20, 30 und 40 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N

Tab. 22 (S.69): Durchschnittliche Werte der verbliebenen auf den Indentor einwirkenden Kraft bei 10, 20, 30 und 40 Sekunden nach ursprünglichem Eindringen mit 15N

10. Literaturverzeichnis

- Ahmad CS, Guiney WB, Drinkwater CJ (2002)
Evaluation of donor site intrinsic healing response in autologous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy* 18: 95–98
- Athanasίου KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC (1991)
Interspecies comparisons of intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 9: 330-340
- Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE (1992)
Heterogeneity of articular chondrocytes. In Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG (eds) *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Raven Press, New York: 237-249
- Aydelotte MB, Michal LE, Reid DR (1996)
Chondrocytes from the articular surface and the deep zone express different, but stable, phenotypes in alginate gel cultures. *Transactions of the Orthopaedic Research Society*: 21, 317
- Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, Mikos AG (1998)
Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Deliv Rev* 33: 111–139
- Backhaus, Klaus et al (2006)
Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung. 11. Auflage. Springer
- Barlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RWJ, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G (2005)
Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg* 87B: 640-645
- Barlett W, Krishnan SP, Skinner JA, Carrington RWJ, Briggs TWR, Bentley G (2006)
Collagen-covered versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a comparison of tourniquet times. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 16: 315-317
- Barnewitz D, Endres M, Krüger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, Ringe J, Sittinger M, Kaps C (2006)
Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials* 27: 2882-2889
- Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Senwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Nöth U, Perka C, Richter W, Schäfer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K (2004)
Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop Grenzgeb* 142: 529–539

- Benya PD, Shaffer JD (1982)
 Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215–224
- Bobic V (1999)
 Die Verwendung von autologen Knorpel-Knochenplantaten in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen. *Orthopäde* 28: 19–25
- Breinan HA, Martin SD, Hsu, H, Spector, M. (2000)
 Healing of canine articular defects treated with microfracture, a type-II-collagen matrix or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res*, 18(5): 781-789
- Brenner JM, Ventura NM, Tse MY, Winterborn A et al (2014)
 Implantation of scaffold-free engineered cartilage constructs in a rabbit model for chondral resurfacing. *Artif Organs* 38(2): E21-32
- 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. *N Engl J Med* 331: 889–895
- Brittberg M, Peterson L, Sjörgen-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A (2003)
 Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. *J Bone Joint Surg* 85A, Suppl 3: 109-115
- Bruckner P, Mendler M, Steinmann B, Huber S, Winterhalter KH (1988)
 The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J Biol Chem* 263: 16911-16917
- Buckwalter JA, Rosenberg LC (1982)
 Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J Biol Chem* 257: 9830-9839
- Buckwalter JA (1995)
 Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies. *J Rheumatol Suppl* 43: 13-15
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1997)
 Articular cartilage. Part I: tissue design and chondrocyte-matrix interaction. *J Bone Joint Surg* 79A: 600–611
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998)
 Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47: 487-504
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998)
 Articular cartilage: tissue design and chondrocytematrix interactions. *Instr Course Lect* 47: 477-86
- Buckwalter JA, Coutts R, Hunziker EB, Mow VC (1999)
 Breakout Session 3: Articular cartilage. *Clin Orthop Rel Res* 367S: 239-243

- Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ (2000)
Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 49: 481-489
- Bugbee WD (2004)
Osteochondral allograft transplantation. In: Cole BJ, Malek MM (Hrsg.) *Articular Cartilage Lesions. A Practical Guide to Assessment and Treatment*. Springer: 82-94
- Burgeson RE, Nimni ME (1992)
Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop*: 250-272
- Buschman MD, Grodzinsky AJ (1995)
A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage. *J Biomech Eng* 117: 179-192
- Chu CR, Szczodry M, Bruno S (2010)
Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 16(1): 105-15
- Convery FR, Akeson WH, Keown GH (1972)
The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop* 82: 253–262
- Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D (2001)
Matrices for Cartilage Repair. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 271–279
- Crema MD, Cibere J, Sayre EC, Roemer FW, Wong H, Thorne A, Singer J, Esdaile JM, Marra MD, Kopec JA, Nicolaou S, Guermazi A (2014)
The relationship between subchondral sclerosis detected with MRI and cartilage loss in a cohort of subjects with knee pain: the knee osteoarthritis progression (KOAP) study. *Osteoarthritis Cartilage*. 22(4): 540-6
- Czitrom A, Keating S, Gross A (1990)
The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg* 72A: 574–581
- Dai L, He Z, Zhang X, Hu X, Yuan L et al (2014)
One-step repair for cartilage defects in a rabbit model: a technique combining the perforated decalcified cortical-cancellous bone matrix scaffold with microfracture. *Am J Sports Med*. 42(3): 583-91
- Davis W, Moskowitz RW (1973)
Degenerative joint changes following posterior cruciate ligament section in the rabbit. *Clin Orthop* 93: 307-312
- Dieppe P (1995)
Arthrose: Risikofaktoren, Verlauf und Ausgang. *Rheumatol.Europa* 24: 66-68
- Dijkgraaf LC, de Bont LGM, Boering G, Liem RSB (1995)
Normal cartilage structure, biochemistry and metabolism: a review of literature. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 924- 929

- Donath, K. (1988)
Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Der Präparator* 34: 197–206
- Draenert K, Draenert Y (1988)
A new procedure for bone biopsies and cartilage and bone transplantation. *Sandorama III/IV*: 33–40
- Drenckhahn D (1994)
Benninghoff Anatomie, Untere Extremität, Kniegelenk, Urban und Schwarzenberger 15. Auflage: 357-366
- Drenckhahn D (1994)
Benninghoff Anatomie, Untere Extremität, Allgemeine Gelenklehre, Urban und Schwarzenberger 15. Auflage: 216-218
- Duan X, Zhu X, Dong X, Yang L et al (2013)
Repair of large osteochondral defects in a Beagle model with a novel type I collagen/glycosaminoglycan- porous titanium biphasic scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 33(7): 3951-7
- Duchow J, Hess T, Kohn D (2000)
Primary stability of press-fit-implanted osteochondral grafts. Influence of graft size, repeated insertion, and harvesting technique. *Am J Sports Med* 28: 24–27
- Eckstein F, Lemberger B, Gratzke C, Hudelmaier M, Glaser C, Englmeier KH, Reiser M (2005)
In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. *Ann Rheum Dis* 64: 291-5
- Eggli PS, Hunziker EB, Schenk RK (1988)
Quantitation of structural features characterizing weight- and less- weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat Rec* 222: 217-227
- Elder BD, Athanasiou KA (2009)
Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 43-53
- Elmer RM, Moskowitz RW, Frankel VH (1977)
Meniscal regeneration and postmenisectomy degenerative joint disease. *Clin Orthop*: 304-310
- Erggelet C, Steinwachs MR, Reichelt A (2000)
The operative treatment of full thickness cartilage defects in the knee joint with autologous chondrocyte transplantation. *Saudi Med J.* 21(8): 715-21
- Erggelet C, Steinwachs M (2001)
Gelenkknorpeldefekte. Steinkopff Verlag, Darmstadt

