

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung des
Universitätsklinikums des Saarlandes

Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Henning Madry

Bioinspirierte Trägermaterialien zur Rekonstruktion des subchondralen Knochens im Kontext der osteochondralen Reparatur

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

Eingereicht von: Kai Hendrik Lindner, geboren am 09.11.1987 in Lebach.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract.....	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract	2
2. Einleitung.....	3
2.1 Problematik und Überblick.....	3
2.2 Biologische Grundlagen der osteochondralen Einheit.....	4
2.3 Aufbau der osteochondralen Einheit	5
2.4 Einteilung der Knorpeldefekte	6
2.5 Klinische Konzepte zur Therapie von fokalen chondralen - und osteochondralen Defekten.....	7
2.6 Experimentelle Therapiekonzepte zur Reparatur osteochondraler Defekte.....	9
2.6.1 Tissue Engineering.....	9
2.6.2 Bauart der Trägermaterialien.....	9
2.6.3 Materialien	10
2.6.4 Zellen	12
2.7 Konzept der vorliegenden Arbeit	12
3. Fragestellungen	14
4. Materialien	15
4.1 Puffer, Lösungen, Medien	15
4.2 Chemikalien	16
4.3 Enzyme	17
4.4 Antikörper	17
4.5 Trägermaterialien.....	17
4.6 Versuchstiere.....	18
4.7 Geräte.....	18
4.8 Operationsinstrumentarium und –materialien.....	19

4.9 Verbrauchsmaterialien	19
4.10 Software	19
5. Methoden.....	20
5.1 Überblick	20
5.2 Implantation des Trägermaterials.....	20
5.2.1 Tiere.....	21
5.2.2 Operation	21
5.2.3 Nachbehandlung	21
5.3 Probengewinnung	22
5.4 Makroskopische Auswertung.....	22
5.5 Auswertung der Mikrofokus-Computertomographie	24
5.6 Histologische Evaluation	26
5.6.1 Herstellung der histologischen Präparate.....	26
5.6.2 Färbung der Schnitte	27
5.7 Biochemische Evaluation.....	33
5.7.1 Papain-Verdau	33
5.7.2 DNS Bestimmung.....	33
5.7.3 Proteoglykan Bestimmung	33
5.7.4 Protein-Bestimmung	34
5.8 Statistische Auswertung.....	35
6. Ergebnisse	36
6.1 Vergleich des Sr-HT-Gahnit - und TCP/HA Trägermaterials	36
6.2 Auswirkungen der Implantation der Trägermaterialien auf die Gelenkhomöostase ..	37
6.2.1 Makroskopischer Befund 28 Tage nach Implantation der Trägermaterialien	37
6.2.2 Synovialmembran.....	37
6.2.3 Degenerative Veränderungen im an den Defekt angrenzenden Knorpel.....	38
6.3 Effekt der Implantation beider Trägermaterialien auf die Rekonstruktion der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens.....	39

6.3.1 Auswirkungen der Implantation der Trägermaterialien auf den benachbarten Knochen.....	40
6.3.2 Auswirkungen auf den Knochen im Defekt	43
6.4 Effekt der subchondralen Implantation der Trägermaterialien auf die Regeneration des Gelenkknorpels.....	48
6.4.1 Makroskopische Evaluation des Gelenkknorpels.....	48
6.4.2 Biochemische Evaluation des Gelenkknorpels	50
6.4.3 Immunhistochemische Evaluation des Gelenkknorpels.....	53
6.4.4 Histologische Evaluation des Gelenkknorpels.....	55
6.5 Korrelationsanalyse zwischen Knorpel- und Knochenreparatur.....	60
6.5.2 Korrelationen der subartikulären Spongiosa	60
7. Diskussion.....	62
7.1 Eignung des gewählten Tiermodells.....	63
7.2 Bewertungssysteme zur Evaluation des Defektareals	63
7.3 Veränderungen des Gelenks nach Implantation der Trägermaterialien.....	63
7.3.1 Veränderungen in der Synovialmembran	63
7.3.2 Veränderungen im benachbarten Knorpel.....	64
7.4 Veränderungen im subchondralen Knochen nach Implantation der Trägermaterialien	64
7.4.1 Veränderungen im benachbarten Knochen nach Implantation der Trägermaterialien.....	64
7.4.2 Veränderung des Knochens im Defekt nach Implantation der Trägermaterialien.....	65
7.5 Auswirkungen der subchondralen Implantation von Trägermaterialien auf die Knorpelreparatur	66
7.5.1 Makroskopische Evaluation der Defektreparatur	66
7.5.2 Biochemie der Gelenkknorpelreparatur	67
7.5.3 Immunhistochemie des Reparaturgewebes	68
7.5.4 Histologie des Reparaturgewebes.....	69
7.6 Korrelationsanalyse	70

7.7 Fazit und Ausblick.....	71
8. Literaturverzeichnis.....	73
9. Danksagung	84

Tabellen

Tabelle 1. Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Tabelle 2. Parameter zur Auswahl eines geeigneten chirurgischen Verfahrens.....	7
Tabelle 3. Puffer und Lösungen.....	16
Tabelle 4. Chemikalien.....	17
Tabelle 5. Verwendete Geräte.....	18
Tabelle 6. Makroskopie Bewertungssystem nach Goebel.....	23
Tabelle 7. Oswestry Makroskopie Bewertungssystem.....	24
Tabelle 8. Histologisches Bewertungssystem nach Sellers.....	28
Tabelle 9. Histologisches Bewertungssystem nach Wakitani.....	29
Tabelle 10. Laverty Bewertungssystem zur Evaluation des benachbarten Knorpels.....	30
Tabelle 11. Synovialmembran Bewertungssystem nach Fortier.....	31
Tabelle 12. Schema Standardreihe Proteoglykanbestimmung.....	34
Tabelle 13. Schema Standardreihe Proteinbestimmung.....	34
Tabelle 14. Korrelationskoeffizienten und deren Bedeutung.....	35
Tabelle 15. Vergleich der Mikroarchitektur der Trägermaterialien.....	37
Tabelle 16. Ergebnisse des Synovialis Bewertungssystems nach Fortier.....	38
Tabelle 17. Mikro-CT Parameter der benachbarten subchondralen Knochenplatte.....	41
Tabelle 18. Mikro-CT Parameter der benachbarten subartikulären Spongiosa.....	42
Tabelle 19. Mikro-CT Parameter der subchondralen Knochenplatte im Defekt.....	44
Tabelle 20. Mikro-CT Parameter der subartikulären Spongiosa im Defekt.....	46
Tabelle 21. Ergebnisse des makroskopischen Bewertungssystems nach Goebel.....	49
Tabelle 22. Ergebnisse des Oswestry Makroskopie Bewertungssystems.....	50
Tabelle 23. Ergebnisse der biochemischen Analysen des knorpeligen Reparaturgewebes.....	51
Tabelle 24. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Sellers.....	57
Tabelle 25. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Wakitani.....	58
Tabelle 26. Ergebnisse der Korrelationsanalyse.....	61

Abbildungen

Abbildung 1. Architektur der osteochondralen Einheit.	6
Abbildung 2. Bauarten von Trägermaterialien.	9
Abbildung 3. Versuchsübersicht.	20
Abbildung 4. Schemazeichnung der „Volumes of Interest“ (VOI).	25
Abbildung 5. Vergleich des Sr-HT-Gahnit - und TCP/HA Trägermaterials.	36
Abbildung 6. Ergebnisse des Synovialis Bewertungssystems nach Fortier.	38
Abbildung 7. Ergebnisse des Laverty Bewertungssystems.	39
Abbildung 8. Übersicht des knöchernen Reparaturgewebes.	40
Abbildung 9. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der benachbarten subchondralen Knochenplatte.	41
Abbildung 10. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der benachbarten subartikulären Spongiosa.	43
Abbildung 11. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der subchondralen Knochenplatte im Defekt.	44
Abbildung 12. Knochenmineraldichte der subchondralen Knochenplatte im Defekt.	45
Abbildung 13. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der subartikulären Spongiosa im Defekt.	47
Abbildung 14. Knochenmineraldichte der subartikulären Spongiosa im Defekt.	47
Abbildung 15. Makroskopisches Erscheinungsbild der Defekte nach 4 Wochen.	48
Abbildung 16. Ergebnisse des Makroskopie Bewertungssystems nach Goebel.	49
Abbildung 17. Ergebnisse des Oswestry Makroskopie Bewertungssystems.	50
Abbildung 18. Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro Gesamtprotein.	51
Abbildung 19. Ergebnisse Biochemie: DNS pro Gesamtprotein.	52
Abbildung 20. Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro DNS.	52
Abbildung 21. Übersicht Typ-I-Kollagen Färbung.	53
Abbildung 22. Typ-I-Kollagen Färbung des Reparaturgewebes (Knorpel).	53
Abbildung 23. Typ-I-Kollagen Färbung des Reparaturgewebes (Knochen).	54
Abbildung 24. Übersicht Typ-II-Kollagen Färbung.	54
Abbildung 25. Typ-II-Kollagen Färbung des Reparaturgewebes (Knorpel).	55
Abbildung 26. Übersicht Safranin-O Färbung.	55
Abbildung 27. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Sellers.	57
Abbildung 28. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Wakitani.	59
Abbildung 29. Polarisationsmikroskopie.	60

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BMD	Bone mineral density (Knochenmineraldichte)
BS/BV	Bone surface / volume (Knochenoberfläche/Volumen)
BS/TV	<i>bone surface density</i> (Knochenoberflächendichte)
BV/TV	<i>bone volume fraction</i> (Knochenvolumen Anteil)
bzw.	beziehungsweise
Ct.Th.	<i>Cortical thickness</i> (kortikale Dicke)
DA	<i>degree of anisotropy</i> (Grad der Anisotropie)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FD	<i>fractal dimension</i> (fraktale Dimension)
h	Stunde
max.	maximal
Mikro-CT / μ CT	Mikrofokus-Computertomographie
min	Minute
mind.	mindestens
MW	Mittelwert
NB	Nicht bestimmbar
PG	Proteoglykane
ROI	<i>Region of interest</i> (Region von Interesse)
s	Sekunde
Score	Bewertungssystem
SD	Standardabweichung
Spearman	Spearman's Korrelationskoeffizient;
SKD	Subchondrale Knochenplatte-Defekt
SMI	<i>structure model index</i> (Struktur Model Index)
SSD	Subartikuläre Spongiosa-Defekt
Tb.N.	<i>trabecular number</i> (Trabekelanzahl)
Tb.Pf.	<i>trabecular pattern factor</i> (trabekulärer Musterfaktor)
Tb.Sp.	<i>trabecular separation</i> (trabekuläre Separation)
Tb.Th.	<i>trabecular thickness</i> (Trabekeldicke)
ü.N.	über Nacht

Tabelle 1. Abkürzungsverzeichnis.

1. Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Fragestellung: Die Reparatur osteochondraler Defekte ist ein weiterhin ungelöstes Problem. Subchondral implantierbare, biologisch abbaubare Gerüstwerke sind ein vielversprechender Ansatz zur Lösung dieses Problems. Strontium-Hardystonit-Gahnit (Sr-HT-Gahnit) ist eine spezielle, bioinspirierte resorbierbare Keramik, die *in vitro* eine sehr gute Osteoinduktivität und Stabilität aufweist, bisher aber noch nicht im Kontext der osteochondralen Reparatur getestet wurde. Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit (TCP/HA) - Gerüstwerke sind bereits im klinischen Einsatz. In dieser Arbeit überprüften wir die Thesen, dass (1) die subchondrale Implantation von Sr-HT-Gahnit *in vivo* unbedenklich ist, (2) die Implantation von Sr-HT-Gahnit-, bzw. TCP/HA-Trägermaterialien mit vergleichbaren strukturellen Parametern, eine bessere Knochenregeneration als Leerdefekte erlauben, (3) Sr-HT-Gahnit-Gerüstwerke eine bessere Rekonstruktion des subchondralen Knochens als TCP/HA Gerüstwerke bedingen und (4) die Regeneration des subchondralen Knochens mit einer besseren Knorpelreparatur korreliert.

Methoden: In standardisierte osteochondrale Defekte in Femurtrochleas von erwachsenen Chinchilla-Bastard-Kaninchen wurden Sr-HT-Gahnit- oder TCP/HA-Gerüstwerke subchondral implantiert. Nach 28 Tagen *in vivo* wurde die osteochondrale Reparatur makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch anhand etablierter Bewertungssysteme, sowie biochemisch, und radiologisch mittels Mikrofokus-Computertomographie untersucht.

Ergebnisse: (1) Subchondrale Implantation von Sr-HT-Gahnit zeigte nach 4 Wochen *in vivo* keine negativen Auswirkungen auf die Gelenkhomöostase. (2) Implantation sowohl von Sr-HT-Gahnit-, als auch von TCP/HA-Trägermaterialien, führte zu einer besseren Knochenregeneration als in Leerdefekten. (3) Sr-HT-Gahnit-Gerüstwerke erlaubten eine bessere Rekonstruktion des subchondralen Knochens als TCP/HA Gerüstwerke. (4) Die Knorpelreparatur war sowohl nach Implantation von Sr-HT-Gahnit als auch in Leerdefekten verbessert im Vergleich mit TCP/HA-Trägermaterialien. Eine verbesserte Regeneration des subchondralen Knochens korreliert in diesem Modell nicht mit einer besseren Knorpelreparatur.

Schlussfolgerung: Die Reparatur des subchondralen Knochens beeinflusst signifikant die Regeneration der gesamten osteochondralen Einheit im fokalen Defektmodell. Synthetische Gerüstwerke aus Strontium-Hardystonit-Gahnit sind potentiell geeignet, eine optimale Rekonstruktion des subchondralen Knochens zu erreichen. Weitere Studien in Großtiermodellen werden die klinische Eignung dieses Materials genauer beurteilen.

1.2 Abstract

Bioinspired scaffolds to reconstruct the subchondral bone for osteochondral Repair.

Background: The repair of osteochondral defects remains an unsolved problem. Subchondral implantation of biodegradable scaffolds is a promising approach for regenerating the subchondral bone. Scaffolds based on tricalciumphosphate-hydroxylapatite (TCP/HA) are already used clinically for subchondral regeneration. Strontium-hardystonite-gahnite (Sr-HT-Gahnite) is a bioinspired, resorbable ceramic, characterized by a very good osteoinductivity and stability *in vitro*, which has not yet been tested in the context of the repair of focal osteochondral defects. In this work, we tested the theses, that (1) subchondral implantation of Sr-HT-Gahnite does not lead to adverse events *in vivo*, (2) subchondral implantation of either Sr-HT-Gahnite or TCP/HA scaffolds, tailored to have similar structural parameters, results in an improved subchondral bone regeneration compared with empty defects, (3) Sr-HT-Gahnite scaffolds induce a superior reconstruction of the subchondral bone than TCP/HA scaffolds and (4) regeneration of the subchondral bone correlates with articular cartilage repair.

Methods: Sr-HT-Gahnite or TCP/HA scaffolds were implanted in a strict subchondral location in standardized osteochondral defects in the femoral trochlea of adult Chinchilla bastard rabbits. After 28 days *in vivo*, osteochondral repair was evaluated qualitatively and quantitatively based on established macroscopical, histological and immunohistochemical scoring systems, and biochemical and microfocus-computertomographical analyses.

Results: (1) Subchondral implantation of Sr-HT-Gahnite scaffolds was well tolerated without an effect on joint homeostasis *in vivo*. (2) Implantation of Sr-HT-Gahnite and TCP/HA scaffolds revealing significant improvements of subchondral bone regeneration compared with empty defects. (3) Sr-HT-Gahnite scaffolds allowed for a significantly enhanced reconstruction of the subchondral bone than TCP/HA scaffolds. Articular cartilage repair was significantly superior after implantation of Sr-HT-Gahnite scaffolds and in empty defects compared with the implantation of TCP/HA scaffolds. (4) Regeneration of the subchondral bone does not correlate with articular cartilage repair in this model system at the selected time point.

Discussion and Conclusion: The repair of the subchondral bone significantly influences the regeneration of the entire osteochondral unit in a focal articular cartilage defect model. Synthetic strontium-hardystonite-gahnite scaffolds are well suited to enable an optimal subchondral bone reconstruction. Studies in large translational animal models will further evaluate the clinical suitability of this compound.

2. Einleitung

2.1 Problematik und Überblick

Die Reparatur von osteochondralen Defekten stellt ein weiterhin ungelöstes Problem dar. Bisher ist es nicht gelungen eine langfristig zufriedenstellende Regeneration von Gelenkknorpeldefekten zu erreichen^{1,2}. Gelenkknorpel besitzt nur eine sehr eingeschränkte Heilungsfähigkeit³⁻⁷. Es entsteht meist ein qualitativ minderwertiger Faserknorpel, welcher der hohen biomechanischen Belastung nicht standhalten kann. Als Folge kann, vom Defekt ausgehend, Arthrose entstehen^{4,8-12}.

Osteochondrale Defekte nehmen eine Sonderstellung ein, da bei ihnen zwei verschiedene Gewebstypen, Knochen und Knorpel, mit unterschiedlichen Heilungskapazitäten^{11,13}, involviert sind¹⁴. Zusammen bilden Gelenkknorpel und subchondraler Knochen die osteochondrale Einheit¹⁵. Ohne einen vitalen subchondralen Knochen ist eine Heilung des darüberliegenden Knorpelgewebes unmöglich¹⁶. Die Ursachen für solche osteochondralen Defekte reichen von traumatischen Läsionen¹⁷, über Osteochondrosis dissecans bis hin zu Knochennekrosen¹⁸. Aktuelle klinische Therapiekonzepte beinhalten die Transplantation eines oder mehrerer autologer, oder allogener, osteochondraler Zylinder. Der Nachteil dieser Therapie besteht in den Schäden an der Entnahmestelle, der Limitierung ihrer Größe und Anzahl, sowie in der Problematik eine kongruente Gelenkfläche herzustellen¹⁹. Deshalb hat es in den letzten Jahren vermehrt Versuche gegeben, diese osteochondrale Einheit durch die technische Konstruktion von Geweben nachzuempfinden und osteochondrale Defekte mit Trägermaterialien (Gerüstwerke) auszufüllen und zu therapieren^{20,21,22}. Bei vielen verschiedenen Ansätzen bezüglich Biomaterial, Form und Eigenschaften der Trägermaterialien gilt es allerdings noch, die bestmöglichen Eigenschaften der Komponenten zu finden²³.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, welches Biomaterial zur Regeneration des subchondralen Knochens geeignet ist. Hierzu implantierten wir Strontium-Hardystonit-Gahnit Gerüstwerke (Sr-HT-Gahnit), welche bzgl. mechanischer Eigenschaften und Struktur dem menschlichen Knochen nachempfunden sind, sowie Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit (TCP/HA) Keramiken in die Femurkondylen von Chinchilla-Bastard-Kaninchen. Leerdefekte dienten als Kontrollgruppe. Anhand etablierter Bewertungssysteme

wurden die Defekte 28 Tage später makroskopisch und histologisch miteinander verglichen, der DNS -, Protein- und Proteoglykangehalt in den Defekten bestimmt, sowie die Struktur des subchondralen Knochens mittels hochauflösender Mikrofokus-Computertomografie untersucht.

2.2 Biologische Grundlagen der osteochondralen Einheit

Der hyaline Gelenkknorpel besteht aus Chondrozyten und aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Diese Matrix wird von den Chondrozyten produziert, in welcher sie eingebettet sind. Daher weisen sie ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum, einen großen Golgi-Apparat und viele Vesikel als Zeichen ihrer sekretorischen Aktivität auf²⁴. Ernährt werden die Zellen über die Synovialflüssigkeit, da hyaliner Gelenkknorpel ein alymphatisches, avaskuläres¹², anervales und bradytrophes Gewebe ist²⁵. Mit zunehmendem Alter nimmt ihre Sensibilität für mechanische Stimuli und Wachstumsfaktoren ab, was dazu führt, dass sich ihre mitotische und metabolische Aktivität verringert^{26,27}. Die extrazelluläre Matrix ist für die mechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes verantwortlich²⁸. Mit seiner glatten, reibungsarmen Oberfläche und Elastizität ist das Knorpelgewebe optimal auf Belastungen in Form von Druck- und Stoßkräften angepasst^{28,29}. Sie besteht hauptsächlich aus Wasser, Typ-II-Kollagen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und nicht-kollagen Proteinen, welche zu einem komplexen, molekularen Gerüst verknüpft sind. Das Typ-II-Kollagen ist dabei für die Form und die Zugsteifigkeit verantwortlich. Die Proteoglykane binden an Typ-II-Kollagen und stabilisieren so das molekulare Gerüst^{28,29}. Das Proteoglykan Aggrecan ist das Hauptproteoglykan des Knorpels. Mit seinen stark negativ geladenen Glykosaminoglykanen bindet es an Hyaluronsäure, lagert Wasser an und ist so maßgeblich für die Elastizität des Gewebes verantwortlich²⁴. Weitere wichtige Kollagene sind Typ-IX-, Typ-X- und Typ-XI-Kollagen²⁴.

Unterhalb des Knorpels findet sich der subchondrale Knochen, welcher im Gegensatz zum Knorpel gut durchblutet und innerviert ist³⁰. Es besteht zu 35% aus organischem – und zu 65% aus anorganischem Material²⁴. Zellulär finden sich vor allem 3 Zelltypen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Osteoblasten sind für die Produktion der Extrazellulärmatrix verantwortlich und unterstützen die Mineralisation durch Produktion des Hormons alkalische Phosphatase (ALP)³⁰. Die Osteozyten entstehen aus Osteoblasten,

unterstützen ebenfalls die Synthese der Matrix, sind aber hauptverantwortlich für die Mechanotransduktion, die Ummodellierung des Knochens gemäß der mechanischen Beanspruchung. Osteoklasten sind für die Resorption der mineralisierten Matrix zuständig und stehen mit den Osteoblasten im Gleichgewicht³⁰. Der anorganische Teil des Gewebes besteht zu 90% aus Kollagen, welcher wiederum zu 95% aus Typ-I-Kollagen besteht, gefolgt von Typ-V-, Typ-III- und Typ-XII-Kollagen. Desweiteren kommen Proteoglykane, Proteine mit Gamma-Glutamylcarboxylase (Fibronektin), und Glykoproteine (Osteonektin) in der organischen Matrix des Knochens vor. Die anorganische Komponente besteht aus Calcium, Phosphat und Carbonat³⁰.

2.3 Aufbau der osteochondralen Einheit

Die Dicke des Gelenkknorpels variiert je nach Beanspruchung und nimmt bei höherer Belastung zu. Unabhängig von der Dicke lässt sich das Gewebe in vier verschiedene Zonen einteilen (siehe Abbildung 1). Kennzeichnend ist der arkadenförmige Verlauf der Typ-II-Kollagen-Fibrillen, welche dadurch eine große Rolle für die Zonengliederung spielen²⁴. Die oberflächlichste Schicht stellt die Tangentialfaserschicht dar. In ihr verlaufen die Kollagenfasern annähernd parallel zur Oberfläche und bilden so die Bögen ihrer arkadenförmigen Architektur. Die Chondrozyten sind meist spindelförmig und liegen ebenfalls parallel zur Oberfläche. Basal davon schließt sich die Transitionalzone an. Die Fibrillen kreuzen sich hier, Chondrozyten liegen eher vereinzelt vor. Darunter findet sich die Radiärzone, in welcher die Kollagenfibrillen senkrecht zur Gelenkoberfläche laufen. Chondrozyten liegen hier in der typischen säulenartigen Konfiguration übereinander. Die sogenannte *Tidemark* trennt die Radiärzone von der mineralisierten Knorpelschicht, welche die Verbindung zur subchondralen Knochenplatte schafft. Dabei werden die weiterhin senkrecht verlaufenden Typ-II-Kollagen Fasern des Knorpels mit dem Typ-I-Kollagen der subchondralen Knochenplatte verknüpft³¹, was die Übertragung von Scherkräften bei Zug und Kompression ermöglicht³².

Die subchondrale Knochenplatte erscheint als parallel zur Gelenkfläche verlaufende, massive Platte mit kleinen, miteinander kommunizierenden Hohlräumen. Tiefer im Knochen nimmt die Zahl der Hohlräume sukzessive zu und formt so, zusammen mit den radiär verlaufenden Knochentrabekeln, die subchondrale Spongiosa³². Das Knochengewebe weist zahlreiche Blutgefäße und Nerven auf, welche durch die Hohlräume der Spongiosa

und der subchondralen Knochenplatte bis in den kalzifizierten Knorpel reichen. Diese sind in Bereichen großer mechanischer Belastung besonders ausgeprägt und können sogar einen basalen Teil des Knorpels durch Diffusion ernähren³².

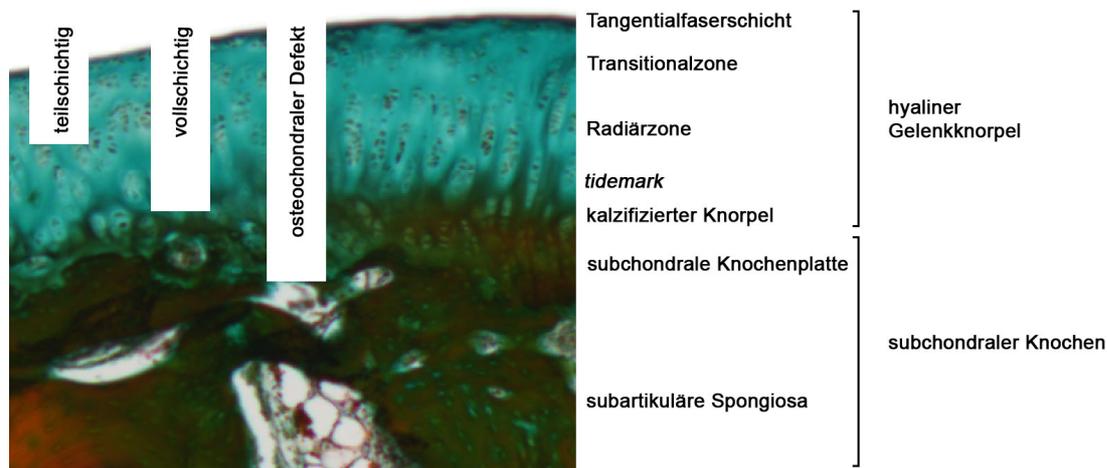


Abbildung 1. Architektur der osteochondralen Einheit anhand eines Chinchilla-Bastard-Kaninchens, exemplarische Darstellung der Tiefe verschiedener chondraler – und osteochondraler Defekte.

