

Aus der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
(Prof. Dr. med. K. M. Stürmer)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Therapie osteochondraler Defekte des Kniegelenks
unter Verwendung des Knorpel-Knochen-
Ersatzmaterials (TruFit®) in Kombination mit einer
einzeitigen autologen Knorpelzelltransplantation im
Langzeittiersversuch

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Milosch Michalak
aus
Posen

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

1. Berichterstatter: i.V. PD Dr. Martin Wachowski

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Nicolai Miosge

3. Berichterstatterin: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Anatomische Grundlagen.....	1
1.2 Pathophysiologie von Knorpelschäden.....	2
1.3 Arthrose.....	3
1.4 Klassifikation von Knorpelschäden.....	4
1.5 Therapie von Knorpelschäden.....	7
1.6 Ziel der Arbeit.....	12
1.6.1 TruFit®-Implantate.....	12
1.6.2 Single-step ACI.....	13
1.6.3 Platelet-rich-plasma (PRP).....	14
1.7 Vorteile gegenüber bestehenden Therapien.....	14
1.8 Fragestellung.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Versuchsablauf.....	17
2.2 Operation.....	17
2.2.1 Versuchsgruppe 1: Leerdefekt.....	18
2.2.2 Versuchsgruppe 2: TruFit®-Implantate.....	19
2.2.3 Versuchsgruppe 3: TruFit®-Implantate und PRP.....	20
2.2.4 Versuchsgruppe 4: TruFit®-Implantate, PRP und Knorpelzellen.....	20
2.2.5 Zusammenfassung der Versuchsgruppen.....	21
2.3 Polychrome Sequenzmarkierung.....	21
2.4 Präparatgewinnung.....	22
2.5 Makroskopische Aufnahmen.....	23
2.6 Präparat-Aufbereitung.....	23

2.7	Aufbereitung für die Mikroradiographie.....	24
2.8	Histologische Aufbereitung.....	25
2.8.1	Färbung mit Toluidinblau-O.....	25
2.8.2	Färbung mit Safranin-O.....	26
2.9	Auswertungen	27
2.9.1	Makroskopische Auswertung	27
2.9.2	Mikroradiographie	28
2.9.2.1	Datengewinnung	28
2.9.3	Histologische Auswertung.....	31
2.9.4	Auswertung der fluoreszenzmarkierten Präparate	34
2.9.5	Statistik	34
3.	Ergebnisse.....	35
3.1	Makroskopische Aufnahmen	35
3.1.1	Versuchsgruppe: Leerdefekt.....	37
3.1.2	Versuchsgruppe: TruFit®-Plug.....	38
3.1.3	Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP	39
3.1.4	Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP + Zellen	40
3.2	Mikroradiographien.....	41
3.2.1	Knochenfläche	41
3.2.2	Trabekuläre Dicke	42
3.2.3	Anzahl trabekulärer Verbindungen.....	43
3.2.4	Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur	45
3.2.5	Zusammenfassung der Mikroradiographie	46
3.2.6	Mikroradiographische Aufnahmen	47
3.3	Scores	48
3.3.1	Wakitani-Score.....	49
3.3.2	O'Driscoll-Score	50

3.4 Fluoreszenzmarkierung	50
3.4.1 Versuchsgruppe: Leerdefekt	53
3.4.2 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug	55
3.4.3 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP	57
3.4.4 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP + Zellen	59
4. Diskussion.....	61
4.1 Methodik.....	61
4.1.1 Tiermodell	61
4.1.2 Implantat	62
4.1.3 PRP.....	64
4.1.4 Einzeitige Knorpeltransplantation.....	66
4.2 Analyse der Ergebnisse.....	69
4.2.1 Ergebnisse der Makroskopie.....	69
4.2.2 Ergebnisse der Mikroradiographie	69
4.2.3 Ergebnisse der Scores	71
4.2.4 Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung	73
4.3 Schlussfolgerungen	74
4.4 Ausblick	74
5. Zusammenfassung.....	76
6. Anhang.....	77
6.1 Zusammenfassungen der Ergebnisse der Mikroradiographie	77
6.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Scores.....	78
6.3 Bewertungskategorien der Scores	78
7. Tabellenverzeichnis.....	82
8. Abbildungsverzeichnis.....	83
9. Literaturverzeichnis.....	84

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACI	autologe Chondrozyten-Implantation
ACT	autologe Chondrozyten-Transplantation
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bidest.	bidestilliert
ECGF	<i>epithelial cell growth factor</i>
h	Stunde
ICRS	International Cartilage Research Society
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
KG	Körpergewicht
konz.	konzentriert
kV	Kilovolt
LFK	laterale Femurkondyle
Lsg.	Lösung
mA	Milli-Ampere
MACI	Matrix-assoziierte Chondrozyten-Implantation
Metachr.	metachromatisch
mm ²	Quadratmillimeter
ms	Millisekunden
N./mm ²	Anzahl Trabekelverbindungen pro Quadratmillimeter
NaCl	Natriumchlorid
OATS	osteochondrales autologes Transplantationssystem
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDLG	Poly-(D,L-Laktid)-Glykolid
PGA	<i>poly glycolid acid</i>
PLGA	<i>poly-(D,L-lactid)-glycolid acid</i>
PRP	<i>platelet- rich-plasma</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>