- Eyre D (2002)
Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4: 30-5
- Fahrmeir L et al. (1996)
Multivariate statistische Verfahren, 2. Auflage
- Ficat RP, Ficat C, Gedeon P, Toussaint JB (1979)
Spongiosisation. A new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop Rel Res* 144: 74-83
- Finer MH, Gerstenfeld LC, Young D, Doty P, Boedtger H (1985)
Collagen expression in embryonic chicken chondrocytes treated with phorbol myristate acetate. *Mol Cell Biol* 5: 1415-1424
- Fischer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD (1995)
Visualisation of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 13: 819-826
- Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G (1998)
Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 240: 58-65
- Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, McIlwraith CW (2006)
Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med* 34: 1824 -1831
- Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW (2006)
A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *VCOT - Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 19: 142-146
- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K (2006)
Biologische Knorpelrekonstruktion im Kniegelenk. *Unfallchirurg* 7: 563-576
- Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD (2000)
Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis Rheum* 43: 953-68
- Ghazavi M, Pritzker K, Davis A, Gross A (1997)
Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg* 79B: 1008-1013
- Goldring MB, Marcu KB (2009)
Cartilage homeostasis
- Goldring MB (2012)
Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4: 269-85
- Gomar-Sancho F und Orquin EG (1987)
Repair of osteochondral defects in articular weightbearing areas in the rabbit's knee. *Int Orthop*, 11: 65-69

- Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE (1999)
Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions. *Clin Orthop* 367S: 176–185
- Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM (1999)
The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 59-70
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I, Toth J, Dioszegi Z, Kendik Z (1997)
Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects. *Orthop Intern* 5: 175–181.
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M (1998)
Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 21: 751-756
- Hangody L, Fules P (2003)
Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg* 85A: 25-32
- Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC (2010)
Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Sep 15;92(12): 2220-33.
- Harrison PE, Ashton IK, Johnson WE, Turner SL, Richardson JB, Ashton BA. (2000). The in vitro growth of human chondrocytes. *Cell Tissue Bank*;1: 255-60
- Hartung (1999)
Statistik. 12. Auflage, 152 ffg.
- Hash TW 2nd (2013)
Magnetic resonance imaging of the knee. *Sports Health.* 2013 Jan;5(1): 78-107.
- Hayashi T, Abe E, Jasin HE (1996)
Fibronectin synthesis in superficial and deep layers of normal articular cartilage. *Arthritis Rheum* 39: 567-573
- Höchsmann N et al (2013)
Einfluss der hyperbaren Oxygenierung auf das Proliferationsverhalten und das Genexpressionsmuster humaner Chondrozyten: 23
- Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T (2000)
Osteochondral transplantation versus autogenous chondrocyte transplantation. A prospective comparative clinical study. *Chirurg* 71(9): 1090-7
- Horas U, Schnettler R (2002)
Knorpeldefekte am Kniegelenk und autogene osteochondrale Zylindertransplantation. *Operat Orthop Traumatol* 14: 237-252

- Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R (2003)
Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg* 85(A): 185-192
- Hunziker EB (1992)
Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC (Hrsg.) *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York, Raven Press: 183-199
- Hunziker EB, Rosenberg LC (1996)
Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 78A: 721-733
- Hunziker EB (1999)
Biologic repair of articular cartilage defect models in experimental animals and matrix requirement. *Clin Orthop Rel Res* 367S: 135-146
- Hutmacher DW (2000)
Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomater* 21: 2529-2543
- Jing L, Zhang J, Leng H, Guo Q, Hu Y (2014)
Repair of articular cartilage defects in the knee with autologous iliac crest cartilage in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.
- Johnson LL (1991)
Arthroscopic abrasion arthroplasty. In: McGinty JB (Hrsg.) *Operative arthroscopy*. Raven Press, New York: 341–360
- Johnstone B, Alini M, Cucciarini M, Dodge GR et al (2013)
Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art. *Eur Cell Mater* 2;25: 248-67
- Jubel A, Andermahr J, Schiffer G, Fischer J, Rehm KE, Stoddart MJ, Häuselmann HJ (2008)
Transplantation of de novo scaffold-free cartilage implants into sheep knee chondral defects. *Am J Sports Med*. 36(8): 1555- 64
- Keene DR, Oxford JT, Morris NP (1995)
Ultrastructural localization of collagen types II, IX, and XI in the growth plate of human rib and fetal bovine epiphyseal cartilage: type XI collagen is restricted to thin fibrils. *J Histochem Cytochem* 43: 967-979
- Kish G, Módis L, Hangody L (1999)
Osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral lesions of the knee and talus in the athlete. *Clin Sports Med* 18: 45–66
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O (2004), Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee – a randomized trial. *J Bone Joint Surg* 86A: 455-464