2.4 Einteilung der Knorpeldefekte

Ein chondraler Defekt ist ein Defekt, der ausschließlich das Knorpelgewebe betrifft. Der subchondrale Knochen ist dabei unversehrt^{32,33}. Innerhalb der chondralen Defekte unterscheidet man wiederum teilschichtige - (*partial thickness*) und vollschichtige (*full thickness*) Defekte (siehe Abbildung 1). Erstere erstrecken sich nur in einem Teil der Knorpelschicht, wohingegen vollschichtige Defekte bis auf den subchondralen Knochen reichen. Bei osteochondralen Defekten ist neben dem Knorpel auch der darunterliegende Knochen beschädigt. Das spielt bei der Heilung eine große Rolle. Schäden, welche bis zum subchondralen Knochen reichen, können durch das Einwandern pluripotenter Stammzellen aus dem Knochenmark effektiver repariert werden als reine Knorpeldefekte^{32,34}. Diese heilen nur durch die spärliche Einwanderung von Zellen aus der Synovialmembran, was ein deutlich geringeres Heilungspotential aufweist^{32,35}. Der Begriff Knorpelreparatur muss dabei vom Begriff der Knorpelregeneration abgegrenzt werden. Bezeichnet die Knorpelreparatur das Entstehen eines minderwertigen Reparaturgewebes, beschreibt die

Knorpelregeneration die vollständige Entstehung eines gesunden, hyalinen Knorpelgewebes^{32,33,36}.

2.5 Klinische Konzepte zur Therapie von fokalen chondralen - und osteochondralen Defekten

Klinische Ansätze zur Therapie von Knorpeldefekten gliedern sich in konservative und operative Maßnahmen. Konservative Maßnahmen, welche insbesondere für die großflächigen Defekte im Rahmen der Arthrose wichtig sind, haben das Ziel, die Lebensqualität des Patienten durch Schmerzreduktion zu erhöhen³⁷. Außerdem sollen sie das Fortschreiten der Knorpelzerstörung durch entzündungshemmende Maßnahmen einschränken³⁷, und somit die Notwendigkeit einer operativen Therapie hinauszögern³⁶. Konservative Behandlungskonzepte gliedern sich wiederum in medikamentöse und nichtmedikamentöse Maßnahmen. Letztere Bestehen aus Physiotherapie, orthopädietechnischer Versorgung und kryo-, sowie elektrotherapeutischen Ansätzen³⁸. Eine medikamentöse Behandlung ist besonders effektiv, wenn sie mit den nicht medikamentösen Maßnahmen kombiniert wird^{39,40}. Kutane -, intraartikuläre - und orale Anwendungsbereiche werden dabei unterschieden. Als Wirkstoffe kommen Paracetamol, nichtsteroidale, antiinflammatorische Substanzen (NSAID), sowie Opioide zum Einsatz³⁷, welche gemäß des WHO Stufenschemas verabreicht werden⁴¹. Zur intraartikulären Injektion stehen Glukokortikoide und Hyaluronsäurepräparate zur Verfügung, welche eine signifikante Verbesserung der Schmerzen und der Gelenkfunktion erreichen⁴².

Knorpeldefekte, die trotz konservativer Behandlung symptomatisch bleiben, sollten durch operative Verfahren therapiert werden. Solche Verfahren haben das Ziel, sekundäre Degenerationen zu verhindern und sollten deshalb frühzeitig durchgeführt werden³⁶. Die Wahl einer geeigneten Behandlung ist dabei an verschiedene Faktoren geknüpft (siehe Tabelle 2).

Patientenspezifische Parameter

Aktivität des Patienten
Art des Defekts (Lokalisation, Größe)
Ätiologie
Begleitpathologien (Band-, Meniskusverletzungen, gegenüberliegende Knorpeldefekte)
Beinachse
BMI
Patientenalter
Ziele des Patienten (Funktion, Schmerzreduktion)

Tabelle 2. Parameter zur Auswahl eines geeigneten chirurgischen Verfahrens.

Verfahren, die ausschließlich darauf ausgelegt sind das Fortschreiten der Knorpelzerstörung zu verhindern, ohne das bereits geschädigte Gewebe zu therapieren, sind die Umstellungsosteotomie und das Débridement. Bei der Umstellungsosteotomie wird die Beinachse gelenknah verändert, eine lokale Druckentlastung des geschädigten Knorpels erreicht und somit ein Fortschreiten des Knorpelschadens verhindert⁴³⁻⁴⁵. Durch das Débridement werden bereits ausgefaserte Knorpelreste im Gelenk abgetragen und entfernt. Der Nutzen liegt bei dieser Technik darin, schädigenden Scherkräften, sowie einer detritusinduzierten Synovialitis vorzubeugen. Eine primäre Verbesserung der Knorpeldegeneration wird nicht erreicht⁴⁶.

Mikrofrakturierung, Pridie-Bohrung und Abrasionsarthroplastik sind markraumeröffnende Verfahren⁴⁷⁻⁴⁹. Das Ziel der Therapie ist die Bildung eines Blutgerinnsels im Defekt. Durch das Schaffen einer direkten Verbindung zum Markraum des subchondralen Knochens gelangen zunehmend Wachstumsfaktoren, Proteine und mesenchymale Stammzellen, welche zu Chondrozyten differenzieren, aus dem Knochenmark in den Knorpeldefekt und bilden ein knorpelähnliches Reparaturgewebe⁴⁷.

Weitere Möglichkeiten eröffnen sich durch die Transplantation von allogenen oder autologen Zellen und Geweben. Auf zellbasierter Ebene ist die Chondrozytentransplantation eine hervorragende Methode⁵⁰. Knorpelzellen werden dem Patienten durch Biopsie entnommen, kultiviert und mit^{51,52,53} oder ohne Trägersubstanz⁵⁴ in den Defekt implantiert.

Die Transplantation osteochondraler Gewebe, ist besonders bei zusätzlichen Schäden des subchondralen Knochens indiziert. Ein osteochondraler Zylinder wird aus einem weniger belasteten Gelenkbereich entnommen und in den Defekt integriert. Bei größeren Schäden können mehrere dieser Zylinder in einer Mosaikplastik bzw. Osteochondral-Autograft-Transfer-System (OATS) in den Defekt implantiert werden⁵⁵⁻⁵⁷. Diese Methoden weisen allerdings einige Nachteile auf. Die Gelenkflächen sind nur schwer nachzuformen, was zu Druckbelastungen innerhalb des Gelenks führen kann; die Integration des gewonnenen Gewebes mit dem nativen Knorpelgewebe ist extrem schwierig und es kommt unweigerlich zu weiteren Schäden im Rahmen der Entnahme der osteochondralen Zylinder⁵⁸.

2.6 Experimentelle Therapiekonzepte zur Reparatur osteochondraler Defekte

Alle klinisch etablierten Konzepte zur Behandlung von Knorpelschäden haben bisher nicht zu einer langfristig zufriedenstellenden Heilung, bzw. Regeneration des hyalinen Knorpelgewebes geführt (siehe 2.1). Um dieses Problem zu lösen, gibt es verschiedene experimentelle Ansätze.

2.6.1 Tissue Engineering

Beim *Tissue-Engineering* (engl. Gewebe-Konstruktion) handelt es sich um ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, in welchem biologische Ersatzmaterialien entwickelt werden, um die Funktion von geschädigten Geweben zu erhalten oder wiederherzustellen⁵⁹. Bei osteochondralen Defekten werden synthetisch hergestellte Gerüstwerke, sogenannte *Scaffolds* (engl. „Grundgerüst, Zellträger, Trägermaterial“), in den Defekt implantiert. Diese sollen helfen, die Zellen zu verankern, zu verteilen und zu organisieren⁶⁰. Sie müssen biokompatibel, mechanisch stabil, porös, biochemisch aktiv und biologisch abbaubar sein, um die Regeneration der Gewebe suffizient zu unterstützen^{59,61,62}.

2.6.2 Bauart der Trägermaterialien

Bei osteochondralen Defekten muss sowohl der subchondrale Knochen, als auch das Knorpelgewebe selbst wiederhergestellt werden. Dementsprechend gliedern sich die Komponenten der Trägermaterialien in einen Knochen- und einen Knorpelteil (siehe Abbildung 2).

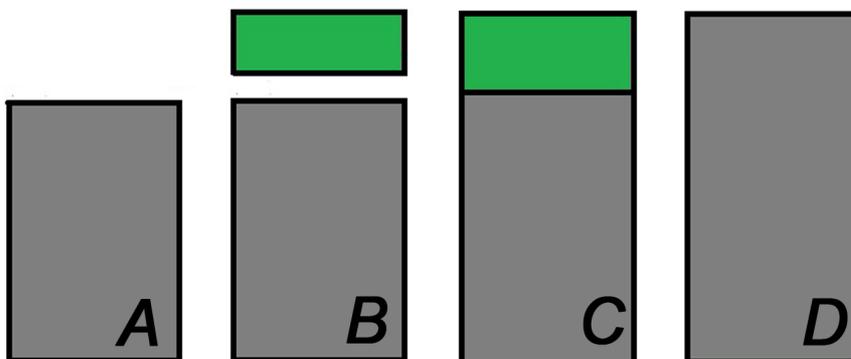


Abbildung 2. Bauarten von Trägermaterialien, Erklärung siehe Text.

Eine Möglichkeit ist, ohne Knorpelkomponente des Trägermaterials zu verfahren. Um den Knorpeldefekt zu therapieren, werden vorher Chondrozyten direkt auf der Oberfläche des Gerüstwerkes angesiedelt⁶³, oder Zellen in Form eines Pellets damit kombiniert⁶⁴ (A).

Eine weitere Möglichkeit ist, zwei verschiedene Materialien für die Knorpel- und Knochenkomponente zu benutzen (B). Die beiden Gerüstwerke müssen dann zu einem einzelnen Träger kombiniert werden²³. Das geschieht durch Naht der beiden Komponenten^{65,66} oder durch Verklebung mittels Fibrinkleber⁶⁷.

Die dritte Gruppe stellen Trägermaterialien dar, die aus einem Gerüstwerk mit zwei heterogenen Schichten zur Knorpel- und Knochenregeneration bestehen (C)^{68,69}.

Ein einzelnes, homogenes Gerüstwerk für den Knochen und Knorpelanteil ist eine weitere Möglichkeit (D). Die chondrogene –, sowie osteogene Heilungskapazität wird dabei durch Integration verschiedener Zellen oder Wachstumsfaktoren in unterschiedliche Bereiche des Gerüstwerks erreicht⁷⁰⁻⁷².

2.6.3 Materialien

Die genutzten Materialien lassen sich in natürliche – und synthetisch hergestellte Gewebe einteilen¹². Da es in den verschiedenen Schichten der osteochondralen Einheit zu unterschiedlichen mechanischen Beanspruchungen kommt, ist es nötig, dass die genutzten Biomaterialien den Anforderungen der Knorpel- bzw. Knochenkomponente nachkommen.

Natürliche Materialien werden aus lebenden Organismen gewonnen und zeichnen sich durch eine gute Biokompatibilität, Zellanhaftung und Differenzierung aus⁵⁹. Zu ihnen gehören die auf Proteinen basierenden Substanzen Kollagen und Fibrin, sowie die Kohlenhydrat-basierten Stoffe Hyaluronsäure, Alginat, Chitosan und Agarose⁷³.

Synthetisch hergestellte Trägermaterialien zeichnen sich wiederum durch eine gute Produzierbarkeit, chemische Modifizierbarkeit und Anpassungsfähigkeit aus. Somit haben sie eine gute Biokompatibilität, passende mechanische Eigenschaften und eine kontrollierbare biologische Abbaubarkeit⁵⁹. Zu ihnen gehören phosphathaltige Keramiken wie Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP), bioaktive Gläser und synthetische Polymere wie Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) und ihr Polymer Polymilchsäure-co-Glykolsäure (PLGA)⁷⁴. Der Vorteil bei diesen Materialien ist, dass die Porosität und Oberflächenstruktur zur Anhaftung von Zellen im Design angepasst werden kann. Trotz dieser Flexibilität im Herstellungsprozess der Trägermaterialien ist es schwierig, die

optimalen, zellkompatiblen Eigenschaften, wie sie natürliche Materialien haben, herzustellen. Außerdem kann es zu inflammatorischen Abstoßungsreaktionen durch toxische Abbauprodukte kommen⁵⁹.

Um die Vorteile zu vereinen, gibt es Ansätze die Biomaterialien beider Gruppen miteinander zu verknüpfen⁷⁵⁻⁷⁸. Dennoch benötigen sie weitere Verbesserungen um die Kompatibilität und funktionellen Eigenschaften zur Knorpelheilung mitzubringen. Dabei spielen die Biomimetik und exzellente physiochemische Merkmale des Nanomaterials eine entscheidende Rolle⁷⁹, weshalb der Weg vermehrt in Richtung nanotechnisch hergestellter Trägermaterialien geht^{80,81}.

Eine häufig für die knöchernen Komponente benutzte Substanz ist Tricalciumphosphat. Diese Keramik ist dem menschlichen Knochen verwandt¹⁷ und führt so zu einer guten Verträglichkeit. Matsumine *et al.* konnten in einer klinischen Studie keinerlei Anzeichen für Infektionen, allergische - oder toxische Reaktionen nach Implantation von Tricalciumphosphat feststellen⁸². Die klinische Nutzbarkeit ist allerdings dadurch begrenzt, dass das Material eine eingeschränkte Absorption und Osteokonduktivität besitzt, was wiederum zu einem spärlichen Einwachsen von Knochengewebe führt⁸³. Eine Erhöhung der Porosität zur Verbesserung des Einwachsens nativen Knochens, würde wiederum die mechanische Stabilität des Gerüstwerks herabsetzen^{83,84}.

Strontium-Hardystonit-Gahnit (Sr-HT-Gahnit) ist eine Keramik, die eine hohe, dem Knochengewebe nachempfundene, biomechanische Stabilität und gute Bioaktivität aufweist⁸⁵. Hardystonit ist eine mineralische Verbindung von Calcium, Silizium, Zink und Sauerstoff ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$). Gahnit ist ebenfalls ein Mineral und enthält die Elemente Zink, Aluminium und Sauerstoff (ZnAl_2O_4). Die anabole Wirkung von Strontium und Zink auf den Knochenstoffwechsel, wurde schon in vergangenen Studien nachgewiesen⁸⁶⁻⁸⁸. Strontium hat sich so bereits in der medikamentösen Osteoporosetherapie etabliert^{89,90} und wird als eine Möglichkeit zur Arthrosebehandlung diskutiert^{91,92}. Die Wirkung von Zink auf den Knochenstoffwechsel wird daran deutlich, dass ein Mangel des Spurenelements mit dem Auftreten osteoporotischer Frakturen korrelierte⁹³. Im direkten Vergleich an rein knöchernen, diaphysären Läsionen am Kaninchenmodell, sowie *in vitro*, konnte Sr-HT-Gahnit eine dem TCP/HA überlegene Knochenregeneration nachgewiesen werden⁸⁵. Zur Therapie osteochondraler Defekte wurde die Keramik bisher nicht eingesetzt.

2.6.4 Zellen

Um eine Heilung der osteochondralen Defekte erreichen zu können, werden die Gerüstwerke mit Zellen kombiniert. Hierfür kommen Chondrozyten und Stammzellen in Frage.

Autologe Chondrozyten sind die einzigen Zellen des Knorpelgewebes und wurden bisher ausgiebig zur Knorpelreparatur genutzt, obgleich ihre Verfügbarkeit stark begrenzt ist. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Zellen *in vitro* kultiviert. Dadurch wurde die Zellzahl zwar erhöht, oftmals fand aber eine Dedifferenzierung statt⁹⁴. Allogene oder xenogene Chondrozytenquellen können wiederum zu inflammatorischen Abstoßungsreaktionen führen oder Krankheiten übertragen⁵⁹.

Zellen, die eine bessere Verfügbarkeit, Zugänglichkeit und ebenfalls eine gute chondrogene Heilungskapazität aufweisen, sind Stammzellen. Mesenchymale Stammzellen kommen in einer Vielzahl von Geweben, wie Knochenmark, Synovialis, Fett und Skelettmuskel vor und sind daher leichter zu gewinnen als Autografts oder Chondrozyten. Außerdem besitzen diese Zellen ausreichend proliferatives Potential um therapeutisch relevante Zellzahlen ohne Dedifferenzierung zu erreichen⁵⁹. Um die Chondrogenese zu induzieren ist eine Kultivierung mit diversen Wachstumsfaktoren nötig⁹⁵.

2.7 Konzept der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit untersuchten wir, welches Material sich als Grundgerüst zur Reparatur des subchondralen Knochens im Rahmen osteochondraler Defekte eignet und wie sich das Material auf die Regeneration des darüberliegenden Knorpelgewebes auswirkt.

Die Beeinflussung der Defektreparatur durch Zellen oder Wachstumsfaktoren ist nicht Ziel dieser Studie und hätte ein komplizierteres, zweizeitiges Vorgehen nötig gemacht. Wir verzichteten somit bewusst auf die zusätzliche Nutzung von Zellen und Wachstumsfaktoren, um die Beeinflussung des Knochenwachstums ausschließlich durch das gewählte Material zu erforschen. Strukturparameter, wie die Porosität, sind bei beiden Trägermaterialien identisch, um dadurch eine Beeinflussung der Defektheilung zu unterbinden. Ebenso verzichteten wir auf eine Knorpelkomponente des Gerüstwerks, um den Einfluss ausschließlich des subchondralen Materials auf das Knorpelwachstum zu sehen. Strontium-Hardystonit-Gahnit, welches bei der Heilung knöcherner Läsionen im

Vergleich zu Tricalciumphosphat eine bessere Osteogenese aufwies⁸⁵, aber bisher noch nicht im Rahmen osteochondraler Defekte untersucht wurde, verglichen wir mit Tricalciumphosphat. Durchgeführt wurde die Studie an Chinchilla Bastard Kaninchen, welche ein hervorragendes Kleintiermodell zur Analyse der osteochondralen Reparatur darstellen^{96,97}. Wir setzten beidseits standardisierte zylindrische Defekte (4 x 4 mm) in die Trochleas der Femurkondylen, um osteochondrale Defekte zu simulieren. In diese wurden die verschiedenen Trägermaterialien subchondral implantiert und 28 Tage *in vivo* belassen. Leerdefekte dienten als Kontrollgruppe. Im Anschluss folgte die Beurteilung der Defekte makroskopisch, anhand des Goebel – und Oswestry Bewertungssystems, sowie die Vermessung des subchondralen Knochens mittels Mikrofokus-Computertomographen. Der neugebildete Knorpel wurde histologisch, immunhistochemisch, sowie biochemisch anhand etablierter Bewertungssysteme evaluiert.

3. Fragestellungen

In dieser Arbeit überprüften wir die Thesen, dass

(1) Die subchondrale Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit *in vivo* unbedenklich ist.

(2) Die Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit-, bzw. Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Trägermaterialien mit vergleichbaren strukturellen Parametern, eine bessere Knochenregeneration als Leerdefekte erlauben.

(3) Strontium-Hardystonit-Gahnit-Gerüstwerke eine bessere Rekonstruktion des subchondralen Knochens als Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Gerüstwerke bedingen.

(4) Die Regeneration des subchondralen Knochens mit einer besseren Knorpelreparatur korreliert.

4. Materialien

4.1 Puffer, Lösungen, Medien

Alle Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt.

Lösung, Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration, Menge, Volumen
1x TNE-Puffer	NaCl	5,8 g (100 mM)
	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	372 mg (1 mM)
	Tris/(HCl) (pH 7,4)	1322 mg (10 mM)
	H ₂ O	
<i>blocking buffer</i>	BSA	6 ml
	PBS	200 ml
DAB-Lösung (3'3 Diaminobenzidin)	H ₂ O	5 ml
	Puffer (pH=7,5)	2 Tropfen
	DAB Substratreagenz	4 Tropfen
	H ₂ O ₂	2 Tropfen
DMMB-Lösung A	D-Cysteinhydrochlorid- monohydrat	0,05 g
	PBE	30 ml
DMMB-Lösung B	Chondroitin-6-Sulfat- Natriumsalz	0,053 g
	Lösung A	1 ml
DMMB-Lösung C	Lösung A	24,95 ml
	Lösung C	0,05 ml
DMMB (pH 3,5)	1,9-Dimethylmethylenblau	16 mg
	Natriumhydroxid (1 M)	25,6 ml
	Ethanol (95%)	5 ml
	Ameisensäure (90%)	3 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Echtgrün- (<i>fast green</i> -) Lösung	<i>fast green</i>	200 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
Entkalkungs-Lösung	Natrium-Citrat	100 g
	Ameisensäure (90%)	250 ml
	H ₂ O	ad 750 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Hämatoxylin-Lösung (nach Harris)	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100%)	120 ml
	Natrium-Iodat	10 g
	AlKSO ₄	200 g
	H ₂ O	ad 2000 ml

HCl-Lösung	HCl (40%)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Papain-Lösung	Papain	5 mg
	PBS	ad 40 ml
PBE	Na ₂ HPO ₄	7,1g
	EDTA	1,86g
	H ₂ O	500 ml
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	KCl (pH 7,2)	2,7 mM
	K ₂ HPO ₄	1,7 mM
	NaCl	136 mM
	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O	10 mM
Safranin-Orange-Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25%)	800 µl
	PBS	ad 200 ml
Trypsin-Stammlösung	Trypsin	25% (V/V)
	PBS	75% (V/V)
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (0,3%)	H ₂ O ₂	0,6 ml
	H ₂ O	200ml

Tabelle 3. Puffer und Lösungen.

4.2 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien, die zur Herstellung von Puffern und Lösungen genutzt wurden, bezogen wir über Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

Produkt	Hersteller
ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame CA, USA)
Albumin Standard	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Braunol	Braun (Melsungen, Deutschland)
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame CA, USA)
Echtgrün (<i>fast green</i> FCF)	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Goldner Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Goldner Lösung II (Phosphorwolframsäure-O)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Goldner Lösung III (Lichtgrün SF)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Ketavet (Ketamin-Hydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn (Erlangen, Deutschland)
Narcofen (Natrium-Pentobarbital)	Merial (Hallbergmoos, Deutschland)
Papain	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Paraffin-Granulat „Roti Plast“	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Rompun (Xylazin-Hydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HCl (1%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Standard-DNS-Lösung (10 µg/ml; Kalbsthymus)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylol	Fischer (Saarbrücken, Deutschland)

Tabelle 4. Chemikalien.

4.3 Enzyme

Zur Verdauung des entnommenen Knorpelgewebes wurde Papain verwendet. Trypsin wurde zur Immunhistochemie genutzt.

4.4 Antikörper

Zur immunhistochemischen Färbung der Präparate nutzen wir monoklonale Anti-Typ-I-Kollagen -, bzw. Anti-Typ-II-Kollagen Antikörper (Spezies Maus, Sigma, Taufkirchen, Deutschland), sowie monoklonale, biotinierte Anti-Maus-IgG Antikörper (Spezies Ziege, Vector, Burlingame CA, USA).

4.5 Trägermaterialien

Strontium-Hydroxyapatit (Sr-HA) Gerüstwerke, sowie Tricalciumphosphat/Hydroxyapatit (TCP/HA) Träger wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Hala Zreiqat von der „*Biomaterials and Tissue Engineering Research Unit, School of AMME*“ (Universität Sydney, Australien) zur Verfügung gestellt.

4.6 Versuchstiere

Weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

4.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, England)
Canon Powershot A480	Canon (Tokio, Japan)
Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74°C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana PG, Italien)
GENios microplate reader	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37°C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetrührer RH basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikrofokus Röntgen Computertomographie Scanner Skyscan 1172	Skyscan (Kontich, Belgien)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CK-2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mischplatte (<i>Mixing Plate</i>)	MD Bioproducts (Saint Paul, USA)
Plattenabdeckung (<i>Plate Sealer</i>)	MD Bioproducts (Saint Paul, USA)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Tischzentrifuge Qualitron <i>Microcentrifuge</i>	Krackeler Scientific (Albany, New York, USA)
Vortex Reagenzglas mischer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Waage EW-600-2M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62°C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wärmeschrank 37°C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad HI 1210 (für histologische Schnitte)	Leica (Nussloch, Deutschland)
96-well Mikrottestplatten F-Profil	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
OptiPlate-96 Black	Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA)

Tabelle 5. Verwendete Geräte.

4.8 Operationsinstrumentarium und -materialien

Während der Operation wurden die Defekte mit 4 mm Hohlbohrern der Firma Synthes (Umkirchen, Deutschland) gesetzt. Weitere Instrumente bezogen wir über Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz). Spritzen, Nadeln, sowie das Nahtmaterial wurden von der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) hergestellt.

4.9 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche genutzten Plastikartikel und Glasbehälter stellten die Firmen Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland) her. Von der Firma Leica (Nussloch, Deutschland) bezogen wir Klingen für das Rotationsmikrotom. Die Metallkassetten, Plastikabdeckungen, Objektträger und Deckgläser, welche für die Herstellung der histologischen Präparate benötigt wurden, stammten von Roth (Karlsruhe, Deutschland).