Tr. Ar. Zent	trabekuläre Fläche zentral
Tr. Ar. Peri	trabekuläre Fläche peripher
Tr. Nd. Zent	Trabekelverbindungen zentral
Tr. Nd. Peri	Trabekelverbindungen peripher
Tr. Wi. Zent	trabekuläre Dicke zentral
Tr. Wi. Peri	trabekuläre Dicke peripher
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Defekte im Gelenkknorpel stellen heutzutage ein weitreichendes Problem in der medizinischen Versorgung dar. Im Vordergrund stehen hier vor allem Gelenke, die dauerhaft unter Belastung stehen und zusätzlich traumatischen Ereignissen und degenerativen Veränderungen ausgesetzt sind. Diese Faktoren treffen insbesondere auf das Kniegelenk zu. Da einmal entstandene Gelenkknorpeldefekte eher eine Tendenz zur Progredienz als zur Regeneration aufweisen, kommt es im Verlauf der Knorpelalterung häufig zur Ausbildung einer Kniegelenksarthrose als Endstadium des Degenerationsprozesses (Mankin 1982; Radin und Burr 1984; Buckwalter und Mankin 1998a; Alford und Cole 2005; Fritz et al. 2006). Aus diesem Grund ist die Therapie bereits kleiner osteochondraler Defekte von entscheidender Bedeutung, um eine weitere Degeneration des Gelenkknorpels zu unterbinden.

Durch die steigende Lebenserwartung und der damit verbundenen Alterung unserer Gesellschaft wird das Problem der Arthrose in Zukunft noch weiter an Bedeutung gewinnen (Woolf und Pfleger 2003). Schon heute ist Arthrose die weltweit häufigste Gelenkerkrankung (Sulzbacher 2000; Swoboda 2001). Laut Schätzungen der WHO von 2003 wird sich die Zahl der Menschen mit Knochen- und Gelenkerkrankungen in den nächsten 20 Jahren verdoppeln. Den größten Teil dieser Krankheitsgruppe stellt die Arthrose dar. Aktuell leiden in der Gruppe der über 65-Jährigen gut die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer an einer Arthrose (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2011).

Um dieser enormen Krankheitslast gerecht zu werden, rief die WHO die <<Bone and Joint Decade 2000-2010>> aus, um die Forschungs- und Versorgungssituation zu verbessern (Woolf 2000).

Auch die sozioökonomischen Kosten stellen für die Gesellschaft eine erhebliche Herausforderung dar. Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes betragen die Krankheitskosten für Arthrose von 2002-2008 jährlich etwa 90 Euro pro Bundesbürger (Zum Vergleich: Diabetes mellitus etwa 70 Euro; Hypertonie etwa 110 Euro; www.gbe-bund.de).

1.1 Anatomische Grundlagen

Das Kniegelenk ist das größte Gelenk des menschlichen Körpers und hat bedeutenden Einfluss auf ein optimales Gehvermögen. Die knöchernen Gelenkpartner sind der Oberschenkelknochen (Femur), das Schienbein (Tibia) und die Kniescheibe

(Patella). Zur Stabilisierung wird das Gelenk durch zahlreiche Strukturen wie Seitenbänder, Kreuzbänder und Menisken verstärkt.

Das eigentliche Kniegelenk bilden dabei der Femur und die Tibia. Die Kontaktflächen dieser beiden Knochen sind von einer glatten Knorpelschicht, dem sogenannten hyalinen Knorpel, überzogen. Dieser hyaline Knorpel ist im Gegensatz zu den anderen beiden Knorpelarten (elastischer Knorpel und Faserknorpel) optimal auf den Einsatz als Gelenkknorpel spezialisiert. Seine Aufgabe besteht darin, ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkpartner zu gewährleisten, für eine gewisse Stoßdämpfung zu sorgen und eine gute Kraftübertragung zwischen den Skelettelementen zu ermöglichen (Rudert und Wirth 1998). Um diese Aufgaben erfüllen zu können, ist hyaliner Knorpel unter anderem reich an Kollagen-II und Aggrecan. Kollagen-II ist dabei für die mechanische Stabilität verantwortlich und Aggrecan sorgt als Wasserbinder für die erforderliche Viskosität.