- Krettek C, Jagodzinski M, Zeichen J (2005)
Knorpelzelltransplantation – eine Alternative zur Endoprothese? *Chirurg* 76: 467–473
- Laprell H, Petersen W (2001)
Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system: 6–12 years follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. *Orthop Trauma Surg* 121: 248–253
- Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J (2004)
Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng* 32: 57-69
- Lu L, Mikos AG (1999)
Biodegradable polymers for cell transplantation. *Science Med* 6: 6–7
- Lu L, Zhu X, Valenzuela RG, Currier BL, Yaszemski MJ (2001)
Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 251–270
- Lyyra Laitinen T, Niinimäki M, Toyras J, Lindgreen R, Kivirantal S, Jurvelin JS (1999)
Optimization of the arthroscopic indentation instrument for the measurement of thin cartilage stiffness. *Phys Med Biol* 44: 2511-2524
- Malda J, Benders KE, Klein TJ, de Grauw JC et al. (2012)
Comparative study of depth-dependent characteristics of equine and human osteochondral tissue from the medial and lateral femoral condyles. *Osteoarthritis Cartilage* 20(10): 1147-51
- Malemud, CJ; Goldberg, V (1999)
Future directions for research and treatment of osteoarthritis. *Front Biosci.* 1999 Oct 15;4: D762-71.
- Makino T, Fujjoka H, Kurosaka M, Matsui N, Yoshihara H, Tsunoda M, Mizuno K (2001)
Histologic analysis of the implanted cartilage in an exact-fit osteochondral transplantation model. *Arthroscopy* 17: 747–751
- Makino T, Fujioka H, Yoshiya S, Terukina M, Matsui N, Kurosaka M. (2002)
The effect of the small and unstable autologous osteochondral graft on repairing the full-thickness large articular cartilage defect in a rabbit model. *Kobe J Med Sci.*; 48(3-4): 97-104
- Mankin HJ (1982)
The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 64A: 460-466
- Maroudas A, Schneidermann R, Popper O (1992)
The role of water, proteoglycan and collagen in solute transport in cartilage. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC (Hrsg.) *Articular cartilage and osteoarthritis*. Raven Press, New York, 355-371
- Marlovits S, Vécsei V (2000)
Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten – Teil 1: Grundlagen der Knorpelbiologie und der Heilung von Knorpeldefekten. *Acta Chir Austriaca* 32: 124-129

Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vecsei V (2004)
Autologe Chondrozytentransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des
Kniegelenkes. Techniken und Ergebnisse. *Radiologe* 44: 763– 772

Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA (1997)
Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth
factor binding proteins. *J Orthop Res* 15: 491-498

Martin JA, Buckwalter JA (2000)
The role of chondrocyte-matrix interactions in
maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 37: 129-140

Meachim, G. (1963)
The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.* 45 B: 150-
161

Metz J (2001)
Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels. In Erggelet C, Steinwachs M
(eds) *Gelenkknorpeldefekte*, Steinkopff Verlag, Darmstadt: 3-13

Meyer C, Schnettler R (2005)
Therapiemöglichkeiten von Knorpeldefekten des Talus. *Arthroskopie* 18: 226–232

Minas T, Peterson L (1999)
Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clin Sports Med* 18: 13

Minas T (2001)
Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop
Relat Res* 91S: 349–361

Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der MK (1984)
Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes
with type II collagen. *J Cell Biol* 98: 1572-1579

Morris, E.A.; Peluso, D.; Gill, T.J.; Powers, J.; Glasso (2001)
The choice of the animal model of articular cartilage repair studies. *Transactions of the 4
Combined Meeting of the Orthopaedic Research Society Group*: 260

Moskowitz RW (1972)
Experimental models of degenerative joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 2: 95-116

Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH,
Frankel VH (1973)
Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the
rabbit. *Arthritis Rheum* 16: 397-405

Mow VC, Zhu W, Ratcliffe A (1991)
Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: Mow VC, Hayes WC (Hrsg.)
Basic Orthopaedic Biomechanics. Raven Press, New York: 143-198

- Naveen SV, Ahmad RE, Hui WJ, Suhaeb AM et al (2013)
Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis. *Int J Med Sci* 21;11(1): 97-105
- Nebelung S, Ladenburger A, Gavenis K, Stoffel M, Andereya S, Muller-Rath R (2011)
Tissue engineering of cartilage replacement material – mechanical stimulation in the in-vitro cultivation of human chondrocytes. *Z Orthop Unfall* 149: 52-60
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1998)
Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 19: 2313–2328
- Nehrer S, Vavken P, Dorotka R, Kotz R (2005)
Matrixassoziierte Chondrozytentransplantation. *Arthroskopie* 18: 203–208
- Negrin LL, Vecsei V (2013)
Do meta-analyses reveal time-dependent differences between the clinical outcomes achieved by microfracture and autologous chondrocyte implantation in the treatment of cartilage defects of the knee? *J Orthop Sci.* 2013 Nov;18(6): 940-8.
- Nixon AJ, Begum L, Mohammed HO, Huibregtse B et al (2011)
Autologous chondrocyte implantation drives early chondrogenesis and organised repair in extensive full- and partial- thickness cartilage defects in an equine model. *J Orthop Res.* 29(7): 1121-30
- O’Driscoll SW (2001)
Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 397- 401
- Ostrander RV, Goomer RS, Tontz WL (2001)
Donor cell fate in tissue engineering for articular cartilage repair. *Clin Orthop*; 389: 228-37
- Outerbridge RE (1961)
The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg* 43B: 752-757
- Pedersen DR, Goetz JE, Kurriger GL, Martin JA (2013)
Comparative digital cartilage histology for human and common osteoarthritis models. *Orthop Res Rev* 12; 2013(5): 13-20
- Petersen JP, Ueblacker P, Goepfert C, Adamietz P, Baumbach K, Stork A, Rueger JM, Poertner R, Amling M, Meenen NM (2008)
Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci: Mater Med* 19: 2029–20
- Poole CA, Ayad S, Gilbert RT (1992)
Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci* 103: 1101-1110

- Poole CA, Jensen CG, Snyder JA, Gray CG, Hermanutz VL, Wheatley DN (1997)
Confocal analysis of primary cilia structure and colocalization with the Golgi apparatus in chondrocytes and aortic smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 21: 483-494
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S (2001)
Cartilage biology, composition and structure of articular cartilage. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 26-33
- Pridie AH (1959)
The method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg* 41B: 618-619
- Proffen BL, McElfresh M, Fleming BC, Murray MM (2012)
A comparative anatomical study of the human knee and six animal species 19(4) :493-9
- Puhl W (1997)
Ätiologie, Pathogenese und Pathochemie der degenerativen Gelenkerkrankungen. In Zichner L, Engelhardt M, Freiwald J (eds) *Sport bei Arthrose und nach endoprothetischem Einsatz*: 9-21.
- Putz R (1994)
Benninghoff Anatomie, Untere Extremität, Knorpel, Urban und Schwarzenberger 15. Auflage: 160-166
- Reid DL, Aydelotte MB, Mollenhauer J (2000)
Cell attachment, collagen binding, and receptor analysis on bovine articular chondrocytes. *J Orthop Res* 18: 364-373
- Redler I, Mow VC, Zimny ML, Mansell J (1975)
The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop*: 357-362
- Reinholz GG, Lu L, Saris DB, Yaszemski MJ, O'Discroll SW (2004)
Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 25: 1511-1521
- Riley CB, Scott WM, Caron JP, Fretz PB, Bailey JV, Barber SM. (1998)
Osteochondritis dessicans and subchondral cystic lesions in draft horses: a retrospective study. Department of Veterinary Anesthesiology, Radiology and Surgery, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon. 1: *Can Vet J.*; 39(10): 627-33.
- Rönz B, (2001)
Skript: Computergestützte Statistik I. Humboldt-Universität zu Berlin, Lehrstuhl für Statistik, Berlin.
- Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, Wirth CJ (2000)
Bioartificial cartilage. *Cells Tissues Organs* 167: 95-105
- Roughley PJ, Lee ER (1994)
Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 28: 385-397