4.10 Software

Zur statistischen Auswertung kamen SPSS (IBM, Armonk, USA), Sigmastat 3.5 (Systat, San José, USA) und XLSTAT (Addinsoft, Andernach, Deutschland) für Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) zum Einsatz.

Die Bilder der Mikrofokus-Computertomographie wurden mit der Software NRecon (Skyscan, Kontich, Belgien) und CTVol (Skyscan) rekonstruiert. Die Software CT-Analyzer (Skyscan) und DataViewer (Skyscan) nutzten wir zur Auswertung und Betrachtung der μ CT Bilder.

Zur Auswertung digitaler Bilder nutzten wir die analySIS (Soft Imaging System, Münster, Deutschland) Software.

5. Methoden

5.1 Überblick

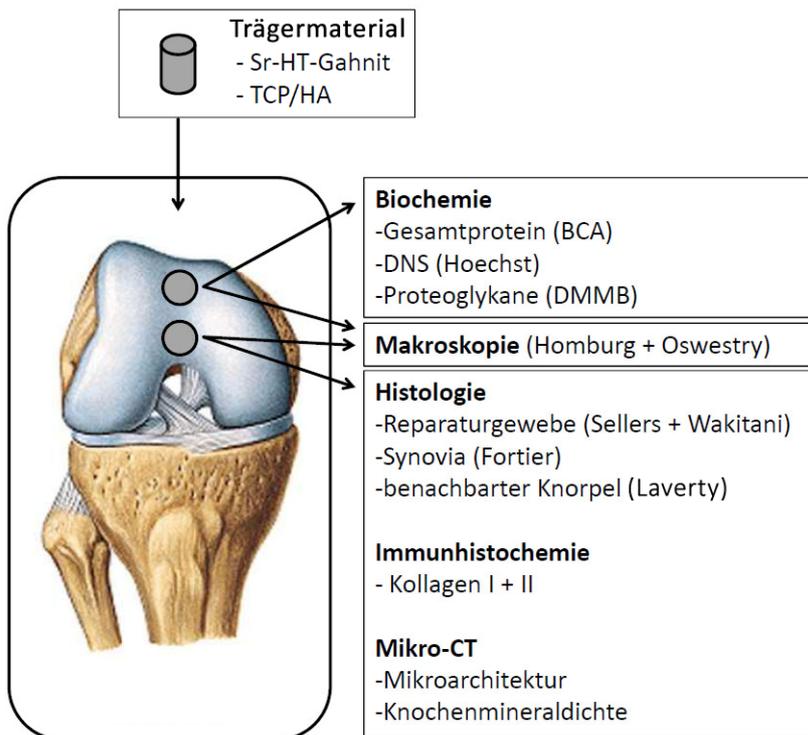


Abbildung 3. Versuchsübersicht.

5.2 Implantation des Trägermaterials

In die Trochlea jedes Knies der neun Tiere wurden zwei Defekte gesetzt. Bei 6 Kaninchen wurde in ein Knie jeweils Gerüstwerke desselben Typs eingesetzt. In das kontralaterale Knie eines Kaninchen erfolgte dann die Implantation des Trägermaterials der anderen Gruppe, sodass insgesamt sechs Tiere, links und rechts alternierend, ein Knie mit zwei Gahnit-Gerüstwerken und eins mit zwei TCP/HA Keramiken aufwiesen. Bei drei Kaninchen ($n = 3$) wurden die Defekte in beiden Knien leer belassen, um als Kontrollgruppe zu dienen.

5.2.1 Tiere

Sämtliche Tierversuche wurden von der saarländischen Tierschutzkommission genehmigt. Für das Experiment verwendeten wir 9 erwachsene Chinchilla Bastard Kaninchen, welche im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes artgerecht, bei konstanter Temperatur und wechselnder Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus, gehalten wurden. Ernährt wurden sie nach einem festgelegten Ernährungsplan und erhielten Wasser nach Bedarf.

5.2.2 Operation

Die Implantation der Trägermaterialien erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes durch Prof. Dr. med. Henning Madry unter Assistenz von Kai Hendrik Lindner.

Vor Operationsbeginn wurden die Kaninchen entsprechend ihres gemessenen Körpergewichtes mit Xylazin (Rompun, 4mg/kg KG) und Ketamin (Ketavet, 0,75 mg/kg Körpergewicht) analgosediert. Nach Schaffen von sterilen Bedingungen, mittels Rasur, Desinfektion mit Braunol und sterilem Abdecken, wurde das Kniegelenk der Kaninchen durch einen medialen parapatellaren Zugang eröffnet. Dabei wurde zunächst die Dermis, gefolgt von der Gelenkkapsel, präpariert. Nach Luxation der Patella nach lateral, hatte man einen direkten Zugang zur Facies patellaris femoris. In 60° und 90° Flexionsstellung wurden hier zwei zylindrische Defekte (Durchmesser 4 mm) mit einem chirurgischen Hohlbohrer gesetzt. Nach Spülung der Bohrlöcher implantierten wir in jeden Defekt ein Trägermaterial auf Höhe des subchondralen Knochens. Die Patella wurde reponiert und der korrekte Sitz der implantierten Gerüstwerke unter manueller Durchbewegung des Kniegelenks getestet. Es folgte die Naht der Gelenkkapsel mittels resorbierbarer Einzelknopfnah, sowie die Naht der Dermis durch resorbierbare Intrakutannaht.

5.2.3 Nachbehandlung

Nach der Operation wurde den Tieren direkt die volle Belastung der Gelenke ohne Immobilisation gestattet. Die Haltung erfolgte unter den bei 5.2.1 beschriebenen Bedingungen.

5.3 Probengewinnung

Die zweite Operation zur Probengewinnung erfolgte 28 Tage nach der Implantation im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes. Erneut wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt, um eine adäquate Analgosedierung, wie unter 5.2.2 beschrieben, durchzuführen. Durch die intravenöse Injektion von Pentobarbital (Narcofen; 150 mg/kg KG) und Luft (10ml) wurden die Tiere eingeschläfert.

Die Probenentnahme erfolgte unter unsterilen Bedingungen. Über einen medialen, parapatellaren Hautschnitt erfolgte die Präparation des distalen Femurs, was uns Zugang zur Facies patellaris femoris gab. Nach Spülen des Gelenkes mit PBS wurden standardisiert Bilder mittels Fotoapparat (Canon Powershot A280) zur späteren makroskopischen Beurteilung aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Entnahme des Reparaturgewebes mittels scharfen Löffels aus den proximalen Defekten. Das gewonnene Material wurde in Reaktionsgefäßen bekannter Leermasse bei -80°C konserviert. Die Femurkondylen wurden schließlich mit einer Zange fixiert, 1 cm proximal der Defekte abgetrennt und in 70%igem Ethanol aufbewahrt.

5.4 Makroskopische Auswertung

Anhand der angefertigten makroskopischen Bilder folgte die makroskopische Auswertung der Defekte. Zur Evaluation wurden dabei zwei verschiedene Bewertungssysteme genutzt. Gemäß des Homburger Bewertungssystems nach Goebel⁹⁸ beurteilten wir Farbe, Beschaffenheit und Höhe des Reparaturgewebes, die Anwesenheit von sichtbaren Blutgefäßen im Defekt, sowie die Beschaffenheit des benachbarten Knorpels. Jedem Merkmal wurde eine Punktzahl (siehe Tabelle 6) zugeteilt, sodass eine Gesamtpunktzahl von 0-20 Punkten, wobei 20 den schlechtmöglichen Wert darstellt, erreicht werden konnte.

1. Farbe des Reparaturgewebes	Hyalin oder weiß	0
	Vorwiegend weiß (> 50%)	1
	Vorwiegend transparent (> 50%)	2
	Transparent	3
	Kein Reparaturgewebe vorhanden	4
2. Sichtbare Blutgefäße im Reparaturgewebes	Keine sichtbaren Blutgefäße	0
	< 25% des Reparaturgewebes	1
	25% - 50% des Reparaturgewebes	2
	50% - 75% des Reparaturgewebes	3
	> 75% des Reparaturgewebes	4
3. Oberflächen- Beschaffenheit des Reparaturgewebes	Glatt, homogen	0
	Glatt, inhomogen	1
	Aufgefasert	2
	Inkompletter neuer Reparaturknorpel	3
	Kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	Im Niveau	0
	> 50% der Defekttiefe ausgefüllt	1
	< 50% der Defekttiefe ausgefüllt	2
	0% der Defekttiefe ausgefüllt	3
	Beschädigung des Subchondralen Knochens	4
5. Beschaffenheit des angrenzenden Knorpels	Normal	0
	Risse und/oder Fibrillationen in der Integrationszone	1
	Diffuse arthrotische Veränderungen	2
	Ausbreitung des Defekts in den angrenzenden Knorpel	3
	Beschädigter Subchondraler Knochen	4
Summe		20

Tabelle 6. Makroskopie Bewertungssystem nach Goebel.

Das Oswestry Makroskopie Bewertungssystem nutzen wir ebenfalls zur Evaluation der Defekte⁹⁹. Bei diesem bewerteten wir die Höhe, die Oberflächenbeschaffenheit und die Farbe des Reparaturgewebes, sowie die Integration mit dem umgebenden Knorpel (siehe Tabelle 7). Die Punktzahl reicht von 0 bis 8, wobei 8 Punkte den bestmöglichen Reparaturknorpel darstellen.

1 Defektfüllung im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	Unterhalb	0
	Oberhalb	1
	Im Niveau	2
2. Integration mit dem benachbarten Knorpel	Größere Unterbrechungen > 25%	0
	Kleinere Unterbrechungen < 25%	1
	Vollständig	2
3. Oberflächen- Beschaffenheit Des Reparaturgewebes	Aufgefaserter	0
	Inhomogen	1
	Glatt, homogen	2
4. Farbe des Reparaturgewebes	Gelber subchondraler Knochen	0
	Weiß	1
	Hyalinartig	2
Summe		8

Tabelle 7. Oswestry Makroskopie Bewertungssystem.

5.5 Auswertung der Mikrofokus-Computertomographie

Um den knöchernen Aufbau jedes Knies darstellen zu können, wurden sie in einem Mikrofokus-Computertomographen (μ CT, Skyscan, Kontich, Belgien) in 70% Ethanol gescannt. Dabei nutzten wir eine Auflösung von 13 μ m, bei einem Strom von 140 mA und einer angelegten Spannung von 70 kV. Pro Femur wurden dabei etwa 1500 Bilder in einem Abstand von 0,4 μ m angefertigt, wobei ein Aluminium/Kupfer Filter dazwischengeschaltet wurde. Zusätzlich wurden mit den selben Einstellungen zwei Phantome mit bekannten Knochenmineraldichten (250 mg CaHA/cm³ bzw. 750 mg CaHA/cm³) gescannt, um mittels Eichgeraden die Dichte der Proben zu ermitteln. Um die Bilder in der Horizontalebene zu rekonstruieren wurde der Feldkamp Strahlenkegel Algorithmus 21 (NRcon, Skyscan) genutzt. Für die 3D Rekonstruktion kam das Programm CTVol (Skyscan) zum Einsatz.

Zum Einzeichnen der „Volumen von Interesse“ (*Volumes of interest, VOI*) nutzten wir den CT-Analyser (CTAn, Skyscan). Hierbei zeichneten wir pro Kondyle sechs verschiedene Bereiche ein, wovon sich drei nur in der subchondralen Knochenplatte und drei in der darunterliegenden Spongiosa befanden (siehe Abbildung 4). Die Volumina „Subchondrale Knochenplatte Defekt (SKD)“ und „Subartikuläre Spongiosa Defekt (SSD)“ wiesen eine Breite von 4 mm, und addiert eine Tiefe von 4 mm auf. Die Bereiche „benachbarte subchondrale Knochenplatte medial, bzw. lateral“ und „benachbarte Spongiosa medial bzw.

lateral“ schlossen sich dabei medial bzw. lateral an den Defekt im gesunden Knochen an. Für die statistische Auswertung wurden die medialen und lateralen kortikalen Bereiche, sowie die medialen und lateralen Bereiche in der Spongiosa zu einem gemeinsamen Wert „Subchondrale Knochenplatte benachbart (SKB)“, respektive „Subartikuläre Spongiosa benachbart (SSB)“ zusammengefasst.

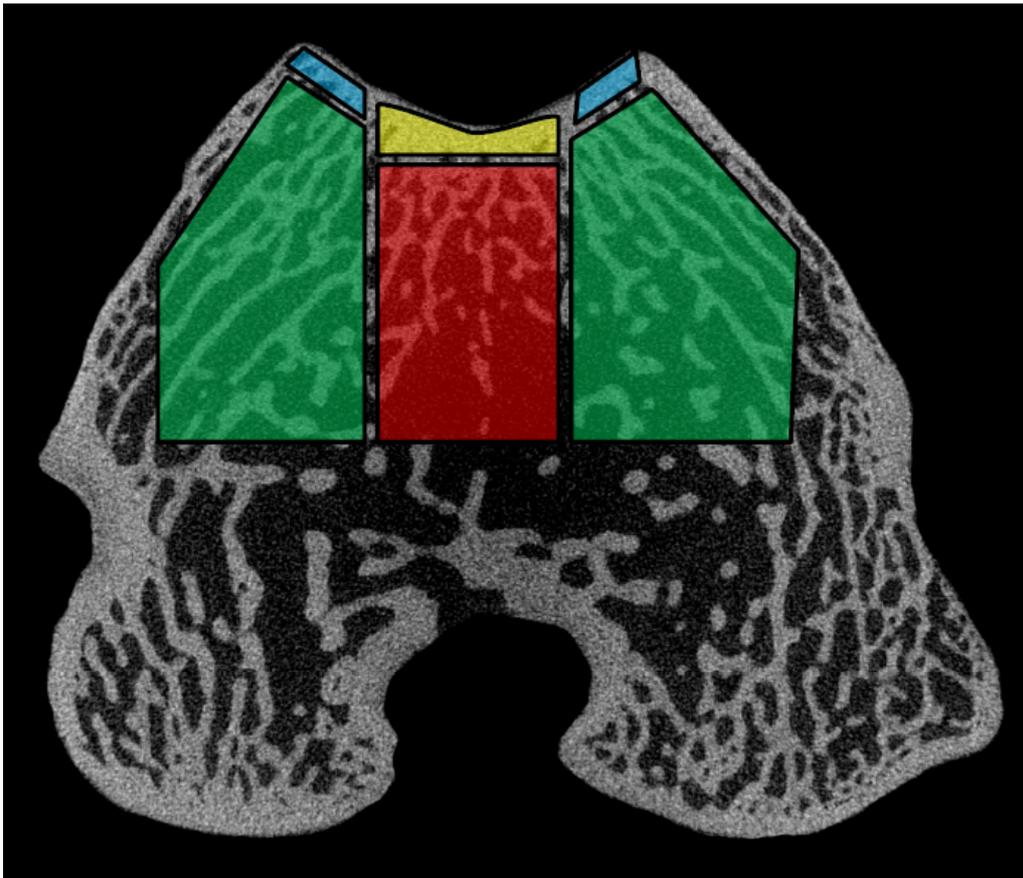


Abbildung 4. Schemazeichnung der „Volumes of Interest“ (VOI), rot = subartikuläre Spongiosa im Defekt, gelb = subchondrale Knochenplatte im Defekt, grün = benachbarte subartikuläre Spongiosa, blau = benachbarte subchondrale Knochenplatte.

Berechnet wurden mittels des CT-Analyzer (CTAn, Skyscan) in jedem Volumen die Werte Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD), Knochenvolumen Anteil (*bone volume fraction*, BV/TV), Verhältnis Knochenoberfläche/Volumen (*bone surface/bone volume*, BS/BV), Knochenoberflächendichte (*bone surface density*, BS/TV), offene Porosität (*open porosity*, Po.op), geschlossene Porosität (*closed porosity*, Po.cl) und gesamte Porosität (*total porosity*, Po.tot).

Der trabekuläre Musterfaktor (*trabecular pattern factor*, Tb.Pf), Struktur Model Index (*structure model index*, SMI), Trabekeldicke (*trabecular thickness*, Tb.Th), Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N), trabekuläre Separation (*trabecular separation*, Tb.Sp), und fraktale Dimension (*fractal dimension*, FD) wurden nur in den spongiösen VOI's ermittelt. Die kortikale Dicke (*cortical thickness*, Ct.Th) hingegen nur in den VOI der subchondralen Knochenplatte.

Zusätzlich zu den Femurkondylen wurde jeweils ein Gerüstwerk jeder Gruppe unter den gleichen Bedingungen gescannt. Pro Trägermaterial wurde ein quadratisches VOI im Zentrum bestimmt und die oben beschriebenen Parameter errechnet.

5.6 Histologische Evaluation

5.6.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die Femurkondylen wurden mittels 4%-igem Formalin für 24 h fixiert. Danach folgte die Überführung in Entkalkungs-Lösung, in welcher die Präparate 6 Wochen, bei wöchentlicher Erneuerung der Lösung, blieben.

Nach Entkalkung wurden die Kondylen bis auf den distalen Defekt der Trochlea zugeschnitten, zwei Stunden in Leitungswasser gereinigt und schließlich in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration entwässert (70%,95%,95%,100%,100%, jeweils 1 h). Im Anschluss folgte die zweimal einstündige Lagerung in Xylol, sowie die Inkubation bei 60°C in einem Xylol-Paraffingemisch (1h) und schließlich in reinem Paraffin (15h).

Zum Herstellen der Paraffinblöcke benutzten wir die Einbettmaschine (Leica). Die zugeschnittene Kondyle wurde dafür in die Mitte einer Metallform mit der Schnittfläche nach unten gelegt und die Form mit Wachs gefüllt. Nach Abkühlen konnten die Blöcke aus der Form entnommen werden.

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (Leica). Bei einem Abstand von maximal 1 mm von der Defektmitte wurden dabei Schnitte mit einer Dicke von 5 µm erstellt, in ein Wasserbad (*Aqua dest.*) bei 40°C gebracht und schließlich auf einen Objektträger aufgetragen. Getrocknet wurden die Schnitte durch Inkubation bei 60°C für 10h.

5.6.2 Färbung der Schnitte

Alle histologischen Färbemethoden wurden in 200ml Glasbehältern durchgeführt.

5.6.2.1 Safranin O

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (2 x 5 min) und schließlich durch das Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90%, 80%, jeweils 2 x 2,5 min). Danach brachten wir die Schnitte in die „fast green“ Lösung (4 min), gefolgt vom Waschen in Leitungswasser. Nach kurzem Differenzieren in Eisessigsäure (1%) färbten wir die im Knorpel befindlichen Mucopolysaccharide mittels Safranin-O-Lösung (1%, 4 min). Daran schloss sich die Entwässerung der Präparate in umgekehrter Reihenfolge zur der bereits beschriebenen Entparaffinierung an. Die Eindeckung der Schnitte wurde mit Roti Histokitt II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt, gefolgt vom Trocknen der Präparate unter einer Abzugshaube bei Raumtemperatur.

Evaluation:

Anhand der angefertigten Safranin O Präparate erfolgte die histologische Evaluation des Reparaturgewebes in den Defekten. Die Bewertung wurde anhand zweier bereits etablierter Bewertungssysteme (Sellers *et al.*, 1997¹⁰⁰, Wakitani *et al.*, 1994¹⁰¹) durchgeführt.

Anhand des Bewertungssystems nach Sellers beurteilten wir 8 verschiedene Eigenschaften des Reparaturgewebes (siehe Tabelle 8). Daraus resultierte eine mögliche Gesamtpunktzahl von 31 (leerer Defekt ohne Reparaturgewebe) bis 0 Punkten (vollständig geheilter Knorpel).

1. Defektfüllung	111 – 125%	1
in Relation zum	91 – 110 %	0
angrenzenden	76 – 90%	1
gesunden Knorpel	51 – 75%	2
	26 – 50%	3
	< 25%	4
2. Integration des	Normale Kontinuität	0
Reparaturgewebes mit	Verminderte Zellularität	1
dem angrenzenden	Spalte auf einer Seite	2
gesunden Knorpel	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit	Normal	0
mit Safranin-O	Leicht vermindert	1
	Mittelstark vermindert	2
	Stark vermindert	3
	Keine Anfärbbarkeit	4

4. Zellmorphologie	(a) normal	0
	(b) vorwiegend runde Zellen, Chondrozytenmorphologie,	
	75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
	25 – 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	(c) 50 % runde Zellen, Chondrozytenmorphologie,	
	75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	25 – 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
	(d) vorwiegend fibroblastenähnliche Zellen	5
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	Normal	0
	1 – 3 kleine Defekte	1
	1 – 3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse/Spalten	4
6. Oberflächenarchitektur	Normal	0
	Leichte Auffaserung	1
	Mittelstarke Auffaserung	2
	Starke Auffaserung	3
7. Neuer subchondraler Knochen im Defekt	90 – 100%	0
	75 – 89%	1
	50 – 74%	2
	25 – 49%	3
	< 25%	4
8. Tidemark	Vollständig	0
	75 – 99%	1
	50 – 74%	2
	25 – 49%	3
	< 25%	4
Summe		31

Tabelle 8. Histologisches Bewertungssystem nach Sellers.

Dem Bewertungssystem nach Wakitani lagen 5 verschiedene Kriterien zugrunde: Die Zellmorphologie, die Anfärbbarkeit, die Oberflächenbeschaffenheit und die Dicke des

Reparaturgewebes, sowie dessen Integration zum benachbarten Knorpel (siehe Tabelle 9). Daraus resultierte eine Spannweite von 0 (vollständig geheilter Knorpel) bis 14 (leerer Defekt ohne Reparaturgewebe) der möglichen Gesamtpunkte.

1. Zellmorphologie	Hyaliner Knorpel	0
	Vorwiegend hyaliner Knorpel	1
	Vorwiegend Faserknorpel	2
	Vorwiegend Nicht-Knorpel-Gewebe	3
	Keinerlei Knorpelgewebe	4
2. Anfärbarkeit mit Safranin-O	Normal	0
	Leicht vermindert	1
	Deutlich vermindert	2
	Keine Färbung	3
3. Oberflächen-Beschaffenheit	Glatt (> 3/4)	0
	Moderat (> 1/2 – 3/4)	1
	Irregulär (1/4 – 1/2)	2
	Massiv irregulär (< 1/4)	3
4. Knorpeldicke in Vergleich zum angrenzenden Knorpel	> 2/3	0
	1/3 – 2/3	1
	< 1/3	2
5. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	Beide Seiten integriert	0
	Eine Seite integriert	1
	Keine Seite integriert	2
Summe		14

Tabelle 9. Histologisches Bewertungssystem nach Wakitani.

Neben dem Defektknorpel wurde auch der benachbarte Knorpel in den Safranin-O Schnitten auf Anzeichen von arthrotischen Veränderungen untersucht. Hierzu nutzten wir das Laverty Bewertungssystem¹⁰², welches Anfärbarkeit, Struktur, Chondrozytendichte und Gruppenbildung im benachbarten Knorpel bewertete (siehe Tabelle 10).

1. Anfärbarkeit des hyalinen Knorpels mit Safranin O	Homogene, kräftige Färbung im gesamten Knorpel	0
	Oberflächliche Minderfärbung < 50% des Knorpels	1
	Oberflächliche Minderfärbung > 50% des Knorpels	2
	Minderfärbung der oberen 2/3 von <50% des Knorpels	3
	Minderfärbung der oberen 2/3 von >50% des Knorpels	4
	Minderfärbung gesamte Tiefe von <50% des Knorpels	5
	Minderfärbung gesamte Tiefe von >50% des Knorpels	6

2. Struktur des Knorpels	Normal	0
	Oberflächliche Unebenheiten	1
	Fissuren in <50% der Knorpeloberfläche	2
	Fissuren in >50% der Knorpeloberfläche	3
	Erosion des oberen Drittels in <50% des Knorpels	4
	Erosion des oberen Drittels in >50% des Knorpels	5
	Erosion der oberen 2/3 in <50% des Knorpels	6
	Erosion der oberen 2/3 in >50% des Knorpels	7
	Erosion der gesamten Tiefe von <50% des Knorpels	8
	Erosion der gesamten Tiefe von >50% des Knorpels	9
	Erosion bis zum subchondralen Knochen von <50% des Knorpels	10
	Erosion bis zum subchondralen Knochen von >50% des	11
3. Chondrozytendichte	Keine Zellverminderung	0
	Lokale Zellverminderung	1
	Multifokale Zellverminderung	2
	Multifokale, zusammenhängende Zellverminderung	3
	Diffuse Zellverminderung	4
4. Gruppenbildung	normal	0
	Mehr als 4 Gruppen	1
	4 bis 8 Gruppen	2
	Mehr als 8 Gruppen	3
Maximalpunktzahl		24

Tabelle 10. Laverty Bewertungssystem zur Evaluation des benachbarten Knorpels.

Pro Defekt wurden 10 Präparate blind bei 20-facher und 40-facher Vergrößerung bewertet.

5.6.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung)

Die Entparaffinierung erfolgte wie unter 5.6.2.1 beschrieben. Danach tauchten wir die Präparate für 10 min in die Hämatoxylin Lösung ein und spülten sie im Anschluss in Leitungswasser. Eine Differenzierung für 2 Sekunden in HCl-Lösung schloss sich an. Nach Bläuen im warmen Wasser für 5 min folgte die Färbung über 10 Sekunden in Eosinlösung und schließlich ein erneutes Waschen der Schnitte in Leitungswasser. Die Entwässerung und Eindeckung wurde wie in 5.6.2.1 beschrieben durchgeführt.