1.2 Pathophysiologie von Knorpelschäden

Häufig kommt es zur Schädigung des Gelenkknorpels und zu damit verbundenen Problemen. Entstehung und Fortschreiten von Defekten im Gelenkknorpel sind bis heute nicht vollständig bekannt, zumal zahlreiche Faktoren an diesen Prozessen beteiligt sind. Neben degenerativen Alterungsprozessen führen häufig auch traumatische Ereignisse zu Knorpelschäden (Cotta 1977).

Grundsätzlich kann man sagen, dass ein Missverhältnis zwischen der Resistenz des Knorpels und seiner mechanischen Beanspruchung zu einer Schädigung des Gelenkknorpels führt (Sulzbacher 2000). Auf molekularbiologischer Ebene kommt es zu einer Differenz von Katabolie und Anabolie zugunsten der Abbauvorgänge, in deren Folge der Kollagen-II und Proteoglykangehalt (vor allem Aggrecan) sinkt. Laut Spahn sind dabei vier wesentliche Grundprozesse beteiligt: Reduktion der Syntheseleistung, verstärkter Abbau der Matrixbestandteile, Synthese von atypischen Metaboliten und zelluläre Veränderungen der Chondrozyten bis hin zur Apoptose (Spahn 2006). Die Ätiologie der Knorpelminderwertigkeit kann im Einzelfall meist nicht eindeutig bestimmt werden. Es handelt sich dabei um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem besonders der natürliche Alterungsprozess, Traumata und Fehlbelastungen eine wesentliche Rolle spielen.

Das ursächliche Problem von Knorpelschäden ist bedingt durch die Tatsache, dass Gelenkknorpel nur eine geringe intrinsische Fähigkeit zu Regeneration aufweist und

sich dieser von entstandenen Defekten kaum erholt (Buckwalter und Mankin 1998b). Zwei wesentliche Eigenschaften des hyalinen Knorpels sind hierfür verantwortlich. Zum einen erfolgt die Ernährung des Gelenkknorpels über die Gelenkflüssigkeit, da es in diesem Gewebe keine versorgenden Blutgefäße gibt (Gardner et al. 1994). Diese diffusionsabhängige Nährstoffzufuhr aus der Gelenkflüssigkeit reicht selten aus, um bei entstandenen Defekten des Gelenkknorpels eine suffiziente Regeneration zu gewährleisten (Fritz et al. 2006).

Ein weiterer Faktor, der die Regenerationsfähigkeit von Gewebe beeinflusst, ist die Zelldichte. Je weniger Zellen ein bestimmter Gewebetyp besitzt, desto geringer ist die Heilungsrate dieses Gewebes. Knorpelgewebe besteht zum Großteil aus extrazellulärer Matrix und nur zu etwa 1-3% aus Zellen (Fritz et al. 2006), was die Wiederherstellung des Gelenkknorpels erheblich beschränkt.

Besonders problematisch sind Knorpelläsionen, die ab einem Durchmesser von 3 mm eine sehr schlechte Heilungstendenz aufweisen (Imhoff et al. 1999a). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass solche Defekte sogar fortschreiten und im Verlauf zu Arthrose führen können (Mankin 1982; Radin und Burr 1984; Buckwalter und Mankin 1998a; Alford und Cole 2005; Fritz et al. 2006). Die Grenzen von physiologischer Alterung, chondraler Schädigung und manifester Arthrose sind dabei fließend (Spahn 2006). Langfristig gesehen führen fast alle Knorpelschäden, unabhängig von der Genese, zu einer Arthrose. Des Weiteren gibt es Belege, dass selbst therapierte Knorpelschäden, die zur Bildung von Faserknorpel führen, im Laufe der Zeit degenerieren und somit ebenfalls zur Arthrosebildung neigen (Coletti et al. 1972; Harris et al. 2010). Vordergründig ist dementsprechend das Ziel, bei der Therapie von Knorpeldefekten möglichst hochwertigen Regenerationsknorpel zu erzeugen, der die Eigenschaften von hyalinem Knorpel besitzt.

1.3 Arthrose

Die Arthrose (Osteoarthrose; Arthrosis deformans; im angloamerikanischen Sprachraum Osteoarthritis) ist per Definition ein Gelenkverschleiß, der über das durch die normale Alterung bedingte Maß hinausgeht (www.gbe-bund.de). Sie wird in eine primäre Form, bei der das Grundleiden oder die auslösende Krankheit nicht nachgewiesen sind, und in eine sekundäre Form unterteilt, bei der ein bekanntes Grundleiden vorliegt.

Risikofaktoren sind ein hohes Alter, weibliches Geschlecht, Übergewicht, genetische Disposition, Gelenkfehlstellungen, eine übermäßige Belastung und Krankheiten wie zum Beispiel die Chondrokalzinose oder Osteoporose (Rehart und Lehnert 2008).