- Salai M, Ganei A, Horoszowski H (1997)
Fresh osteochondral allografts at the knee joint: good functional results in a follow-up study of more than 15 years. *Arch Orthop Trauma Surg* 116: 423–425
- Salk RS, Chang TJ, D'Costa WF, Soomekh DJ, Grogan KA (2006)
Sodium hyaluronate in the treatment of osteoarthritis of the ankle: a controlled, randomized, double-blind pilot study. *J Bone Joint Surg* 88A: 295-302
- Scheffé, H. (1959)
The Analysis of Variance. Wiley, New York.
- Schleicher I, Lips KS, Sommer U, Schappat I et al (2013)
Allogeneous bone with collagen for repair of deep osteochondral defects. *J Surg Res*. 185(2): 667-75
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J (2002)
Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 62-70
- Schnettler R, Horas U, Meyer Ch (2008)
Autologe Osteochondrale Transplantate. *Orthopäde* 37: 734-742
- Singh A, Goel SC, Gupta KK, Kumar M et al (2014)
The role of stem cells in osteoarthritis: An experimental study in rabbits 13;3(2): 32-7
- Sittinger M, Braunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J (1997)
Proliferative potential of nasal septum chondrocytes for in vitro culture of cartilage transplants. *Laryngorhinootologie* 76: 96-100
- Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI (2001)
Experimental models of cartilage repair. *Cartilage regeneration using principles of tissue engineering*. *Clin Orthop Rel Res* 391S: 161-170
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999)
Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde* 28: 26-32
- Steadman JR, Biggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey T (2003)
Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow up. *Arthroscopy* 19: 477–484
- Stegen P, Wunsch C, Kauffmann G. (2001)
Magnetresonanztomographie, Radiologie 2. Auflage 2001, Urban und Fischer: 102
- Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, Gohlke-Steinwachs U (1999)
Klinische und zellbiologische Aspekte der autologen Chondrozytentransplantation. *Unfallchirurg* 102: 855-860
- Steinwachs M, Kreuz P (2005)
Nichtmatrixgebundene Chondrozytentransplantation. *Arthroscopie* 18: 198–202

- Swann DA, Radin EL (1972)
The molecular basis of articular lubrication. I. Purification and properties of a lubricating fraction from bovine synovial fluid. *J Biol Chem* 247: 8069-8073
- Swann DA, Radin EL, Nazimiec M, Weisser PA, Curran N, Lewinnek G (1974)
Role of hyaluronic acid in joint lubrication. *Ann Rheum Dis* 33: 318-326
- Swann DA, Hendren RB, Radin EL, Sotman SL, Duda EA (1981)
The lubricating activity of synovial fluid glycoproteins. *Arthritis Rheum* 24: 22-30
- Todhunter RJ, Minor RR, Wootton JAM, Krook L, Burton-Wurster N, Lust G (1993)
Effects of exercise and polysulfated glucosaminoglycan on repair of articular cartilage in the equine carpus. *J Orthop Res* 11: 782-795
- Urban JP (1994)
The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 33: 901-8
- Vanderploeg EJ, Wilson CG, Levenston ME (2008)
Articular chondrocytes derived from distinct tissue zones differentially respond to in vitro oscillatory tensile loading. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1228-36
- Von der Mark K, Gluckert K (1990)
Biochemical and molecular biologic aspects of early detection of human arthrosis. *Orthopade*, 19: 2-15
- Wagner H (1964)
Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. *Z Orthop* 98: 333-355
- Wagner H (1972)
Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 110: 708-715
- Winter GM, Poole CA, Ilic MZ, Ross JM, Robinson HC, Handley CJ (1998)
Identification of distinct metabolic pools of aggrecan and their relationship to type VI collagen in the chondrons of mature bovine articular cartilage explants. *Connect Tissue Res* 37: 277-293
- Wong M, Hunziker EB (2001)
Articular Cartilage Biology and Biomechanics. In Erggelet C, Steinwachs M (eds) *Gelenkknorpeldefekte*, Steinkopff Verlag, Darmstadt: 15-28
- Wu JP, Kirk TB, Zheng MH (2008)
Study of the collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *J Orthop Surg Res* 3: 29
- Xue X, Zheng Q, Wu H, Zou L, Li P (2013)
Different responses to mechanical injury in neonatal and adult ovine articular cartilage. *Biomed Eng Online* 17; 12: 53