Evaluation:

Anhand der HE-gefärbten Schnitte erfolgte die Untersuchung der Synovialmembran auf Anzeichen für Entzündungen anhand des Synovialmembran-Bewertungssystems nach Fortier¹⁰³ (siehe Tabelle 11). Die Evaluation erfolgte verblindet in 40-facher Vergrößerung.

1. Villus-Fibrosierung	normal	0
	leicht	1
	mittelmäßig	2
	stark	3
2. Villus-Architektur	normal	0
	leichte Abstumpfung	1
	mittelmäßige Abstumpfung	2
	starke Abstumpfung	3
3. Entzündliche Zellinfiltrate	kein Infiltrat	0
	leicht	1
	mittelmäßig	2
	stark	3
Summe		9

Tabelle 11. Synovialmembran Bewertungssystem nach Fortier.

Zusätzlich betrachteten wir die HE-gefärbten Schnitte mit dem Polarisationsmikroskop, um einen Einblick in die Organisation und Struktur des Reparaturgewebes zu erhalten.

5.6.2.3 Masson Goldner Färbung

Dem Entparaffinieren (siehe 5.6.2.1) schloss sich ein Einbringen der Präparate in Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert für 2 ½ min an, gefolgt vom Bläuen in Leitungswasser für 10 min. Im Anschluss wurden die Schnitte für 5 min in Goldner Lösung I getaucht, kurz mit 1%-iger Essigsäure differenziert und schließlich für 4 min in Goldner Lösung II aufbewahrt. Erneut wurde mit 1%-iger Essigsäure kurz differenziert und im Anschluss mit Goldner Lösung III gegengefärbt (5 min). Nach kurzem Auswaschen mit Essigsäure (1%) für 3 min wurden die Präparate entwässert und mit Roti Histokitt II (siehe 5.6.2.1) eingedeckt. Als Ergebnis stellten sich die Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma rot und das Bindegewebe grüngefärbt dar.

5.6.2.4 Typ-I-Kollagen + Typ-II-Kollagen Immunhistochemie

Die Entparaffinierung erfolgte wie unter 5.6.2.1 beschrieben. Danach wurden die Schnitte für 30 min in eine Wasserstoffperoxid Lösung (0,3%) eingebracht und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Zum Andauen wurden die Präparate für 10 min in Trypsin Lösung (0,1%) getaucht, erneut in PBS gewaschen, und schließlich in die „*blocking buffer*“-Lösung für 30 min gegeben. Der nächste Schritt war die Applikation eines primären, monoklonalen Anti-Typ-I-Kollagen Antikörper (bzw. Anti-Typ-II-Kollagen Antikörper) bei einer Verdünnung in „*blocking buffer*“ von 1:100 (0,5 mg/ml). Die Präparate wurden für eine Stunde inkubiert und anschließend erneut zweimal in PBS gewaschen. Es folgte die Auftragung des sekundären Antikörpers (biotiniliert), welcher 1:500 in PBS verdünnt (1,5 mg/ml), und für 1 h in feuchtem Milieu inkubiert wurde. Der Überschuss wurde mit PBS dreimalig abgewaschen und die Präparate danach mit der ABC Reagenz, welche nach Herstellerangaben zubereitet wurde, benetzt. Nach 30 min spülten wir wieder mit PBS und gaben schließlich die DAB Lösung (nach Herstellerangaben angefertigt) für 7 min auf die Schnitte. Einem letzten Waschen mit PBS folgte die Entwässerung und Eindeckung wie bereits unter 5.6.2.1 beschrieben.

Evaluation:

Die ABC Reagenz enthielt eine Peroxidase, welche zu einer Braunfärbung der Präparate geführt hat. Da diese Braunfärbung aber aufgrund des häufigen Waschens nur dort stattgefunden haben kann, wo der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper, und dieser wiederum an Typ-I-Kollagen bzw. Typ-II-Kollagen gebunden hat, ist die Intensität der Färbung proportional zum Gehalt an Typ-I-Kollagen bzw. Typ-II-Kollagen im Gewebe. Die Intensität der Färbung wurde mit dem benachbarten Knorpel (Typ-II-Kollagen) bzw. dem benachbarten Knochen (Typ-I-Kollagen) verglichen und dementsprechend Punktzahlen von 0 bis 4 zugeordnet. Dabei entsprachen 0 Punkte keinerlei Färbung, 1 Punkt einer sehr schwachen -, 2 Punkte einer schwachen - und 3 Punkte einer Färbung ähnlich dem benachbarten, nicht im Defekt befindlichen Gewebe. Vier Punkte wurden verteilt, wenn die Färbung im Defekt stärker war als im benachbarten Bereich. Die Evaluation erfolgte verblindet durch eine Person.

5.7 Biochemische Evaluation

5.7.1 Papain-Verdau

Um das gewonnene Defektgewebe einer biochemischen Evaluation zugänglich zu machen, erfolgte im ersten Schritt die Verdauung mittels Papain.

Hierzu erfolgte die Verdünnung der Papain Lösung (25 mg/ml) mit PBS auf 5 mg/ml. Im Anschluss wurden jeweils 400 µl der Lösung zu jeder Probe hinzugegeben.

5.7.2 DNS Bestimmung

Die Standardreihe wurde in einer schwarzen 96-well-Platte angelegt. 0, 5, 10, 20 und 50 µl einer Standard DNS Lösung (1 mg/ml) wurden dabei mit TNE Puffer auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Von jeder der verdauten Gewebeproben wurden 20 µl entnommen, mit 80 µl TNE Puffer verdünnt und ebenfalls auf die 96-well-Platte pipettiert. Sowohl der Standardreihe, als auch den Proben wurden im Anschluss 100 µl Höchst 33258, welches mit PBS Lösung auf 1:500 verdünnt wurde, hinzugegeben. Mittels des *GENios plate reader* wurden die Emissionen der Wellenlänge von 465 nm, bei einer Exzitations-Wellenlänge von 360 nm detektiert. Bei bekannten DNS Konzentrationen der Standardreihe, konnte eine Kalibriergerade berechnet und somit der DNS Gehalt jeder Probe bestimmt werden. Da Höchst 33258 mit der DNS, besonders dem Basenpaar Adenin/Thymin interkaliert¹⁰⁴, stellt dieses Verfahren eine geeignete Methode zur DNS Bestimmung dar.

5.7.3 Proteoglykan Bestimmung

Sowohl Chondroitinsulfat, als auch Proteoglykane binden in gleicher Weise an DMMB Lösung¹⁰⁵. Dieser Umstand ermöglichte es uns, eine Standardreihe mit bekannten Chondroitinsulfat-Konzentrationen gemäß eines festgelegten Schemas (siehe Tabelle 12) zu erstellen. Das Schema wurde auf eine transparente 96-well-Platte doppelbestimmt appliziert.

Von jeder Papain-verdauten Probe wurden 10 µl entnommen und mit 30 µl von Lösung A ergänzt. Je Well (auch der Standardreihe) wurden im Anschluss 250 µl DMMB Lösung (pH Wert 3,5) hinzugefügt¹⁰⁶ und die Absorption bei 530 nm bestimmt. Bei bekannten Konzentrationen der Standardreihe erstellten wir eine Kalibriergerade und konnten so den Proteoglykangehalt der Reparaturgewebeproben bestimmen.

Herstellung des Standards	Konzentration	Standard
40 µl Lösung C	100 µg/ml	A
32 µl Lösung C + 8 µl Lösung A	80 µg/ml	B
24 µl Lösung C + 16 µl Lösung A	60 µg/ml	C
16 µl Lösung C + 24 µl Lösung A	40 µg/ml	D
8 µl Lösung C + 32 µl Lösung A	20 µg/ml	E
40 µl Lösung A	0 µg/ml	F

Tabelle 12. Schema Standardreihe Proteoglykanbestimmung.

5.7.4 Protein-Bestimmung

Mit Hilfe des BCA Tests bestimmten wir den Proteingehalt der gewonnenen Gewebeproben. Zunächst erfolgte wieder die Anlage einer Standardreihe (jeweils 25 µl pro Vertiefung) zur Errechnung einer Kalibriergeraden gemäß des dargestellten Schemas (siehe Tabelle 13, Standardlösung (*stock*) = 2 mg/ml BSA).

H ₂ O	BSA	BSA - Konzentration	Standard
0 µl	75 µl <i>stock</i>	2000 µg/ml	A
31,3 µl	93,8 µl <i>stock</i>	1500 µg/ml	B
81,3 µl	81,3 µl <i>stock</i>	1000 µg/ml	C
43,8 µl	43,8 µl von B	750 µg/ml	D
81,3 µl	81,3 µl von C	500 µg/ml	E
81,3 µl	81,3 µl von E	250 µg/ml	F
81,3 µl	81,3 µl von F	125 µg/ml	G
100 µl	25 µl von G	25 µg/ml	H
100 µl	0 µl	0 µg/ml	I

Tabelle 13. Schema Standardreihe Proteinbestimmung, Standardlösung (*stock*) = 2 mg/ml BSA.

Von den verdauten Proben des Reparaturgewebes wurden jeweils 2 µl auf die 96-well-Platte aufgetragen, 200 µl der nach Herstellerangaben hergestellten „*working reagenz*“ in alle Vertiefungen der Platte pipettiert und bei 37°C inkubiert (30min). Da die BCA Reagenz in Anwesenheit von Proteinen zu einem violetten Farbumschlag führt (Reaktion der zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen -)¹⁰⁷ kann die Absorption bei 530 nm gemessen, und somit der Proteingehalt des Reparaturgewebes bestimmt werden.

5.8 Statistische Auswertung

Zur Interpretation der makroskopisch -, histologisch -, radiologisch -, sowie biochemisch erhobenen Werte, wurden diese statistischen Tests unterzogen. Die Überprüfung eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen den verschiedenen Gruppen erfolgte dabei mittels der unter 4.10 beschriebenen Software. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Mittels SPSS wurden zusätzlich Korrelationsanalysen durchgeführt, um den Zusammenhang der verschiedenen Datensätze zu untersuchen. Dabei korrelierten wir die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD), Knochenvolumen Anteil (*bone volume fraction*, BV/TV), Knochenoberflächendichte (*bone surface density*, BS/TV), Trabekeldicke (*trabecular thickness*, Tb.Th), bzw. Kortikalisdicke (*cortical thickness*, Ct.Th), welche mittels Mikrocomputertomographie im Defektareal bestimmt wurden, mit den Punktzahlen für subchondralen Knochen, *Tidemark* und Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems nach Sellers. Bei nichtnormalverteilten Werten nutzten wir den Spearman Korrelationskoeffizienten, welcher Werte von 0 (keine Korrelation) bis 1 (perfekte Korrelation) annehmen konnte (siehe Tabelle 14).

Korrelationskoeffizienten	Interpretation
0	Keine Korrelation
über 0 bis 0,2	Sehr schwache Korrelation
0,2 bis 0,4	Schwache Korrelation
0,4 bis 0,6	Mittelmäßige Korrelation
0,6 bis 0,8	Starke Korrelation
0,8 bis unter 1	Sehr starke Korrelation
1	Perfekte Korrelation

Tabelle 14. Korrelationskoeffizienten und deren Bedeutung.

6. Ergebnisse

6.1 Vergleich des Sr-HT-Gahnit - und TCP/HA Trägermaterials

Bei der Untersuchung der Mikroarchitektur der Trägermaterialien mittels hochauflösendem Mikrofokus-Computertomographen zeigte sich, dass Sr-HT-Gahnit Gerüstwerke eine 1,44-fach höhere Hartschubstanz aufweisen, verglichen mit TCP/HA. Ebenso ist die Trabekeldicke um das 1,7-fache größer. Die Gesamtporosität beider Trägermaterialien ist nahezu identisch (Sr-HT-Gahnit: 92,84; TCP/HA: 92,86) (siehe Tabelle 15).

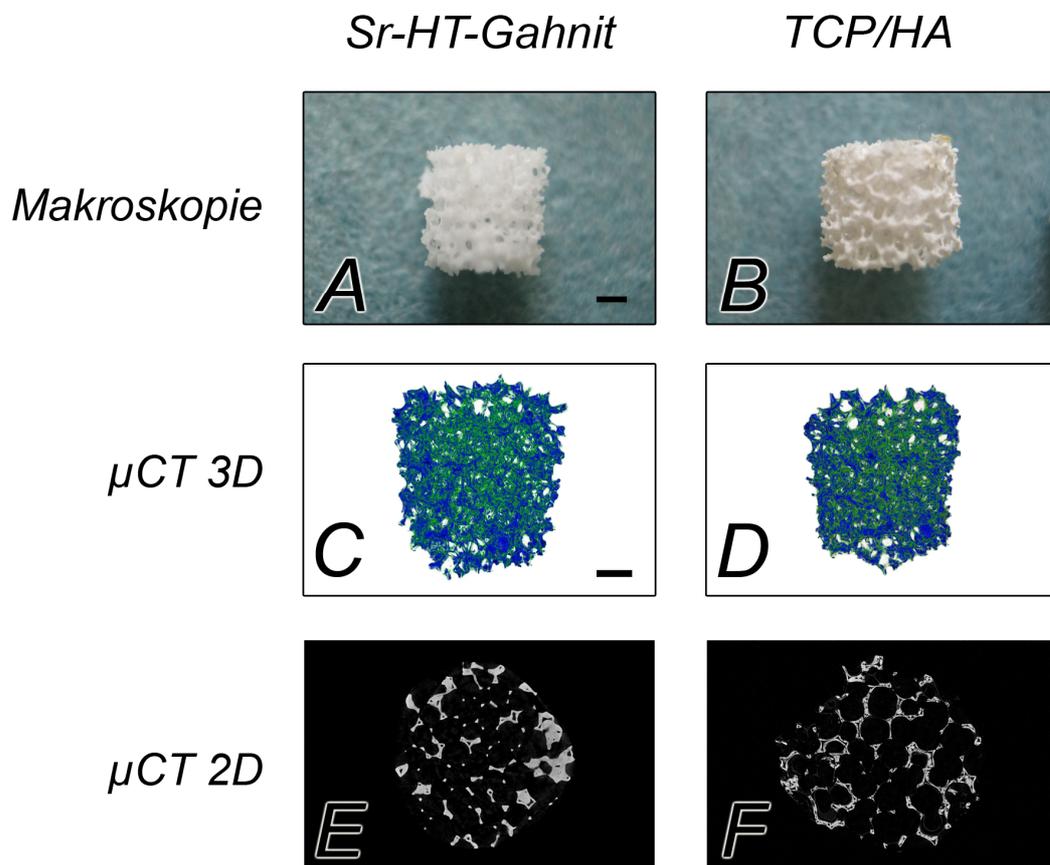


Abbildung 5. Vergleich des Sr-HT-Gahnit - und TCP/HA Trägermaterials, Maßstabsbalken = 1mm.

	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA
Parameter		
BV/TV [%]	10,32	7,14
BS/BV [1/mm]	47,84	89,5
BS/TV [1/mm]	4,94	6,39
Tb.Pf [1/mm]	6,15	-5,03
SMI	0,75	0,17
Tb.Th [mm]	0,07	0,04
Tb.N [1/mm]	1,51	1,93
Tb.Sp [mm]	0,43	0,47
FD	2,04	2,21
Po(cl) [%]	3,68	0,32
Po(op) [%]	89,28	92,84
Po(tot) [%]	92,84	92,86

Tabelle 15. Vergleich der Mikroarchitektur der Trägermaterialien.

6.2 Auswirkungen der Implantation der Trägermaterialien auf die Gelenkhomöostase

6.2.1 Makroskopischer Befund 28 Tage nach Implantation der Trägermaterialien

Bei keinem der Gelenke zeigte sich ein Gelenkerguss, Osteophyten oder eine makroskopische Synovialitis. Alle Defekte waren gut abgrenzbar.

6.2.2 Synovialmembran

Bei der histologischen Untersuchung der HE gefärbten Präparate zeigten sich bezüglich der Villusdicke, Villusarchitektur und entzündlichen Infiltrate keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Tabelle 16).

	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
Kategorie	Mittelwert ± SA			P-Werte		
Villusdicke	0,4±0,53	0,4±0,54	0,66±0,51	1	0,534	0,537
Villusarchitektur	0,0±0,0	0,2±0,44	0,0±0,0	0,639	1	0,662
Entzündl. Infiltrat	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1	1	1
Gesamtpunktzahl	1,43±0,53	1,6±0,89	1,66±0,51	0,876	0,534	0,792

Tabelle 16. Ergebnisse des Synovialis Bewertungssystems nach Fortier.

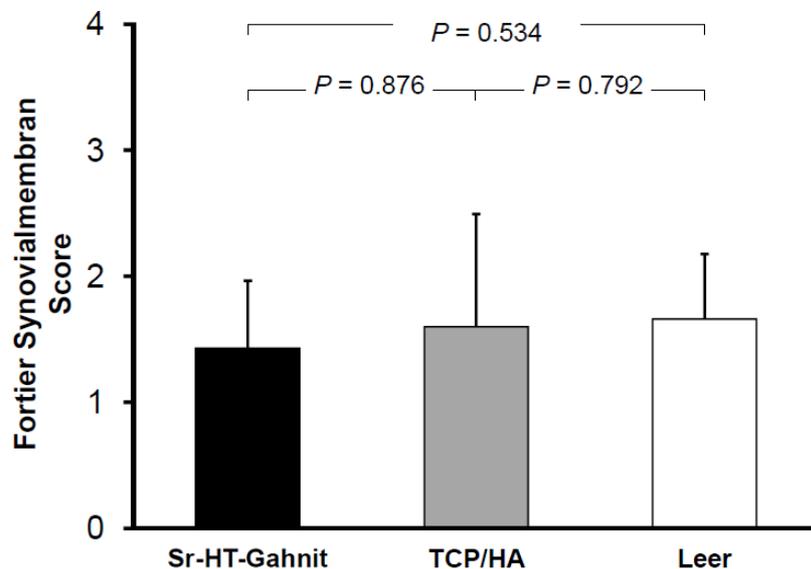


Abbildung 6. Ergebnisse des Synovialis-Bewertungssystems nach Fortier.

6.2.3 Degenerative Veränderungen im an den Defekt angrenzenden Knorpel

Der dem Defekt benachbarte Knorpel wurde anhand der Safranin-O gefärbten Schnitte beurteilt. Hierzu wendeten wir das Bewertungssystem nach Laverty an. In allen 3 Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Der Mittelwert lag dabei bei einer Gesamtpunktzahl von 5 (0-24).

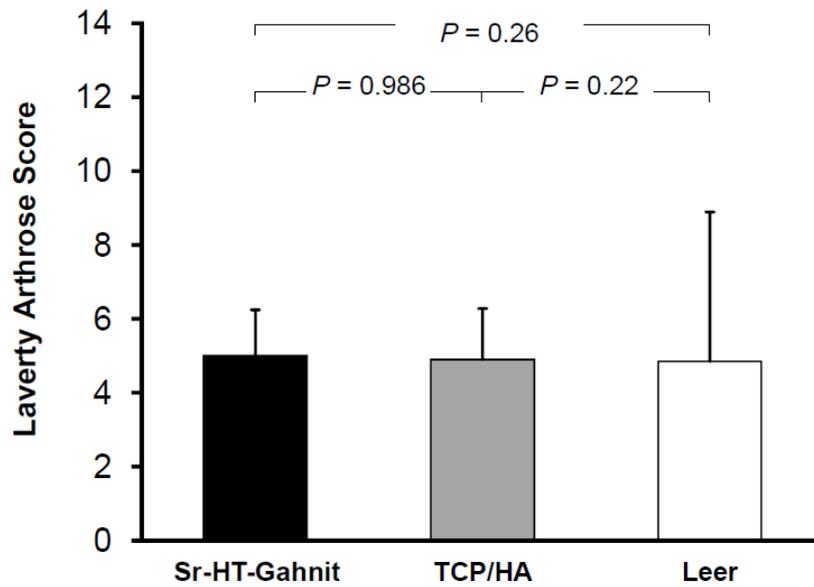


Abbildung 7. Ergebnisse des Lavery Bewertungssystems.

6.3 Effekt der Implantation beider Trägermaterialien auf die Rekonstruktion der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens

Eine Übersicht zur knöchernen Regeneration der Defekte der verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abbildung 8 dargestellt.

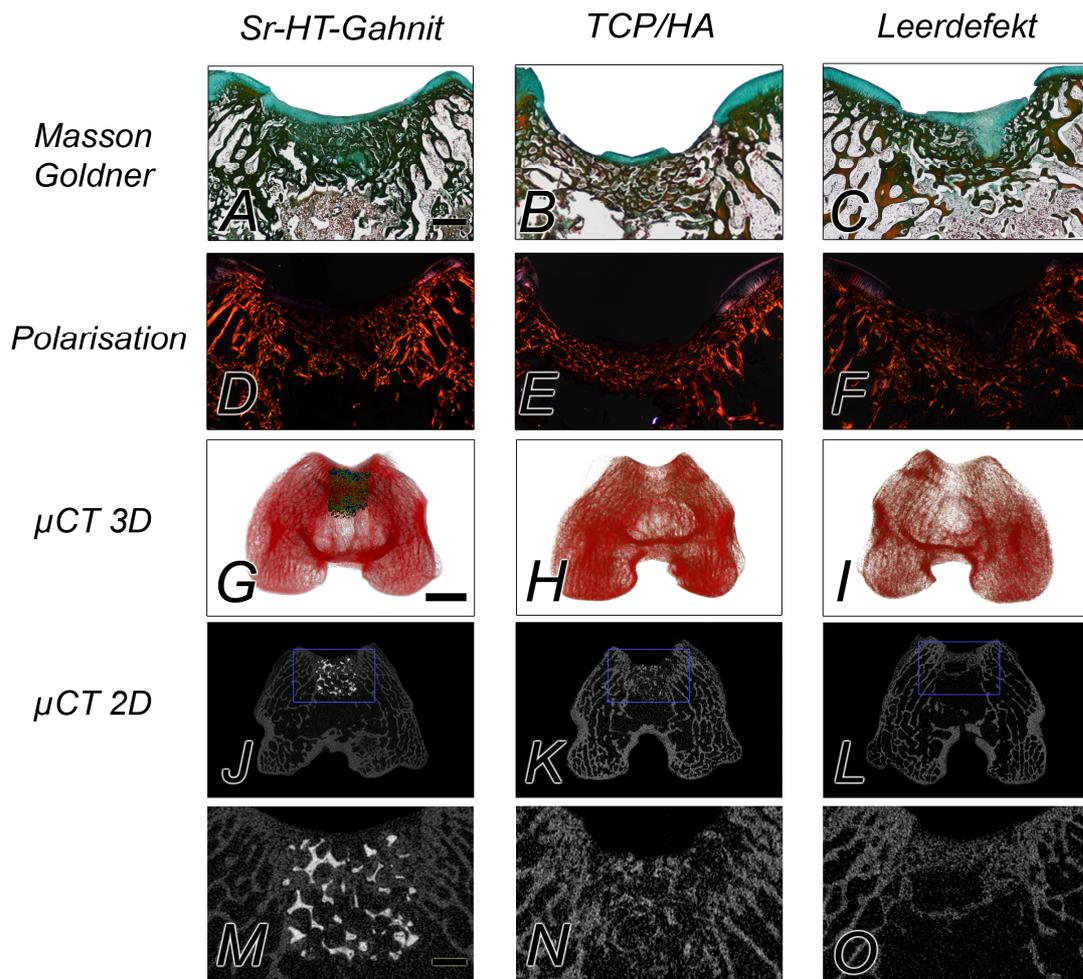


Abbildung 8. Übersicht des knöchernen Reparaturgewebes, Maßstabsbalken (A-F) = 1mm, Maßstabsbalken (G-L) = 4mm, Maßstabsbalken (M-O) = 1mm.

6.3.1 Auswirkungen der Implantation der Trägermaterialien auf den benachbarten Knochen

6.3.1.1 Mikro-CT Untersuchung der benachbarten subchondralen Knochenplatte

In der benachbarten subchondralen Knochenplatte wies die Gahnit Gruppe ein höheres Knochenvolumen pro Volumen auf als die TCP/HA Gruppe, welche wiederum einen höheren Wert als die Leerdefekte aufwies (siehe Tabelle 17). Dementsprechend zeigten die Leerdefekte die höchste Porosität aller Gruppen, gefolgt von der TCP/HA Gruppe. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) war bei den Leerdefekten signifikant höher, als in den Defekten, welche mit Sr-HT-Gahnit Trägermaterialien behandelt wurden. Eine statistische Signifikanz wurde beim Vergleich der anderen Parameter zwischen den Gruppen nicht erreicht.

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P-Werte		
BMD [mg/cm ³]	298,18±29,2	316,43±22,03	325,36±13,74	0,163	0,004*	0,176
BV/TV [%]	74,39±8,60	71,32±11,58	66,72±9,84	0,668	0,1	0,176
BS/BV [1/mm]	33,75±7,02	35,07±8,88	39,74±8,28	0,921	0,069	0,199
BS/TV [1/mm]	24,58±2,58	24,12±2,10	25,82±2,72	0,448	0,26	0,176
Tb.Pf [1/mm]	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
SMI	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
Ct.Th [mm]	0,56±0,02	0,53±0,05	0,57±0,04	0,807	0,197	0,315
Tb.N [1/mm]	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
Tb.Sp [mm]	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
FD	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
Po(cl) [%]	0,64±0,41	0,56±0,37	0,35±0,37	0,621	0,078	0,106
Po(op) [%]	25,08±8,92	28,23±11,82	33,0±10,11	0,668	0,112	0,176
Po(tot) [%]	25,60±8,60	28,67±11,58	33,27±9,84	0,668	0,1	0,176

Tabelle 17. Mikro-CT Parameter der benachbarten subchondralen Knochenplatte.

