

**Aus dem Zentrum für Operative Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie**

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K.E. Rehm

**Die Evaluation der Spontanheilung von
„Partial – Thickness – Knorpeldefekten“ bei
Schafen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Vorgelegt von Michael W E I S S aus Windhuk/Namibia

Promoviert am: 22. April 2009

**Aus dem Zentrum für Operative Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie**

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K.E. Rehm

**Die Evaluation der Spontanheilung von
„Partial – Thickness – Knorpeldefekten“ bei
Schafen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Vorgelegt von Michael W E I S S aus Windhuk/Namibia

Promoviert am: 22.April 2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Jubel

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. P. Eysel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Priv.-Doz. Dr. med. Axel Jubel, St. Eduardus Krankenhaus, Köln, Leiter der Arbeitsgruppe Chondrozytentransplantation der Klinik für Unfall-, Hand und Wiederherstellungschirurgie der Universität zu Köln

Dr. med. Harald Bergmann, München, Mitglied der Arbeitsgruppe

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 1. August 2008

W E I S S, Michael

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jubel danke ich für seine unendliche Geduld, seine Hingabe für dieses Projekt, seine Professionalität und letztendlich für die Möglichkeit mir diese Dissertation zu ermöglichen.

Herrn OSA Dr. med. Bergmann, als die „Gute Seele“ hinter den Kulissen.

Der Familie Markus und Julia Menhofer für Ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, zu allen Tages- und Nachtzeiten.

Ein Krieger betrachtet die zwei Säulen zu beiden Seiten der Tür, die er öffnen will. Die eine heißt „Angst“, die andere heißt „Wunsch“.

Der Krieger schaut auf die Säule der Angst, und dort steht: „Du wirst in eine unbekannte, gefährliche Welt treten, in der alles, was Du bislang gelernt hast, nichts nützen wird.“

Der Krieger schaut auf die Säule des Wunsches, und dort steht: „Du wirst aus einer bekannten Welt heraustreten, in der die Dinge verwahrt sind, die Du immer haben wolltest und um die Du so viel gekämpft hast.“

Der Krieger lächelt, weil es nichts gibt, was ihn schreckt, und nichts was ihn hält. Sicher wie jemand, der weiß, was er will, öffnet er die Tür.

Paulo Coelho
„Handbuch des Kriegers
des Lichts“

1. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Aufbau und Physiologie des Knorpels.....	3
1.3 Epidemiologie des Knorpelschadens.....	8
1.3.1 Gelenkknorpel und Verletzung.....	8
1.4 Klassifikation der Knorpeldefekte.....	9
1.4.1 Outerbridge Score.....	9
1.4.2 ICRS Score.....	10
1.5 Therapiemöglichkeiten.....	11
1.5.1 Chirurgische Therapieoptionen.....	11
1.5.2 Medikamentöse Therapie.....	12
1.5.3 Neue Untersuchungen.....	13
1.6 Das Ziel dieser Versuchsreihe, Fragestellung.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Versuchstiere.....	19
2.2 Versuchsablauf.....	22
2.3 Operationsablauf: Narkoseverfahren.....	24
2.4 Operationsablauf.....	26
2.5 Auswertung der Ergebnisse.....	30
2.5.1 Kernspintomographie / MRT.....	31
2.5.2 Makroskopische Auswertung.....	34
2.5.3 Vermessung durch Digitalfotografie.....	36
2.5.4 Mechanische Stabilitätsprüfung.....	36
2.5.5 Fixierung und Einfärbung der Histologien.....	37

3. Ergebnisse	42
3.1 Beurteilung der Kernspintomographie / MRT.....	42
3.2 Makroskopische Beurteilung.....	44
3.3 Mechanische Stabilitätsmessung.....	49
3.4 Histologische Beurteilung.....	50
4. Diskussion	55
Das Regeneratgewebe.....	57
Lokalisation von Defekt und Spenderregion.....	60
Der „Partial-Thickness-Defekt“.....	61
Der unbehandelte Defekt.....	64
Das Verhalten der Defektperipherie.....	66
Klinische Relevanz der Forschungsergebnisse.....	67
Schlussfolgerung.....	67
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	72
7. Anhang	91
7.1 Tabellenverzeichnis.....	91
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	92
7.3 Lebenslauf.....	93

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
CPM	Continous passive motion
FCS	Fetal Calf Serum
ICRS	International Cartilage Repair Society
LD	Leerdefektgruppe
MACI	Matrix-induced autologous chondrocyte implantation
MW	Mittelwert
OATS	Osteochondr. Autologous chondrocyte Transfersystem
PE	Probeentnahme
PL	Periostlappengruppe
RS	Relative (Knorpel)Stabilität
SD	Standardabweichung
TP	Transplantatgruppe
Tab.	Tabelle
VHS	Visual Histology Score

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Durch seinen einzigartigen Aufbau ermöglicht hyaliner Gelenkknorpel eine annähernd reibungslose Bewegung in den Gelenken und schützt, einem Stoßdämpfer gleich, den darunter liegenden Knochen. Die besondere Zusammensetzung aus Proteoglykanen, Kollagen, Wasser und nur 2% Knorpelzellen birgt allerdings auch Probleme.

Bereits 1743 schrieb Hunter: *“Ulcerated cartilage is a troublesome thing and that when it is destroyed, it is not repaired...”* (59)

Sir James Paget bemerkte dazu knapp 120 Jahre später: *“...there is, I believe, no instance, in which a lost portion of cartilage has been restored, or a wounded portion repaired with a new and well-formed permanent cartilage in the human body...”* (123)

Auch heute besitzt Knorpelgewebe beim Erwachsenen laut einschlägiger Literatur kaum Regenerationsfähigkeit, und eine restitutio ad integrum eines einmal beschädigten Knorpelbettes ist bisher trotz internationaler Bemühungen nicht zufriedenstellend gelungen (126,134,149,161,162,164,168,174).

In der postoperativen Beobachtung zeigte sich eine fortschreitende Verschlechterung, die häufig in einer kompletten Gelenksarthrose nach drei bis zehn Jahren endete, welche nur durch einen künstlichen Gelenkersatz behoben werden konnte (Colwell et al. bezeichnen diese Knorpelschäden als die häufigste Ursache einer sekundären Arthrose) (23).

In den seltenen Fällen der Heilung eines begrenzten Knorpeldefektes, wird die Arthroseprävalenz (im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung) als dreifach erhöht angesehen. Sind zusätzlich andere Strukturen, wie z.B. Bänder, beteiligt, erhöht sich dieses Risiko noch weiter (137,147,151,155). Auch wenn das Augenmerk der vorliegenden Arbeit auf den defekten Gelenkknorpel gerichtet ist, erscheint die Betrachtung der Arthrose sinnvoll, da sie die gesamten Strukturen eines Gelenks betrifft (Gelenkknorpel, Synovialgewebe, subchondraler Knochen und mesenchymales Nachbargewebe).

Doch trotz großer Fortschritte in der Medizin sind „Wunderheilungen“ nicht möglich: Für die Durchführung einer operativen Knorpelregeneration in Form einer Pridie-Bohrung oder Mikrofrakturierung müssen besondere Voraussetzungen vorhanden sein, um diese durchführen zu können (125,135,148,151,157,158,160). Alle genannten Methoden haben bis jetzt keine zufrieden stellenden Langzeitergebnisse oder –vorteile für sich verbuchen können, da das Regenerationsgewebe im Wesentlichen aus minderwertigem Faserknorpel besteht.

Eine der häufigsten Ursachen für Arthrose bei jungen und aktiven Patienten ist der durch ein Trauma bedingte isolierte Knorpelschaden. Es ist bis heute nicht gelungen, am verletzten Knorpelbett eine Heilung zu erzielen. Ausnahmen sind große osteochondrale Fragmente, die mit Hilfe von metallischen oder biologisch abbaubaren Implantaten an Ort und Stelle fixiert werden können. Aufgrund der erheblichen Schmerzen bei fortschreitender Arthrose, ist ein künstlicher Gelenkersatz mit all seinen Problemen

erforderlich. Gerade bei jüngeren, aktiven Menschen ist die Standzeit der Endoprothesen begrenzt.

1.2 Aufbau und Physiologie des Knorpels

Gesunder Gelenkknorpel ist an seiner Oberfläche spiegelglatt, elastisch und weiß. Er ist frei von Nerven und anderen Gefäßen und besteht nur zu 2% aus Knorpelzellen. Der Rest besteht zu 70% aus Wasser und 28% Kollagenanteilen und Proteoglykanen, die das Wasser binden. Dadurch ist der Knorpel fest, aber doch so elastisch und verformbar, dass er als Stoßdämpfer wirken kann.

Alle knöchernen Strukturen eines Gelenkes, die einer Druckbelastung ausgesetzt sind, sind mit hyalinem Knorpel bedeckt. Durch Zwischenlagerung der sehr viskösen Synovialflüssigkeit wird ein direktes Aufeinandertreffen der Knochen beim Gesunden vermieden. Dies ist bei Mensch und Tier gleich ⁽¹⁵⁹⁾.

Knorpel gehört zum Binde- und Stützgewebe. Die Knorpelzellen (Chondrozyten) sind von einer Matrix aus azellulärem Gewebe umgeben, welche dem Gelenkknorpel seine charakteristische Druckelastizität verleihen. Anhand des Fasergehalts der Matrix, unterscheidet man zwischen hyalinem, elastischem und Faserknorpel.

Die Matrix, auch Interterritorialsubstanz genannt, ist schneidbar, aber dennoch fest. Sie setzt sich zu 97% aus Wasser und zu 3% aus Kollagen Typ II, Chondroitinsulfat und Proteoglykanen zusammen. Chondroitinsulfat A und C sind für das Wasserbindungsvermögen, aber auch für die hohe Basophilie in Knorpelhistologien verantwortlich. Die Proteoglykane bestehen aus wasserbindenden

Heteroglykanen mit Proteinanteilen. Im gesunden Knorpel sind die Kollagenfasern „maskiert“ und damit lichtmikroskopisch nicht sichtbar. Das Kollagen ermöglicht dem Knorpel eine hohe Toleranz gegenüber tangentialen Reiß- und Scherkräften und damit eine ausgeprägte Polsterfunktion (4,6,11,16,18,20,159).

Chondrozyten haben keine Zellfortsätze. Sie sondern Matrixsubstanz in den Interzellularraum ab und mauern sich dadurch in Lakunen ein. Die Knorpelkapsel, die die Chondron-Lakunen umgibt, ist stark basophil aufgrund der PAS-positiven sulfatierten Glykosaminoglykane.

Ein Chondron ist eine Gruppe von 2 bis 6 Chondrozyten, die als Klon aus einem Chondrozyt entstanden und alle von derselben Knorpelkapsel umgeben sind. Die Chondrozyten eines Erwachsenen teilen sich nicht mehr.

Die Ernährung des Knorpels erfolgt durch Diffusion aus dem Knochen heraus und aus der Synovialflüssigkeit, bzw. aus dem Perichondrium. Die subperichondralen Bezirke des Perichondrium zerfallen in ein Stratum cellulare und ein Stratum fibrosum. Das Stratum cellulare ist dem Knorpel am nächsten und sehr chondrozytenreich. Das Stratum fibrosum bildet mit dem Perichondrium die Oberfläche des Knorpels zum Gelenkraum hin. Im ausgereiften Knorpel fehlt das Perichondrium.

Knorpel ist mesenchymalen Ursprungs und reift aus Vorknorpel heran. Dieser hat noch Chondroblasten, welche Grundsubstanz abscheiden, bevor sie sich zu Chondrozyten weiterdifferenzieren.

Den Chondroblasten stehen zwei Arten des Wachstums zur Verfügung: das appositionelle Wachstum (von Seiten des Perichondriums her) oder das interstitielle Wachsen (durch Teilung der Chondroblasten innerhalb der „Knorpelmasse“). Das Fehlen des Perichondriums und die weitgehende Ausdifferenzierung der Chondrozyten ist einer der Gründe für die mangelnde Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes (4,6,18). Ein weiterer Grund ist die fehlende Vaskularisierung.

Da nur hyaliner Knorpel in gesunden Gelenken zu finden ist, wird im Folgenden sein Aufbau beschrieben: Hyaliner Knorpel enthält viel Grundmatrix, wenige Chondrone und maskiertes Kollagen Typ II. Hyaliner Knorpel kommt in Gelenken vor, in der Trachea und im Nasenskelett, aber auch in Rippen, Bronchien, Epiphysenfugen und Synchronosen. Im Alter treten sogenannte „Asbestfasern“ auf. Dies sind Kollagenfasern, die durch Verschleiß und Wasserverlust der Matrix lichtmikroskopisch sichtbar werden. Hyaliner Knorpel ist gekennzeichnet durch hohe Druckfestigkeit aber geringer Zugfestigkeit und Verformbarkeit.

Im Gegensatz zu hyalinem Knorpel ist Faserknorpel reich an Kollagen Typ I und kommt u.a. in den Menisken vor. Die mechanische Stabilität des Faserknorpels ist wesentlich geringer als die des hyalinen Knorpels

In histologischen Schnittpräparaten wird Gelenkknorpel grundsätzlich in vier voneinander abgrenzbare Schichten aufgeteilt: Der oberflächlichen Zone I, der mittleren Zone II, der tiefen Zone III und dem verknöcherten Übergang zum Knochen, Zone IV. Die physiologischen Verhältnisse im Gelenk stellen sich wie folgt dar:

Zone I (syn. Tangentialfaserschicht)

Die sehr kleinen, oberflächlichen Zone-I-Chondrozyten produzieren wie die Synovialmukosa ein besonderes Gleitprotein (Lubricin) zur Reduzierung des Gelenkreibens. Eine treffende Beschreibung dieser glatten Oberflächenbeschaffenheit bietet der Vergleich zu zwei Eisstücken, die mehr Reibung aufeinander erzeugen, als die Knorpelflächen in einem Gelenk.

In dieser Zone verlaufen die Kollagenfasern tangential und parallel zur Oberfläche. Die Chondrozyten der Zone I sind spindelförmig und ebenfalls parallel zur Oberfläche angeordnet. Der Proteoglykangehalt dieser Zone ist geringer als der der anderen Knorpelzonen. Mechanisch ist die Zone I besonders stabil gegenüber Scherbewegungen.

Zone II

Ab der darunter liegenden Zone II, nimmt der Durchmesser der Chondrozyten und der Kollagenfasern zu, während ihre Zugfestigkeit und Belastbarkeit abnehmen. Es werden auch vermehrt Proteoglykane gebildet. Ab dieser Zone tendieren die Knorpelzellen dazu, sich in einer säulenförmigen Anordnung zu arrangieren.

Zone III (syn. Radiärzone)

Im Vergleich zu allen anderen hat die Zone III die wenigsten Chondrozyten, jedoch die meisten Proteoglykane. Hier werden auch vermehrt Proteoglykanabbauprodukte gefunden, da sich diese Zone zu weit von allen Versorgungsstraßen entfernt befindet, um diese effektiv abtransportieren zu können. Die Kollagenfasern in diesem Bereich sind die dicksten des Knorpels und senkrecht zur

Oberfläche ausgerichtet. Zwischen Zone III und IV befindet sich ein Grenzgebiet, die „Tidemark“, die zwischen 2 und 3 μm dick ist.

Zone IV

In der Zone IV bildet sich der Übergang zum Knochen aus. Hier liegen durch Hypertrophie bedingte Riesenchondrozyten vor, die die sie umgebende Knorpelmatrix in Knochen umwandeln.

1.3 Epidemiologie des Knorpelschadens

Eine Verletzung des Gelenkknorpels kann nach mehreren Jahren zur Entwicklung einer Arthrose führen. Besonders schwerwiegend sind aus diesem Grund Verletzungen der Knie- und Sprunggelenke, da diese am häufigsten von traumatischen Knorpelschäden betroffen sind. Dabei ist es unerheblich, ob dieser Schaden durch ein einziges großes Trauma oder durch mehrere kleine, sich wiederholende Mikrotraumen entsteht. Werden Bänder oder Weichteile dieser Gelenke verletzt (z.B. bei direktem Trauma), kann man in bis zu 40% der Fälle auch von einer Mitbeteiligung des Gelenkknorpels ausgehen (126,134,137,147,149,151,155,161,164,168,174).

Durch Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ab einer Defektgröße von 2 cm² Beschwerden in Form von Schmerzen, Gelenkergüssen und Bewegungseinschränkungen auftreten. Wurde durch das Trauma Knorpelgewebe abgesplittert, kann dieser Knorpelkeil im schlimmsten Fall zu einer kompletten Blockade des Gelenks führen (125,135,148,151,157,158,160).

1.3.1 Gelenkknorpel und Verletzungen

Definition Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Knorpelverletzungen: Ist der subchondrale Knochen betroffen, spricht man von einem „Full-Thickness-Defekt“. Ist das Knochengewebe unverletzt, wird dieses „Partial-Thickness-Defekt“ genannt. In beiden Fällen reicht die Eigenelastizität des Knorpelbetts nicht mehr aus, um als Stoßdämpfer die Wucht des Traumas

abzufangen. Der Knorpel reißt ein. Versuche mit Schweineknorpel haben gezeigt, dass mit wachsendem Abstand von der Knorpeloberfläche der Elastizitätskoeffizient abnimmt. Das bedeutet, dass Knorpelgewebe immer von der Zone IV (subchondrale Knorpelschicht) in Richtung Oberfläche (Zone I) einreißt (52a).

1.3.1.a „Partial-Thickness-Defekte“

Diese Art der Verletzung ist die weitaus häufigere der beiden Verletzungsarten und gilt als ursächlich für eine spätere Arthrose. Der Defekt kann durch eine Reihe von Verletzungsmustern entstehen, wie sie häufig bei Traumen vorkommen, oder aber auch durch Fehlbelastung, die erst später zu einem Knorpelschaden führt. Auf diese Defektart soll sich auch der Inhalt dieser Dissertation konzentrieren.

1.3.1.b „Full-Thickness-Defekte“

Wird durch die Wucht der Verletzung der subchondrale Raum eröffnet, kommt es zur Einblutung mit Ausbildung eines Blutkoagels. Dieses kann undifferenzierte Stammzellen aus dem Markraum enthalten, die sich im Defekt unter bestimmten Bedingungen zu Faserknorpel weiter differenzieren können. Faserknorpel ist zwar reich an Kollagen I, hat aber nur wenig Matrix und ist daher sehr anfällig für Schäden durch Druck und Scherkräfte (150).

1.4 Klassifikation der Knorpeldefekte

1.4.1 Outerbridge Score

Die am häufigsten verwendete Klassifikation für Knorpelschäden ist die nach Outerbridge. Diese wird seit Anfang der 60er Jahre verwendet und ist eigentlich eine Abwandlung eines Score zur

Stadieneinteilung der hereditären Patellaerweichung
(Chondromalacia patellae). (121,122)

Tab. 1.1 Outerbridge Score

Grad 1	Knorpelerweichung
Grad 2	Oberflächliche Defekte und Fissuren
Grad 3	Tiefe Fissuren und Lappenbildung bis zum subch. Knochen
Grad 4	freiliegender subchondraler Knochen („Knorpelglätze“)

1.4.2 ICRS Score

Im Jahr 2000 produzierte die „International Cartilage Repair Society“ einen Bewertungsmaßstab zur Klassifikation von Knorpelschäden. Beurteilt werden die Knorpelschäden nach Tiefe, Lokalisation, Flächenausdehnung und Verlauf. Dieser Maßstab ist umfangreicher und lässt damit eine präzisere Einteilung als der Outerbridge Score zu. Siehe hierzu Tabelle 1.2.