Yang Q, Peng J, Lu SB, Guo QY et al. (2011)

Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Chin Med J* 124(23): 3930-8

11. Erklärung zur Dissertation

„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.“

8. Danksagung

Ich möchte Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler für die Überlassung und die Nutzung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie herzlich danken. Durch sein ausgesprochenes Engagement im Aufbau des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Giessen wurde die Grundlage unter anderem für das hier vorgestellte Projekt geschaffen. Er stand mir zu jeder Zeit freundlich und hilfsbereit zu Verfügung und hat mich vor allem bei der Korrektur dieser Arbeit geduldig unterstützt.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. med. Christoph Meyer, der mir durch die Überlassung des Themas dieser Arbeit das Vertrauen ausgesprochen hat.

Das Team des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Giessen unter der Leitung von Frau PD Dr. med. vet. Sabine Wenisch und Frau PD Dr. Kathrin Lips hat eine hervorragende Arbeit in der Durchführung der histologischen, histochemischen, immunhistologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen geleistet. Hier gilt der besondere Dank Frau Dr. med. vet. Ursula Sommer für ihre große Unterstützung bei histologischen Fragestellungen.

Die biomechanischen Testreihen der Vorversuche wurden mit fachlicher und apparativer Unterstützung im Institut für Werkstofftechnik der Universität Siegen durchgeführt. Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr.-Ing. H.-J. Christ für die Möglichkeit, diese Untersuchungen an seinem Institut durchführen zu können, sowie ganz besonders seinen Mitarbeitern Herrn Dipl.-Ing. Arne Ohrndorf und Herrn Gerhard Dietrich für die kompetente und freundliche technische Beratung und Hilfestellung.

Herrn Dr. med. vet. Dirk Barnewitz danke ich als verantwortlichem Tierarzt für die Operationen und die medizinische Betreuung der Pferde.

Die Untersuchung von Hundekniegelenken ermöglichte uns die Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (Direktor: Herr Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Kramer), wofür ich mich herzlich bedanke.

Ein weiterer Dank geht an das Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen, vor allem Herrn Dr. R.-H. Bödecker und Herrn W. Pabst für die freundliche Unterstützung und die statistische Auswertung der Daten.

Ich danke meiner Familie, die mich bei der Beschaffung der unterschiedlichen Knorpelproben tatkräftig unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gilt Gerhard und Pamela Schöne, die darauf geachtet haben, dass am Ende auch jedes Komma an der richtigen Stelle sitzt.

Jeder, der wissenschaftlich Arbeit und viel Zeit neben seiner regulären Arbeitszeit mit der Forschung verbringt, weiß, dass dies für seinen Partner eine zusätzliche Belastung bedeutet. Und daher möchte ich meiner Frau, Esther Schöne-Unzeitig, danken, dass sie mich während dieser Zeit mit Rat und Tat unterstützt und von Zeit zu Zeit wieder aufgebaut hat.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6361-0



9 783835 196361 0