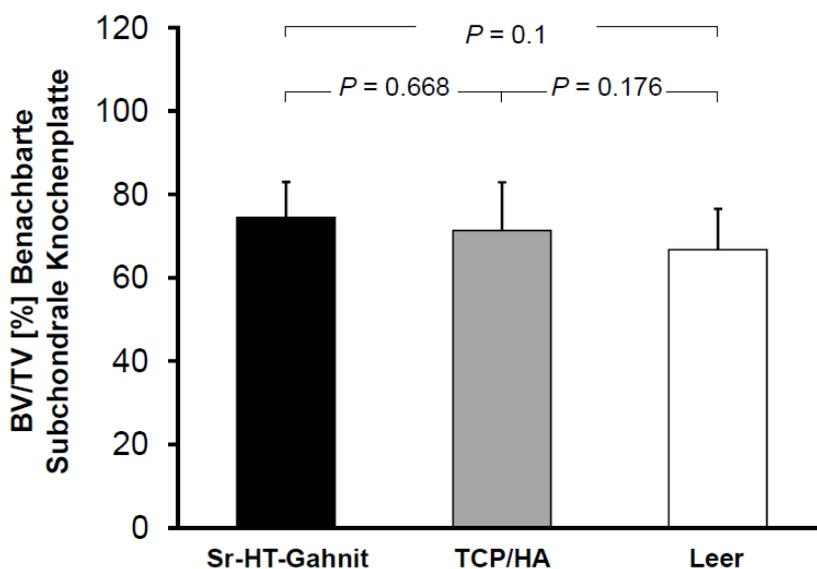


Abbildung 9. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der benachbarten subchondralen Knochenplatte.

6.3.1.2 Mikro-CT Untersuchung der benachbarten subartikulären Spongiosa

Ein Vergleich der Mikroarchitektur der benachbarten Spongiosa zwischen der Gahnit Gruppe und der TCP/HA Gruppe zeigte einen signifikant höheren trabekulären Musterfaktor und Struktur Model Index bei den Gahnit Defekten, wohingegen die fraktale Dimerisierung in der TCP/HA Gruppe höher war (siehe Tabelle 18).

Verglichen mit den Leerdefekten zeigte sich nach Implantation von Sr-HT-Gahnit eine signifikant höhere Trabekeldicke, geschlossene Porosität, sowie mehr Knochenvolumen pro Gesamtvolumen. Bei der Knochenoberfläche pro Knochenvolumen, Knochenmineraldichte, trabekulären Separierung und fraktalen Dimerisierung verhielt es sich umgekehrt.

Durch die Implantation von TCP/HA Trägermaterialien wurde eine höhere Trabekelzahl, geschlossene Porosität und ein höheres Knochenvolumen pro Gesamtvolumen erreicht im Vergleich zu den Leerdefekten. Die offene -, sowie die Gesamtporosität, war bei den Leerdefekten wiederum signifikant höher.

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P-Werte		
BMD [mg/cm ³]	273,68±24,47	290,1±27,53	298,77±25,87	0,114	0,032*	0,448
BV/TV [%]	20,16±3,34	20,25±2,16	16,52±3,44	0,767	0,046*	0,011*
BS/BV [1/mm]	37,33±4,10	39,97±4,47	43,79±4,20	0,156	0,002*	0,106*
BS/TV [1/mm]	7,42±0,71	8,10±1,29	7,15±1,18	0,176	0,371	0,081
Tb.Pf [1/mm]	2,08±2,21	-1,08±1,89	-0,25±3,63	0,004*	0,194	0,575
SMI	1,21±0,16	0,85±0,23	0,98±0,31	<0,001*	0,141	0,223
Tb.Th [mm]	0,09±0,00	0,09±0,01	0,08±0,00	0,060	<0,001*	0,106
Tb.N [1/mm]	2,03±0,21	2,23±0,31	1,92±0,36	0,106	0,26	0,044*
Tb.Sp [mm]	0,30±0,03	0,32±0,05	0,38±0,07	0,106	0,017*	0,223
FD	2,21±0,02	2,27±0,02	2,25±0,04	0,001*	0,007*	0,410
Po(cl) [%]	0,23±0,04	0,20±0,04	0,15±0,04	0,199	0,001*	0,023*
Po(op) [%]	79,79±3,36	79,20±2,16	83,45±3,45	0,767	0,046*	0,011*
Po(tot) [%]	79,83±3,34	79,74±2,16	83,47±3,44	0,767	0,046*	0,011*

Tabelle 18. Mikro-CT Parameter der benachbarten subartikulären Spongiosa.

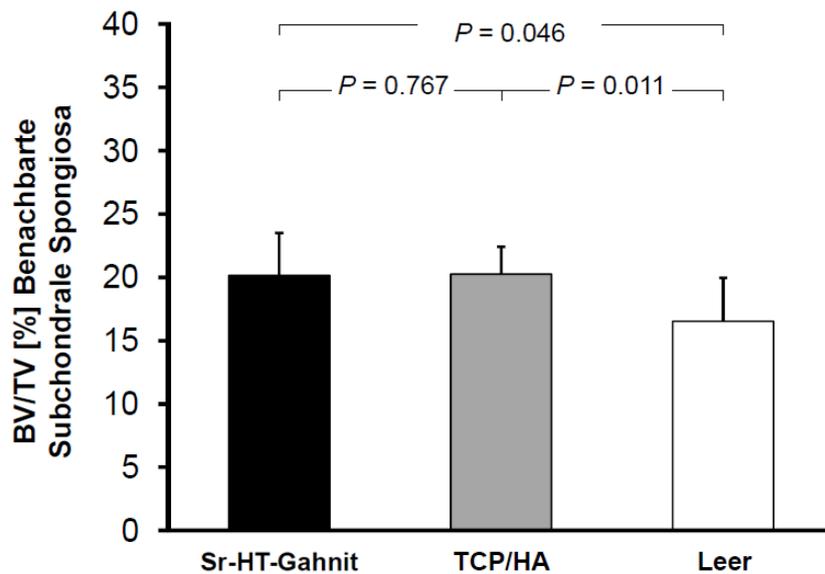


Abbildung 10. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der benachbarten subartikulären Spongiosa.

6.3.2 Auswirkungen auf den Knochen im Defekt

6.3.2.1 Subchondrale Knochenplatte

Bei der Untersuchung der subchondralen Knochenplatte wiesen die Sr-HT-Gahnit Defekte eine signifikant höhere Knochenmineraldichte als die Leerdefekte auf ($P = 0,022$) (siehe Tabelle 19). Die Knochenmineraldichte nach Implantation von TCP/HA unterschied sich nicht signifikant von den anderen Gerüstwerken. Das Knochenvolumen pro Gesamtvolumen zeigte sich ebenfalls nach Implantation von Sr-HT-Gahnit am höchsten, gefolgt von den TCP/HA Defekten. Den geringsten Anteil wiesen die Leerdefekte auf. Die Gesamtporosität wies bei den Leerdefekten den höchsten und nach Implantation des Sr-HT-Gahnit Trägermaterials den geringsten Wert auf ($P > 0,05$).

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P-Werte		
BMD [mg/cm ³]	488,5±167,9	251,9±76,9	268,9±25,3	0,070	0,022*	0,903
BV/TV [%]	34,52±12,14	27,19±19,54	22,90±14,30	0,329	0,240	0,931
BS/BV [1/mm]	46,05±9,98	50,73±14,09	62,73±12,34	0,662	0,041*	0,329
BS/TV [1/mm]	15,04±4,33	12,22±6,85	12,98±4,34	0,537	0,485	0,662
Tb.Pf [1/mm]	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
SMI	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
Ct.Th [mm]	0,16±0,08	0,17±0,1	0,19±0,08	0,684	0,431	0,927
Tb.N [1/mm]	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
Tb.Sp [mm]	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
FD	N.B.	N.B.	N.B.	-	-	-
Po(cl) [%]	0,40±0,49	0,38±0,37	0,08±0,12	0,931	0,065	0,052
Po(op) [%]	65,30±12,26	72,65±19,75	77,05±14,36	0,329	0,24	0,931
Po(tot) [%]	65,47±12,14	72,80±19,54	77,09±14,30	0,329	0,24	0,931

Tabelle 19. Mikro-CT Parameter der subchondralen Knochenplatte im Defekt.

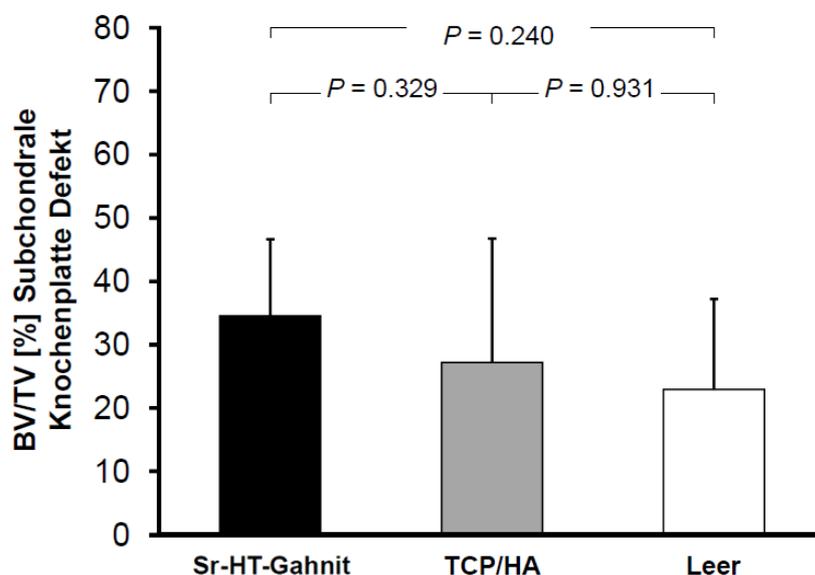


Abbildung 11. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der subchondralen Knochenplatte im Defekt.

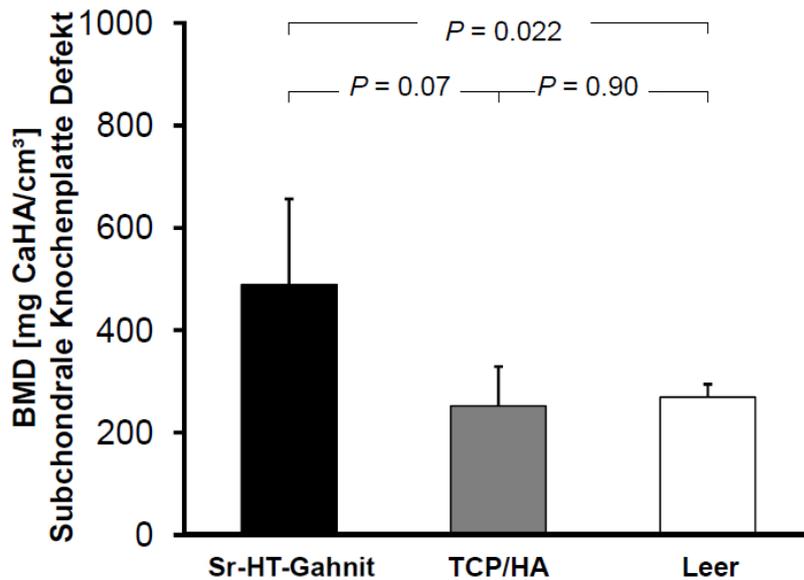


Abbildung 12. Knochenmineraldichte der subchondralen Knochenplatte im Defekt.

6.3.2.2 Subartikuläre Spongiosa

In der subchondralen Spongiosa führte die Implantation von Sr-HT-Gahnit Trägermaterial zu einem höheren Knochenvolumen/Totalvolumen Verhältnis, einer höheren Knochenmineraldichte, einem höheren Knochenoberfläche/Totalvolumen Verhältnis, einer höheren Trabekeldicke, Trabekelanzahl und Fraktaler Dimension als in Defekten, in welche TCP/HA Gerüstwerke implantiert wurden (siehe Tabelle 20). In dieser Gruppe war das Verhältnis Knochenoberfläche/Knochenvolumen, der trabekuläre Musterfaktor, die trabekuläre Separation und Porosität signifikant höher, als in der Gahnit Gruppe.

Verglichen mit den Leerdefekten wies die Sr-HT-Gahnit Gruppe ein höheres Knochenvolumen / Gesamtvolumen Verhältnis, Knochenmineraldichte, Knochenoberfläche / Totalvolumen Verhältnis, Trabekeldicke, Trabekelanzahl und fraktale Dimension auf. Signifikant höher waren die Werte Knochenoberfläche/Knochenvolumen, trabekulärer Musterfaktor, trabekuläre Separierung und Porosität in der subartikulären Spongiosa der Leerdefekte.

Die Implantation von TCP/HA Trägermaterial in die gebohrten Defekte führte zu einem signifikant höheren Knochenvolumen / Totalvolumen -, bzw. Knochenoberfläche / Totalvolumen Verhältnis, einer höheren Trabekelzahl und fraktalen Dimension im Vergleich zu den leer belassenen Defekten. Die trabekuläre Separierung und Porosität der

subartikulären Spongiosa wies wiederum in den Leerdefekten einen signifikant höheren Wert auf.

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P-Werte		
BMD [mg/cm ³]	805,3±107,7	270,5±29,4	237,2±55,2	0,01*	0,004*	0,540
BV/TV [%]	40,59±8,24	12,70±2,45	3,14±2,71	0,003*	0,001*	0,004*
BS/BV [1/mm]	33,08±12,59	63,81±5,95	69,90±20,65	0,018*	0,008*	0,931
BS/TV [1/mm]	13,97±3,70	8,00±0,97	1,91±1,36	0,018*	0,001*	0,004*
Tb.Pf [1/mm]	4,70±12,31	22,0±3,69	29,74±16,71	0,030*	0,022*	0,792
SMI	1,88±0,82	2,51±0,11	2,75±0,54	0,149	0,051	0,662
Tb.Th [mm]	0,12±0,02	0,07±0,00	0,07±0,01	0,030*	0,008*	0,931
Tb.N [1/mm]	2,93±0,82	1,71±0,25	0,41±0,35	0,018*	0,001*	0,004*
Tb.Sp [mm]	0,14±0,05	0,24±0,02	0,60±0,15	0,018*	0,001*	0,004*
FD	2,34±0,17	2,06±0,06	1,79±0,27	0,018*	0,001*	0,017*
Po(cl) [%]	0,04±0,02	0,04±0,02	0,08±0,08	0,530	0,836	0,792
Po(op) [%]	63,00±13,85	87,29±2,45	96,86±2,71	0,018*	0,001*	0,004*
Po(tot) [%]	63,02±13,84	87,30±2,45	96,86±2,71	0,018*	0,001*	0,004*

Tabelle 20. Mikro-CT Parameter der subartikulären Spongiosa im Defekt.

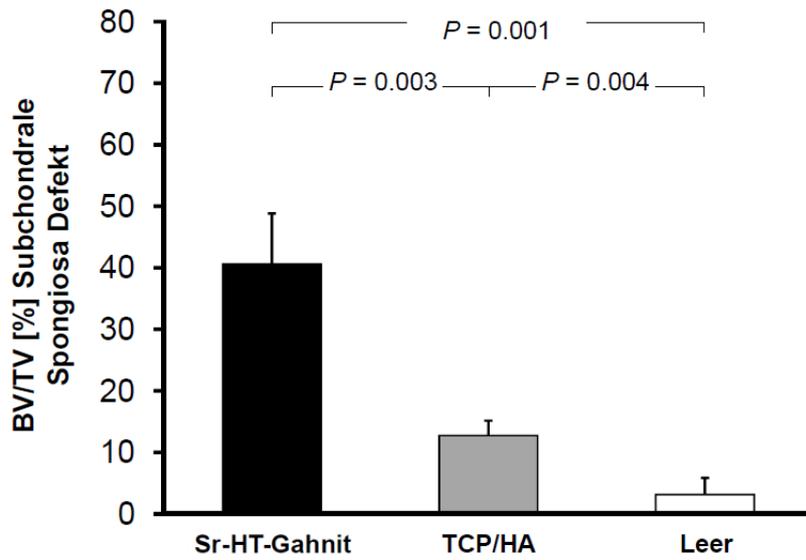


Abbildung 13. Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (BV/TV) der subartikulären Spongiosa im Defekt.

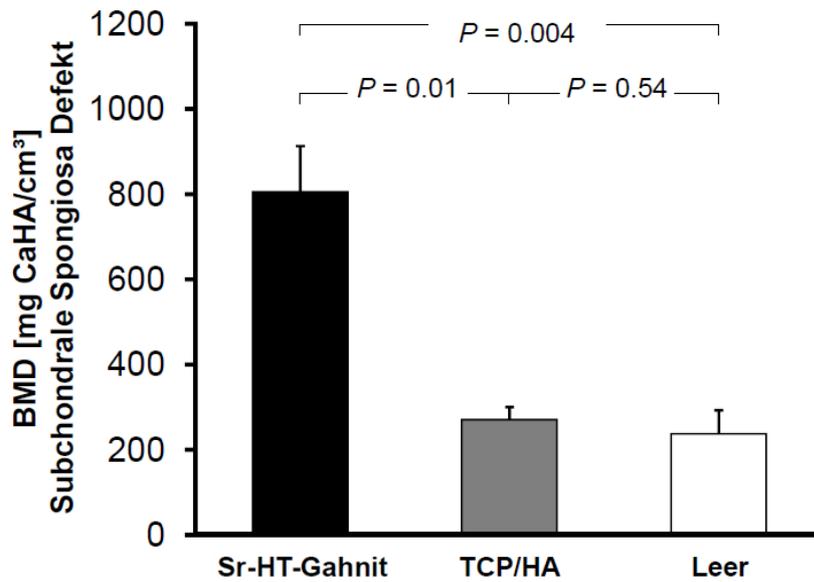


Abbildung 14. Knochenmineraldichte der subartikulären Spongiosa im Defekt.

6.4 Effekt der subchondralen Implantation der Trägermaterialien auf die Regeneration des Gelenkknorpels

6.4.1 Makroskopische Evaluation des Gelenkknorpels

Eine Übersicht des makroskopischen Erscheinungsbildes der verschiedenen Defektgruppen ist in Abbildung 15 dargestellt.

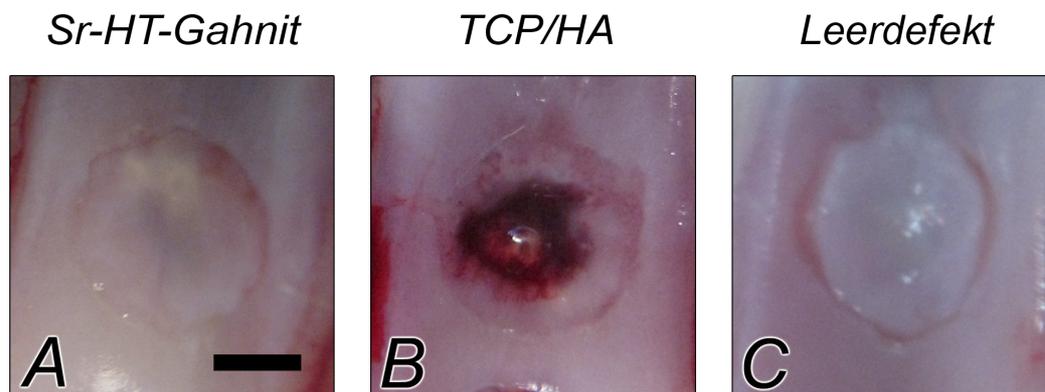


Abbildung 15. Makroskopisches Erscheinungsbild der Defekte nach 4 Wochen *in vivo*, Maßstabsbalken = 2mm.

6.4.1.1 Makroskopie Bewertungssystem nach Goebel

Die Defekte, welche mit Sr-HT-Gahnit Gerüstwerken therapiert wurden, wiesen eine signifikant bessere Defektfüllung, sowie Farbe und Oberflächenbeschaffenheit des Reparaturgewebes im Vergleich zu den TCP/HA Defekten auf. Ebenso waren weniger Blutgefäße im Defekt zu sehen (siehe Tabelle 21). Die Kontrollgruppe wies ebenfalls eine signifikant bessere Farbe, Oberflächenbeschaffenheit, sowie Abwesenheit von sichtbaren Blutgefäßen im Gewebe im Vergleich zu Defekten nach TCP/HA Implantation auf. Das zeigt sich auch in der Gesamtpunktzahl, wo sowohl die Sr-HT-Gahnit Gruppe (4.23 ± 2.74), als auch die Kontrollgruppe (4.5 ± 2.65) eine signifikant bessere Defektheilung im Vergleich zur TCP/HA Gruppe (8.73 ± 3.5) aufwiesen. Zwischen den mit Sr-HT-Gahnit behandelten - und den leer belassenen Defekten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P-Werte		
Farbe	1,0±1,0	2,09±1,04	0,92±0,79	0,026*	0,957	0,014*
Blutgefäße	1,23±1,09	2,64±1,21	1,08±1,08	0,012*	0,744	0,011*
Oberfläche	1,46±0,88	2,64±0,81	1,50±0,80	0,016*	0,805	0,012*
Defektfüllung	0,00±0,00	0,55±0,52	0,33±0,49	0,024*	0,161	0,403
Benachbarter Knorpel	0,54±0,52	0,82±0,87	0,67±0,49	0,561	0,603	0,926
Gesamtpunktzahl	4,23±2,74	8,73±3,5	4,5±2,65	0,005*	0,849	0,013*

Tabelle 21. Ergebnisse des makroskopischen Bewertungssystems nach Goebel.

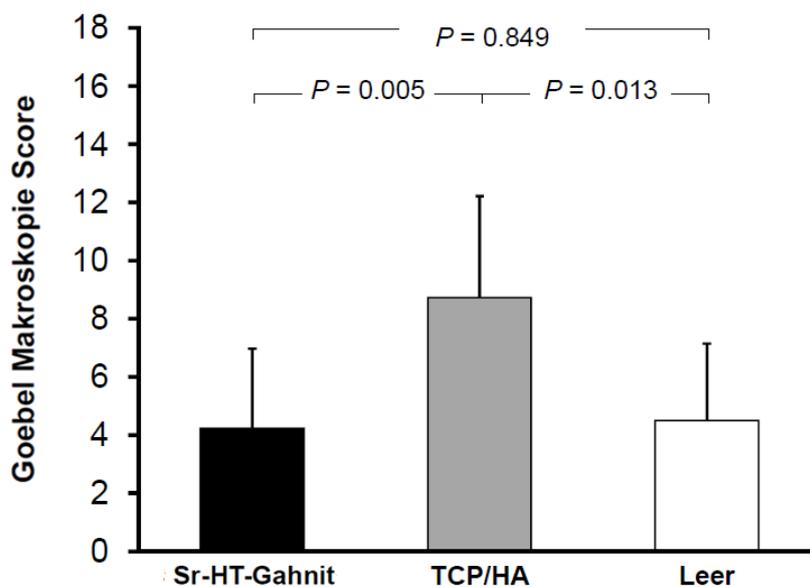


Abbildung 16. Ergebnisse des Makroskopie Bewertungssystems nach Goebel.

6.4.1.2 Oswestry Makroskopie Bewertungssystem

Im Oswestry Makroskopie Bewertungssystem zeigte sich ebenfalls eine signifikant bessere Oberflächenbeschaffenheit, Farbe, Defektfüllung, sowie Gesamtpunktzahl des Reparaturgewebes nach Sr-HT-Gahnit Implantation gegenüber der TCP/HA Gruppe.

Zwischen der Kontrollgruppe und den mit Sr-HT-Gahnit behandelten Defekten gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 22).

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P-Werte		
Defektfüllung	1,85±0,55	0,73±1,01	1,42±0,79	0,021*	0,179	0,13
Integration	0,38±0,51	0,36±0,50	0,33±0,49	0,954	0,848	0,926
Oberfläche	0,92±0,49	0,36±0,67	0,83±0,58	0,034	0,742	0,084
Farbe	1,23±0,60	0,36±0,50	1,42±0,51	0,006*	0,53	0,001*
Gesamtpunktzahl	4,38±1,56	1,82±2,18	4,0±1,65	0,013*	0,703	0,025*

Tabelle 22. Ergebnisse des Oswestry Makroskopie Bewertungssystems.

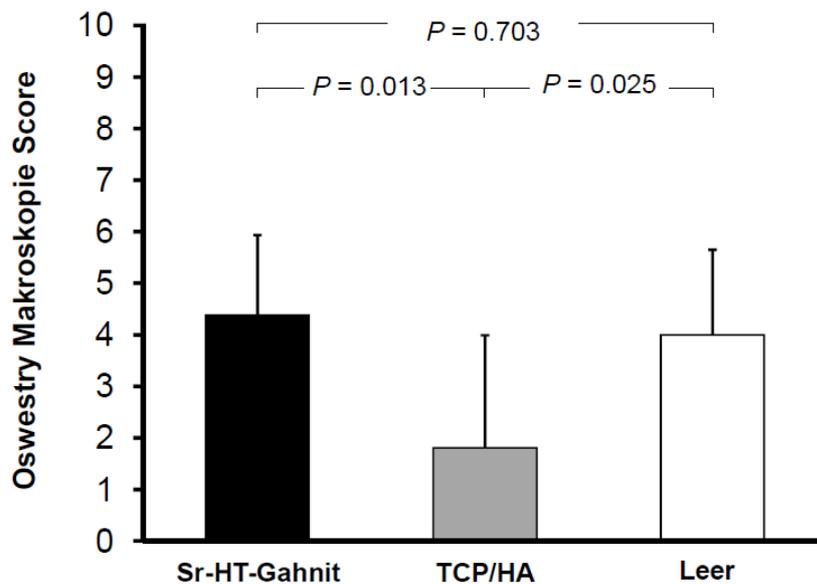


Abbildung 17. Ergebnisse des Oswestry Makroskopie Bewertungssystems.