Tab 1.2 ICRS Klassifikation der Knorpelschäden

Grad	0	normaler Knorpel
Grad	1	annähernd normaler Knorpel
		A: Aufweichung der Oberfläche
		B: Oberflächliche Fissuren der Zone I
Grad	2	nicht normaler Knorpel, Läsionen betreffen < 50% der Knorpeldicke
Grad	3	Schwerer Knorpelschaden
		A: Läsion betreffen > 50% der Knorpeldicke
		B: Läsion bis zur kalzifizierenden Zone
		C: Läsion bis zum subchondralen Knochen
		D: Ablösung des Knochen
Grad	4	schwerste Knorpelschädigung
		A: Oberflächlich
		B Tief

1.5 Therapiemöglichkeiten

1.5.1 Chirurgische Therapieoptionen

In der folgenden Tabelle sind die chirurgischen Therapieoptionen dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine Ansammlung

verschiedener Behandlungsansätze, von denen einige schon seit Jahrzehnten verwendet werden.

Tab. 1.3 Chirurgische Therapieoptionen

Förderung der Intrinsic Heilung	Arthroskopische Basistherapie	Biologische Knorpelregeneration
Pridie-Bohrung	Gelenklavage	Transplantation osteochondraler Zylinder (OATS)
Mikrofrakturierung	Debridement	Periost- /Perichondriumtransplantation
Abrasionsarthroplastik		Autologe Chondrozytentransplantation

1.5.2 Medikamentöse Therapie

Was in der Inneren Medizin schon lange Standard zur Behandlung rheumatischer Gelenkbeschwerden ist, wurde anfangs auch bei Gelenkknorpelverletzungen angewandt: Die intra-artikuläre Instillation von Kortisonpräparaten. Es stellte sich aber relativ schnell heraus, dass dieses zu einem Untergang des noch vorhandenen Knorpelgewebes führte (86). Auch die Hyaluronsäure, von der man sich viel versprach, konnte sich in placebo-kontrollierten Studien nicht durchsetzen. Trotz intensiver Suche nach einem Medikament, welches die Knorpelregeneration anregen sollte, blieben alle Versuche bislang erfolglos (120,141,145,146,152,171,173).

Fazit

Seit den 50er Jahren wurden verschiedene operative (wie z.B. die Pridie-Bohrung, die Mikrofrakturierung und Gelenklavage) und medikamentöse Verfahren zur Knorpelregeneration am Tiermodell untersucht. Manche dieser Verfahren gelangten über die experimentelle Phase hinaus zur Anwendung am Menschen. Diese Methoden haben sich entweder nur kurzfristig oder gar nicht bewährt, da sie nur ein minderwertiges Ersatzregenerat (Faserknorpel) schufen. In keinem Fall entstand vollwertiger und belastbarer hyaliner Knorpel. Die in den ersten zwei Spalten der oben vorgestellten Tabelle aufgeführten Methoden besitzen zum größten Teil ausschließlich historische Relevanz.

1.5.3 Neue Untersuchungen (biologische Regeneration)

1.5.3.a Transplantation osteochondraler Zylinder.

Die Idee, aus intakten Gelenkarealen Knorpelzylinder auszustanzten und in defekte Regionen zu verpflanzen (OATS genannt, Osteochondrales Autologes Transfer System), geht auf die Jahrhundertwende zurück und wurde in den 60er Jahren wieder aufgegriffen.

Die Idee bestand darin, einen Knochen-Knorpelzylinder mittels einer Fräse aus einem intakten Gelenkbereich zu entfernen und in den vorbereiteten Defekt einzusetzen. Bevorzugt werden hierfür Regionen verwendet, die einer geringeren Gelenkbelastung ausgesetzt sind. Geeignet sind die laterale Patella und die Außenbezirke des femoro-patellaren Gleitlagers.

Eine Abwandlung des eben genannten Prinzips macht man sich bei der ‚Mosaikplastik‘ zunutze (45). Hierbei können auch großflächige Defekte bis zu 9 cm² abgedeckt werden. Dabei werden mehrere Zylinder unterschiedlichen Durchmessers in dem Defekt verankert.

In Ungarn wurde durch Hangody dieses Verfahren bei Defekten durchgeführt, die bis zu 8,5 cm² groß waren. Von den 57 untersuchten Patienten wurden in 91% der Fälle gute bis sehr gute Ergebnisse nach drei Jahren erreicht (46,47).

Im Jahr 2000 sorgte diese Technik schließlich für Schlagzeilen, als Äschlimann et al. eine Untersuchung am Schaf publizierte, die zeigte, dass der ehemals gesunde Randwallknorpel um den Defekt herum degenerierte und „...in den Defektraum kippte“ (1,154,160,163,166). Dies lag zum einen an dem Operationstrauma, bei dem Knorpelzylinder in den Defekt verkeilt wurden, und andererseits auch daran, dass das Transplantat niedriger gelegen war als das umliegende Gewebe. An der ursprünglichen Entnahmestelle des gesunden Knorpels kam es oft zu Einblutungen, Schmerzen und einer generellen Instabilität des gesamten Gelenks.

Die wenigen Publikationen, die von der Anwendung dieses Verfahrens beim Menschen berichten, zeigen aber in einem Zeitraum von bis zu 7 Jahren postoperativ in 90% der Fälle gute bis sehr gute Ergebnisse (160,163).

Es gibt bis heute nur zwei Studien, die die Mosaikplastik mit der OATS vergleichen. Bei einer von diesen, mit einem follow-up von knapp 20 Monaten, zeigte die Gruppe um Bentley bei 58 Patienten

mit einer OATS mit 88% gute bis sehr gute Ergebnisse im Vergleich zur Mosaikplastik (10,31)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch dieses Verfahren kleine bis mittelgroße Defekte mit Knorpelzylindern abgedeckt werden können, dieses aber nicht ohne traumatischen Schaden der Spenderzone erfolgt. Dadurch werden wiederum neue Schwachstellen in der Gelenkintegrität geschaffen. (7,8,9,31).

1.5.3.b Periost- und Perichondriumtransplantation

Bereits 1925 entdeckte Häbler, daß die innerste Schicht des Periost und des Perichondriums (das Kambium) eine lebenslange Fähigkeit besitzen, hyalinen Knorpel und Knochen neu zu synthetisieren (45). Beruhend hierauf, wurden mehrere Untersuchungen angestellt.

Die Ergebnispublikationen sind allerdings widersprüchlich: 1990 beschrieb die Arbeitsgruppe um Homminga ihre guten Ergebnisse nach zwei Jahren Beobachtung (55,56). 1997 widerlegte Bouwmeester dieses jedoch, als er nach vier Jahren Beobachtungszeit in 55% der Fälle schlechte Ergebnisse vermeldete (6). Ursachen waren ein überschießendes Wachstum des Transplantats, oder auch eine Verknöcherung desselben. Um diese Vorgänge zu verhindern, bzw. zu verlangsamen, wurde intensiv weiter geforscht: Gewisse Erfolge erzielten der Einsatz von Wachstumshormonen, Polilaktitsäure, die Beschichtung des Transplantates, aber auch die „kontinuierliche passive Bewegung“. O'Driscoll und Salter zeigten, dass gerade der letzte Punkt einen chondrogenen Effekt bewirkte (104,113,114,115,116,117,118).

In einer Metaanalyse, in der 10 Studien aus dem Zeitraum von 1981 bis 1999 evaluiert wurden, stellte Angermann 2000 diesem Verfahren aber eine insgesamt schlechte Beurteilung aus mit wenig Perspektive (4). Daher wird sie z. Z. auch nur für klinische Studien eingesetzt, nicht aber in kurativer Absicht.

1.5.3.c Autologe Chondrozyten Transplantation (OATS)

Die Forschung auf diesem Gebiet begann erst relativ spät. Nach der technischen Ausreifung und ersten Ergebnissen am Menschen, wurde dieses Verfahren 1994 in Schweden von Brittberg und Mitarbeitern vorgestellt (8,11,12,13,14,15). An 101 Patienten, die zwischen 1987 und 1995 eine OATS erhalten hatten, wurden die arthroskopischen, histochemischen und klinischen Ergebnisse evaluiert. An seinen Patienten beurteilte Brittberg die Ergebnisse in 92% der Fälle als „sehr gut“ und konnte dies mit 37 Knorpelproben gut belegen (14,15). 1996 wurden dann von derselben Arbeitsgruppe die Ergebnisse dieser Technik an Kaninchen vorgestellt (11).

In dieser Untersuchung setzte Brittberg den Tieren künstliche Defekte mit einem Durchmesser von 3 mm ein. Der Defekt reichte bis in das Subchondrium. Die Ergebnisse nach einem Jahr beschrieb er als „...qualitativ und quantitativ besser“ als in seinen Vergleichsgruppen, die nur ein Periostlappen oder einen unbehandelten Defekt eingesetzt bekamen.

Kritik gab es von anderen Autoren, da er angab, für seine Tierversuche nur ausgewachsene Tiere (die eine geringere Regenerationsfähigkeit besitzen als junge Tiere) benutzt zu haben. Das Alter der Tiere ließ sich aber radiologisch und histologisch nicht nachweisen. Weitere Kritikpunkte entstanden, als die Brittberg-

Technik an Hunden untersucht wurde. In diesem Fall wurde der subchondrale Raum aber nicht eröffnet (3,9,10,153,167). Es konnten daher nun auch keine Knochenmark-Stammzellen in den Defekt einwandern. Breinan et al. (7,10) untersuchte dies weiter, und fand nach 18 Monaten keinen signifikanten Unterschied der Methode zu den unbehandelten Defekten oder den Periosttransplantierten.

Trotzdem wird die OATS als ein zukunftssträchtiges Verfahren betrachtet. (41,43). Letztendlich gibt es noch Fragen, die hinsichtlich der Indikation, der Defektgröße und Tiefe des Knorpelschadens geklärt werden müssen.

1.6 Das Ziel dieser Versuchsreihe, Fragestellung

In der aktuellen Literatur wird viel über Versuche zur Knorpelregeneration am Tiermodell berichtet. Dabei handelt es sich zum größten Teil um „Full-Thickness-Defekte“, die aber beim Menschen eher selten vorkommen (22,25,150). Typischerweise entstehen hier nach einem Trauma größtenteils „Partial-Thickness-Defekte“. Es gibt nur wenige Publikationen über das Verhalten dieses Defekttypus, bei dem der subchondrale Raum nicht eröffnet wird. Das Ziel dieser Untersuchung bestand in der Beobachtung der Knorpelregeneration und Charakterisierung des Regeneratgewebes von 4 mm „Partial-Thickness-Knorpeldefekten“ anhand des Schafskniemodells. Die Fragen, die mit dieser Untersuchung beantwortet werden sollen, sind:

1. Wie entwickelt sich ein unbehandelter und umschriebener Knorpeldefekt am medialen Kondylus des Schafskniegelenkes makroskopisch und mikroskopisch im zeitlichen Verlauf?
2. Ist das Schaf als Versuchstier zur Beurteilung der Regeneration von isolierten Knorpeldefekten geeignet?

Diese Untersuchung ist Teil eines koordinierten Großtierversuchs, in dem verschiedene Regeneratansätze unter tierexperimentellen Bedingungen getestet wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Von der Bezirksregierung Köln wurde der Versuch, gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes, unter dem Aktenzeichen 23.203.2-K 34/00 angemeldet und genehmigt.

Beteiligt an der Untersuchungsreihe waren 24 ausgewachsene, weibliche Schafe. Diese wurden randomisiert auf sieben Untersuchungsgruppen verteilt. Siehe hierzu die Tabelle 2.1

Tab. 2.1. Anzahl und Aufteilung der Versuchstiere

Untersuchungszeitraum (in Wochen)	4	6	8	12	16	26	52
Anzahl der Versuchstiere (n)	2	3	3	3	2	3	4
Verluste (n)	0	0	0	0	0	3	1

Bei den erwähnten Verlusten handelt es sich um Todesfälle. In allen Fällen wurden von Tierärzten Obduktionen durchgeführt. Es konnte aber kein Bezug zu den Operationsverfahren hergestellt werden.

Für die Versuchsreihen gab es keine eigens gezüchteten Tiere. Aus einer großen Schafherde wurden insgesamt 24 weibliche Tiere (der Rasse Suffolk) ausgewählt. Sie waren alle älter als sechs Jahre und damit ausgewachsen. Keines war trächtig. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Tiere eigens mit einem Halsband als auch

mit einer Ohrmarke versehen. Diese behielten sie bis zum Ende bei.
Siehe hierzu untenstehende Tabelle.

Tab. 2.2 Verteilung und Identifikation der Versuchstiere

Gruppennummer	Halsbandnummer	Opferungsdatum	Gruppenzugehörigkeit
LD 9	HB LD 9	17.04.2002	4 Wochen
LD 10	HB LD 10	17.04.2002	4 Wochen
LD 6	HB 63 Rot	16.04.2002	6 Wochen
LD 12	HB LD 12	17.04.2002	6 Wochen
LD 8	HB LD 8	17.04.2002	6 Wochen
LD 4	HB 60 Rot	17.04.2002	8 Wochen
LD 5	HB 41 Rot	17.04.2002	8 Wochen
LD 11	HB 1 Gelb	17.04.2002	8 Wochen
LD 3	HB 4 Gelb	?	12 Wochen
LD 7	HB 49 Rot	16.4.2002	12 Wochen
LD 13	HB 5 Gelb	17.04.2002	12 Wochen
LD 1(Y 014)	HB 59	17.12.2001	16 Wochen
LD 2	HB 3 Gelb	18.12.2001	16 Wochen
Y 007	HB 82	14.12.2001	26 Wochen
Y 008	HB 58/54	14.12.2001	26 Wochen
Y 020	HB 64	05.12.2001	26 Wochen
Y 021	HB 83	07.12.2001	26 Wochen
Y 022	HB 78	14.12.2001	26 Wochen
Y 023	HB 94	14.12.2001	26 Wochen
X 001	HB 80	02.05.2001	52 Wochen
X 002	HB 74	02.05.2001	52 Wochen
X 006	HB 72	30.04.2001	52 Wochen
X 010P	HB 63	21.06.2001	52 Wochen
X 018	HB 95	03.05.2001	52 Wochen

LD: Unbehandelter Defekt HB: Halsbandnummer X/Y: Gruppenzugehörigkeit

Wenn sie nicht in Köln zur Untersuchung benötigt wurden, standen sie bei dem Landwirt Herrn Kutscheid in Hopperath / Eifel auf der Weide. Die nötige Pflege und Gesundheitsuntersuchungen wurden von den Versuchsteilnehmern in wöchentlichen Abständen durchgeführt. Der Tierarzt vor Ort war Dr.med.vet. Bürgener aus Kelberg / Eifel.

Mit einem Durchschnittsgewicht von 74,7 kg und einer Schulterhöhe von 70,8 cm hatten sie ideale Größen und Gewichtsproportionen. Schafe sind mit zwei Jahren ausgewachsen und geschlechtsreif.

Die Tiere wurden für die Operationen in Sechsergruppen in das Institut für Experimentelle Medizin der Universitätskliniken Köln verbracht, wo sie während der Zeit in einem angegliederten Freigehege gehalten wurden. Dort standen sie unter Beobachtung von Tierärzten und –pflegern. Nach einer Operation wurden sie zur Überwachung bis zu 72 Stunden postoperativ in eine Box gebracht und versorgt, bevor sie wieder in die Eifel verbracht wurden.

2.2 Versuchsablauf

In einem Eingriff wurde in das mittlere Drittel der medialen Kondyle ein standardisierter Defekt gesetzt. Der Knorpel ist hier am dicksten, und dieses Areal ist der Hauptbelastungspunkt des Gelenks. (Untersuchungen an Schafskadavern haben gezeigt, dass die darunter liegende Knochenlamelle mit der Belastungsstärke korreliert. Als weniger beansprucht gelten die medialen und lateralen Ränder des femoralen Gleitlagers.)

Durchgeführt wurde eine anteromediale Miniarthrotomie. Durch Beugung des Knies konnte die Belastungszone der medialen Femurkondyle dargestellt werden. Nun wurde ein Defekt von 4mm

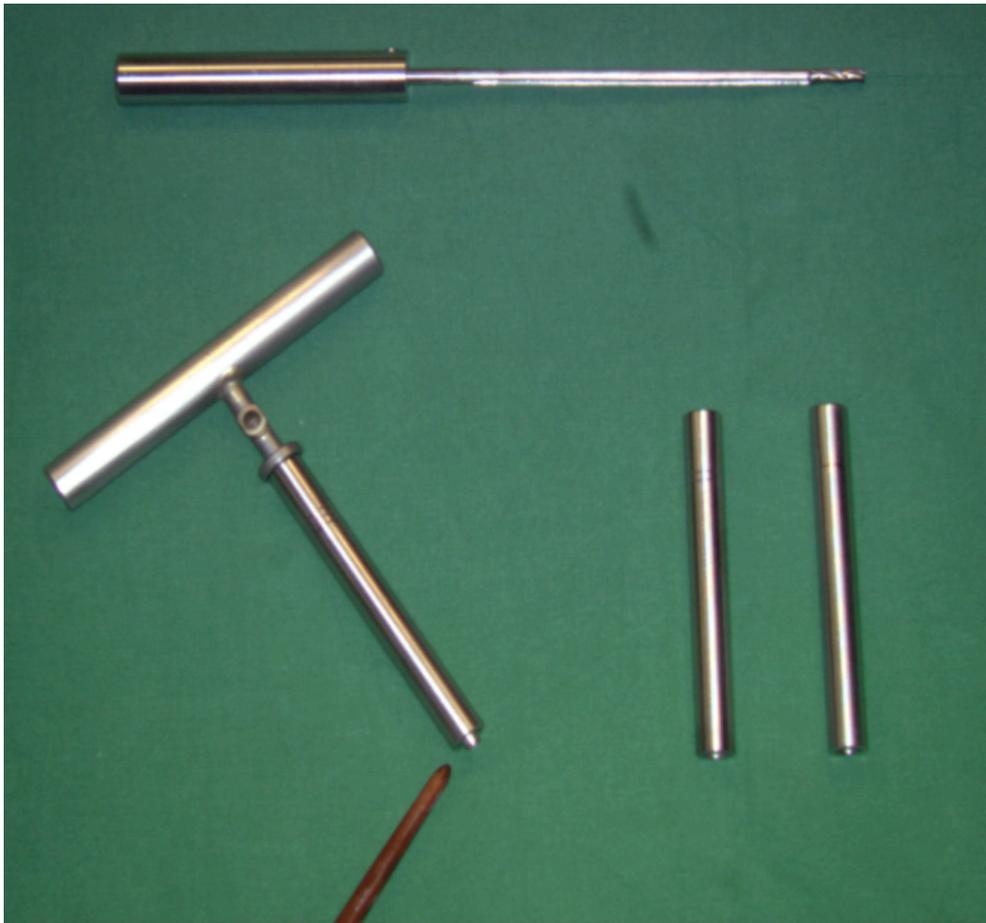


Abb. 2.1 Detailaufnahme der Stanze. Diese Stanze wurde eigens für die Untersuchungsreihe entwickelt. Sie besteht aus einem T-förmigen Hohlmeißel in welcher eine Fräse (am oberen Bildrand sichtbar) eingeführt wurde. Die Hülsen auf der rechten Bildseite dienen zur Arretierung auf der Knorpeloberfläche. (Entwurf und Durchführung der Entwicklung durch PD Dr. med. A. Jubel)

Durchmesser in den Kondylenknorpel gestanzt. Wichtig war, dass der subchondrale Markraum nicht eröffnet wurde. Um dies zu gewährleisten, wurde für den Versuch eigens eine Präzisionsstanze entwickelt. Für die oben aufgeführte Gruppe war nach diesem Eingriff der Versuch beendet. Von nun an wurde der intrinsische Heilungsverlauf abgewartet.