6.4.2 Biochemische Evaluation des Gelenkknorpels

Als Indikator für die Zellzahl im Reparaturgewebe bestimmten wir den Gehalt an DNS. Zur Quantifizierung des Gewebes bestimmten wir zusätzlich den Gesamtproteingehalt. Außerdem den Proteoglykangehalt um eine Aussage über die Qualität des Reparaturgewebes machen zu können. Die drei Messwerte setzten wir in Relation

zueinander und bestimmten die Quotienten aus Proteoglykan/Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), DNS/Gesamtprotein ($\text{ng}/\mu\text{g}$) und Proteoglykane/DNS ($\mu\text{g}/\text{ng}$)(siehe Tabelle 23).

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert \pm SA			P-Werte		
PG/Protein [$\mu\text{g}/\mu\text{g}$]	1,72 \pm 0,77	1,19 \pm 0,78	1,44 \pm 0,32	0,259	0,415	0,488
DNS/Protein [ng/ μg]	38,78 \pm 23,41	37,78 \pm 15,02	32,36 \pm 14,80	0,931	0,583	0,543
PG/DNS [$\mu\text{g}/\text{ng}$]	53,92 \pm 22,90	31,04 \pm 16,31	52,22 \pm 25,03	0,074	0,905	0,113

Tabelle 23. Ergebnisse der biochemischen Analysen des knorpeligen Reparaturgewebes.

6.4.2.1 Proteoglykane

Der Gehalt an Proteoglykanen pro Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) im knorpeligen Reparaturgewebe war nicht statistisch signifikant unterschiedlich nach Implantation von Sr-HT-Gahnit Trägermaterialien ($1,72 \pm 0,77$), den Leerdefekten ($1,44 \pm 0,32$) oder nach Implantation von TCP/HA ($1,19 \pm 0,78$) ($P > 0,05$).

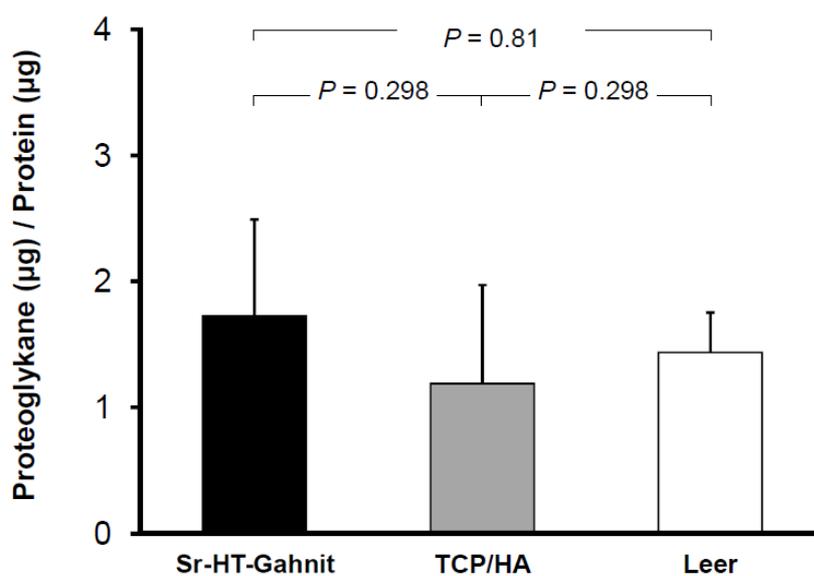


Abbildung 18. Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro Gesamtprotein.

6.4.2.2 DNS

Der DNS Gehalt pro Gesamtprotein im knorpeligen Reparaturgewebe wies keine statistisch signifikanten Unterschiede nach Implantation von Sr-HT-Gahnit ($38,78 \pm 23,41$), TCP/HA ($37,78 \pm 15,02$) und den Leerdefekten ($32,36 \pm 14,8$) auf ($P > 0,05$).

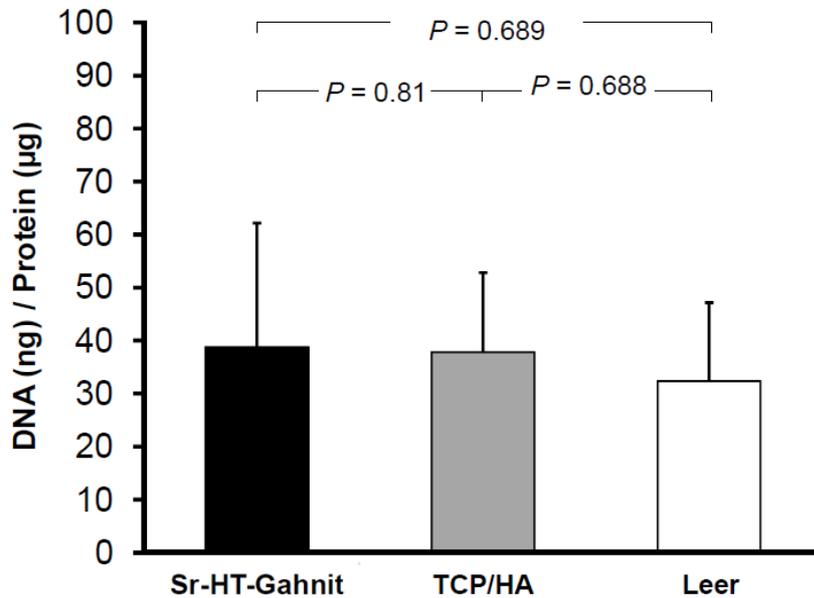


Abbildung 19. Ergebnisse Biochemie: DNS pro Gesamtprotein.

6.4.2.3 Proteoglykane / DNS

Das Verhältnis Proteoglykane pro DNS ($\mu\text{g}/\text{ng}$) wies keine statistisch signifikanten Unterschiede nach Implantation von Sr-HT-Gahnit Trägermaterialien ($53,92 \pm 22,9$), TCP/HA Trägermaterialien ($31,04 \pm 16,31$) oder den Leerdefekten ($52,22 \pm 25,03$) auf ($P > 0,05$).

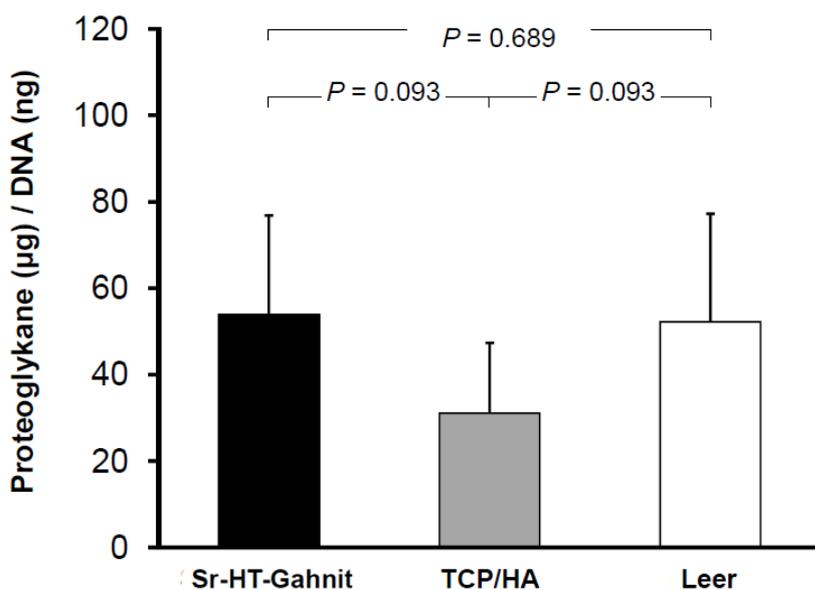


Abbildung 20. Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro DNS.

6.4.3 Immunhistochemische Evaluation des Gelenkknorpels

6.4.3.1 Typ-I-Kollagen

Die immunhistochemische Anfärbarkeit des Typ-I-Kollagens wies keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Sr-HT-Gahnit Gruppe, der TCP/HA Gruppe und den Leerdefekten auf ($P > 0,05$).

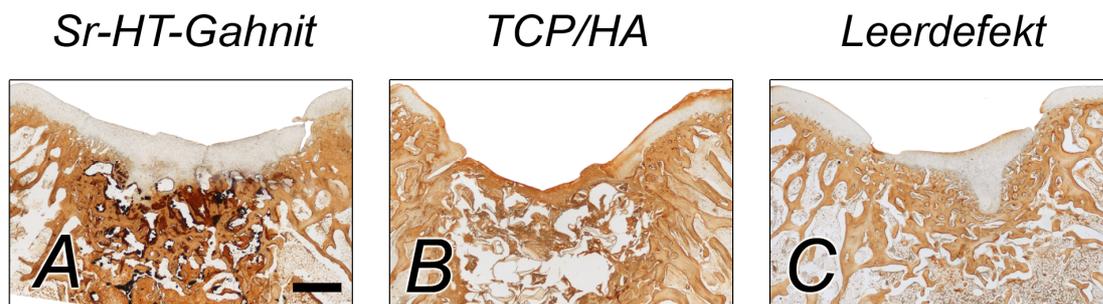


Abbildung 21. Übersicht Typ-I-Kollagen Färbung, Maßstabsbalken = 1mm.

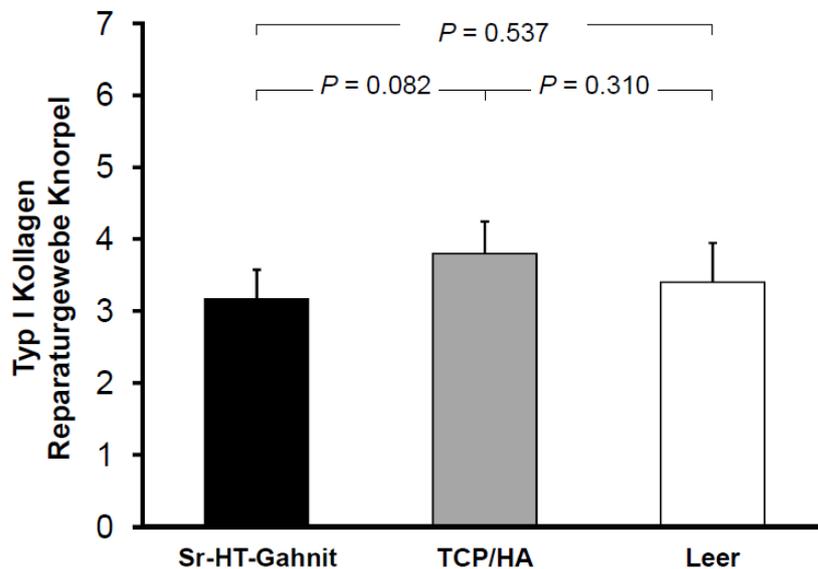


Abbildung 22. Immunhistochemie: Typ-I-Kollagen Färbung des Reparaturgewebes (Knorpel).

Die Typ-I-Kollagen Färbung des subchondralen Knochens zeigte die stärkste Ausprägung nach Implantation von Sr-HT-Gahnit ($3,66 \pm 0,51$), gefolgt von der TCP/HA Gruppe ($3,4 \pm 0,54$). Die schwächste Färbung wiesen die Leerdefekte auf ($2,5 \pm 0,54$).

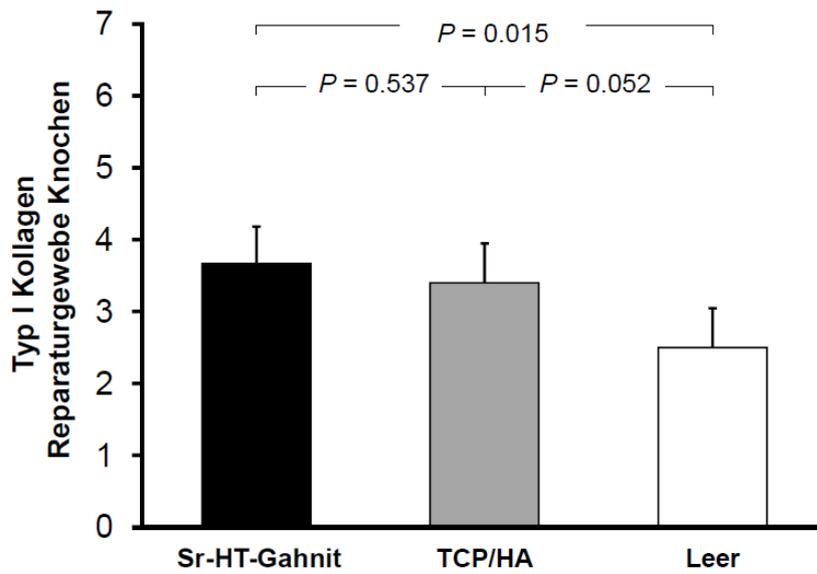


Abbildung 23. Immunhistochemie: Typ-I-Kollagen Färbung des Reparaturgewebes (Knochen).

6.4.3.2 Typ-II-Kollagen

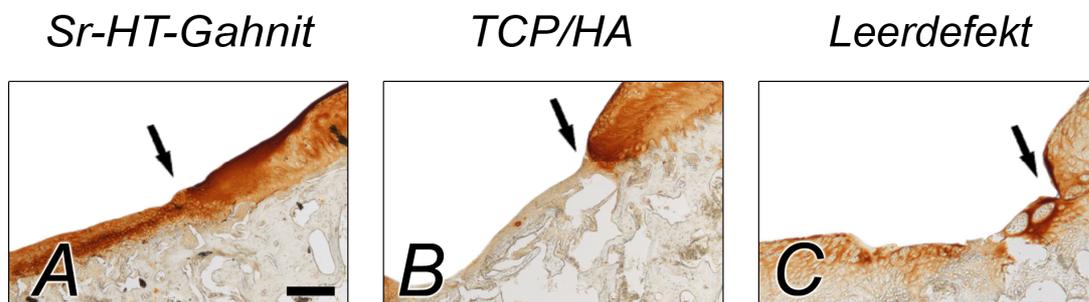


Abbildung 24. Übersicht Typ-II-Kollagen Färbung, Pfeil = Defektgrenze, Maßstabsbalken = 100 μ m.

Die immunhistochemische Färbung des Typ-II-Kollagens im Reparaturknorpel zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede nach Implantation von Sr-HT-Gahnit ($2,57 \pm 0,78$), TCP/HA ($1,6 \pm 0,89$) und den Leerdefekten ($2 \pm 0,89$) ($P > 0,05$).

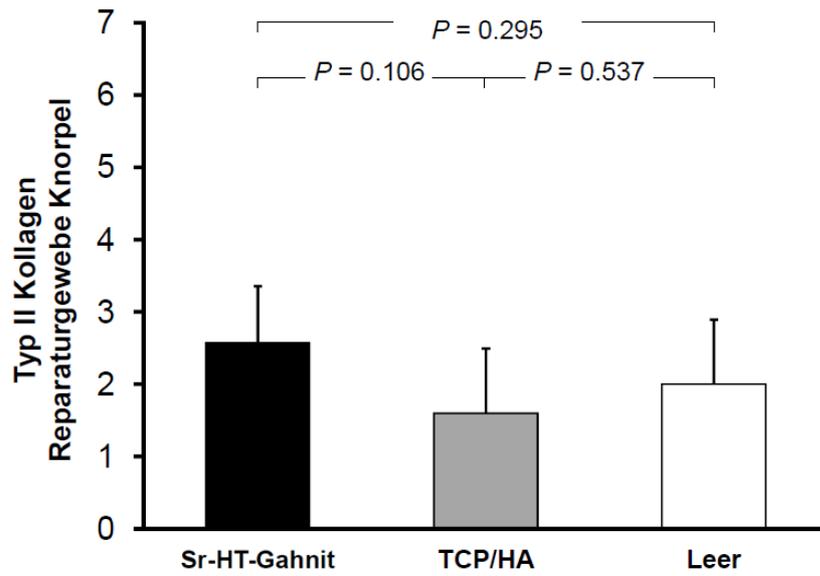


Abbildung 25. Immunhistochemie: Typ-II-Kollagen Färbung des Reparaturgewebes (Knorpel).

6.4.4 Histologische Evaluation des Gelenkknorpels

6.4.4.1 Safranin-O Färbung

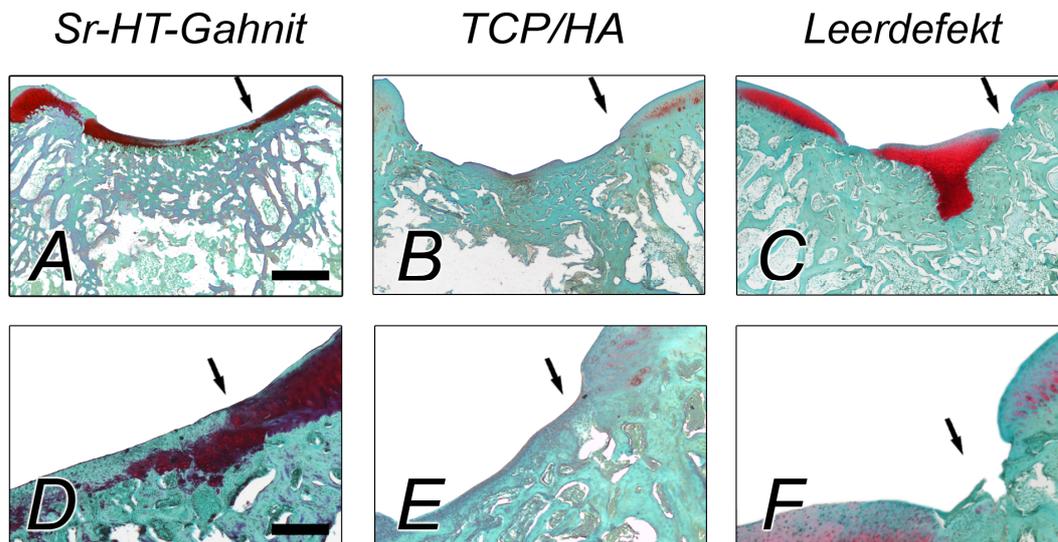


Abbildung 26. Übersicht Safranin-O Färbung, Pfeil = Defektgrenze, Maßstabsbalken (A-C) = 1mm, Maßstabsbalken (D-F) = 100 μ m.

Die histologische Analyse der Safranin-O gefärbten Schnitte gemäß des Bewertungssystems nach Sellers zeigte, dass die Anfärbbarkeit mit Safranin O, die Zellmorphologie, Defektarchitektur, Oberflächenbeschaffenheit und Neubildung des subchondralen Knochens signifikant besser in mit Sr-HT-Gahnit Trägermaterial behandelten Defekten waren, verglichen mit der TCP/HA Gruppe. Auch der Vergleich der Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems zeigte sich hier signifikant besser nach Implantation von Sr-HT-Gahnit (siehe Tabelle 24).

Ein Vergleich der Sr-Ht-Gahnit Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte eine verbesserte Anfärbbarkeit, Defekt- und Oberflächenbeschaffenheit in der Kontrollgruppe ($P < 0,05$), wohingegen die Integration zum benachbarten Knorpelgewebe und die Neubildung des subchondralen Knochens in den Sr-HT-Gahnit Defekten signifikant besser war. Bei den anderen Kriterien zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, sodass auch die Gesamtpunktzahl des Sellers Bewertungssystems keine signifikanten Unterschiede aufwies ($P > 0,05$).

Verglichen mit den TCP/HA Defekten zeigten die Leerdefekte eine signifikant bessere Anfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defekt- und Oberflächenbeschaffenheit, sowie Knochenneubildung. Umgekehrt verhielt es sich bei der Integration, bei welcher die TCP/HA Gruppe signifikant bessere Werte aufweist. Bei der Gesamtpunktzahl zeigt sich in der Kontrollgruppe eine weit bessere Defektheilung, als nach TCP/HA Implantation. ($P < 0,05$).

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert ± SA			P Werte		
Defektfüllung	0,50±0,70	0,70±0,54	0,80±0,58	0,05*	0,007*	0,477
Integration	1,73±0,66	1,83±0,51	2,15±0,70	0,05*	0,002*	0,023*
Anfärbbarkeit	0,94±1,04	1,66±1,13	0,49±1,10	0,002*	0,002*	<0,001*
Zellmorphologie	2,82±1,34	3,75±1,29	2,43±1,03	<0,001*	0,174	<0,001*
Defekt- beschaffenheit	1,22±1,36	2,27±1,49	0,45±0,59	<0,001*	0,004*	<0,001*
Oberflächen- beschaffenheit	1,34±1,13	2,31±0,87	0,56±0,77	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Subchondraler Knochen	0,12±0,37	2,10±0,90	1,24±1,07	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Tidemark	3,59±0,62	3,70±0,54	3,84±0,36	0,374	0,052	0,386
Gesamtpunktzahl	12,3±4,3	18,4±4,5	12,0±3,5	<0,001*	0,583	<0,001*

Tabelle 24. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Sellers.

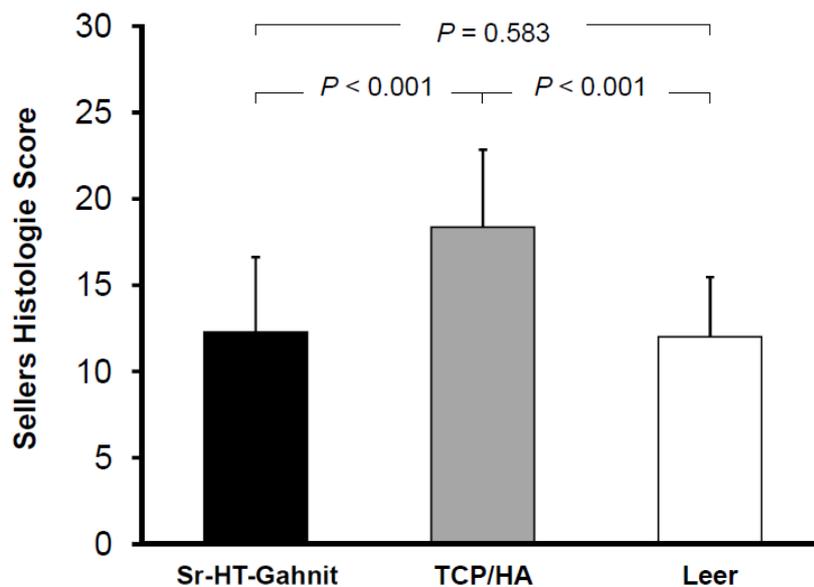


Abbildung 27. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Sellers.

Anhand des histologischen Bewertungssystems nach Wakitani zeigte sich, dass die Zellmorphologie, Anfärbbarkeit und Oberflächenbeschaffenheit signifikant besser in der Sr-HT-Gahnit Gruppe, verglichen mit der TCP/HA Gruppe, war (siehe Tabelle 25). Dieser Unterschied zeigte sich auch in der Gesamtpunktzahl, welche ebenfalls signifikant besser bei den Gahnit Defekten war. Die Unterschiede in den anderen Kriterien verfehlten das Signifikanzniveau.

Die Leerdefekte zeigten bis auf eine signifikant schlechtere Integration mit dem benachbarten Knorpel keine statistisch relevanten Unterschiede zu der Gahnit Gruppe. Das zeigte sich auch in der Gesamtpunktzahl ($P > 0,05$).

Defekte welche mit TCP/HA Trägermaterialien gefüllt wurden, zeigten eine signifikant schlechtere Zellmorphologie, Anfärbbarkeit, Oberflächenbeschaffenheit und Dicke des Reparaturgewebes verglichen mit den Leerdefekten. Lediglich die Integration war mit statistischer Relevanz besser. In der Gesamtpunktzahl gemäß des Wakitani Bewertungssystems sind die Leerdefekte aber signifikant besser geheilt, als die mit TCP/HA Gerüstwerken therapierten Defekte.

Kategorie	Sr-HT-Gahnit	TCP/HA	Leerdefekte	Gahnit - TCP/HA	Gahnit - Leerdefekte	TCP/HA - Leerdefekte
	Mittelwert \pm SA			P Werte		
Zellmorphologie	1,19 \pm 0,60	1,68 \pm 0,51	1,15 \pm 0,36	<0,001*	0,819	<0,001*
Anfärbbarkeit	0,61 \pm 0,73	1,54 \pm 0,83	0,52 \pm 1,10	<0,001*	0,063	<0,001*
Oberflächenbeschaffenheit	0,60 \pm 0,90	1,24 \pm 0,65	0,66 \pm 0,78	<0,001*	0,464	<0,001*
Dicke Reparaturknorpel	0,58 \pm 0,73	0,80 \pm 0,75	0,29 \pm 0,46	0,142	0,073	0,001*
Integration	0,55 \pm 0,58	0,72 \pm 0,49	1,22 \pm 0,62	0,128	<0,001*	<0,001*
Gesamtpunktzahl	3,8 \pm 2,8	6,0 \pm 2,0	3,9 \pm 1,4	0,001*	0,2	<0,001*

Tabelle 25. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Wakitani.