2.3 Operationsablauf: Narkoseverfahren

Um die Tiere zu sedieren, wurde mit einer Venenverweilkanüle (Größe: 18G) die linke Vena cephalica antebrachii punktiert, über welche Disoprivan® (Propofol) 3-7mg/kg/KG infundiert wurde. Nach Körpergewicht dosiert, war dies zwischen 400 bis 650mg i.v. pro Tier. Maßstab für eine ausreichende Narkosetiefe waren verstärkter Speichelfluss, Nachlassen des Kaumuskulaturtonus und Verdrehen der Bulbi. Vor der Operation wurde jedes Tier noch einmal gewogen. Hier lag der Median bei 74.7kg.

Auf dem Operationstisch wurde das Versuchstier in Rückenlage mittels eines veterinärmedizinischen Larynxspatels (Typ-4 Miller-Laryngoskop mit 28 cm langem und geraden Spatel) intubiert. Eingesetzt wurde der normierte Hi-Lo Tubus, Durchmesser 8,5 mm der mit 15 ml Luft geblockt wurde.

Die Beatmungsparameter waren: AMV 650 – 850 ml/min, ein Beatmungsdruck < 25 mbar, FiO₂ 30 – 40%, AF 17 – 20 min⁻¹. Als Inhalationsanästhetikum wurde 4% Isofluran verwendet. Unmittelbar nach Intubation erhielten alle Tiere 0,3 mg Buprenorphin (Temgesic®) i.v. und während der Operation 2 g Metamizol (Novalgin®, ein Analgetikum und Antipyretikum) neben 100 mg Tramadol (Tramal®). Diese Analgetika wurden nach Ausleitung

durch eine intramuskuläre Gabe von 2,5 g Metamizol in den Hinterlauf ergänzt. Als Antibiotikaphylaxe wurden 2 g Cephazolin (Cephazolin Fresenius®) i.v. gegeben. Während der gesamten Operation wurden Sauerstoffsättigung und pH durch Blutgasanalysen überwacht. Die Herzfrequenz lag mit 60 – 70 Schlag pro Minute im Normbereich. Die Narkosezeiten betragen, je nach Operationsdauer, zwischen 20 und 60 Minuten.

Als problematisch erwies sich die natürliche Fermentation von Pflanzenresten in den Mägen der Tiere, welches zu Blähungen postoperativ führte. Diesem konnte durch Einlage eines Pansenschlauchs (Durchmesser 15 mm) und Beißkeil präoperativ begegnet werden.

Für alle Operationen wurde ein komplettes Operationsteam mit Operateur, Assistent, Instrumenteur und Narkosearzt aufgestellt. Über jede Operation wurde ein Protokoll geführt. Für den Operationssaal und das Personal galten die gleichen sterilen Bedingungen, gemäß den Richtlinien für Operationen.

Sämtliche Untersuchungen, Versuche und Operationen wurden im Institut für Forschung und Experimentelle Medizin an den Universitätskliniken zu Köln durchgeführt. Dieses Institut, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Fischer, verfügte über die geeigneten Kapazitäten, Infrastruktur und über die Tierärzte.

2.4 Operationsablauf

Nach Intubation wurden die Schafe in Linksseitenlage verbracht. Der rechte Hinterlauf wurde bis zur Flanke geschoren und mit Betaisadona®-Seife gewaschen. Die Hautdesinfektion erfolgte mit Cutasept-G®. Der Lauf mit dem Huf wurde mit einer sterilen Einmal-Stockinette (Firma Hartmann®) umwickelt.



Abb. 2.2 Operationsvorbereitung. Die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Versuchstier wurde rasiert, gewaschen, abgedeckt und der rechte Hinterlauf, bis auf das relevante Kniegelenk, mit einer sterilen Stockinette eingewickelt.

2.4.a Arthrotomie

Über einen bis zu 9 cm langen Hautschnitt von dem rechten Patellaunterrand bis zur Tuberositas tibiae erfolgte der anteromediale Zugang zu dem Gelenkraum. Es handelt sich hierbei um eine so genannte „Miniarthrotomie“. (Der Standardzugang über einen anterolateralen Zugang mit Patellamobilisation wurde hier verlassen, da die laterale Kondyle des Schafsknies durch die Sehne des M. extensor digitorum longus bedeckt wird (3). Durch Vorversuche konnte auch gezeigt werden, dass die Belastungszone der medialen Femurkondyle durch diesen Zugangsweg besser zu erreichen war.)

Mit einem ERBE®-Elektrokauter wurde das subkutane Fett, die Faszie, die Gelenkkapsel und Quadrizepsmuskulatur durchtrennt. Per Scherenschnitt wurde die Synovialmembran zum Gelenkraum vorsichtig durchtrennt. Die Blutstillung erfolgte mit einem bipolaren ERBE®-Elektrokauter. Nach Eröffnung des Gelenkraumes wurde das Knie bis zu 80° angewinkelt um einen optimalen Zugang zur medialen Femurkondyle zu haben.

2.4.b Platzierung des Knorpeldefekts

Für die Versuchsreihe wurde eine Präzisionsstanze eingesetzt. Diese hatte einen Innendurchmesser von 4mm und wurde eingesetzt, um einen (kreisrunden) Defekt ins Zentrum der medialen Femurkondyle zu setzen. Wichtig war, nur die Zonen III und IV zu erreichen. Die Stanze wurde senkrecht bis zur Knorpel-Knochengrenze in den Knorpel gedrückt, um dann mit einer Halterungshülse an der Knorpeloberfläche arretiert zu werden. (Somit wurde ein Eröffnen des Subchondralraums verhindert.) Durch

eine spezielle Fräse, die als Seele in die Stanze geführt wird, wurde der Knorpel entfernt.

Für die Versuchstiere dieser Defektgruppe war damit die Operation abgeschlossen. Es folgte der schichtweise Wundverschluss. Der anschließende Wundverschluss erfolgte über resorbierbare 3/0 Fäden und einem auf die Haut aufgetragenen Sprühpflaster (Aluderm®). Die Stanze, aus rostfreiem Edelstahl hergestellt, wurde nach jeder Operation gewartet und sterilisiert.

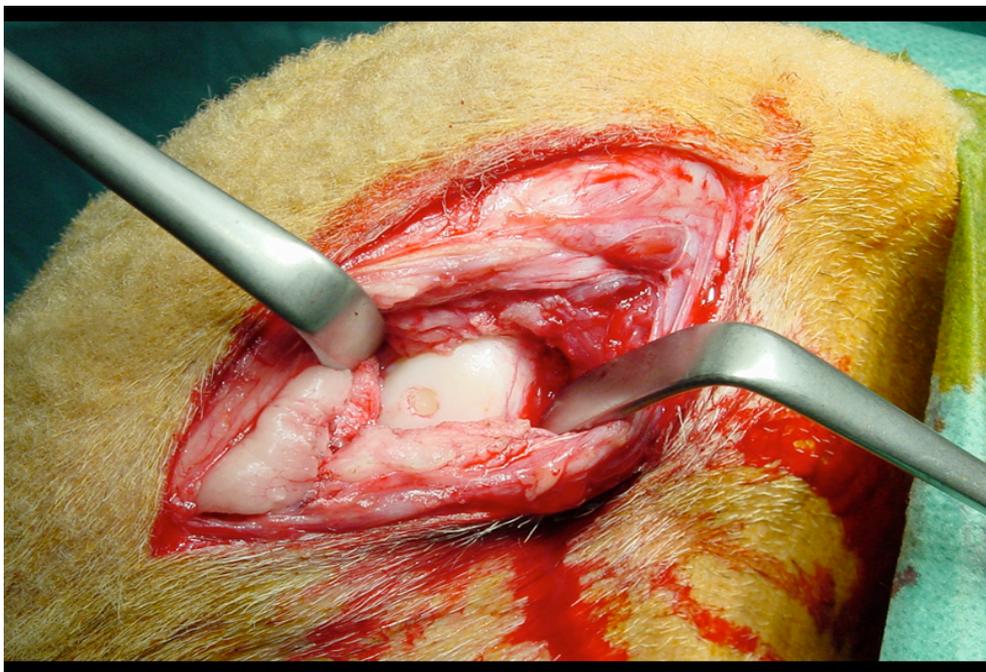


Abb. 2.3. Intraoperative Darstellung nach Setzen des 4mm Defektes. Der Hinterlauf musste im Kniegelenk angewinkelt werden, um somit die bestmöglichen Sichtverhältnisse auf den Situs zu bekommen. Man beachte, dass das Schafsknie nicht bis auf die blanke Haut rasiert wurde, da dies zum einem schwer möglich war (wegen der Verletzungsgefahr), zum anderen auch sehr zeitintensiv. Interessanterweise gab es in keinem Fall eine oberflächliche Wundheilungsstörung, Wundinfektion oder Nahtdehiszenz.



Abb. 2.4 Intraoperative Darstellung nach Setzen des 4mm Defektes. Auch wenn alle Versuchstiere der gleichen Rasse (Suffolk) angehörten, gab es Variationen des Fellkolorits.

Für verschiedene Tiere galten sowohl für die Operation als auch die letztendliche Opferung (nach 4, 6, 8, 12, 16, 26 und 52 Wochen) verschiedene Termine. Durch eine umsichtige Planung konnten diese im Großen und Ganzen eingehalten werden.

2.5 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Die Proben waren „verblindet“, bevor sie jeweils zwei, von dieser Forschungsarbeit unabhängigen, Untersuchern vorgelegt wurden.

Die Schafe wurden zum Versuchsende (dem errechneten Opferungstermin) in eine tiefe Narkose versetzt und dann getötet. Durch eine Tierärztin des Instituts für Experimentelle Medizin wurden im Anschluß daran die beiden Hinterläufe jedes Tieres am Hüftgelenk exartikuliert. Die Hinterläufe wurden provisorisch gereinigt und unfixiert in das Radiologische Institut der Universitätskliniken Köln gebracht, wo sie per MRT durchleuchtet wurden. Erst hiernach wurde das Gelenk erneut eröffnet und die rechte mediale Femurkondyle entfernt. Als weiterführende Untersuchungen wurden durchgeführt:

Eine mechanische Stabilitätsmessung des (noch immer unfixierten) Defektrandes. Dies erfolgte mit dem Artscan 200®-Indenter. (Als Kontrolle und Vergleich für alle weiteren Messungen, wurde in allen Fällen auch die linke Femurkondyle explantiert und den gleichen Untersuchungen ausgesetzt.) Da aber der Verfall des Gewebes rapide einsetzte, mussten die Kondylen zur Konservierung in Formalinpuffer eingelegt werden. Die Proben wurden anschließend abfotografiert und vermessen, um später durch weitere Spezialverfahren fixiert zu werden. Letztendlich konnten alle Femurkondylen zu histologischen Präparaten verarbeitet werden.

Tab. 2.3 Standardisierter Auswertungsablauf nach der Opferung

1.	Kernspintomographie (MRT)
2.	Makroskopische Beurteilung
3.	Digitale Fotodokumentation
4.	Mechanische Stabilitätsmessung
5.	Fixierung und Einfärbung der Histologien
6.	Digitale Defektvermessung
7.	Histologische Auswertung

2.5.1. Kernspintomographie (MRT)

Durch Kooperation mit dem Institut für Radiologische Diagnostik der Universitätskliniken zu Köln, stand ein 1,0 T Gerät vom Typ Gyroscan NT 6.7.2 der Firma Philips® zur Verfügung. Für die Untersuchungen wurde eine Extremitätenspule („Standard Imaging Knee Coil“) verwendet. Dafür musste der Hinterlauf in maximaler Beugung auf dem Untersuchungstisch fixiert werden, um die bestmögliche Sicht auf die Hauptbelastungszone zu bekommen und um Überlagerungen durch den Weichteilmantel zu vermeiden. An jeder Probe wurden zwei Protokolldurchläufe durchgeführt: Als erstes eine T1-Durchleuchtung, gefolgt von einer T2-gewichteten Serie, beide jeweils in sagittaler Schnitfführung. Bei der T1-Gewichtung waren jeweils 75 Minuten pro Durchlauf anberaumt. Hierbei handelt es sich um eine „Fast Field Echo Fat Supression“. Die T2-Gewichtung wurde als „Turbo Spin Echo“ durchgeführt, mit

einer Untersuchungszeit von 6 Minuten und 34 Sekunden pro Durchlauf.

Beurteilt wurden in T1 und T2 die Knorpeldecke der medialen Femurkondyle, während fragliche Ödembildungen nur in der T2-Gewichtung zu sehen waren. Zusätzlich wurde die Dicke des Knorpels im Defektzentrum als auch des Defektrandes gemessen.

Dargestellt wurden die unbehandelten Defekte als Unterbrechung in den hellen Knorpellinien (in der T1-Gewichtung) oder als lokale Signalverstärkung, die durch eine Ansammlung von Synovialflüssigkeit in dem Defektraum angezeigt wurde (bei der T2-Gewichtung). Mit Hilfe des digitalen Vermessungsprogramms „Osiris®“ war es möglich, durch das Ausmaß und die Tiefe der Ödeme und Flüssigkeitsansammlungen Rückschlüsse auf die Defektgrößen ziehen zu können.

Zur Auswertung der MRT-Bilder wurde ein Bewertungsschlüssel benutzt, den Lang et al. in Anlehnung an den Outerbridge Score entwickelte. Hierbei werden 4 Stadien unterschieden, wie in der Tabelle dargestellt werden.

Tab. 2.4 MRT Score zur Knorpelbeurteilung

	Bewertungskriterium	Punktzahl
Grad 0	Normaler Knorpel	0
Grad 1	Substanzverlust < 50% der Gesamtknorpeldicke	1
Grad 2	Substanzverlust > 50% der Gesamtknorpeldicke	2
Grad 3	100% Substanzverlust	3

Des Weiteren wurde noch ein Score für die unter dem Knorpeldefekt liegenden Knochenschäden eingesetzt.

Tab. 2.5 MRT Score zur Beurteilung des subchondralen Knochens

	Bewertungskriterium	Punktzahl
Grad 0	Kein Knochenödem	0
Grad 1	Flüssigkeitsansammlung im Defekt	1
Grad 2	Geringes Ödem, das < 0,5cm in die Tiefe geht	2
Grad 3	Schweres subchondrales Ödem	3

Es wurden Bilder mit einer Schichtdicke von 3 mm in sagittaler Schnittführung hergestellt. Mit einem Sichtradius von 18 cm und einer Matrix von 256 x 256 konnte eine Auflösung von 0.7 x 0.7 Pixel erreicht werden.

2.5.2 Makroskopische Beurteilung

2.5.2.a Explantation der Femurkondylen

Nach der Durchführung der MRT-Sequenzen, wurde an dem noch unfixierten Hinterlauf der Gelenkraum eröffnet und mittels eines Meißels die mediale Femurkondyle frei präpariert und entfernt. Das dabei gewonnene Gelenkfragment hatte eine Kantenlänge von knapp 2 cm x 2 cm. Der Knorpeldefekt lag im Zentrum des Fragments.

2.5.2.b Bewertung durch den ICRS Score

Die Beurteilung der Knorpelregeneration erfolgte mit Hilfe des „International Cartilage Repair Assessment Score“-Protokolls. Hierbei handelt es sich um ein Bewertungsinstrument, das von der „International Cartilage Repair Society“ empfohlen wird, um Knorpelschäden und deren Behandlungserfolge messbar zu machen.

Die makroskopischen Kriterien zur standardisierten Beurteilung erfassen I) den Grad der Defektausfüllung, II) das Erscheinungsbild der Regeneratoberfläche und III) die Integration des Regenerats in den umliegenden Knorpel. Die folgende Tabelle führt die einzelnen Kriterien mit deren Abstufungen auf.

Tab. 2.6 ICRS Cartilage Repair Assessment Score

Kriterium	Parameter	Punktzahl
Füllung der Defekttiefe	Gleiches Niveau wie Knorpel am Defektrand	4
	75% Ausfüllung des Defekts	3
	50% Ausfüllung	2
	25% Ausfüllung	1
	0% Ausfüllung	0
Integration an der Grenze zum Nachbarknorpel	Komplette Integration	4
	Lücke unter 1 mm	3
	75% integriert, 25% mit Lücke > 1 mm	2
	50% integriert, 50% mit Lücke > 1 mm	1
	25% integriert bis keine Integration	0
Makroskopische Erscheinung	Intakte glatte Oberfläche	4
	Ausgefranzte Oberfläche	3
	Wenige, kleine Fissuren / Spalten	2
	Kleine, aber tiefe Fissuren	1
	Komplette Degeneration des Transplantats	0
Gesamtbewertung	1° - normal	12
	2° - fast normal	11 – 8
	3° - anormal	7 – 4
	4° - grob anormal	3 – 1

2.5.3. Vermessung durch Digitalfotografie

Die Digitalbilder wurden mit einer Sony® Cyber-shot 3,2 Mega Pixel Kamera angefertigt, bei einer Auflösung von 2240 x 1280 dpi. Als bildverarbeitendes Programm erbot sich die Photoshop® Version 6.0. Sämtliche Aufnahmen wurden mit einer Millimeterskala versehen, um eine Ausmessung zu ermöglichen. Mit dem Programm VistaMetrix®, Version 1.20.0 (©2003,2004 SkillCrest® LLC) war eine Flächenausmessung der Defektgröße möglich. Durch Umfahren der Defektränder und unter Ausnutzung einer linearen Zwei-Punkt-Abstandsmessung, konnte der Flächeninhalt und der Durchmesser relativ genau berechnet werden. Der Radius des am Tag 0 hergestellten Stanzdefekts betrug 2 mm. Somit errechnete sich am Tag 0 eine Defektfläche von $A = 0,13 \text{ cm}^2$.

2.5.4. Mechanische Stabilitätsprüfung

Eine finnische Arbeitsgruppe um Jurka Juvelin hatte für ihre Arbeiten ein „Indentations-Instrument“ entwickelt, welches verwendet wurde, um die biomechanische Stabilität in dem Knorpel des Defektrandes zu messen (72,73). Dieses Gerät trägt die Bezeichnung „Artscan 200®“. Der für die vorliegende Untersuchungsreihe benutzte „Indenter“, mit der Seriennummer 20126, ist eine spezielle Weiterentwicklung dieses ursprünglichen Gerätes. Mit diesem konnten nun auch Messungen an sehr dünnen Knorpelproben erfolgen.

Kernstück des Gerätes ist ein ca. 150 mm langer mal 5 mm dicker Messstab (engl. „Rod“) der an seiner Spitze einen „Indenter“ trägt. Dies ist ein kleiner 0,1 mm langer Zapfen, der beim Messen auf den

Knorpel gedrückt wird. Über die Kraft (in Newton), die es bedarf den Indenter einzudrücken, wird die Festigkeit bzw. mechanische Stabilität der Knorpeloberfläche gemessen. Über ein Grafikprogramm (Artskan 200®, Version 2.1.1) wird diese Kraft auf einen zu dem „Indenter“ gehörenden PC übertragen und dokumentiert.

Gemessen wurde der Defekt an fünf Punkten. Hierzu wurde die Femurkondyle in vier Quadranten aufgeteilt und jeder Quadrant separat ausgemessen (ca. 5 mm vom Defektrand entfernt). Dann wurde die Defektmitte ausgemessen. Letztendlich gab es pro Knorpelstück fünf Messwerte. Als Kontrolle wurde die linke (unverletzte) Femurkondyle desselben Versuchstieres ausgemessen.

Der „Indenter“ wurde eingestellt, um 5 Messungen pro Sekunde durchzuführen. Die Messzeit lag bei 20 Sekunden. Aufzeichnungen begannen ab einer Kraft von 6 N. In den 6 bis 8 Durchgängen, die pro Kondyle durchgeführt wurden, wurde ein Mittelwert berechnet, welcher über das Programm SPSS® auf Windows übertragen werden konnte.

2.5.5 Fixierung und Einfärbung der Histologien

Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (von 30 % bis 100%), wurde den Proben Flüssigkeit entzogen. Anschließend wurden sie für zweimal 4 Tage bei 4°C in Methylmetacrylat gelagert. Danach folgte eine mehrstufige Polymerisation:

Zunächst wurden die Proben mit einer „weichen“ Lösung aus 100 ml Methylmetacrylat, 3,5 g Benzoylperoxid und 25 ml Nonylphenol 7 Tage lang bei 4°C versetzt. Nach Ablauf derselben, wurden die Präparate in einem Wasserbad bei 37°C mit einer „harten“ Lösung

aus 100 ml Methylmetacrylat, 4 g Benzoylperoxid und 0,5 g Polyethylenglycol gehärtet. Im Anschluß hieran wurden die Blöcke für 24 Stunden in einem Wärmeschrank bei 60°C endgültig ausgehärtet. Mittels eines Zwei-Komponenten-Klebers konnten die Proben nun auf die Einspannvorrichtung für die Diamantsäge befestigt werden.

Durch eine besondere Vereinbarung mit dem Veterinärmedizinischen Institut der Universität Zürich / Schweiz, konnte die Forschungsgruppe dort histologische Dünnschnitte der Kniegelenkspräparate anfertigen lassen (Präparatdicke: 0,5 mm). Dieses Institut verfügt nicht nur über die größte Erfahrung diesbezüglich, es besitzt auch die nötige Apparatur, um die Schnittserien durchführen zu können. Von jedem Defekt konnten somit 6 bis 8 Schnittpräparate angefertigt werden. Diese wurden dann anschließend entweder mit Giemsa, Masson-Goldner, Safranin-O oder mit Toluidin-Blau eingefärbt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte in Köln.

2.5.5.a ICRS VHA (Visual Histological Assessment) Score

Die einzelnen Schnittserien wurden mittels des „ICRS Visual Histological Score“ (und seiner Erweiterung, welche eine Beurteilung von Untersuchung an Tierpräparaten erlaubt) bewertet. Beurteilt und verglichen wurden sechs Kriterien: I) Oberfläche des Knorpels, II) die Matrixqualität, III) die Chondrozytenverteilung, IV) die Zellvitalität, V) subchondrale Knochenqualität und VI) die Mineralisation des Knorpels.

Tab. 2.7 ICRS Visual Histological Score

Kriterium	Parameter	Punktzahl
Oberfläche	Glatt	3
	Diskontinuierlich / irregulär	0
Matrix	Hyaliner Knorpel	3
	Hyaliner - / Faserknorpel	2
	Faserknorpel	1
	Bindegewebe	0
Zellverteilung	Säulenartig	3
	Mischung aus Säulen / Cluster	2
	Cluster	1
	Einzelne, unorganisierte Zellen	0
Zellvitalität	Überwiegend vitale Zellen	3
	> 10% vitale Zellen	1
	< 10% vitale Zellen	0
Subchondraler Knochen	Normal	3
	Vermehrtes Remodelling	2
	Nekrose / Granulationsgewebe	1
	Kallus / Fraktur	0
Knorpelmineralisation	Normal	3
	Heterotop	0

Eine Mineralisation des Knorpels ist immer als pathologisch anzusehen.

Jeder dieser Eigenschaften wird einzeln und unabhängig voneinander bewertet und einzeln aufgeführt (z. B. kann eine Histologiebewertung des Präparates „A“ die Bewertung I:3/II:0/III:2/IV:1/V:2/VI:0 ergeben). Die höchste Punktzahl ist eine „3“. Theoretisch könnten somit 18 Punkte erreicht werden. Um aber einen adäquat differenzierten Vergleich zwischen zwei Proben zu erhalten, werden die einzelnen Parameter nicht addiert.

2.5.5.b Mankin Score

Zusätzlich zu dem ICRS Visual Histological Score wurden die Schnitte mit dem Mankin Score bewertet (91,92,93,94). Hierbei werden nur vier Kriterien berücksichtigt: I) die Knorpelstruktur, II) die Zellzahl, III) das Ergebnis der Safranin-O-Einfärbung und IV) die Integrität der Tidemark. Siehe hierzu Tabelle 2.8.

Tab. 2.8 Mankin Score

Kriterium	Parameter	Punktzahl
Struktur	Normal	0
	Oberflächliche Unregelmäßigkeit	1
	Pannus und oberflächliche Unregelmäßigkeit	2
	Defekt bis in die transitionale Zone	3
	Defekt bis in die radiale Zone	4
	Defekt bis in die kalzifizierende Zone	5
	Unorganisiert	6
Zellzahl	Normal	0
	Diffus hyperzellulär	1
	„clonig“	2
	Hypozellulär	3
Safranin-O-Färbung	Normal	0
	Leichter Proteoglykanverlust	1
	Moderater Proteoglykanverlust	2
	Erheblicher Proteoglykanverlust	3
	Keine nachweisbaren Proteoglykane	4
Tidemarkintegrität	Intakt	0
	Mit Gefäßeinsprossungen	1

Im Gegensatz zum ICRS Score werden für das beste Ergebnis die niedrigste Note vergeben. In diesem Fall werden die Punkte addiert, wobei das schlechteste Präparat die Note „14“, das Beste die Note „0“ erhält.

3. Ergebnisse

Alle Tiere, die operiert wurden, überstanden die Eingriffe gut. Sie konnten binnen einer Woche wieder der Herde auf der Weide zugeführt werden. Nur in drei Fällen verblieb ein Resthinken, welches aber nach zwei Wochen verschwand. Wundheilungsstörungen oder Infektionen des Wundgebietes wurden nicht beobachtet. Auch nach der Opferung konnte in keinem Kniegelenk ein Infektionsgeschehen nachgewiesen werden.

Vier Tiere starben vor Versuchsende, sodass letztendlich 20 Tiere für die Auswertung nach 4, 6, 8, 12, 16, 26 und 52 Wochen zur Verfügung standen. (Tabelle 3.1)

Tab. 3.1 Anzahl der Versuchstiere

Untersuchungszeitraum (in Wochen)	4	6	8	12	16	26	52
Teilnehmerzahl (n)	2	3	3	3	2	3	4

3.1 Beurteilung der Kernspintomographien / MRT

In 9 der 20 Fälle waren im MRT begrenzte Ödeme bzw. Flüssigkeitsansammlungen im subchondralen Knochen unter dem Defekt nachweisbar. Alle Defekte, die nicht von Regeneratgewebe nach 52 Wochen ausgefüllt waren, konnten im MRT nachgewiesen werden.

Tab 3.2 MRT Bewertung der Knorpeloberfläche in der T1 Gewichtung

Wertungsfaktor	Anzahl der Versuchstiere (n = 20)
0 – Intakte Knorpeloberfläche	0
1 - Leichte Unregelmäßigkeit	0
2 – Knorpeldefekt unter 100% der Defekttiefe	14
3 - Defekt reicht bis in den subchondralen Knochen	6

Tab.3.3 MRT Bewertung der Knorpeloberfläche in der T2- Gewichtung

Wertungsfaktor	Anzahl der Versuchstiere (n = 20)
0 - Intakter Knorpel	0
1 - leichte Unregelmäßigkeit	3
2 - Knorpeldefekt unter 100% der Defekttiefe	15
3 - Defekt reicht bis in den subchondralen Knorpel	2

Tab 3.4 MRT Bewertung bei subchondralem Ödem in der T2-Gewichtung

Wertungsfaktor	Anzahl der Versuchstiere (n = 20)
0 – kein Ödem	0
1- Flüssigkeitsansammlung im Defektbereich	9
2 – Ödem < 0,5 cm peripher des Defektrandes	10
3 – Ödem > 0,5 cm peripher des Defektrandes	1

3.2 Makroskopische Beurteilung

Es fanden sich makroskopisch zum Teil gravierende Unterschiede im Defektausmaß zwischen den einzelnen Gruppen. Auffallend war, dass alle Defekte vom Zeitpunkt 0 bis zur 12. Woche kontinuierlich kleiner wurden, um sich danach bis zum Ende des Versuches (nach 52 Wochen) wieder auszuweiten. Ein Defekt, der im Durchmesser größer als der ursprünglich gestanzte (mit 4 mm Durchmesser) war, konnte in keinem Fall beobachtet werden.

In einem Fall waren nach 52 Wochen ausgeprägte Anzeichen einer beginnenden Arthrose nachweisbar (mit Osteophytenspiculae an den medialen und lateralen Tibiakanten und Zelldebris mit

Fibrinablagerungen im Gelenkraum). In allen anderen Fällen war eine geringe oder keine Ausfüllung des Defektraums sichtbar.

3.2.1 Die Defektgröße

Die unbehandelten Defekte fielen durch ihre unregelmäßigen Defektbegrenzungen und dem unvollständig ausgefüllten Defektraum auf. In 1 von 3 Fällen in der 26-Wochen-Gruppe und in 2 von 4 Fällen der 52-Wochen-Gruppe war überhaupt kein Regeneratgewebe nachweisbar. In 2 von 3 Fällen der 26-Wochen-Gruppe und in 2 von 4 Fällen in der 52-Wochen-Gruppe war nur eine geringe Defektfüllung nachweisbar.

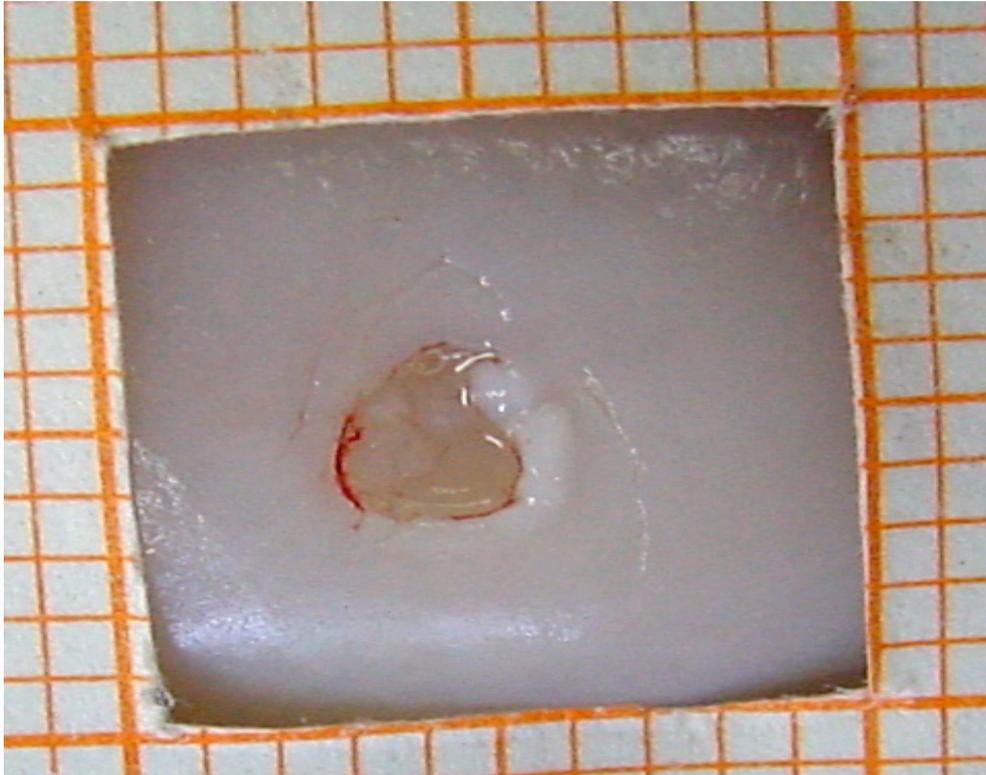


Abb.3.1 Unbehandelter Defekt aus der 4-Wochen-Gruppe. Ein als Knorpelwulst sichtbarer unregelmäßiger Defektrand begrenzt den Defekt von 2 bis 7 Uhr. Auffällig sind die ringförmigen Knorpelfissuren am oberen Präparatrand. Der Defektboden selbst ist aufgeworfen. Ein Blutkoagel ist nicht nachweisbar.

(Färbung: nativ, unfixiert; Vergrößerung: 1-fach)

In allen Fällen, auch bei Nicht-Ausfüllung des Defektes, verkleinerte sich Defektbereich im Vergleich zum ursprünglichen Defekt zum Zeitpunkt 0 (mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Fläche von 0,136 cm²). Die mittlere Größe der verbleibenden Defektfläche betrug für die 26-Wochen-Gruppe 44%, für die 52-Wochen-Gruppe aber 62,5%, des Ausgangswertes.

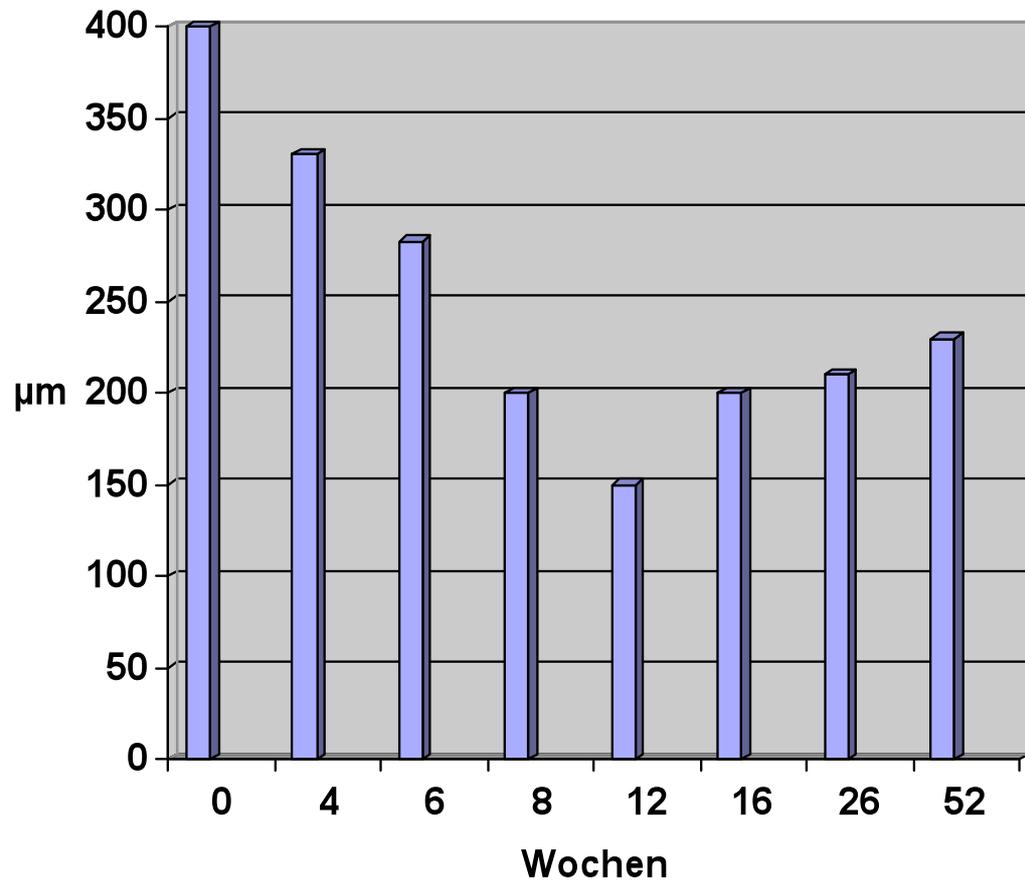
Als Maßstab für die Verkleinerung des Defektes wurde der Defekt an seinem breitesten Durchmesser vermessen. Die Messwerte hierzu sind in der folgenden Tabelle und Grafik dargestellt.

Tab.3.5 Defektdurchmesser

Zeitverlauf (in Wochen)	4	6	8	12	16	26	52
Durchmesser (in mm mit SD)	3,3 +/- 0,9	2,83 +/- 0,6	2,0 +/- 1,4	1,5 +/- 0,7	2,0 +/- 0,5	2,1 +/- 0,6	2,3 +/- 0,6

SD: Standardabweichung

Grafik 3.1 Defektdurchmesser



Grafik 3.1 Darstellung der Defektdurchmesser. Um die einzelnen Werte (unter Berücksichtigung der Standardabweichungen) besser darstellen zu können, wurde die Ordinate der oben aufgeführten Grafik im Mikrometer (μm) dargestellt. Wie in Tabelle 3.5 ausgeführt, zeigt sich, dass die Defekte nach 12 Wochen den kleinsten Durchmesser hatten, um im Verlauf wieder größer zu werden.

3.2.2 ICRS Cartilage Repair Assessment

Mit diesem Bewertungssystem konnte die Qualität der Regenerate makroskopisch beurteilt und miteinander verglichen werden. (Tabelle 3.6)

Tab 3.6 ICRS Cartilage Repair Assessment Score

Untersuchungsgruppe (Zeitverlauf in Wochen)	Messwerte (Punkte+/-SD)	Grad
4	0.0	IV
6	0.7 +/- 0.6	IV
8	2.0 +/- 1.0	IV
12	0.5 +/- 0.7	IV
16	2.0 +/- 3.0	IV
26	4.6 +/- 2.7	IV
52	3.0 +/- 5.0	IV

Hierbei gelten folgende Klassifizierungen: Grad I: „normal“, Grad II: „fast normal“, Grad III: „nicht mehr normal“, Grad IV: „grob anormal“.

Wie aus Tabelle 3.6 ersichtlich, wurden alle Defekte als „Grad IV“-Schäden bewertet. Es konnte in den Gruppen in keinem Fall eine Defektausfüllung im Sinne einer Defektheilung beobachtet werden

3.3 Mechanische Stabilitätsmessung (Artsan 200®)

3.3.a Stabilität, gemessen im Defektzentrum

Die relative Stabilität (RS) des Knorpelgewebes, verglichen mit dem unversehrten Knorpelgewebe der kontralateralen, linken

Femurkondyle des gleichen Versuchstieres (hier ist die relative Stabilität $RS = 1,0$), war abhängig vom Zeitpunkt der Messung.

Die Stabilität in allen untersuchten Fällen war nach 52 Wochen schlechter als nach 26 Wochen. Verglichen mit der unverletzten Kondyle des linken Knies, betrug die Stabilität nach 26 Wochen 60% der kontralateralen Kondyle, und 51% nach 52 Wochen.