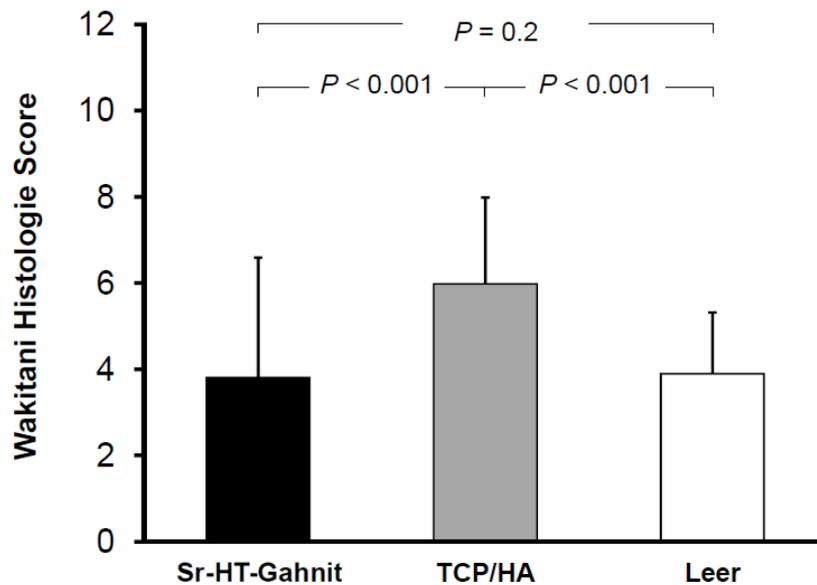


Abbildung 28. Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach Wakitani.

Sowohl das Bewertungssystem nach Sellers, als auch nach Wakitani zeigte, dass Defekte, in welche Sr-HT-Gahnit Trägermaterial implantiert wurde, ein signifikant besseres Reparaturgewebe aufwiesen, als solche die mit TCP/HA therapiert wurden. Die Heilung der Leerdefekte bewegte sich dabei auf dem Niveau der Gahnit-Gruppe.

6.4.4.2 Histologische Untersuchung unter dem Polarisationsmikroskop

Die Betrachtung der HE gefärbten Schnitte unter dem Polarisationsmikroskop zeigte, dass der Reparaturknorpel in keiner der drei Gruppen eine normale Struktur wie im benachbarten Knorpel aufwies. Die Doppelbrechung, ein Indikator für den Kollagengehalt, war unabhängig von der Art des eingesetzten Trägermaterials ähnlich den Leerdefekten. Im subchondralen Knochen hingegen zeigte die Polarisationsmikroskopie eine ähnliche Struktur und Doppelbrechung im Defektgewebe, wie im dem Defekt benachbarten Knochengewebe.

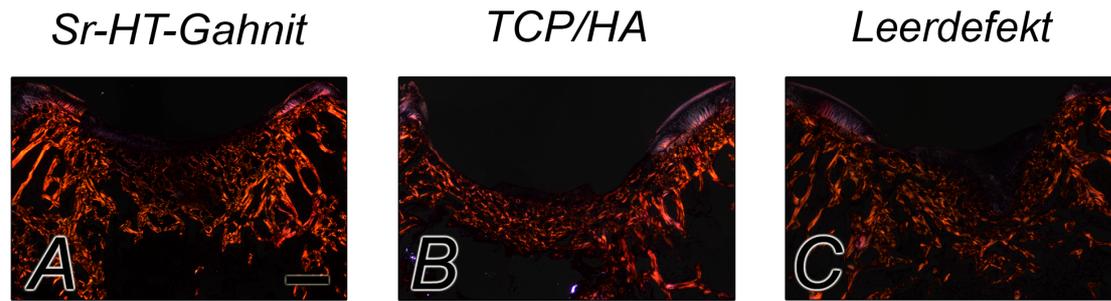


Abbildung 29. Polarisationsmikroskopie, Maßstabsbalken = 1mm.

6.5 Korrelationsanalyse zwischen Knorpel- und Knochenreparatur

Bei nicht normalverteilten Werten nutzten wir den Spearman Korrelationskoeffizienten. Es wurde der Zusammenhang zwischen der *Tidemark*, dem neuen subchondralen Knochen und der Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems nach Sellers mit Werten der Mikro-CT Untersuchung in den „*volumes of interest*“ (VOI) „subchondrale Knochenplatte Defekt“ und „subchondrale Spongiosa Defekt“ bewertet. Dabei zeigten sich insgesamt 5 signifikante Korrelationen (siehe Tabelle 26).

6.5.1 Korrelationen der subchondralen Knochenplatte

In der subchondralen Knochenplatte korrelieren der histologisch bestimmte Parameter „neuer subchondraler Knochen“ mit der berechneten Knochenmineraldichte signifikant ($-0,483$, $P = 0,049$). Da das Bewertungssystem nach Sellers ein inverses Bewertungssystem ist, eine gute Heilung also eine geringe Punktzahl aufweist, ist das Vorzeichen des Spearman Korrelationskoeffizienten negativ.

6.5.2 Korrelationen der subartikulären Spongiosa

In der subchondralen Spongiosa korrelieren die Werte BMD ($-0,702$, $P = 0,002$), BV/TV ($-0,511$, $P = 0,036$) und Tb.Th ($-0,744$, $P = 0,001$) mit dem neugebildeten subchondralen Knochen gemäß des Sellers Bewertungssystems signifikant. Der Korrelationskoeffizient größer $0,7$ zeigte dabei eine äußerst gute Korrelation der Werte „BMD“ und „Tb.th“ mit dem neugebildeten subchondralen Knochen des Sellers Bewertungssystems.

		Gesamtpunktzahl Sellers	Subchondraler Knochen Sellers	Tidemark Sellers
SKD	BMD [mg/cm ³]	-0,445 (0,073)	-0,483 (0,049)*	-0,234 (0,366)
	BV/TV [%]	-0,331 (0,194)	-0,094 (0,720)	-0,059 (0,823)
	BS/TV [1/mm]	-0,319 (0,212)	-0,088 (0,738)	-0,032 (0,904)
	Ct.Th [mm]	-0,225 (0,368)	-0,178 (0,480)	-0,167 (0,507)
SSD	BMD [mg/cm ³]	-0,315 (0,218)	-0,702 (0,002)*	-0,062 (0,814)
	BV/TV [%]	-0,109 (0,677)	-0,511 (0,036)*	-0,194 (0,456)
	BS/TV [1/mm]	-0,113 (0,666)	-0,424 (0,090)	-0,211 (0,416)
	Tb.Th [mm]	-0,472 (0,056)	-0,744 (0,001)*	-0,253 (0,328)

Tabelle 26. Ergebnisse der Korrelationsanalyse, SKD = subchondrale Knochenplatte im Defekt, SSD = subartikuläre Spongiosa im Defekt). Angaben: Korrelationskoeffizient (P-Wert).

7. Diskussion

Der subchondrale Knochen ist die wichtigste Struktur zur Unterstützung des hyalinen Gelenkknorpels.

In dieser Arbeit überprüften wir die Thesen, dass (1) die subchondrale Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit *in vivo* unbedenklich ist, (2) die Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit-, bzw. Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Trägermaterialien mit vergleichbaren strukturellen Parametern, eine bessere Knochenregeneration als Leerdefekte erlauben, (3) Strontium-Hardystonit-Gahnit-Gerüstwerke eine bessere Rekonstruktion des subchondralen Knochens als Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Gerüstwerke bedingen und (4) die Regeneration des subchondralen Knochens mit einer besseren Knorpelreparatur korreliert.

Hierzu wurden Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit -, oder Strontium-Hardystonit-Gahnit Gerüstträger in die Trochleas der Kniegelenke von erwachsenen Chinchilla Bastard Kaninchen implantiert und die Defekte nach 4 Wochen *in vivo* makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch, biochemisch und radiologisch untersucht. Als Kontrollgruppe dienten leer belassene Defekte. Um mögliche Effekte der Architektur der Trägermaterialien auszuschließen, wurden Gerüstträger mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften (z.B. Porosität) verwendet. Aus den erhobenen Daten lassen sich 4 wesentliche Schlussfolgerungen im Kontext der aufgeworfenen Fragen ziehen:

(1) Die subchondrale Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit zeigte nach 4 Wochen *in vivo* keine negativen Auswirkungen auf die Gelenkhomeostase.

(2) Die Implantation sowohl von Strontium-Hardystonit-Gahnit-, als auch Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Trägermaterialien, führte zu einer besseren Knochenregeneration als in Leerdefekten.

(3) Strontium-Hardystonit-Gahnit-Gerüstwerke erlaubten eine bessere Rekonstruktion des subchondralen Knochens als Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Gerüstwerke.

(4) Die Knorpelreparatur war sowohl nach Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit, als auch in Leerdefekten verbessert im Vergleich mit Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Trägermaterialien. Eine verbesserte Regeneration des subchondralen Knochens korreliert in diesem Modell nicht mit einer besseren Knorpelreparatur.

7.1 Eignung des gewählten Tiermodells

Durch Tierexperimente ist es möglich, das Risiko neuer Behandlungsmethoden für den Menschen erheblich zu reduzieren, da sich die Auswirkungen auf den menschlichen Organismus im Tiermodell erahnen lassen^{12,108}. Für Studien zu osteochondralen Defekten bieten sich eine Vielzahl von Tieren an, angefangen bei Kleintieren wie Kaninchen¹⁰⁹⁻¹¹¹ und Mischweinen¹¹²⁻¹¹⁴, bis hin zu Großtiermodellen wie Schafe¹¹⁵⁻¹¹⁷ und Pferde^{118,119}.

7.2 Bewertungssysteme zur Evaluation des Defektareals

Die genutzten Bewertungssysteme zur Evaluation der Defektreparatur sind allesamt etablierte Bewertungssysteme, die schon in vergangenen Studien zum Einsatz kamen.

Das zur makroskopischen Auswertung genutzte Bewertungssystem nach Goebel⁹⁸ stellt dabei eine Weiterentwicklung des ebenfalls angewandten Oswestry Bewertungssystems⁹⁹ dar, was an der möglichen Gesamtpunktzahl von 20 im Vergleich zu 8 Punkten zu erkennen ist. Somit lässt sich der Defekt detailliert und genau beschreiben.

Auch im Rahmen der histologischen Evaluation kamen zwei verschiedene Bewertungssysteme zum Einsatz. Hier stellt das Bewertungssystem nach Sellers⁹⁶ mit einer Gesamtpunktzahl von 31 das differenziertere System zur histologischen Defektevaluation im Vergleich zum Bewertungssystem nach Wakitani¹⁰¹ (14 mögliche Punkte) dar. Zur Beurteilung des benachbarten Knorpels nutzten wir das Bewertungssystem nach Laverty¹⁰².

7.3 Veränderungen des Gelenks nach Implantation der Trägermaterialien

7.3.1 Veränderungen in der Synovialmembran

Bei der Evaluation der Synovialmembran mit Hilfe des Synovialmembran-Bewertungssystem nach Fortier¹⁰³ zeigten sich in keiner der Gruppen entzündliche Veränderungen. Dieselben Beobachtungen konnte man in vergangenen Studien unseres Labors^{120,121} machen und unterstreicht die Eignung der Operationsmethode zur

Untersuchung osteochondraler Defekte. Ebenso lässt sich aus den Beobachtungen schließen, dass sowohl TCP/HA, als auch Sr-HT-Gahnit eine gute Biokompatibilität aufweisen. Unsere Erkenntnisse decken sich mit denen von Roohani-Esfahani *et al.*⁸⁵, welche keine Hinweise für Infektionen, Entzündungen oder Nekrosen bei Therapie eines größeren Knochendefektes am Kaninchenmodell mit den von uns genutzten Trägermaterialien fanden.

7.3.2 Veränderungen im benachbarten Knorpel

Im benachbarten Knorpel konnten bei der Evaluation mittels Laverty Bewertungssystem¹⁰² keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

Da der Mittelwerte aller Gruppen im Bereich einer Gesamtpunktzahl von 5 (0-24) liegt, zeigt sich, dass es schon zu leichten degenerativen Veränderungen gekommen ist, was eine mögliche Konsequenz osteochondraler Defekte darstellt¹²²⁻¹²⁴.

7.4 Veränderungen im subchondralen Knochen nach Implantation der Trägermaterialien

Die Mikro-CT Analyse stellt eine genaue und geeignete Methode zur Untersuchung der Mikroarchitektur und der Dichte des subchondralen Knochens im Tiermodell dar¹²⁵⁻¹²⁷. Die Einteilung der „Volumes of Interest“ erfolgte dabei wie schon in vorangegangenen Studien¹²⁸ und erlaubt eine präzise Beschreibung des benachbarten -, als auch des Knochens im Defekt.

7.4.1 Veränderungen im benachbarten Knochen nach Implantation der Trägermaterialien

In der subchondralen Knochenplatte des benachbarten Knorpels zeigten sich in der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Knochenmineraldichte im Vergleich zu der Gahnit Gruppe.

Zwischen der Sr-HT-Gahnit Gruppe und den TCP/HA Defekten zeigt sich im Hinblick auf die Knochenmineraldichte, Knochenvolumen und Porosität keine signifikanten Unterschiede in der benachbarten subchondralen Spongiosa. Verglichen mit den Leerdefekten zeigten sich

eine signifikant geringere Knochenmineraldichte, sowie ein signifikant höheres Knochenvolumen in der Gahnit Gruppe. Zum höheren Knochenvolumen passend finden wir eine signifikant höhere Trabekeldicke (Tb.Th), was für ein dichteres Netz an dickeren Trabekeln spricht. Passenderweise findet sich eine signifikant geringere Porosität in der Gahnit Gruppe. Für den Vergleich der TCP/HA Defekte mit der Kontrollgruppe finden sich ähnliche Ergebnisse, mit dem Unterschied, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Knochenmineraldichte und der Trabekeldicke gibt. Dafür ist die Trabekelanzahl signifikant höher.

7.4.2 Veränderung des Knochens im Defekt nach Implantation der Trägermaterialien

Nach 28 Tagen *in vivo* waren die Sr-HT-Gahnit Gerüstwerke noch deutlich mit einer intakten Mikroarchitektur zu erkennen, wohingegen die TCP/HA Gerüstwerke als solche nicht mehr zu identifizieren waren. Das deckt sich mit den Ergebnissen von Roohani-Esfahani *et al.*⁸⁵, bei denen Sr-HT-Gahnit Gerüstwerke nach 28 Tagen *in vitro* kaum resorbiert wurden (2%). Ebenso behielten die Gahnit Gerüstwerke ihre Mikroarchitektur im Vergleich zu TCP/HA bei und zerbrachen auch *in vivo* unter Belastung nicht.

In der subchondralen Knochenplatte zeigte sich in den Sr-HT-Gahnit Defekten eine deutlich erhöhte Knochenmineraldichte im Vergleich zu den TCP/HA Defekten (1,9 - fach). Passend dazu, zeigt sich ebenso ein erhöhtes Knochenvolumen pro Volumen in der Sr-HT-Gahnit Gruppe, was auf eine erhöhte Knochendichte und somit eine massivere subchondrale Knochenplatte schließen lässt. Interessanterweise weist die Kontrollgruppe eine geringfügig höhere Knochenmineraldichte als die TCP/HA Gruppe auf (1,06 - fach), zeigt aber beim Knochenvolumen den geringsten Wert aller Gruppen.

In vergangenen Studien wurde beobachtet, dass eine zu massive subchondrale Knochenplatte die Degeneration des darüber liegenden Knorpelgewebes forcieren kann, da schädigende Scherkräfte begünstigt werden^{129,130}. Da in dieser Studie die Gahnit Defekte, welche, verglichen mit den anderen Defektgruppen, die massivste subchondrale Knochenplatte zeigten, mitunter die beste Knorpelregeneration aufwiesen ist die Durchführung von Langzeitstudien unabdingbar.

In der subchondralen Spongiosa des Defekts zeigt sich der dichteste Knochen ebenfalls in der Sr-HT-Gahnit Gruppe. Die Knochenmineraldichte (3 – fach), sowie das Knochenvolumen (3,2 – fach) ist dabei statistisch signifikant erhöht, verglichen mit Defekten, welche mit

TCP/HA Trägermaterialien therapiert wurden. Ursächlich dafür ist ein dichteres Netz an dickeren Trabekeln im knöchernen Defektareal, was sich an der signifikant größeren Trabekeldicke (1,7 – fach), sowie einem signifikant geringeren trabekulären Musterfaktor, einem inversen Maß für die Konnektivität (Tb.Pf, 4,7 – fach), ablesen lässt. Umgekehrt ist die Gesamtporosität in der TCP/HA Gruppe größer (1,4 – fach).

Die Ergebnisse der Gruppe um Roohani-Esfahani⁸⁵ zeigten, passend zu unseren Beobachtungen, dass Sr-HT-Gahnit Gerüstwerke *in vitro* eine hohe Bioaktivität besitzen und das Knochenwachstum stimulieren. Das wurde *in vivo* am Kaninchenmodell bestätigt, in welchem diese Gerüstwerke eine signifikant bessere Knochenregeneration aufwiesen, als die mit TCP/HA Trägermaterial therapierten Defekte.

Gotterbarm *et al.* zeigten durch semiquantitative, histologische Analysen am Kaninchenmodell eine signifikant bessere Knochenregeneration nach Einbringung von TCP Gerüstwerken, im Vergleich zu Leerdefekten¹³¹. Das deckt sich mit unseren Ergebnissen des Mikro-CT. Tanaka *et al.* beobachteten ebenfalls eine Knochenneubildung nach Einbringung von TCP in osteochondrale Defekte¹³². Im Gegenzug dazu beobachtete die Gruppe um Hing einen massiven Rückgang des Knochenwachstums, nach initial guter Neubildung, bei den TCP Defekten¹³³. Als Ursache wird die mechanische Instabilität des porösen Materials angenommen, die zum Zerbrechen, pH Wert Verschiebungen und chemischen -, als auch zellbasierten Resorptionsvorgängen geführt hat¹³³. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studie zeigen, dass die mechanische Stabilität des Biomaterials mitunter entscheidend für die Heilung des Gewebes ist.

Sr-HT-Gahnit führt also im Vergleich zu TCP/HA Gerüstwerken, besonders in der subartikulären Spongiosa, zu einer verbesserten Rekonstruktion des subchondralen Knochens und scheint so eine vielversprechende Alternative zur Therapie des subchondralen Knochens unter Belastung zu sein.

7.5 Auswirkungen der subchondralen Implantation von Trägermaterialien auf die Knorpelreparatur

7.5.1 Makroskopische Evaluation der Defektreparatur

Die Defekte, in welche Sr-HT-Gahnit implantiert wurde, sowie die Leerdefekte, zeigten eine signifikant bessere Defektheilung als die Defekte nach TCP/HA Implantation. Das spiegelt

sich auch in der Gesamtpunktzahl des Bewertungssystems nach Goebel wieder, bei dem sowohl die Sr-HT-Gahnit Gruppe, als auch die Kontrollgruppe eine signifikant bessere Punktzahl im Vergleich zur TCP/HA Gruppe aufwiesen. Die Farbe, Füllung, sowie die Oberflächenbeschaffenheit des Reparaturgewebes war dabei im Vergleich zu den TCP/HA Defekten signifikant verbessert. Ebenso waren weniger Blutgefäße im Defekt zu sehen. Zwischen den mit Sr-HT-Gahnit behandelten - und den leer belassenen Defekten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tanaka *et al.* beobachtete makroskopisch, dass es 8 Wochen nach Implantation von β -TCP in einen osteochondralen Defekt im Kaninchenmodell, ausschließlich zur Ausbildung eines dünnen, fibrösen Gewebes kam¹³², unter welchem das implantierte Trägermaterial noch makroskopisch zu erkennen war. Die schlechte Knorpelreparatur wurde in dieser Studie durch histologische Analysen bestätigt und deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie. Sr-HT-Gahnit wurde bisher noch nicht im Rahmen osteochondraler Defekte untersucht.

7.5.2 Biochemie der Gelenkknorpelreparatur

7.5.2.1 Proteoglykane pro DNS

Der Quotient aus den bestimmten Proteoglykanen und dem gemessenen DNS Gehalt ist ein Indikator für die Qualität des Reparaturgewebes. Proteoglykane werden im Knorpelgewebe von Chondrozyten gebildet und sind maßgeblich für die mechanische Stabilität verantwortlich (siehe 2.2). Dementsprechend ist ein erniedrigter Proteoglykangehalt ein Hinweis für eine minderwertige Regeneration des Defekts¹³⁴. Das deckt sich mit Ergebnissen von Kaul *et al.*, die bei Patienten mit fehlgeschlagener Markraumstimulation bei früher Arthrose ebenfalls einen erniedrigten Proteoglykan pro DNS Gehalt im faserknorpeligen Reparaturgewebe gefunden haben¹³⁵.

In unserer Studien zeigten sich die höchsten Anteile an Proteoglykanen pro DNS nach Implantation von Sr-HT-Gahnit und den Leerdefekten. Nach Implantation von TCP/HA zeigten sich bedeutend weniger Proteoglykane pro DNS, eine statistische Signifikanz wurde jedoch verfehlt. Dies spricht für ein qualitativ hochwertigeres Reparaturgewebe in der Gahnit-Gruppe, als auch bei den Leerdefekten, was mit der Gesamtpunktzahl der histologischen Evaluation übereinstimmt. Auch die Parameter „Zellmorphologie“, sowie „Matrixanfärbbarkeit“, ein Maß für das Vorhandensein von Proteoglykanen, des Sellers - und des Wakitani Bewertungssystems zeigen bei den Leerdefekten und nach Sr-HT-Gahnit-

Implantation eine signifikant bessere Punktzahl. Die semiquantitative Analyse der Typ-II-Kollagen Färbung, sowie die makroskopische Auswertung des Defekts zeigen dieselbe Tendenz wie der biochemisch bestimmte Proteoglykangehalt pro DNS.

7.5.2.2 DNS pro Protein

Der Gesamtgehalt an DNS pro Protein ist ein Maß für die Zellzahl im untersuchten Reparaturgewebe. In allen drei Versuchsgruppen waren die Ergebnisse vergleichbar und verfehlten eine statistische Signifikanz. Im Hinblick auf den unterschiedlichen Proteoglykangehalt pro DNS, lässt sich vermuten, dass im Reparaturgewebe nach TCP/HA Implantation mehrheitlich Fibroblasten vorkommen, die keine Proteoglykansynthese betreiben. Eine hohe Zellzahl, bei kleinem PG/DNS Gehalt fand ebenfalls die Gruppe um Kaul in ihrer Untersuchung von minderwertigem, faserknorpeligem Reparaturgewebe nach fehlgeschlagener Markraumstimulation¹³⁵.

7.5.3 Immunhistochemie des Reparaturgewebes

7.5.3.1 Immunhistochemie des chondrogenen Reparaturgewebes

Sowohl die Typ-I-Kollagen -, als auch die Typ-II-Kollagen Färbung des knorpeligen Reparaturgewebes zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Die Gahnit Gruppe zeigte im Rahmen der Typ-II-Kollagen Färbung die stärkste Anfärbbarkeit, gefolgt von den Leerdefekten. Am schwächsten ausgeprägt war die Anfärbbarkeit mit Typ-II-Kollagen bei den TCP/HA Defekten. Da Typ-II-Kollagen ein wesentlicher Bestandteil des gesunden, hyalinen Gelenkknorpels darstellt, lässt sich anhand der semiquantitativen Analyse der Typ-II-Kollagen Färbung auf die Qualität des Reparaturgewebes schließen. Wenn auch keine statistische Signifikanz erreicht wird, reflektiert diese Tendenz jedoch die Ergebnisse der histologischen Auswertung des Defektknorpels, bei der sowohl die Gahnit-Gruppe, als auch die Leerdefekte eine bessere Heilung aufwiesen.

7.5.3.2 Immunhistochemie des knöchernen Reparaturgewebes

Typ-I-Kollagen ist mit 95% das Hauptkollagen des Knochens. Dementsprechend ist die Anfärbbarkeit des Typ-I-Kollagen im subchondralen Reparaturgewebe ein Indiz für das

Vorhandensein von neu gebildetem Knochen im Defekt. Die stärkste Ausprägung zeigte sich dabei nach Implantation von Sr-HT-Gahnit, gefolgt von Defekten, in welche TCP/HA implantiert wurde. Die schwächste Färbung wiesen die Leerdefekte auf. Die Beobachtungen decken sich mit den mittels Mikro-CT berechneten Knochenvolumina und Knochenmineraldichten der verschiedenen Gruppen.

Die Tendenz unserer Ergebnisse deckt sich mit denen von Roohani-Esfahani *et al.*⁸⁵, welche *in vitro* eine signifikant höhere Expression von Typ-I-Kollagen durch Implantation von Sr-HT-Gahnit Trägermaterialien, im Vergleich zu TCP/HA Trägermaterialien nachwies.

7.5.4 Histologie des Reparaturgewebes

Die histologische Analyse der Safranin-O gefärbten Schnitte gemäß des Bewertungssystems nach Sellers zeigte, dass die Knorpelreparatur der Sr-HT-Gahnit Gruppe signifikant besser war, als nach Implantation von TCP/HA (Gesamtpunktzahl $12,3 \pm 4,3$ vs $18,4 \pm 4,5$, $P < 0,001$). Ursächlich dafür waren eine bessere Anfärbbarkeit mit Safranin O, die Zellmorphologie, Defektarchitektur, Oberflächenbeschaffenheit und Neubildung des subchondralen Knochens nach Implantation des Sr-HT-Gahnit Trägermaterials. Interessanterweise zeigen die Leerdefekte eine der Gahnit-Gruppe gleichwertige Knorpelheilung ($12,0 \pm 3,5$), wenn es auch zum Teil signifikante Unterschiede in den einzelnen Parametern gibt. Einzig die Integration zum benachbarten Knorpel zeigte sich signifikant schlechter in leer belassenen Defekten. Auffällig ist außerdem der signifikant schlechteste Wert aller Gruppen bzgl. des Parameters „subchondraler Knochen“ für TCP/HA.

Bisher gab es keine Studie, die die Knorpelreparatur bei osteochondralen Defekten nach Implantation eines Trägermaterials zur ausschließlichen Therapie des subchondralen Knochens evaluierte.