3.3.b Stabilität, gemessen in der Defektperipherie

Um zu prüfen, wie sich der Stanzdefekt auf das umliegende Knorpelgewebe auswirkte, wurde die relative Stabilität (RS) dort gemessen. Nach der 12. Woche bis zum Ende des Versuches nach 52 Wochen nahm die Stabilität des Randgewebes kontinuierlich ab. Der Stabilitätsverlust betrug im Mittel 30%.

3.4 Histologische Beurteilung

Die histologischen Präparate zeigen im zeitlichen Verlauf, dass es am Defektrand zu einer Verformung und dem Wegkippen des regulären Knorpelgewebes in Richtung Defektmitte kam. Dies führte zu einer Abflachung und Ausdünnung des Randknorpels. Zusätzlich wurden in den 26-Wochen- und 52-Wochen-Gruppen tiefe Fissuren, die zum Teil bis in die verknöchernde Zone IV reichten, beobachtet. Die im Defektrand verbliebenen Chondrozyten wiesen eine Clusterbildung auf. Die Safranin-O-Färbung zeigte einen kontinuierlichen Schwund des Proteoglykangehalts der Matrix.

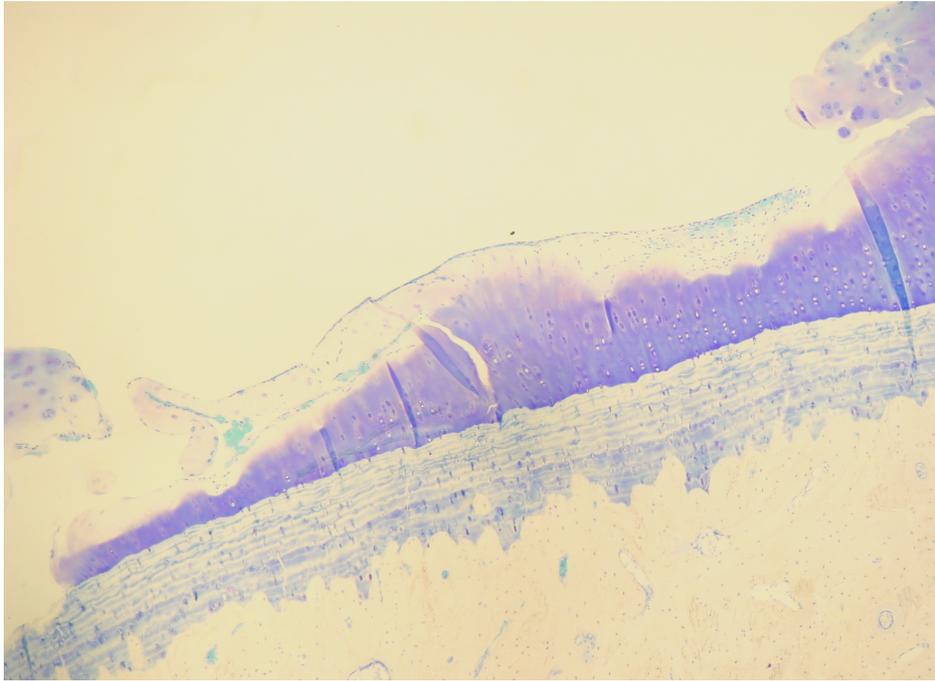


Abb.3.2 Histologiepräparat der 8-Wochen-Gruppe. Zu beiden Seiten sichtbar ist der Defektrand, der in Richtung Defektmitte fließt. Eine Spaltbildung ist am Defektboden zu sehen. Der subchondrale Knochen ist als lamellenartiges Band am unteren Bildrand zu erkennen.

(Färbung: Giemsa; Vergrößerung: Objektiv 6-fach)

In den Defekten war nur eine kleine Anzahl von Knorpelzellen zu finden, die sehr unorganisiert vorlagen (Cluster). Die Clusterbildung war nur bis zur 16. Woche nachweisbar und wurde später von einer allgemeinen Verminderung des Zellgehalts in und um den Defekt herum abgelöst. Eine bestimmte Wachstumsrichtung der verbleibenden Zellen ließ sich nicht mehr erkennen.

Diese Veränderungen gingen mit einer allgemeinen Abnahme der Vitalität und dem bereits oben erwähnten Verlust der Proteoglykane einher.

In den histologischen Präparaten war ein Teil der Defektoberfläche mit einer Bindegewebsschicht bedeckt. In einigen Fällen ließ sich diese abwischen, da nur in wenigen Präparaten eine feste Haftung mit dem Defektgrund vorlag.

Bei allen Defekten, die mit der Präzisionsstanze gesetzt wurden, wurde darauf geachtet, die Knorpel-Knochengrenze nicht zu eröffnen („Partial-Thickness-Defekte“). Trotzdem zeigten drei Proben ein beginnendes „Remodelling“ des unter dem Defekt liegenden Knochenbereichs. Wie bereits oben erwähnt, waren in neun Fällen auch subchondrale Ödeme vorhanden. In einem Fall fand sich nach 52 Wochen eine beginnende Nekrose des subchondralen Knochens, in einem anderen Fall war in der 26-Wochen-Gruppe eine heterotope Verknöcherung des Defektbereichs nachweisbar.

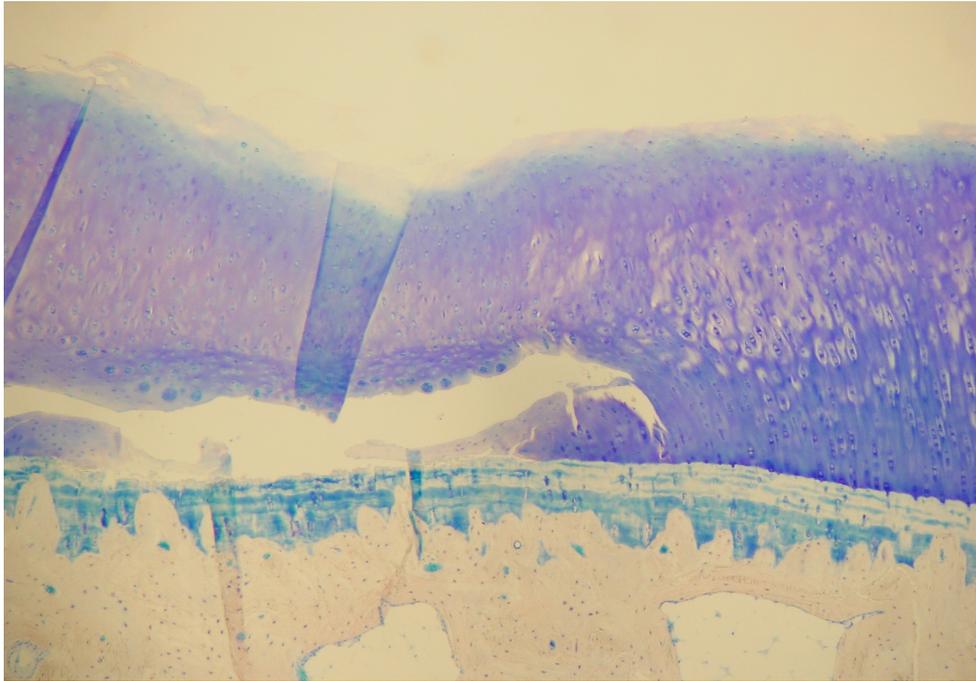


Abb.3.3 Histologiepräparat nach 12 Wochen. Präparat eines unbehandelten Defektes nach 12 Wochen postoperativ. Zu beachten sind die überlappenden Fixationsdefekte in der linken Bildhälfte. Am Boden des Defektes finden sich Fibrinablagerungen. Verteilt in dem Randwall sind zum Teil Cluster mit Riesenchondrozyten sichtbar. Vereinzelt sind auch Granulozyten vorhanden, auch wenn es sich hierbei um kein Infektgeschehen im Defektbereich handelt. Betrachtet man die Integrität der subchondralen Knochenlamelle, ist ersichtlich, dass diese nicht mehr intakt ist. Ein Blutkoagel mit Stammzellen aus dem Knochenmark ist aber nicht zu finden.

(Färbung: Giemsa ; Vergrößerung: Objektiv 6-fach)

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der einzelnen Kriterien des ICRS Score und der Summe des Mankin-Score in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tab. 3.7 Ergebnisse des ICRS Score und Mankin Score

Zeitverlauf (in Wochen)	4	6	8	12	16	26	52
Anzahl (n)	2	3	3	3	2	3	4
Defektdurchmesser (mm) mean \pm SD	3,3 \pm 0,9	2,8 \pm 0,6	2,0 \pm 1,4	1,5 \pm 0,7	2,0 \pm 0,5	2,1 \pm 0,5	2,3 \pm 0,6
ICRS Knorpelreperatur Auswertung (Punkte)	0,0	0,7 \pm 0,6	2,9 \pm 1,0	0,5 \pm 0,7	2,0 \pm 3,0	4,6 \pm 2,7	3,0 \pm 5,0
ICRS VHA Score Oberfläche (Punkte)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ICRS VHA Score Matrix (Punkte)	0,0	0,7 \pm 1,2	1,5 \pm 0,7	0,7 \pm 0,6	0,0	0,75 \pm 1,0	0,7 \pm 1,2
ICRS VHA Score Zellverteilung (Punkte)	0,5 \pm 0,7	1,0 \pm 1,0	1,0	0,3 \pm 0,6	1,0	0,5 \pm 0,6	0,0
ICRS VHA Score Zellpopulation (Punkte)	1,0	1,7 \pm 1,2	0,7 \pm 0,6	1,0	1,0	1,75 \pm 1,5	0,7 \pm 0,6
ICRS VHA Score: Intaktheit des Knochen (Punkte)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,0
ICRS VHA Score: Knorpelmineralisation (Punkte)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,3 \pm 1,5	3,0
Summe der ICRS VHA Scores	7,5 \pm 0,7	9,3 \pm 3,2	10,5 \pm 0,7	6,6 \pm 1,5	8,0 \pm 0,0	9,0 \pm 2,2	6,3 \pm 2,3
Summe des Mankin – Score	11,5 \pm 0,7	10,3 \pm 2,0	9,0 \pm 2,8	11,3 \pm 1,2	11,5 \pm 0,7	11,5 \pm 1,5	12,3 \pm 1,5
Relative Festigkeit des Knorpelgewebes im Defektbereich	0,0	0,02 \pm 0,03	0,2 \pm 0,16	0,2 \pm 0,16	0,01 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
Relative Festigkeit des Knorpelgewebes am Defektrand	0,61 \pm 0,2	0,63 \pm 0,1	0,71 \pm 0,1	0,78 \pm 0,4	0,88 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2	0,52 \pm 0,1

4. Diskussion

An einer großen Anzahl verschiedener Versuchstiere ist bereits geforscht worden, um neue Knorpelreparaturverfahren zu standardisieren und miteinander zu vergleichen. Aus der Literatur bekannt sind Versuche an Pferden, Schweinen, Hunden, Kaninchen, Ziegen, Schafen und Meerschweinchen (1,2,3,8,9,10,11,28,29,119,153,154,160,163,166,167,170,171). Bei den Ergebnissen aus diesen Versuchen ist allerdings zu berücksichtigen, dass menschlicher Knorpel dicker und die Dimensionen größer sind. Auch reagieren die humanen Chondrozyten anders als die der Versuchstiere. Ein großes Problem, vor allem bei kleineren Tieren, besteht darin, dass sich die Gelenkphysiologie der Vierbeiner mit dessen Belastungsschwerpunkten erheblich von denen des Menschen, als Zweibeiner, unterscheidet. (Menschlicher Kniegelenksknorpel ist z.B. zehnmal dicker als der nur 0,5 mm dicke Kondylenknorpel der Kaninchen.)

Als zusätzliche Erschwernis kommt hinzu, dass nur der Mensch in der Lage ist, Schmerzqualitäten zu empfinden und sie empirisch messbar zu äußern. Trotz dieser Einschränkungen kann auf das Tiermodell nicht verzichtet werden. Kleintiere sind darüber hinaus in der Anschaffung und Haltung preiswert und werden weiterhin für die Grundlagenforschung neuer Therapiestrategien verwendet werden müssen. So haben z. B. die Arbeitsgruppen um Brittberg und Lang das Autologe Knorpelzelltransplantationsverfahren (ACT) an 3 mm großen osteochondralen Defekten der Femurkondylen an Kaninchen untersucht (11). In Bern konnten Hunziker et al. erfolgreich Knorpelwachstumsfaktoren einsetzen, um oberflächliche Knorpeldefekte bei Meerschweinchen zu behandeln (60,61,62).

Der menschlichen Knorpeldicke kommt das Pferdmodell sehr viel näher. Da vor allem die hoch gezüchteten Sportpferde, die sehr teuer in Anschaffung und Unterhalt sind, häufig unter Degenerationsbeschwerden der Fesselgelenke leiden, ist es sinnvoll, neue Behandlungskonzepte an ihnen zu erforschen. Dies wurde mit Hinblick auf eine Erweiterung der Therapie auf den Menschen getan (62,63,91,109,123,153).

Andere Wege gingen Forscher, die an Hunden (Femurkondylendicke zwischen 0,5 bis 1 mm) und Ziegen forschten (Femurkondylendicke 1 bis 2 mm).

Bei dem hier vorliegenden Projekt entschied man sich für das Schafsmodell (Femurkondylendicke 1 bis 2 mm), da die Untersucher große Erfahrung hinsichtlich des Umgangs, der Pflege und Narkose mit dieser Spezies aus anderen Projekten hatten. Hierdurch wurde eine größtmögliche Sicherheit für die Tiere gewährleistet, die sich durch die minimale Verlustrate bis zum Versuchsende bestätigte.

Auch andere Forschungsgruppen entdeckten das Schafskniegelenk als Forschungsobjekt für Knorpelreparaturverfahren (1,154,160,163,166). So konnte Bruns et al. die chondrogene Potenz von Rippenperichondrium am Schafsknie nachweisen (3).

Allerdings gibt es bis heute kein Standard-Tiermodell. Bis jetzt konnte keine „ideale“ Schafsrasse, keine standardisierte Defektlokalisierung, –tiefe, oder ein Mindestbeobachtungszeitraum ermittelt werden.

Daher formulierte die Arbeitsgruppe „ACT und Tissue-Engineering“ der „Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie“ und die „Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie“ Richtlinien zur Erprobung neuer Knorpelreparaturverfahren. Sie forderten I) die ausschließliche Durchführung von Untersuchungen an „skelettreifen“ Tieren, II) Langzeituntersuchungen (von mindestens 6 Monaten Dauer), III) eine Evaluierung der immunologischen Reaktion auf die Untersuchung, IV) eine Bewertung der Regenerate gemäß ICRS-Kriterien, nebst einer V) histologischen Untersuchung und VI) einer physikalischen Stabilitätsprüfung des Regenerationsgewebes.

Bis auf Punkt III wurden in der hier vorliegenden Untersuchung alle geforderten Punkte umgesetzt. Eine Evaluierung der immunologischen Reaktion war nicht erforderlich, da in dieser Untersuchungsreihe kein Material transplantiert wurde. Immunologische Abstoßungsreaktionen waren daher nicht zu erwarten und wurden auch in keinem der untersuchten Tiere (einschließlich der 4 Verstorbenen, die obduziert wurden) nachgewiesen.

Als Versuchstier entschied sich die Arbeitsgruppe für Tiere der Rasse Suffolk. Diese in Deutschland sehr weit verbreitete Rasse ist sehr widerstandsfähig, kräftig und anspruchslos. Hierzulande werden sie zur Fleischproduktion gezüchtet.

Das Regeneratgewebe

Bekannt ist, dass die Regenerationsfähigkeit des Knorpels äußerst gering ist. 2001 veröffentlichte Jackson et al. seine Ergebnisse an „Full-Thickness-Knorpeldefekten“, die er Ziegen setzte (68).

Hierbei wurde den Tieren ein 6 mm breiter und tiefer Defekt in die medialen Femurkondyle gestanzt. Der subchondrale Knochen wurde eröffnet. Anhand von 10 Kriterien wurden die Regenerate nach 12 Monaten ausgewertet. Es wurde festgestellt, dass die Defekte nicht verheilten. Stattdessen wurde ein Prozess ausgelöst, der zu einem Untergang des peripheren Knorpels und des subchondralen Knochens führte. Auch hier wurde in der Frühphase eine Verkleinerung der Defekte durch ein „Hereinfließen“ des Knorpels vom Rand her beobachtet. Es resultierte eine zunehmende Abflachung der Knorpelhöhe am Defektrand mit nachfolgender Degeneration. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Untersuchung an 4 mm Defekten gemacht werden. (Allerdings blieb der subchondrale Knochen intakt.) Auch hier konnte im zeitlichen Verlauf zunächst ein Hineinfließen des Knorpels vom Rand zum Zentrum des Defektes beobachtet werden. Dies führte zu einer Verkleinerung der Defektfläche sowie einem Höhenverlust des Defektrandes. Histologisch war dieser Prozess durch eine zunehmende Degeneration des Knorpels am Defektrand mit Clusterbildung, Proteoglykanverarmung und zunehmender Rissbildung durch Flüssigkeitsverlust gekennzeichnet.

Buckwalter versuchte 2002 zu erklären, weshalb es bei einem „Partial-Thickness-Defekt“ in der ersten Zeit zu einer (beginnenden, und damit erwünschten) Defektheilung kam, diese aber nach kurzer Zeit sistierte (17,18,19,20). Er beschrieb, dass bei mechanischen Knorpelverletzungen gehäuft Apoptosen im umliegenden Gewebe auftreten. Dies konnte in Untersuchungen an Kaninchen und Ziegen *in vivo* und *-vitro* eindrucksvoll nachgewiesen werden.

Colwell und Mitarbeiter stellten 2001 eine Arbeit vor, in der 20 Patienten nach einer Kniegelenksverletzung untersucht wurden (23). Arthroskopisch wurden Proben aus dem peritraumatischen und gesunden Gewebe entnommen. Auch beim Menschen fanden sich im Knorpelgewebe um den traumatischen Defekt herum vermehrt Apoptosen. Erstmals wurde hier der Verdacht formuliert, dass neben dem eigentlichen Trauma noch andere Faktoren einen Zellsuizid auslösen können. Es wird zur Zeit daran geforscht, diese komplexe Kaskade zu verstehen, um diesen Prozess unterbrechen zu können. Konkrete Ergebnisse stehen dazu bislang noch aus. Bekannt aber ist, dass im Bereich des Defektes die Knorpelzellen anfangs vermehrt Matrix produzieren. Diese reicht aber nicht aus, um den Verlust zu kompensieren. Ob sich die Zellen dadurch verausgaben und deshalb absterben, muss noch geklärt werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Regeneration begonnen hat, diese aber nach etwa 12 Wochen durch unbekannte Faktoren unterbrochen wurde. Dies machte sich bemerkbar durch die Abnahme der Qualität und der Quantität des Regenerationsgewebes nach diesem Zeitraum. Bis zum Versuchsende nach 52 Wochen erholte sich das Gewebe nicht mehr.

Aus einer Untersuchung, die Ritsila und Jaroma 1987 an 36 ausgewachsenen Kaninchen veröffentlichten, wurde der „Full-Thickness-Defekt“ eingehender untersucht (145). Hierbei wurden 26 Tiere mit Transplantaten, die unter Periost vernäht wurden, 10 Tieren mit einem unbehandelten Defekt gegenüber gestellt. Bei den Tieren der Verumgruppe entwickelte sich in allen Fällen ein Knorpelregenerat, während die Tiere der Kontrollgruppe (die

unbehandelten Defekte) hingegen alle nur eine geringe Knorpelregeneration und eine beginnende Arthrose aufwiesen. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde der Subchondralraum nicht eröffnet. Somit wurde verhindert, dass eine Knorpelregeneration aus dem Knochenmark durch Einwanderung unspezifischer Stammzellen stattfinden konnte.

Die von Brittberg 1998 vorgestellte Technik (12,13,14) rief anfänglich viel Kritik hervor. Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten, seine Ergebnisse zu widerlegen. Ein Beispiel hierfür ist die Arbeit von Breinan et al., der die Brittberg-Technik mit einem 4 mm Stanzdefekt an Hunden untersuchte (7,8). Beteiligt waren 44 Hunde, bei denen der subchondrale Knochen nicht eröffnet wurde. Nach Ablauf von zwölf und achtzehn Monaten wurden die Tiere untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass es keinen Unterschied zwischen Transplantierten, nur mit Periostlappen behandelten und unbehandelten Defekten gab.

Lokalisation von Defekt und Spenderregion

Bevor mit der hier vorliegenden Untersuchung begonnen werden konnte, wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Dies war nötig, um sich mit den speziellen Gegebenheiten des Schafskniegelenks vertraut zu machen.

Da beim Menschen die meisten Knorpelschäden in Arealen auftreten, auf die große Kräfte einwirken, sollte dies auch bei dem Versuchstier nachempfunden werden. Beim Menschen tragen die Femurkondylen den Großteil des Gewichts, weshalb das Operationsteam den Schafen den Defekt auch dort setzte. Von 5 auf

dem Schlachthof erworbenen Kniegelenken wurden Dünnschicht-CT-Aufnahmen angefertigt, um die Region mit der dicksten subchondralen Knochenlamelle auszumachen. Hierbei erwies sich das Zentrum der Kondylen als der Anteil mit dem dicksten Knorpelanteil und dem dicksten subchondralem Knochen. (Es besteht eine Korrelation zwischen Knorpeldicke und mechanischer Beanspruchung eines Gelenkanteils. Je dicker der Knorpelbelag ist, desto größer ist die mechanische Beanspruchung.) Als Zone der größten mechanischen Beanspruchung des Schafskniegelenkes wurde das Zentrum des mittleren Drittels (im sagittalen als auch frontalen Schnittbild) der medialen Femurkondyle ermittelt. Die Zonen der geringsten mechanischen Beanspruchung sind der mediale und laterale Rand des femoralen Gleitlagers.

Wichtig für die Untersuchung war auch das Alter der Versuchstiere. Bekannt ist, dass bei jugendlichen Tieren Knorpeldefekte erheblich besser und schneller verheilen als bei ausgewachsenen Individuen. Die Tiere der hier durchgeführten Versuchsreihe waren alle älter als 6 Jahre. Schafe gelten ab einem Alter von 2 Jahren als ausgewachsen.

Der „Partial-Thickness-Defekt“

Ein „Partial-Thickness-Defekt“ beschreibt eine chondrale Läsion, die einem Knorpelschaden Grad II bis III der ICRS-Klassifikation entspricht. Der subchondrale Knochen ist nicht eröffnet. Die Knorpeloberfläche ist mit Spalten und Fissuren überzogen. Derartige Läsionen findet man beim Menschen häufig als Begleitverletzung nach traumatischen Band- oder Meniskusverletzungen. Sie heilen nicht spontan aus, sondern degenerieren im Laufe der Zeit und gelten somit als Vorstufe einer Arthrose. Neuerdings wird bei

Knorpelverletzungen Gebrauch von einem Modell gemacht, welches Poole et al. entwickelten (131,132,133,134). Hierbei wird der Zonenaufbau der Matrix als Basis für die Erklärung der Pathomechanismen benutzt. Tritt ein Riss der Knorpeloberfläche in Zone I auf, pflanzt sich die Verletzung durch Konvektion in die tiefer gelegenen Zonen fort, da hier große Scherkräfte bei Gelenkbewegungen wirken.

Die nun freiliegende Matrix verliert Proteoglykane. Da sie dadurch ihre Wasserbindungsfähigkeit verliert, reduziert sich der Turgor des Knorpelbelags. Dies führt zu einem Verlust der Stoßdämpferfunktion des Knorpels, sodass sich der Schaden durch mechanische Krafteinwirkungen noch weiter erhöht. Entlang der Wand des Bruchkeils in die Tiefe, hypertrophieren die Chondrozyten. Dieses Phänomen kommt normalerweise nur in der Zone IV, selten bereits in Zone III, vor. Pathologisch ist, dass diese Riesenchondrozyten beginnen, eine Matrixverknöcherung des Bruchspaltes herbei zu führen. Letztendlich erreicht diese Kalzifizierung auch die Knorpeloberfläche, wodurch diese noch rigider wird und zu weiteren Einrissen neigt.

Da die ohnehin schon schlechte Versorgung der Chondrozyten mit Nährstoffen nun durch Kalkspangen im Knorpel des Weiteren eingeschränkt wird, gehen viele Zellen durch Apoptose zugrunde. Damit wird die Knorpelmatrix ihrer Regenerationsfähigkeit beraubt.

Bei osteochondralen Läsionen (dies entspricht dem „Full-Thickness-Defekt“), wird der Knochenmarkraum unter dem Knorpeldefekt eröffnet. Hierdurch haben mesenchymale Knochenmarksstammzellen die Gelegenheit, in den Defekt

einzuwandern. Es erfolgt eine Weiterdifferenzierung zu Fibroblasten und einigen Chondroblasten. Diese Regeneration führt zu einem Ersatzgewebe, das im Wesentlichen aus Faserknorpel und Bindegewebe besteht. Dieses Prinzip der Knorpelregeneration wird bei einigen Behandlungsmaßnahmen, wie der Mikrofrakturierung, der Pridiebohrung oder der Abrasionsarthroplastik gezielt angewendet (18,19,20,34,35,36,37,65,85).

Andere Untersucher haben gezeigt, dass kleinere „Full-Thickness-Knorpeldefekte“ bei Kaninchen und Ziegen durchaus spontan heilen können (22,25,77). Wird allerdings eine kritische Größe überschritten, tritt keine Spontanheilung mehr ein. Es wird vermutet, dass durch den fehlenden Zugang der Knorpelläsion zu den „heilenden Faktoren“ des Subchondralraums (z.B. Endothelzellen, Stammzellen und andere), die Selbstheilungsprozesse behindert werden oder ganz ausbleiben. Der Knorpel selber ist avaskulär und ernährt sich durch Diffusion. Stammzellen können also gar nicht dorthin gelangen.

Hunziker konnte 1996 nachweisen, dass Zellen aus der Synovialmembran über die Knorpeloberfläche diffundieren können und so zu dem Defekt gelangen (60,61). Unter physiologischen (bei intakter Knorpeloberfläche) Bedingungen wird dieser Prozess verhindert, da ebendiese Oberfläche spiegelnd glatt und ohne Möglichkeit einer Andockung durch Rezeptoren der Zellen ist. Wurden diese anti-adhäsiven Moleküle aber chemisch abgewaschen (mittels Chondroitase ABC), konnten mesenchymale Zellen dort andocken. Hunziker förderte zusätzlich das Wachstum der Zellen mittels bFGF (basic-Fibroblast-Growth-Factor), EGF (Epidermal-Growth-Factor) und IGF-1 (Insulin-like-Growth-Factor-1)

und konnte damit ein Wachstum der Zellen im Defekt induzieren. Eine Differenzierung zu hyalinem Knorpel ist aber nicht möglich. Wird der Defekt mit einer biologisch abbaubaren Matrix ausgefüllt, vermehren sich die Zellen und bilden ein Reperaturgewebe. Durch Hinzufügen eines chondrogenen Differenzierungsfaktors, war es möglich, ein knorpelähnliches Gewebe zu schaffen. (10,60,61,62)

Der unbehandelte Defekt

Durch Setzen eines Defektes sollte die Möglichkeit überprüft werden, inwieweit die intrinsische Selbstheilungskapazität des Knorpels ausreicht, um diesen von selbst zu heilen. Die ersten Untersuchungen unmittelbar nachdem die Defekte ausgestanzt wurden (zum Zeitpunkt 0), zeigten einen zylindrischen Defekt, der scharf begrenzt war und dem 4 mm - Durchmesser der Stanze entsprach. Hierbei wurde das Knorpelgewebe bis zur Tidemark, d.h. bis zum Übergang zum kalzifizierenden Knorpel, abgetragen. Im Laufe der ersten vier Wochen begann der Knorpelrand, seine Festigkeit zu verlieren und „floss“ vom Rand her in Richtung Defektmittle. Dieses Phänomen blieb in allen weiteren Untersuchungen erhalten. Nach weiteren acht Wochen hatten die Defekte dadurch ihr geringstes Ausmaß erreicht und knapp die Hälfte des Defektraumes ausgefüllt. (Der kleinste Durchmesser der während des ganzen Beobachtungszeitraumes gemessen wurde, war 1,5 mm (SD +/- 0,7 mm) in Woche 12.)

Was anfangs nur makroskopisch nachweisbar war, wurde spätestens nach 16 Wochen auch mikroskopisch sichtbar. Es trat ein merklicher Umbau mit schließlichem Untergang des gesunden Knorpels auf, der durch eine Reduktion der Zellzahl, eine Clusterbildung der

Restchondrozyten und eine Abnahme des Proteoglykangehalts der Knorpelmatrix gekennzeichnet war. Dies führte dazu, dass der Defekt wieder größer wurde. Es kam zu einer regelrechten „Aufweichung“ des ehemals gesunden Randgewebes und zeigte sich in Einrissen und Gewebebrücken am Knorpelrand.

Schon vier Wochen postoperativ hatten sich Chondrozyten-Anhäufungen, sprich Cluster, am Randsaum angesammelt. Sie konnten im gesamten Bereich des Randwalls des Defektes beobachtet werden. Das Einfärben mit Safranin-O zeigte, dass der Proteoglykangehalt im diesem Bereich merklich geringer war. Dies wurde schon von Jackson et al. bei Versuchen an Ziegen beschrieben.

Die Clusterbildung der verbleibenden Chondrozyten am Defektrand wird in der Frühphase als ein Versuch des Organismus angesehen, den Knorpeldefekt zu regenerieren. In der Spätphase (zwischen 16 und 52 Wochen postoperativ) fand sich eine Zellverarmung der Defektperipherie.

Innerhalb von vier Wochen hatte sich in der Defektmitte ein Gemisch aus Gelenkflüssigkeit, Fasergewebe, Knorpelspäne und Blut am tiefsten Punkt angesammelt. Neutrophile Leukozyten waren im Koagel und subchondralem Knochen nachweisbar, ohne dass ein Infektgeschehen vorlag.

In der vierten bis zur sechsten Woche wurde postoperativ eine erhöhte Chondroblastenaktivität an der Defektbasis beobachtet, während sich in einzelnen wandständigen Clusterinseln eine enchondrale Verknöcherung vollzog. Nach sechs Wochen wurden

vielkernige Chondrozyten im Bereich des Knorpel-Knochenüberganges und im Defektkoagel selbst sichtbar. Diese führten aber bei keinem der untersuchten Schafe zu einem Nachwachsen des Knorpels aus Richtung des subchondralen Knochens nach apikal. Exemplarisch fand sich auch in fünf von elf Fällen ein subchondrales Ödem. Dieses hatte zwar in keinem Fall ein größeres Ausmaß als 4 mm, zeigte aber, dass dieser Bereich ebenfalls durch das Defekttrauma betroffen war und dieses zu kompensieren versuchte.

Nach 26 Wochen war die Defektoberfläche von einer zum Teil abwischbaren Fibrinschicht überwuchert, die sich vom Defektrand aus in Richtung Defektmittle vorschob. Von dieser strahlten Fibrinfasern, Kollagen und Faserknorpel in die Defektmasse ein. Diesem Ersatzgewebe gelang es aber nicht, den Defekt ganz auszufüllen, und eine zystenartige Konkavität blieb erhalten. Nach Ablauf von 52 Wochen hatte sich der Defektdurchmesser soweit bei allen Versuchstieren verringert, dass man von einem „Versuch der natürlichen Reperatur“ sprechen kann. Bei zweien der Versuchstiere waren auch Gefäßeinsprossungen zu sehen.

Der ursprüngliche Defekt betrug im Durchmesser 4 mm. In keinem der 20 untersuchten Defekte war nach einem Jahr der Defekt verheilt. Bei allen Tieren hatten die Defekte Durchmesser von 2 bis 3 mm.

Das Verhalten der Defektperipherie

Die Messung der Knorpelstabilität am Defektrand zeigte, dass bei keiner der Versuchsgruppen die Festigkeit gesunden Knorpels erreicht werden konnte. Nach 52 Wochen betrug die Festigkeit des

Randknorpels nur noch 51% der Festigkeit des gesunden kontralateralen Gelenkknorpels.

Es wird vermutet, dass die Verschlechterung der Stabilität im Randbezirk durch das bloße Vorhandensein eines Defektes herführte, da der umliegende Gelenkknorpel in den Defektraum „wegfloss“. Ein „Schulterschluss“, wie bei einer intakten Knorpelfläche, war nicht mehr gegeben. Ergänzend hierzu kam die Beobachtung, dass zu keiner Zeit eine Regeneration vom Randbereich aus erfolgte.

Schlussfolgerung

Die Untersuchung der “Partial-Thickness-Defekte“ über 52 Wochen hinweg hat gezeigt, dass chondrale Defekte der medialen Kondyle mit einem Durchmesser von 4 mm in diesem Zeitraum nicht ausheilen. Vielmehr wurde in relativ kurzer Zeit ein unaufhaltsamer Prozess ausgelöst, der kontinuierlich zu einer Degeneration des benachbarten Knorpels führte. Damit steht nun ein Tiermodell zur Verfügung, an dem verschiedene Behandlungsmethoden getestet werden können, da eine intrinsische Heilung nicht erfolgt.

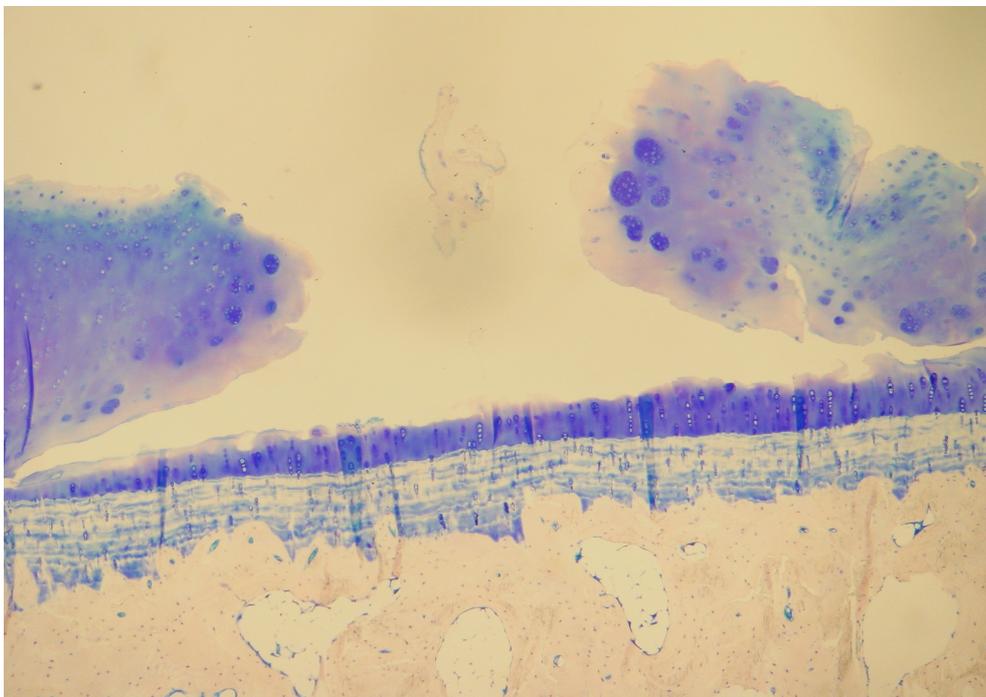


Abb. 4.1 Histologiepräparat eines unbehandelten Defektes nach 16 Wochen. Man beachte den abgeflachten Randsaum mit Knorpelclustern und Gewebebrücken die sich in den Defekt vorwölben. Der Boden des Defektes weist keine Koagel oder Fibrinbelege auf. Eine Aussicht auf eine restitutio ad integrum ist von nun an nicht mehr zu erwarten.

(Färbung: Giemsa; Vergrößerung: Objektiv 6-fach)

5. Zusammenfassung

Einleitung:

Ein häufig untersuchtes Modell zur Evaluation der Knorpelregeneration ist der sogenannte „Full-Thickness“-Defekt. Hierbei handelt es sich um Knorpelläsion, mit Eröffnung des subchondralen Knochens. Im klinischen Alltag werden allerdings sehr viel häufiger so genannte „Partial-Thickness“-Defekte beobachtet. Hier beschränkt sich die Läsion auf den weichen Knorpelbelag, der subchondrale Knochen bleibt intakt. Bei „Full-Thickness“-Defekten erfolgt die Regeneration über eine Einwanderung mesenchymaler Stammzellen, die dann ein Faserknorpelregenerat bilden.

Das Ziel der hier vorliegenden Untersuchung bestand in der Charakterisierung des Regeneratgewebes bei „Partial-Thickness-Knorpeldefekten“ an der medialen Femurkondyle des Suffolk-Schafes.

Material und Methoden:

Über eine Arthrotomie des rechten Kniegelenks, wurde mit einer Präzisionstanze jeweils ein Knorpeldefekt (Kreisdurchmesser 4 mm) an der medialen Kondyle des rechten Kniegelenks bei 20 erwachsenen, weiblichen Suffolk-Schafen platziert. Die Defekte reichten bis an die kalzifizierte Knochen-Knorpelgrenze heran, eröffneten diese aber nicht.

Im Anschluß wurde der spontane Heilungsverlauf beobachtet. Die Tiere wurden nach 4,6,8,12,16,26 und 52 Wochen geopfert und die Kniegelenke explantiert.

Unfixiert wurde eine Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT Phillips® (Gyrosan NT) 1,5 Tesla Gerät mit T1- und T2-Gewichtung) des operierten rechten Kniegelenkes durchgeführt, bevor die Kondylen entfernt und der makroskopischen Beurteilung und mechanischen Stabilitätsmessung zugeführt wurden. Die Bestimmung der Knorpelstabilität um den Defekt herum erfolgte mit dem Artscan® 200 Indentationsgerät. Als Kontrollen dienten die gesunden kontralateralen medialen Femurkondylen desselben Tieres. Nach der Explantation wurden die Defekte digital fotografiert (SONYR® Cyber-Shot Kamera, bei einer Auflösung von 3,3 Megapixel) und der maximale Defektdurchmesser berechnet.

Die Defekte wurden makroskopisch mit Hilfe des Brittberg Score und histologisch mit Hilfe des Mankin- und ICRS Score beurteilt. Zur histologischen Beurteilung der Defekte erfolgte eine Färbung nach Giemsa, Alcian-Blau sowie mit Safranin-O und Masson-Goldner.