Da bei den verwendeten Biomaterialien bewusst auf eine Komponente zur Knorpelregeneration verzichtet wurde, lässt sich anhand unserer Ergebnisse schließen, dass die Wahl des Trägermaterials zur subchondralen Regeneration bereits einen erheblichen Einfluss auf die Knorpelheilung hat. Dabei ist die Implantation von Trägermaterialien nicht zwangsläufig förderlich, wie die signifikant schlechtere Punktzahl nach TCP/HA Implantation sowohl beim Sellers -, als auch beim Wakitani Bewertungssystem zeigt. Tanaka *et al.* verwendeten in ihrer Studie β -TCP Gerüstträger als Kontrollgruppe¹³². Dabei konnte zu keiner Zeit eine Knorpelneubildung beobachtet werden, was sich mit der schlechten Defektheilung unserer TCP/HA Gruppe vergleichen lässt. Hing *et al.* zeigten an

osteocondralen Defekten im Kaninchenmodell, dass es unter der Therapie mit TCP Keramiken, nach anfänglich guter Osteokonduktivität, zu chemischen und osteoklastischen Resorptionsvorgängen kommt, welche Einflüsse auf den lokalen pH Wert haben und somit die Knochenheilung beeinträchtigen¹³³. Als Ursache wird die Instabilität des porösen Materials gesehen, die zur Freisetzung von Calcium- und Phosphationen führt. Dieser Hintergrund könnte eine Erklärung für die beobachtete schlechtere Knorpelheilung in unserer Studie sein. Der Grund für den signifikant schlechtesten Wert des Parameters „subchondraler Knochen“ der TCP/HA Keramiken, sowie die Diskrepanz zu den Mikro-CT Messungen, könnte ebenfalls in der mechanischen Instabilität liegen, welche die Keramik während des Schneidens mittels Mikrotom hat zerfallen lassen.

7.6 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse dient der Untersuchung der Abhängigkeit zweier Beobachtungen voneinander. Die Untersuchung der Korrelation zwischen histologischer Auswertung und Mikro-CT Messung zeigten eine positive Korrelation des Parameters „subchondraler Knochen“ des Bewertungssystems nach Sellers mit den Parametern „Knochenmineraldichte“ der subchondralen Knochenplatte, sowie der „Knochenmineraldichte“, dem „Knochenvolumen“ und der „Trabekeldicke“ der subchondralen Spongiosa. Daraus lässt sich schließen, dass die histologische Evaluation des subchondralen Knochens repräsentativ für die tatsächliche Regeneration des Knochens im Defekt ist.

Die Gesamtpunktzahl der histologischen Evaluation mittels Sellers Bewertungssystem korreliert nicht mit den Parametern des Mikro-CT, welche für eine gute Knochenregeneration sprechen. Somit hängt die Heilung des Knorpelgewebes primär nicht mit der Regeneration des subchondralen Knochens zusammen. Unsere Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Orth *et al.*, welche ebenfalls keine signifikante Korrelation der Knorpelreparatur mit der Knochenregeneration aufwiesen¹³⁶.

7.7 Fazit und Ausblick

Die Reparatur osteochondraler Defekte ist nach wie vor eine große Herausforderung. Die aktuelle Studie ist die erste, die Strontium-Hardystonit-Gahnit-Gerüstwerke zur Therapie des subchondralen Knochens im Kontext osteochondraler Defekte untersucht. Im Besonderen wurde der Einfluss monophasischer, ausschließlich subchondral implantierter, Trägermaterialien sowohl auf die Regeneration des subchondralen Knochens, als auch auf die Reparatur des darüberliegenden Knorpelgewebes untersucht.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse lassen sich vier große Erkenntnisse gewinnen:

- 1. Die subchondrale Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit zeigte nach 4 Wochen *in vivo* keine negativen Auswirkungen auf die Gelenkhomöostase.**
- 2. Die Implantation sowohl von Strontium-Hardystonit-Gahnit-, als auch von Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Trägermaterialien, führte zu einer besseren Knochenregeneration als in Leerdefekten.**
- 3. Strontium-Hardystonit-Gahnit-Gerüstwerke erlaubten eine bessere Rekonstruktion des subchondralen Knochens als Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit Gerüstwerke.**
- 4. Die Knorpelreparatur war sowohl nach Implantation von Strontium-Hardystonit-Gahnit als auch in Leerdefekten verbessert im Vergleich mit Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit-Trägermaterialien. Eine verbesserte Regeneration des subchondralen Knochens korreliert in diesem Modell nicht mit einer besseren Knorpelreparatur.**

Um die Auswirkung auf das Kniegelenk und den Organismus besser beurteilen zu können, sind weitergehende Studien nötig. Unabdingbar sind besonders Langzeitstudien, da die Heilung des Knochens zeitlich versetzt zum Knorpel verläuft¹³⁶ und somit die Entwicklung der osteochondralen Einheit im Laufe der Zeit beobachtet werden muss. So wurde in diversen Studien beobachtet, dass sich eine initial gute Knorpelheilung im Laufe der Zeit verschlechterte^{137,138}. Hierzu eignen sich besonders translationale Großtiermodelle¹⁰⁸, wie Schafe oder Ziegen. Außerdem muss die Resorption des Strontium-Hardystonit-Gahnit Materials im Organismus untersucht werden, da dazu noch keine Langzeitergebnisse vorliegen, sowie biomechanische Analysen durchgeführt werden.

Die Kombination des Strontium-Hardystonit-Gahnit Materials mit Komponenten zur Knorpelregeneration ist ebenfalls eine unverzichtbare Aufgabe für zukünftige Studien. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Knorpelheilung durch Nutzung von Strontium-Hardystonit-Gahnit Keramiken, etwa gleichwertig mit derer leer belassener Defekte war. Chondrozyten⁶⁶, Stammzellen¹³⁹ und Wachstumsfaktoren¹³¹, kombiniert mit diversen Biomaterialien haben schon zu signifikant besseren Knorpelreparaturen geführt, sodass deren Kombination und Interaktion mit Strontium-Hardystonit-Gahnit untersucht werden sollte.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Berücksichtigung der Regeneration des subchondralen Knochens im Kontext der osteochondralen Reparatur ein wichtiger Baustein für den Erfolg darstellt. Strontium-Hardystonit-Gahnit ist dabei eine vielversprechende Alternative zu den bereits etablierten Biomaterialien wie Tricalciumphosphat. Weitere Forschungen am Tier, sowie schließlich am Menschen sind nötig, um die Eignung der Materialien zur besseren Regeneration osteochondraler Defekte zu beurteilen.

8. Literaturverzeichnis

1. Cook JL, Hung CT, Kuroki K, Stoker AM, Cook CR, Pfeiffer FM, Sherman SL, Stannard JP. Animal models of cartilage repair. *Bone Joint Res.* 2014;3(4):89-94.
2. Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(12):1824-1833.
3. O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(12):1795-1812.
4. Chiang H, Jiang C-C. Repair of articular cartilage defects: Review and perspectives. *J Formos Med Assoc.* 2009;108(2):87-101.
5. Hunziker EB. The elusive path to cartilage regeneration. *Adv Mater.* 2009;21(32-33):3419-3424.
6. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, Lafont J, Denoix J-M, Audigié F, Mallein-Gerin F, Legendre F, Galera P. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta.* March 2014.
7. Sutherland AJ, Beck EC, Dennis SC, Converse GL, Hopkins R a., Berklund CJ, Detamore MS. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering. *PLoS One.* 2015;10(5):e0121966.
8. Madry H, Pape D. Autologe Chondrozytentransplantation. *Der Orthopäde.* 2008;37(8):756-763.
9. Simon TM, Aberman HM. Cartilage regeneration and repair testing in a surrogate large animal model. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):65-79.
10. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A(1):53-64.
11. Steinmetz NJ, Aisenbrey E a., Westbrook KK, Qi HJ, Bryant SJ. Mechanical loading regulates human MSC differentiation in a multi-layer hydrogel for osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater.* 2015;21:142-153.
12. Sakata R, Iwakura T, Reddi AH. Articular cartilage regeneration: Challenges and opportunities. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(5):461-473.
13. Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giavaresi G, Francioli S, Martin I, Pressato D, Arcangeli E, Quarto R, Sandri M, Marcacci M. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res.* 2010;28:116-124.

14. Berninger MT, Wexel G, Rummeny EJ, Imhoff AB, Anton M, Henning TD, Vogt S. Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee Joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *J Vis Exp*. 2013.
15. Wang Y, Yuan X, Wang A, Peng J, Lu S. Treatment strategy of osteochondral defects of knee joint. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2014;28(1):113-118.
16. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E. The subchondral bone in articular cartilage repair: Current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):434-447.
17. Algul D, Sipahi H, Aydin A, Kelleci F, Ozdatli S, Yener FG. Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate–chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue. *Int J Biol Macromol*. 2015:1-7.
18. Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop Relat Res*. 82:253-262.
19. 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. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2003;19:182-187.
20. Dresing I, Zeiter S, Auer J, Alini M, Eglin D. Evaluation of a press-fit osteochondral poly(ester-urethane) scaffold in a rabbit defect model. *J Mater Sci Mater Med*. March 2014.
21. Johnson B, Lever C, Roberts S, Richardson J, McCarthy H, Harrison P, Laing P, Makwana N. Cell cultured chondrocyte implantation and scaffold techniques for osteochondral talar lesions. *Foot Ankle Clin*. 2013;18(1):135-150.
22. Vannini F, Filardo G, Kon E, Roffi A, Marcacci M, Giannini S. Scaffolds for cartilage repair of the ankle joint: The impact on surgical practice. *Foot Ankle Surg*. 2013;19(1):2-8.
23. Martin I, Miot S, Barbero A, Jakob M, Wendt D. Osteochondral tissue engineering. *J Biomech*. 2007;40(4):750-765.
24. Welsch U (Anatomische AL-M-UM. *Welsch, Lehrbuch Histologie.*; 2005:127ff.
25. Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lect*. 1983;32:349-370.
26. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(8):971-979.
27. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl:106-110.
28. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnič M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(3):423-435.

29. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465-480.
30. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):47-51.
31. Hoemann CD, Lafantaisie-Favreau C-H, Lascau-Coman V, Chen G, Guzmán-Morales J. The cartilage-bone interface. *J Knee Surg.* 2012;25(2):85-97.
32. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):419-433.
33. Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med.* 17(4):505-513.
34. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(4):532-553.
35. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: Cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78(5):721-733.
36. Madry H, Grün UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: Medical and surgical treatment options. *Deutsches Ärzteblatt Int.* 2011;108(40):669-677.
37. Steinmeyer J, Konttinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):168-211.
38. Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. Biologische Knorpelrekonstruktion im Kniegelenk. *Der Unfallchirurg.* 2006;109(7):563-574; 575-576.
39. Jordan KM. EULAR Recommendations 2003: An evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2003;62(12):1145-1155.
40. Zhang W, Doherty M, Arden N, Bannwarth B, Bijlsma J, Gunther K-P, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Jordan K, Kaklamanis P, Leeb B, Lequesne M, Lohmander S, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton a, Punzi L, Swoboda B, Varatojo R, Verbruggen G, Zimmermann-Gorska I, Dougados M. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2005;64(5):669-681.
41. Kon E, Filardo G, Drobic M, Madry H, Jelic M, van Dijk N, Della Villa S. Non-surgical management of early knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(3):436-449.
42. Salk RS, Chang TJ, D'Costa WF, Soomekh DJ, Grogan KA. Sodium hyaluronate in the treatment of osteoarthritis of the ankle: A controlled, randomized, double-blind pilot study. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(2):295-302.

43. Fujisawa Y, Masuhara K, Shiomi S. The effect of high tibial osteotomy on osteoarthritis of the knee. An arthroscopic study of 54 knee joints. *Orthop Clin North Am.* 1979;10(3):585-608.
44. Kanamiya T, Naito M, Hara M, Yoshimura I. The influences of biomechanical factors on cartilage regeneration after high tibial osteotomy for knees with medial compartment osteoarthritis: Clinical and arthroscopic observations. *Arthroscopy.* 2002;18(7):725-729.
45. Wakabayashi S, Akizuki S, Takizawa T, Yasukawa Y. A comparison of the healing potential of fibrillated cartilage versus eburnated bone in osteoarthritic knees after high tibial osteotomy: An arthroscopic study with 1-year follow-up. *Arthroscopy.* 2002;18(3):272-278.
46. Lützner J, Kasten P, Günther K-P, Kirschner S. Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(6):309-316.
47. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:362-369.
48. Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. Marrow stimulation techniques. *Injury.* 2008;39 Suppl 1:26-31.
49. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status. *Arthroscopy.* 1986;2(1):54-69.
50. Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl:109-115.
51. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(4):571-578.
52. Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: A review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1259-1271.
53. Niemeyer P, Lenz P, Kreuz PC, Salzmänn GM, Südkamp NP, Schmal H, Steinwachs M. Chondrocyte-seeded type I/III collagen membrane for autologous chondrocyte transplantation: Prospective 2-year results in patients with cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy.* 2010;26(8):1074-1082.
54. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(14):889-895.
55. Safran MR, Seiber K. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2010;18(5):259-266.

56. Paul J, Sagstetter A, Kriner M, Imhoff AB, Spang J, Hinterwimmer S. Donor-site morbidity after osteochondral autologous transplantation for lesions of the talus. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(7):1683-1688.
57. Hangody L, Dobos J, Baló E, Pánics G, Hangody LR, Berkes I. Clinical experiences with autologous osteochondral mosaicplasty in an athletic population: A 17-year prospective multicenter study. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1125-1133.
58. Clair BL, Johnson AR, Howard T. Cartilage repair: Current and emerging options in treatment. *Foot Ankle Spec.* 2009;2(4):179-188.
59. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng.* 2009;37(1-2):1-57.
60. Safran MR, Kim H, Zaffagnini S. The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16(6):306-311.
61. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(24):2529-2543.
62. Castro NJ, Hacking SA, Zhang LG. Recent progress in interfacial tissue engineering approaches for osteochondral defects. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(8):1628-1640.
63. Wang X, Grogan SP, Rieser F, Winkelmann V, Maquet V, Berge M La, Mainil-Varlet P. Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: An in vitro study. *Biomaterials.* 2004;25(17):3681-3688.
64. Tuli R, Nandi S, Li W-J, Tuli S, Huang X, Manner PA, Laquerriere P, Nöth U, Hall DJ, Tuan RS. Human mesenchymal progenitor cell-based tissue engineering of a single-unit osteochondral construct. *Tissue Eng.* 10(7-8):1169-1179.
65. Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials.* 2000;21(24):2599-2606.
66. Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A, Bergin I, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum.* 2002;46(9):2524-2534.
67. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2001;7(4):363-371.
68. Schek RM, Taboas JM, Segvich SJ, Hollister SJ, Krebsbach PH. Engineered osteochondral grafts using biphasic composite solid free-form fabricated scaffolds. *Tissue Eng.* 10(9-10):1376-1385.
69. Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials.* 2002;23(24):4739-4751.

70. Cao T, Ho K-H, Teoh S-H. Scaffold design and in vitro study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling. *Tissue Eng.* 2003;9 Suppl 1:103-112.
71. Alhadlaq A, Elisseeff JH, Hong L, Williams CG, Caplan AI, Sharma B, Kopher RA, Tomkoria S, Lennon DP, Lopez A, Mao JJ. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(7):911-923.
72. Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Okazaki K, Tsuta K, Shikinami Y, Uchida A. Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2005;26(20):4301-4308.
73. Getgood a, Brooks R, Fortier L, Rushton N. Articular cartilage tissue engineering: Today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(5):565-576.
74. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine : Classic options , novel strategies , and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014;9(1):1-27.
75. Wu S-C, Chang J-K, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment. *Biomaterials.* 2010;31(4):631-640.
76. Ameer GA, Mahmood TA, Langer R. A biodegradable composite scaffold for cell transplantation. *J Orthop Res.* 2002;20(1):16-19.
77. Huang Q, Goh JCH, Hutmacher DW, Lee EH. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng.* 2002;8(3):469-482.
78. Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials.* 2000;21(6):571-580.
79. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today.* 2009;4(1):66-80.
80. Li W-JW-J, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KGKG, Hall DJDJ, Tuan RSRS. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2005;26(6):599-609.
81. Li W-J, Jiang YJ, Tuan RS. Cell-nanofiber-based cartilage tissue engineering using improved cell seeding, growth factor, and bioreactor technologies. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(5):639-648.
82. Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K, Araki N, Seto M, Yoshikawa H, Uchida A. Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(5):719-725.

83. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(1):110-117.
84. Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;(179):246-252.
85. Roohani-Esfahani SI, Dunstan CR, Li JJ, Lu Z, Davies B, Pearce S, Field J, Williams R, Zreiqat H. Unique microstructural design of ceramic scaffolds for bone regeneration under load. *Acta Biomater.* 2013;9(6):7014-7024.
86. Zreiqat H, Ramaswamy Y, Wu C, Paschalidis A, Lu Z, James B, Birke O, McDonald M, Little D, Dunstan CR. The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31:3175-3184.
87. Ramaswamy Y, Wu C, Zhou H, Zreiqat H. Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca-Si-based ceramics. *Acta Biomater.* 2008;4:1487-1497.
88. Wu C, Ramaswamy Y, Kwik D, Zreiqat H. The effect of strontium incorporation into CaSiO₃ ceramics on their physical and biological properties. *Biomaterials.* 2007;28:3171-3181.
89. Giusti A, Bianchi G. Treatment of primary osteoporosis in men. *Clin Interv Aging.* 2015;10:105-115.
90. Bernabei R, Martone AM, Ortolani E, Landi F, Marzetti E. Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: A brief review. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2014;11(3):201-207.
91. Gelber AC. Conventional medical therapy for osteoarthritis: Current state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol.* March 2015.
92. Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Lories RJ, Abramson S, Spector T, Pastoureau P, Christiansen C, Attur M, Henriksen K, Goldring SR, Kraus V. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: Opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? *Ann Rheum Dis.* 2014;73(2):336-348.
93. Karaaslan F, Mutlu M, Mermerkaya MU, Karaoğlu S, Saçmacı Ş, Kartal Ş. Comparison of bone tissue trace-element concentrations and mineral density in osteoporotic femoral neck fractures and osteoarthritis. *Clin Interv Aging.* 2014;9:1375-1382.
94. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res.* 2005;23(2):425-432.
95. Athanasiou KA, Darling EM, Hu JC. Articular cartilage tissue engineering. *Synth Lect Tissue Eng.* 2009;1(1):1-182.
96. Solchaga LA, Gao J, Dennis JE, Awadallah A, Lundberg M, Caplan AI, Goldberg VM. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.* 2002;8(2):333-347.

97. Holland TA, Bodde EWH, Cuijpers VMJI, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA. Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(2):187-197.
98. Goebel L, Orth P, Müller A, Zurakowski D, Bückler A, Cucchiari M, Pape D, Madry H. Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T--comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(9):1046-1055.
99. Van den Borne MPJ, Raijmakers NJH, Vanlauwe J, Victor J, de Jong SN, Bellemans J, Saris DBF. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in autologous chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(12):1397-1402.
100. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79(10):1452-1463.
101. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579-592.
102. Lavery S., Girard C.A., Williams J.M., Hunziker E.B. Pritzker K.P.H. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(3):53-65.
103. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(2):276-288.
104. Brunk CF, Jones KC, James TW. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem*. 1979;92(2):497-500.
105. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett a J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 1986;883(2):173-177.
106. Müller G, Hanschke M. Quantitative and qualitative analyses of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue. *Connect Tissue Res*. 1996;33(4):243-248.
107. Mallia AK, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Olson BJ, Klenk DC, Company PC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. 1985;85:76-85.
108. Bernstein A, Niemeyer P, Salzmann G, Südkamp NP, Hube R, Klehm J, Menzel M, Von Eisenhart-Rothe R, Bohner M, Görz L, Mayr HO. Microporous calcium phosphate ceramics as tissue engineering scaffolds for the repair of osteochondral defects: Histological results. *Acta Biomater*. 2013;9:7490-7505.
109. Ahn J-H, Lee T-H, Oh J-S, Kim S-Y, Kim H-J, Park I-K, Choi B-S, Im G-I. Novel hyaluronate-atelocollagen/beta-TCP-hydroxyapatite biphasic scaffold for the repair of osteochondral defects in rabbits. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2595-2604.

110. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge. *Tissue Eng.* 2002;8:827-837.
111. Boopalan PRJVC, Arumugam S, Livingston A, Mohanty M, Chittaranjan S. Pulsed electromagnetic field therapy results in healing of full thickness articular cartilage defect. *Int Orthop.* 2011;35:143-148.
112. Ho STB, Hutmacher DW, Ekaputra AK, Hitendra D, Hui JH. The evaluation of a biphasic osteochondral implant coupled with an electrospun membrane in a large animal model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:1123-1141.
113. Jiang CC, Chiang H, Liao CJ, Lin YJ, Kuo TF, Shieh CS, Huang YY, Tuan RS. Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *J Orthop Res.* 2007;25:1277-1290.
114. Im G-I, Ahn J-H, Kim S-Y, Choi B-S, Lee S-W. A hyaluronate-atelocollagen/beta-tricalcium phosphate-hydroxyapatite biphasic scaffold for the repair of osteochondral defects: A porcine study. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:1189-1200.
115. Marquass B, Somerson JS, Hepp P, Aigner T, Schwan S, Bader A, Josten C, Zscharnack M, Schulz RM. A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects. *J Orthop Res.* 2010;28:1586-1599.
116. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, Josten C, Bader A, Marquass B. Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sports Med.* 2010;38:1857-1869.
117. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G, Martin I, Marcacci M. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:220.
118. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89:672-685.
119. Strauss EJ, Goodrich LR, Chen C-T, Hidaka C, Nixon AJ. Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med.* 2005;33:1647-1653.
120. Kaul G, Cucchiari M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 2006;8:100-111.
121. Orth P, Kaul G, Cucchiari M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Madry H. Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2011;19:2119-2130.

122. Christensen BB, Foldager CB, Jensen J, Jensen NC, Lind M. Poor osteochondral repair by a biomimetic collagen scaffold: 1- to 3-year clinical and radiological follow-up. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2015;1-8.
123. Cahill B. Osteochondritis dissecans of the knee: Treatment of juvenile and adult forms. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3:237-247.
124. Detterline AJ, Goldstein JL, Rue J-PH, Bach BR. Evaluation and treatment of osteochondritis dissecans lesions of the knee. *J Knee Surg.* 2008;21:106-115.
125. Barou O, Valentin D, Vico L, Tirode C, Barbier A, Alexandre C, Lafage-Proust M-H. High-resolution three-dimensional micro-computed tomography detects bone loss and changes in trabecular architecture early: Comparison with DEXA and bone histomorphometry in a rat model of disuse osteoporosis. *Invest Radiol.* 2002;37:40-46.
126. Müller R, Hahn M, Vogel M, Delling G, Rügsegger P. Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: Comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. *Bone.* 1996;18:215-220.
127. Orth P, Peifer C, Goebel L, Cucchiari M, Madry H. Comprehensive analysis of translational osteochondral repair: Focus on the histological assessment. *Prog Histochem Cytochem.* 2015;50(3):19-36.
128. Orth P, Cucchiari M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn DM, Madry H. Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthr Cartil.* 2013;21:614-624.
129. Burr DB, Radin EL. Microfractures and microcracks in subchondral bone: Are they relevant to osteoarthrosis? *Rheum Dis Clin North Am.* 2003;29:675-685.
130. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res.* 1986:34-40.
131. Gotterbarm T, Richter W, Jung M, Berardi Vilei S, Mainil-Varlet P, Yamashita T, Breusch SJ. An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. *Biomaterials.* 2006;27:3387-3395.
132. Tanaka T, Komaki H, Chazono M, Fujii K. Use of a biphasic graft constructed with chondrocytes overlying a beta-tricalcium phosphate block in the treatment of rabbit osteochondral defects. *Tissue Eng.* 11:331-339.
133. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J.* 7:475-490.
134. Strauss EJ, Goodrich LR, Chen C-T, Hidaka C, Nixon AJ. Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med.* 2005;33:1647-1653.

135. Kaul G, Cucchiarini M, Remberger K, Kohn D, Madry H. Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: A biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2012;20:2315-2324.
136. Orth P, Cucchiarini M, Kaul G, Ong MF, Gräber S, Kohn DM, Madry H. Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20:1161-1169.
137. Solheim E, Hegna J, Oyen J, Austgulen OK, Harlem T, Strand T. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee: Results at 5 to 9 years. *Knee.* 2010;17:84-87.
138. Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JCH, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials.* 2006;27:1071-1080.
139. Pei M, He F, Boyce BM, Kish VL. Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs. *Osteoarthr Cartil.* 2009;17:714-722.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die mich bei der Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Henning Madry, für die exzellente Betreuung danken. Er hat mich zu jeder Zeit mit großem Engagement unterstützt, mit seiner fachlichen Kompetenz gefördert und den erfolgreichen Abschluss der Arbeit so erst ermöglicht.

PD Dr. med. Patrick Orth, der sich stets für jedes noch so kleine Problem Zeit genommen - und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Die gemeinsame Arbeit wird mir in sehr guter Erinnerung bleiben.

Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiarini für die Hilfe bei der Durchführung der biochemischen Experimente.

Allen Mitarbeitern des Labors, besonders Gertrud Schmitt, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie die permanente Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen.

Prof. Dr. Hala Zreiqat (Sydney, Australien) für die Bereitstellung der Trägermaterialien.

Meiner Freundin Marilen Hartz, die mich immer unterstützt hat und wenn immer es nötig war, neu motiviert hat.

Meinen ehemaligen Kommilitonen, besonders Joachim Löffler und Gregor Schleider, für den regen Austausch bei diversen Bierchen, und dafür, dass sie mir stets mit gutem Beispiel vorangegangen sind.

Und zuletzt meinen Eltern, Gabriele Kowol-Lindner und Georg Lindner, die mir mein Studium, sowie die Durchführung der Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben, danke für alles.