Ergebnisse:

Die Durchmesser der Defekte nahmen zunächst bis zur 12. Woche ab. Im weiteren Verlauf vergrößerten sie sich wieder. Der mittlere Wert des Brittberg Score betrug 5,1 Punkte nach 26 Wochen und 2,4 Punkte nach 52 Wochen. Die relative Stabilität (RS) des Defektrandes nahm im zeitlichen Verlauf ab. Im Vergleich zum Knorpel der kontralateralen Seite, betrug die Stabilität 60% nach 26 Wochen und 51% bei Versuchende. Makroskopisch waren einige Defekte nach 6 und 8 Wochen zum Teil mit Regeneratgewebe ausgefüllt. Kernspintomographisch fand sich unter den Defekten eine Flüssigkeitsansammlung im subchondralen Knochen. Am Defektrand zeigte sich in den Histologien eine Verformung mit Ausdünnung des

Knorpelbelags. Nach 4 Wochen war zunächst eine Clusterbildung der Knorpelzellen, im weiteren Verlauf eine Verminderung der Zellzahl und Zellvitalität sowie ein progressiver Proteoglykanverlust der Matrix nachweisbar. Einzelne Defekte waren an der Oberfläche mit einer dünnen Bindegewebsschicht bedeckt. Eine Remodelling des subchondralen Knochens konnte histologisch teilweise beobachtet werden.

Schlussfolgerung:

4 mm große „Partial-Thickness“-Defekte der medialen Kondyle des Kniegelenkes von Suffolk-Schafen heilen nicht spontan. Vielmehr entwickeln sich progressive degenerative Veränderungen, die zu einem Kollaps des umliegenden Knorpels führen.

6. Literaturverzeichnis

1.-Abdolvahab-Emminger H: Physikum Exakt, 3. vollständig überarbeitete Auflage, 79-81: 2003

2.-Aberman HM, Jackson DL, Simon TM: Spontaneous Repair of full-thickness Defects of Articular Cartilage in a Goat Model; J of Bone&Joint Surgery, Volume 83-A, (1), 53-64, 2001

3.-Allen MJ, Houlton JEF, Adams SB, Rushton N: 1998 Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep. Veterinary Surgery 27: 596-605, 1998

4.-Angermann P.: Periosteal Transplantation in the treatment of cartilage defects in the knee. ICRS Newsletter, 2000 (3): 8, 2000

5.-Bobic V: Die Verwendung von autologen Knochen-Knorpel-Transplantation in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen; Orthopäde 28 (1): 19 -25, 1999

6.-Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kujier R, van der Linden AJ Bulstra SK: Longterm results of the perichondral grafts for the repair of cartilage defects in the human knee; Int. Orthop 21 (5): 313 – 317 , 1997

7.-Breinan HA , Minas T, Tsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M : Effect of the cultured autologous chondrocytes on the repair of chondral defects in the canine model; J Bone Joint Surg Am 79 (10): 1439 – 51, 1997

8.-Brittberg M, Mainil-Varlet P, Aigner T, Bullogh P, Hollander A, Hunziker E., Kandel R, Nehrer S, Pritzker K, Roberts S, Staufer E: Histological Assesment of Cartilage Repair. J of Bone&Joint Surgery, Volume 85-A (Suppl. 2): 45-57, 2003

9.-Bruns, J, Meyer-Pannwitt U, Silbermann, M: The rib perichondrium. An anatomical study in sheep of tissue used as transplant in the treatment of hyaline-cartilage defects. Acta Anat (Basel), 144(3): 258-66, 1992

10- Breinan HA, Minas T, Tsu HP, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M : Autologous chondrocyte implantation in the canine model: change in composition of reparative tissue with time; J Orthop Res 19 (3): 482 – 492, 2001

11.-Brittberg M, Nillson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L: Rabbit Articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocyte transplantation; N England J Med 331 (14) : 889 – 895, 1994

12.-Brittberg M, Peterson L: Introduction to an articular cartilage classification, ICRS Newsletter 1998 1 (1): 5 – 8, 1998

13.-Brittberg M: Evaluation of Cartilage Injuries and Cartilage Repair; Osteologie 9 (1): 17 – 25, 2000

14.-Brittberg M, Peterson L, Sjogren – Jansson E, Talheden T, Lindahl A: Articular Cartilage Engineering with autologous chondrocyte Transplantation. Review of recent developments; J Bone Joint Surgery Am 85-A (Suppl 3): 109 – 115, 2003

15.-Brittberg M, Winalski CS: Evaluation of cartilage injuries and repair; Osteologie 9 (1) : 17 – 25 , 2000

16.-Buckwalter JA, Rosenberg IA, Hunziger EB: Articular cartilage: Composition, Structure, Response to Injury and Methods of Facilitated Repair. In: Ewing JW, ed. Articular Cartilage and Knee and Joint Function: Basic Science and Arthroscopy. New York Raven Press pp. 19 – 52, 1990

17.-Buckwalter JA: Cartilage Repair in Osteoarthritis; In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VW, Mankin HS, eds. Osteoarthritis: Diagnosis and Management. ED. 2 Philadelphia – Saunders, pp 71 – 107, 1992

18. Buckwalter JA: Mechanical Injuries of Articular Cartilage; In: Biology and Biomechanics of the Traumatized Synovial Joint, Park Ridge ,IL, 1992

19. Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander ME, Cruess RL: Healing of Musculoskeletal Tissues; In: Rockwood RL, ed. Fractures. Philadelphia: Lippincott, pp. 261 – 304, 1996

- 20.-Buckwalter JA, Mankin HJ:** Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation; Instr Course Lectures 47: 487 – 504, 1998
- 21.-Cameron ML, Briggs KK, Steadman JR:** Reproducibility and reliability of the Outerbridge Classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically; Am J SportsMed,:31 (1): 83 – 86, 2003
- 22.-Carranza – Bencano A, Garcia – Paino L, Armas – Padron JR, Cayuela Dominguez A:** Neochondrogenesis in repair of full – thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow – up in six months; Osteoarthritis Cartilage 8 (5) 351 – 358, 2000
- 23.-Colwell CW, D’Lima DD, Hoenecke HR, Fronck J, Pulido P, Morris BA, Chung C, Resnick D, Lotz M:** In vivo changes after mechanical injuries; Clin Orthopaedics (391 Suppl): 116 – 123 , 2001
- 24.-Cullison TR, O’Brian TJ, Getka K, Johnson S:** Anterior cruciate ligament reconstruction in the military patient; Mil Med 163 (1):17 – 19, 1998
- 25.-Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G:** Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects; Arthroscopy 16 (6): 571 – 577, 2000
- 26.-D’Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Lotz MK:** Impact of mechanical trauma on matrix and cells; Clin Orthop (391 Suppl) 90 – 99, 2001
- 27.-Driesang IM, Hunziker EB:** Delamination rates of tissue flaps used in articular cartilage repair; J Orthop Res 18 (6): 909 - 911, 2000
- 28.-Engkvist O:** Reconstruction of patellar articular cartilage with free autologous perichondral grafts. An experimental study in rabbits; Scand J Plast Reconstr Surg 13 (2): 371 – 369, 1979

- 29.-Fragonas E, Valente M, Pozzi – Muzelli M, Toffrain R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F:** Articular Cartilage Repair in rabbits, using suspension of allogenic chondrocytes in alginate; *Biomaterials* 21 (8): 195 – 801, 2000
- 30.-Franzen A, Inerot S, Hejderup SO, Heinegard D:** Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface; *Biochem J* 195 (3): 535 – 543, 1981
- 31. Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Fe-kei RD:** Preliminary results with abrasion autoplasty in the osteoarthritic knee; *Clin Orthop* (182): 200 -205, 1984
- 32.-Frisbie DD, Kawcak CE, Baxter GM, Trotter GW, Powers BE, Lassen ED, McIlwright CW:** Effects of 6-alpha-Methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model; *Am J Vet Res* 59 (12): 1619 – 1628, 1998
- 33.-Gerngross H, Burri C, Claes L:** Experimental Studies on the influence of fibrin factor XIII, and calcitriol on the incorporation and remodelling of autologous bone grafts; *Arch Orthop Trauma Surg* 106 (1) : 23 -31 , 1986
- 34.-Gibson JN, White MD, Chapman VM, Strachan RK:** Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee; *J Bone Joint Surgery Br* 74 (4): 534 -537, 1992
- 35.-Gill TJ:** The Role of the Microfracture Technique in the Treatment of Full – thickness Chondral Injuries; *Op Tech Sports Med* (8): 138 – 140, 2000
- 36.-Gill TJ:** The treatment of Articular Cartilage defects using Microfracture and Debridement; *Am J Knee Surg* 13 (1): 33 -4, 2000
- 37.-Gill TJ, McGillivray J:** The technique of Microfracture for the treatment of articluar Cartilage defects in the knee; *OP Tech in Orthop* (2): 105 -107, 2001
- 38.-Gillogly SD, Voight M, Blackburn T:** Treatment of Articular Cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation; *J Orthop SportsPhys Ther* 28 (4): 241 – 251, 1998

- 39.-Girdler NM:** Repair of articular defects with autologous mandibular condylar cartilage; *J Bone Joint Surg Br* 75 (5): 710 – 714, 1993
- 40.-Goldring MB:** The role of chondrocytes in Osteoarthritis; *Arthritis Rheum* 43 (9):1916 -1926, 2000
- 41.-Gotterbarm T, Reitzel T, Schneider U, Voss HJ, Stofft E, Breusch SJ:** Einwachsverhalten von periostgedeckten Knochendübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen. Eine tierexperimentelle Untersuchung am Göttinger Minipig.; *Orthopäde* 32 (1): 65 – 73, 2003
- 42.-Grande DA, Singh IJ, Pugh J:** Healing of Experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation; *Anat Rec* 218 (2): 142 – 148, 1987
- 43.-Grande DA, Pitman MI, Peterson LI, Menche D, Klein M:** The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation; *J Orthop Res* 7 (2): 208 – 218, 1989
- 44.-Haebler C:** Experimentelle Untersuchung über die Regeneration des Gelenkknorpels; *Klin Chir* (134): 602 – 640, 1925
- 45.-Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M:** Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice; *Orthopedics* 21 (7): 751 – 756, 1998
- 46.-Hangody L, Kish G, Modis L, Szerb I, Gaspar L, Dioszegi Z, Kendig Z:** Mosaicplasty for the treatment of osteochondritis dissecans of the talus: two to seven year results in 36 patients; *Foot Ankle Int* 22 (7): 552 – 558, 2001
- 47.-Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ:** Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads; *Matrix* 12 (2): 116 -129, 1992
- 48.-Hauselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, Stefanovic – Racic M, Evans CH:** Nitric Oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture; *FEBS Lett* 352 (3): 361 – 364, 1994

49.-Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ: Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long – term culture in alginate beads; *J Cell Sci* 107 (Pt 1): 17 -27, 1994

50.-Hauselmann HJ, Flura T, Marti C, Hauser N, Hedbom E: Von der Chondrozytenkultur zum Gelenkknorpelersatz. Entwicklung von de – novo in vitro.: *Schweiz Med Wochenschr* 128 (21): 824 – 832, 1998

51.-Heath CA, Magari SR: Mini Review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro; *Biotechnol Bioeng* (62A): 430 – 437, 1996

52.-Hedbom E, Hettlinger L, Hauselmann HJ: Culture of artificial chondrocytes in alginate gel- means to generate cartilage – like implantable tissue; *Osteoarthritis Cartilage* 9 (Suppl A): 123 -130, 2001

52.a-Hempfling H, Weise K, Bohndorf K, Weber M, Schiltenswolf M, Ludolph E, Schröter F: Begutachtung des Knorpelschadens – traumatisch versus nichttraumatisch-; *DGU-Mitteilungen und Nachrichten* (Suppl 1 /2007): 3 – 60, 2007

53.-Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR: Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes and extends into the cartilage with progressive degeneration; *J Clin Invest* 96 (6): 2859 -2869, 1995

54.-Hollinger JO, Winn S, Bonadio J: Options for tissue engineering to address challenges of the aging skeleton; *Tissue Eng* 6 (4): 341 -350, 2000

55.-Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, Van der Linden AJ: Perichondral grafts for cartilage lesions of the knee; *J Bone Joint Surg Br* 72 (6): 1003 – 1007, 1990

56.-Homminga GN, Bulstra SK, Kuijjer R, Van der Linden AJ: Repair of Sheep articular cartilage defects with a rabbit perichondral graft; *Acta Ortop Scand* 62 (5): 415 – 418, 1991

- 57.-Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R:** Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative study; J Bone Joint Surg Am 85 - A (2): 185 – 192, 2003
- 58.-Howell DS:** Pathogenesis of Osteoarthritis; Am J Med 80 (4B): 24 -28, 1986
- 59.-Hunter W:** Of the structure and diseases of articular cartilage; Philod Trans R Soc Lond 470 (42B): 514 – 521, 1743
- 60.-Hunziker EB, Kapfinger E:** Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage enhances coverage by repair cells; J Bone Joint Surg Br 80 (1): 144 – 150, 1998
- 61.-Hunziker EB:** Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements; Clin Orthop (367 Suppl): 135 -146, 1999
- 62.-Hunziker EB:** Clinical Applicable Animal Models in Tissue Engineering; NewYork: Lippincott, 2000
- 63.-Hurtig M, Pearce S, Warren S, Kalra M, Miniaci A:** Arthroscopic mosaicarthroplasty in the equine carpalbone; Vet Surg 30 (3): 228 -239, 2001
- 64.-Imhoff AB, Ottl M, Burkat A, Traub S:** Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedene Gelenke.; Orthopäde 28 (1): 33 – 44, 1999
- 65.-Insall JN:** The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee; Clin Orthop 101 (1): 61 – 67, 1974
- 66.-Insall JN:** Intra – articular surgery for the degenerative arthritis of the knee – A report of the work of the late K.H. Pridie; J Bone Joint SurgBr 49 (2): 211 – 228, 1967
- 67.-Jackson DW, Simon TM:** Tissue Engineering principles in orthopaedic surgery; Clin Orthop (367 Suppl): 31 - 45, 1999
- 68.-Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon MT:** Spontaneous repair of full – thickness defects in articular cartilage in a goat model. A preliminary study; J Bone Joint Surg Am 83 – A (1): 53 – 64, 2001

- 69.-Johnson LL:** Athroscopic abrasion arthroplasy historical and pathological perspective: present status; *Arthroscopy*2 (1): 54 – 69, 1986
- 70.-Johnson LL:** Arthroscopic Abrasion Arthroslasty; In: McGinty JB, ed. *Operative Arthroscopy*. Philadelphia: Lippincott – Raven, pp. 427. 446, 1996
- 71.-Jubel A, Andermahr J, Koebke J, Hauselmann HJ; Rehm KE:** Die Therapie von Knorpeldefekten 1; *Dtsch Med Wochenschr* 127 (37): 1904 – 1908, 2002
- 72.-Jurvelin J, Kirivanta I, Tammi M, Helminien HJ:** Effect of physical exercise on indentation stiffness of articular cartilage in the canine knee; *Int J Sports Med* 7(2): 106 – 110, 1986
- 73.-Jurvelin J, Kirivanta I, Saamanen AM, Tammi M, Helminen HJ:** Indentation stiffness of young canine knee articular cartilage – influence of strenuous joint loading; *J Biomech* 23 (12): 1239 -1246, 1990
- 74.-Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M:** The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycanes; *Biochem Biophys Acta*297 (2): 456 – 472, 1973
- 75.-Kim HK, Moran ME, Salter RB:** The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits; *J Boone Joint Surgery Am* 73 (9): 1301 -1315, 1991
- 76.-Korhonen RK, Wong MJ, Arokoski J, Lindgren R, Helminen HJ, Hunziker EB, Jurvelin JS:** Importance of the superficial tissue layer for the indentation stiffness of articular cartilage; *Med Eng Phys*24 (2): 99 – 108, 2002
- 77.-Korkola O, Kuokkanen H:** Autogenous osteoperiostal grafts in the reconstruction of full – thickness joint surface defects; *Int Orthop* 15 (3) : 233 -237, 1991

- 78. Kreder HJ, Morsan M, Keely FW, Salter RB:** Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogenic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model; *Clin Orthop* (300): 288 -296, 1994
- 79. Kruger T, Wohlrab D, Reichel H, Klein W:** Der Effekt des arthroskopischen Gelenkdebridements bei fortgeschrittener Arthrose des Kniegelenks; *Zentralbibl Chir* 125 (6): 490 – 493, 2000
- 80. Kurz B, Lemke A, Kehn M, Domm C, Patwari P, Frank EH, Grodzinsky AJ, Schunke M:** Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression; *Arthritis Rheum* 50 (1): 123 – 130, 2004
- 81. Laasanen MS, Toyras J, Hirvonen J, Saarakkala S, Korhonen RK, Nieminen MT, Kiviranta I, Jurvelin JS:** Novel mechano – acoustic technique and instrument for diagnosis of cartilage degeneration; *Physiol Meas* 23 (§): 491 – 503, 2002
- 82. Lai D, Fu L, Weng S, Qui L, Yu C, Wang H, Chen W:** Blocking caspase-3- activity with a snRNA promoter – driven ribozyme enhances survivability of CHO cells cultured in low serum medium and production of interferon – beta; *Biotechnol Bioeng* 85 (1): 20 -28, 2004
- 83. Laprell H, Petersen W:** Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone –cutting system (DBCS) : a 6 to 12 year follow – up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint; *Arch Orthop Trauma Surg* 121 (5): 248 – 253, 2001
- 84. Lexer E:** Substitution of whole of joints from freshly amputated extremities by free plastic operations; *Surt Gynec and Obstet*: 601 – 607, 1908
- 85. Linschoten NJ, Johnson CA:** Arthroscopic debridement of knee joints arthritis: effect of advancing articular degeneration; *J South Orthop Assoc* 6 (1): 25 – 36, 1997
- 86. Liu SR:** Cartilage damage caused by intra – articular injection of prednisolone; *Zonghua Fang She Xue Za Zhi* 22 (1): 45 -47, 1988

87. Loening AM, James E, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, Nuttal ME, Hung HH, Iake SM, Grodzinsky AJ, Lark MW: Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis; Arch Biochem Biophys 381 (2): 205 – 212, 2000

88. Lyrra T, Jurvelin J, Pitkanen P, Vaatainen U, Kiviranta I: Indentation instruments for the measurement of cartilage stiffness under arthroscopic control; Med Eng Phys 17 (5): 395 – 399, 1999

89. Lyrra T, Kiviranta T, Vaatainen U, Helminen HJ, Jurvelin JS: In vivo characterisation of indentation stiffness of articular cartilage in the normal human knee; J Biomed Mater Res 48 (4): 482 – 487, 1999

90. Lyrra – Laitinen T; Niinimäki M, Toyras J, Lindgren R, Jurvelin JS: Optimization of the arthroscopic indentation instrument for the measurement of the cartilage stiffness; Phys Med Biol 44 (2): 2511 – 2524, 1999

91. Mankin HJ: Localisation of tritiated thymidine cartilage: Growth of immature cartilage; J Bone Joint Surg 44A (682 – 688) , 1999

92. Mankin JH: The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts); N Engl J Med 291 (24): 1285 -1292, 1974

93. Mankin HJ: The response of articular cartilage to mechanical injury and osteoarthritis (second of two parts); N Engl J Med 291 (25): 1335 – 1340, 1974

94. Mankin HJ: Chondrocyte transplantation- answers to an old question; N Engl J med 331 (14): 940 – 941, 1994

95. Maroudas A, Bayliss MT, Venn MF: Further studies on the composition of human femoral head cartilage; Ann Rheum Dis 39 (5):514 – 523, 1980

96. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H: Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with the anterior cruciate ligament disruption; Arthroscopy 9 (3): 318 -321, 1993

- 97. McGinlery BJ, Cushner FD, Scott WN:** Debridement Arthroscopy: a 10 year follow –up; Clin Orthop (367): 190 – 194, 1999
- 98. McLaren AC, Blokker CP, Fowler FJ, Roth JN, Rock MG:** Arthroscopic debridement of the knee for osteoarthritis; Can J Surg 34 (6): 595 – 598, 1991
- 99. Messner K, Gillquist J:** Cartilage repair. A critical review. ; Acta Orthop Scand 67 (5): 523 – 529, 1996
- 100. Messner K, Maletius W:** The long – term prognosis for severe damage to weight – bearing cartilage in the knee: a 14 – year clinical and radiographic follow - up in 28 athletes; Acta Orthop Scand 67 (2): 165 -168, 1996
- 101.-Minas T:** Autologous chondrocyte implantation for focal chondrocyte defects of the knee; Clin Orthop (391 Suppl): 349 – 361, 2001
- 102.-Mirashi M, Azzarone B, Soria J; Mirshai F, Soria C:** The role of fibroblasts in organization and degradation of a fibrin clot; J Lab V Clin Med 117 (4): 274 – 281, 1991
- 103.-Mitrovic D, Quintero M, Stankovica; Ryckewaert A:** Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces; Lab Invest 49 (3): 309 – 316, 1983
- 104.-Miuray, Fitzsimmons JS, Commissio CN, Gallay SH, O'Driscoll SW:** Enhancement of periosteal chondrogenesis in vitro. Dose – response for transforming growth factor beta – 1 (TGF – beta12); Clin Orthop (301): 271 – 280 , 1994
- 105.-Moran ME, Kim HK, Salter RB:** Biological resurfacing of full – thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion; J Bone Joint Surg Br 74 (5): 659 – 667, 1992
- 106.-Mosely JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TI, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP:** A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee; N Eng J Med 34 7 (2): 81 – 88, 2002

- 107.-Mukherjee N, Saris DB, Schultz FM, Berglund LJ, An KN:** The enhancement of periosteal osteochondrogenesis in organ culture by dynamic fluid pressure; *J Orthop Res* 19 (4):524 – 530, 2001
- 108.-Muller B, Kohn D:** Indikation und Durchführung der Knorpel – Knochen Anbohrung nach Pridie; *Orthopäde* 28 (1):4 -10, 1999
- 109.-Murray RC, Debowes RM, Gaughan EM, Zhu CF, Atanasious KA:** The effects of intra – articular methylprednisolone and exercise on the mechanical properties of articular cartilage in the horse; *Osteoarthritis Cartilage* 6 (2): 106 -114, 1998
- 110.-Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI:** Culture – expanded human periosteal – derived cells exhibit osteochondral potential in vivo; *J Orthop Res* 9 (4): 465 – 476, 1991
- 111.-Nehrer S, Minas T:** Treatment of articular cartilage defects; *Invest Radiol* 35 (10): 639 – 646, 2000
- 112.-Niskanen RO, Paavilainen PJ, Jaakkola M, Korkola OL:** Poor correlation of clinical signs with patellar cartilaginous changes; *Arthroscopy* 17 (3): 307 – 310, 2001
- 113.-O'Driscoll SW, Salter RB:** The induction of neochondrogenesis in free autogenous periosteal grafts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit; *J Bone Joint Surg Am* (66): 1248 -1257, 1984
- 114.-O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB:** The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full – thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit; *J Bone Joint Surg Am* 68 (7):1017 – 1035, 1986
- 115.-O'Driscoll SW, Salter RB:** The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous periosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit.; *Clin Orthop* (208):131 – 140, 1986

- 116.-O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB:** Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full –thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow –up report after one year; J Bone Joint Surg Am 70 (4): 595 - 606, 1988
- 117.-O'Driscoll SW, Recklies AD, Poole AR:** Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in – vitro study; J Bone Joint Surg Am 76 (7):1042 -1051, 1994
- 118.-O'Driscoll SW:** The healing and regeneration of articular cartilage; J bone Joint Surgery Am 80 (12): 1795 – 1812 , 1998
- 119.-Ohlsen L:** Cartilage formation from free perichondral grafts : an experimental study in rabbits; Br J Plast Surg 29 (3): 262 -267, 1976
- 120.-Olah EH, Kostensky KS,:** Effect of prednisolone on the glycosaminoglycane components of the regenerating articular cartilage; Acta Biol 27 (3): 129 -134, 1976
- 121.-Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE:** The use of lateral patellar autologous grafts for the repair of large osteochondral defects in the knee; J Bone Joint Surg Am 77 (1): 65 – 72, 1995
- 122.-Outerbridge HK, Outerbridge RE, Smith DE:** Osteochondral defects in the knee. A treatment using lateral patellar autografts; Clin Orthop (377): 145 – 1251, 2000
- 123.-Paget J:** Healing of injuries in various tissues; Lect Surg Path (Lond) 1, 2623 – 270,1853
- 124.-Paige JT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BJ, Vacanti JP, Vacanti CA:** De - novo cartilage generation using calcium – alginate chondrocyte constructs; Plast Reconstr Surg 97 (1): 168 – 178, 1996
- 125.-Pässler HH:** Die Mikrofrakturierung zur Behandlung von Knorpeldefekten; Zentrbl Chir (125): 500 – 504, 2000
- 126.-Patwari P, Fay J, Cook MN, Badger Am, Kerin AJ, Lark MW, Grodzinsky AJ:** In vitro Models for investigation of the effects of acute mechanical injury on cartilage; Clin Orthop (391 Supp I): 61 - 71, 2001

- 127.-Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K:** The influence of transforming growth factor beta1 on mesenchymal cell repair of full – thickness cartilage defects; *J Biomed Mater Res* 52 (3): 543 – 552, 2000
- 128.-Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren – Jansson EM, Linfohl A:** Two to 9 – year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee; *Clin Orthop* (374): 212 – 234, 2000
- 129.-Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A:** Autologous chondrocyte transplantation; Biomechanics and long – term durability; *Am J Sports Med* 30 (1): 2 -12, 2002
- 130.-Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A:** Treatment of osteochondrosis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation : results at two to ten years; *J Bone Joint Surg Am* 85 – A Suppl 2: 17 – 24, 2003
- 131.-Poole AR, Webber C, Pidoux I, Choi H, Rosenberg LC:** Localization of Dermatan sulphate proteoglycan (DS – PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues; *J Histochem Cytochem* 34 (5): 619 – 625, 1986
- 132.-Poole AR:** Cartilage in health and disease. In: Koopman W, ed. *Arthritis and Allied Conditions. A textbook of Rheumatology. Vol. 1* Ed. 14. New York: Lippincott Williams and Wilkins, pp. 22360 – 2284, 2001
- 133.-Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S:** Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair, *Clin Orthop* (391 Suppl): 26 - 33, 2001
- 134.-Poole AR:** What type of cartilage repair are we attempting to attain? ; *J Bone Joint Surg Am* 85 –A Suppl 2: 40 – 44, 2003
- 135.-Pridie KH:** A method of resurfacing osteoarthritic knee joints; *J Bone Joint Surg Br* (40): 618 – 619, 1959
- 136.-Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Eibach T, Peters C, Baldus SE, Rehm KE:** Soft tissue reaction of different biodegradable polylactide implants; *Biomaterials* 25 (2):259 – 267, 2004

137.-Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R: Mechanical overload induces VEGF in cartilage disc via hypoxia – inducible factor; *Am J Pathol* 164 (1):185 – 192, 2004

138.-Reading AD, Rooney P, Taylor GJ: Quantitative assessment of the effect of 0.05% chlorhexidine on rat articular cartilage metabolism in - vitro and in – vivo; *J Orthop Res* 18 (5): 762 – 767, 2000

139.-Reddi AH: Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials; *Tissue Eng* 6 (4):345 -349, 2000

140.-Reddi AH: Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells and biomimetic biomaterials; *Tissue Eng* 6 (4): 351 – 359, 2000

141.-Reddi AH: Bone morphogenic proteins: from basic science to clinical applications; *Biochem Soc Trans* 28 (4): 345 – 349, 2000

142.-Rehm KE, Helling HJ, Claes L: Bericht der Arbeitsgruppe ‚Biodregradable‘ Implantate; *Aktuelle Traumatol* 24 (2): 70 – 73, 1994

143.-Rieppo J, Toyras J, Nieminen MT, Hyttinen M, Helminen HJ, Jurvelin J: Quantitative microscopical and mechanical analyses reveal sensitively structural and functional changes of articular cartilage after enzymatic degradation using collagenase and elastase; *Trans Orthop Res Soc* (25): 905, 2000

144.-Rieppo J, Toyras J, Nieminen MT, Kovanen V, Hyttinen MM, Korhonen RK, Jurvelin J, Helminen HJ: Structure - function relationships in enzymatically modified articular cartilage; *Cells Tissues Organs* 175 (3):121 – 132, 2003

145.-Ritsila VA, Jaroma M: Periosteal and perichondral grafting in reconstructivesurgery. *Clin Orthop*, (302): 259 – 265, 1994

146.-Robion FC, Doize B, Boure L, Marcoux M, Ionescu M, Reiner M, Poole AR, Laverty S: Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study the effects of repeated intra – articular administration of methyl prednisolone acetate on articular cartilage in vivo; *J Orthop Res*19 (2): 250 -258, 2001

147.-Rudel T: Caspase inhibitors in prevention of apoptosis; Herz 24 (3): 236 – 241, 1999

148.-Sahlstrom A, Johnell O, Redlund – Johnell I: The natural course of arthrosis of the knee; Clin Orthop (340):152 – 157, 1997

149.-Schmidt H, Schulze KJ, Cyffka R: Ergebnisse der Behandlung von Knorpelschäden durch Pridie – Bohrung am Kniegelenk; Beitr Orthop Traumatol 35 (3):117 – 122, 1988

150.-Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB: Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protection , synthesized by cells lining the synovial joints; J Orthop Res 17 (1):110 – 120, 1999

151.-Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ: Cell origin and differentiation in the repair of full – thickness defects of articular cartilage; J Bone Joint Surg Am 75 (4): 532 – 553, 1993

152.-Shelbourne KD, Jari S, Gray T: Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history; J Bone Joint Surg Am 85 – A Suppl 2: 8 -16, 2003

153.-Shoemaker RS, Bertone AL, Martin GS, McIlwraith CW, Roberts ED, Pechman R, Kearney MT: Effects of intra- articular administration of methyl prednisolone acetate on normal articular cartilage and on healing of experimentally induced osteochondral defects in horses; Am J Vet Res 53 (8): 1446 – 1453, 1992

154.-Shortkroff S, Barone L, Hsu HP, Wrenn C, Gagne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M: Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model : the role of cultured Chondrocytes in regeneration of articular cartilage; Biomaterials 17 (2):147 – 154 , 1996

155.-Siebert CH, Miltner O, Weber M, Sopka S, Koch S, Niedhart C: Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF; Arthroscopy 19 (2):182 – 187, 2003

156.-Simon LS: Osteoarthritis: A Review; Clin Cornerstone 2 (2): 26 – 37, 1999

- 157.-Skoog T, Ohlsen L, Sohn SA:** Perichondral potential for cartilagenous regeneration ; Scand J Plast Reconstr Surg 6 (2):123 – 125, 1972
- 158.-Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ:** Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk; Orthopäde 28 (1): 26 – 32, 1999
- 159.-Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG:** Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11 – year follow – up; Arthroscopy 19 (5): 477 – 484, 2003
- 160.-Stockwell RA, Meachin G: The Chondrocytes:** In Freeman: MAR ed. Adult Articular Cartilage. Ed. 2 Tunbridge Wells, United Kingdom : Pitman Medical, pp.66 – 144, 1979
- 161.-Szomor ZL, Martin TE, Boar F, Murrell GA:** The protective effects of mechanical transplantation on cartilage. An experimental study in sheep; J Bone Joint Surg Am 82 (1):80 – 88, 2000
- 162.-Tew SR, Kwan AP, Hann A, Thomson BM, Archer CW:** The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis; Arthritis Rheum 43 (1): 215 – 225, 2000
- 163.-Thompson RC, Jr:** An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within in the joint; Clin Orthop (107):239 - 248, 1975
- 164.-Trumble T, Allan CH, Miyano J, Clark JM, Ott S, Fernicola P, Magnusson M, Tencer A:** A preliminary study of joint surface changes after an intra – articular- fracture: a sheep model of tibia fracture with weight bearing after external fixation ; J Orthop Trauma 15 (5):326 – 332, 2001
- 165.-Van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA:** Epidemiology of Osteoarthritis: Zoete Meer Survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that of 10 other populations; Ann Rheum Dis 48 (4): 271 – 280, 1989

166.-Vasara AI, Nieminen MT, Peterson L, Lindahl A, Jurvelin JS, Kiviranta I: In vivo assessment of autologous chondrocyte transplantation using arthroscopic stiffness measurement and quantitative MRI of proteoglycans; *Trans Orthop Res Soc*(27): 458, 2002

167.-von Schroeder HP, Kwan M, Amiel D, Coutts RD: The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects; *J Biomed Mater Res* 25 (3):329 – 339, 1991

168.-Wang Q, Breinan HA, Hsu HP, Spector M: Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of non-vascular alpha – smooth muscle actin – containing cells; *Wound Repair Regen* 8 (2): 145 – 158, 2000

169.-Warman ML: Human genetic insights into skeletal development, growth, and homeostasis; *Clin Orthop* (379 Suppl): 40 – 54, 2000

170.-Wattersson JR, Esdaile JM: Viscosupplementation: Therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee; *J Am Acad Orthop Surg* 8 (5): 277 – 284, 2000

171.-Wei X, Messner K: Maturation .- dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joints; *J Biomed MaterRes* 46 (4):539 – 548,1999

172.-Williams JM, Rayan V, Sumner DR, Thonar EJ: The use of intra – articular Sodium – hyaluronate as a potential chondroprotective device in experimentally induced acute articular cartilage injury and repair in rabbits; *J Orthop Res* 21 (2): 305 -311, 2003

173.-Wohl G, Goplen G, Ford J; Novak K, Hurtig M, McPherson R, McGann L, Schachar N, Zernicke RF: Mechanical integrity of subchondral bone in osteochondral autografts and allografts; *Can J Surg* 41 (3): 228 – 233,1998

174.-Wong M, Siegrist M, Wang X, Hunziker E: Development of mechanically stable alginate / chondrocyte constructs: effects of glucuronic acid content and matrix synthesis; *J Orthop Res*19 (3): 493 – 499, 2001

175.-Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR: Sites of collagen cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13; *Arthritis Rheum* 46 (8): 2087 – 2094 , 2002

176.-Zarnett R, Salter RB: Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin; *Can J Surg* 32 (3): 171 – 174, 1989

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Outerbridge Score

Tab. 1.2 ICRS Klassifikation der Knorpelschäden

Tab. 1.3 Chirurgische Therapieoptionen

Tab. 2.1 Anzahl und Aufteilung der Versuchstiere

Tab. 2.2 Verteilung und Identifikation der Versuchstiere

Tab. 2.3 Standardisierter Auswertungsablauf nach der Opferung

Tab. 2.4 MRT Score zur Knorpelbeurteilung

Tab. 2.5 MRT Score zur Beurteilung des subchondrale Knochens

Tab. 2.6 ICRS Cartilage Repair Assessment Score

Tab. 2.7 ICRS Visual Histological Score

Tab. 2.8 Mankin Score

Tab. 3.1 Anzahl der Versuchstiere zu Versuchende

Tab. 3.2 MRT Bewertung der Knorpeloberfläche bei T1-Gewichtung

Tab. 3.3 MRT Bewertung der Knorpeloberfläche bei T2 Gewichtung

Tab. 3.4 T2 Gewichtung bei subchondralem Ödem

Tab. 3.5 Defektdurchmesser

Tab. 3.6 ICRS Cartilage Repair Assessment Score

Tab. 3.7 Ergebnisse des ICRS Score und Mankin Score

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Detailaufnahme der Stanze

Abb. 2.2 Operationsvorbereitung

Abb. 2.3 Intraoperative Darstellung nach Setzen des 4mm Defektes

Abb. 2.4 Intraoperative Darstellung nach Setzen des 4mm Defektes

Abb. 3.1 Unbehandelter Defekt aus der 4-Wochen-Gruppe

Abb. 3.2 Histologiepräparat der 8-Wochen-Gruppe

Abb. 3.3 Histologiepräparat nach 12 Wochen

Abb. 4.1 Histologiepräparat eines unbehandelten Defektes nach 16
Wochen

Grafik 3.1 Defektdurchmesser

7.3 Lebenslauf

Mein Name ist Michael Weiss. Ich wurde am 2. Oktober 1979 als Ältester von drei Geschwistern in Windhuk / Namibia geboren. Mein Vater, Walter Kurt Graca Weiss, 1956 in Huambo / Angola geboren, kam 1975 als Bürgerkriegsflüchtling nach Namibia, wo er bis zu seinem Tod 1992 als Kfz – Meister arbeitete. Mein Mutter Christine Weiss, geb. Böck, wurde 1960 in Windhuk geboren und arbeitet als MTA noch dort. Meine Schwester Silvia, Jahrgang 1981, ist Tierärztin in Pretoria / Südafrika; Stefanie, die 1988 als Jüngste geboren wurde, studiert seit 2007 Humanmedizin ebenfalls in Pretoria.

Mit sechs Jahren wurde ich 1986 an die Deutsche Grundschule in Windhuk eingeschult, von der ich 1993 auf die Afrikaanse Oberstufe wechselte. Dort beendete ich meine Schullaufbahn 1997 mit dem englischen Abitur (HIGCSE). Im gleichen Jahr bewarb ich mich bei der deutschen Bundeswehr für die Offizierslaufbahn mit Medizinstudium. Grundvoraussetzung dafür war das deutsche Abitur, welches ich im Oktober 1998 an der Deutschen Höheren Privatschule in Windhuk erwarb.

Seit dem 12. November 1998 bin ich in Deutschland und wurde zum 1. Januar 1999 als Grundwehrdienstleistender in die Bundeswehr eingezogen. Im Juli 1999 wechselte ich dann als Zeitsoldat in die Laufbahn der Reserveoffiziere, um im Januar 2001 in die Laufbahn der Sanitätsoffiziere übernommen zu werden. Mein Humanmedizinstudium nahm ich zum Sommersemester 2001 an der Universität Köln auf.

Das Physikum erwarb ich im März 2004 und mein Praktisches Jahr (PJ) erfolgte an der Universitätsklinik Köln. Famulaturen hab ich u.a. in Bundeswehreinrichtungen, in Israel und am Tropenmedizinischen Institut der Universität Leipzig absolviert.

Nebenberuflich arbeite ich in der Notaufnahme des St. Elisabeth Krankenhaus, Köln – Lindenthal. Seit November 2006 habe ich nach zweijähriger Ausbildung die Prüfung zum Heilpraktiker erfolgreich bestanden. Ich bin geschieden.

Nach meinem Studium bin ich für das Bundeswehrkrankenhaus Berlin vorgesehen. Ich strebe eine Ausbildung als Facharzt für Labormedizin an.

gez. W E I S S, Michael

Köln, den 1. August 2008