Die Symptome der Patienten sind individuell sehr unterschiedlich. Anfangs kommt es zum Spannungsgefühl und Steifigkeit in den Gelenken, später dann zu Einlauf-, Belastungs- und Dauerschmerz. Doch lässt sich allein anhand dieser Symptome nicht auf den Schweregrad der Arthrose schließen. Denn schon kleine isolierte Läsionen im Gelenkknorpel können Beschwerden hervorrufen, die mit den Beschwerden von Patienten vergleichbar sind, bei denen eine Indikation für ein künstliches Kniegelenk gestellt wurde (Heir et al. 2010). Auf der anderen Seite gibt es Patienten, die röntgenologisch die Kriterien für eine Arthrose erfüllen, allerdings wenig Symptome beklagen.

1.4 Klassifikation von Knorpelschäden

Aus den zuvor genannten Gründen wurden zahlreiche Therapien entwickelt, um Knorpeldefekte zu therapieren (Burkart und Imhoff 1999; Marlovits und Vecsei 2000b; Kalson et al. 2010). Da die Wahl der Therapie vom Ausprägungsgrad des Knorpelschadens abhängt, wurden verschiedene Klassifikationssysteme zur Beurteilung der Knorpelschädigung eingeführt.

Grundsätzlich sollte bei der Einteilung von Knorpelverletzungen eine Beurteilung der Größe, der Tiefe, der Lokalisation und des Zustandes der korrespondierenden Gelenkoberfläche mit erfolgen (Marlovits und Vecsei 2000a). Des Weiteren sollte bei Gelenkknorpeldefekten eine Differenzierung zwischen reinen chondralen und osteochondralen Defekten stattfinden, wobei letztere die subchondrale Lamelle bzw. den subchondralen Knochen durchbrechen. Bewährt hat sich hier zunächst die international anerkannte Outerbridge-Klassifikation (Outerbridge 1961) zur arthroskopischen Einteilung von Knorpeldefekten, siehe hierzu Tabelle 1 (Bös und Ellermann 2003):

Tabelle 1: Outerbridge-Klassifikation

Grad	Befund
0	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter weißer Oberfläche
1	Glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation, aber Erweichung der Oberfläche
2	Oberfläche aufgefasert mit Einrissen und deutlicher Fibrillation
3	Tiefe Fissuren, Ulcus bzw. Krater mit instabilen oder unterminierten Rändern, subchondraler Knochen noch nicht erreicht
4	Vollschicht-Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen

Die 4-stufige Outerbridge-Klassifikation wurde 2003 von der International Cartilage Research Society erweitert und als *ICRS Hyaline Cartilage Lesion Classification System* veröffentlicht. Dieses System kann heutzutage als weltweite Standardklassifikation angesehen werden (Brittberg und Winalski 2003). Siehe hierzu Abbildung 1: ICRS-Klassifikation (www.cartilage.org).

ICRS Grad 1



A

B

ICRS Grad 2



C

ICRS Grad 3



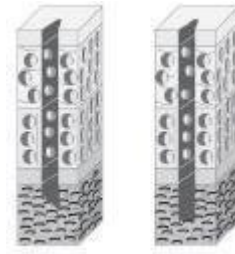
D

E

F

G

ICRS Grad 4



H

I

Abbildung 1: ICRS-Klassifikation; Grad 1: Oberflächliche Knorpelerweichung (A) und/oder Fissuren und Risse (B); Grad 2: Knorpelläsionen bis zu 50% der Knorpeltiefe (C); Grad 3: Knorpeldefekte über 50% der Knorpeltiefe (D), bis zur kalzifizierten Schicht (E), bis zum subchondralen Knochen, aber nicht durch diesen hindurch reichend (F), Bläschenbildung auf der Knorpeloberfläche (G); Grad 4: Osteochondrale Defekte (H und I); mit freundlicher Genehmigung des ICRS Executive Office.

Nicht-invasive Möglichkeiten zur Abschätzung des Schweregrades sind die Röntgen- und die MRT-Untersuchung. So geht eine Arthrose mit folgenden Veränderungen auf dem Röntgenbild einher: Gelenkspaltverschmälerung, Inkongruenz der Gelenkflächen, subchondrale Sklerosierungen, Zystenbildung und Randwülste (Osteophyten). Entsprechend dieser radiologischen Merkmale wird der Schweregrad der Arthrose nach Kellgren und Lawrence in vier Stadien eingeteilt (Kessler et al. 1998). Die MRT-Untersuchung dient zur weiteren, präziseren Beschreibung von Lokalisation, Tiefe und Größe des Defekts und ist vor allem für die Operationsplanung bedeutend. Die Klassifikation des Knorpelschadens erfolgt dabei analog der

arthroskopischen Einteilung in 5 Grade (Frentz und Kirchner 2003; Spahn et al. 2007).

1.5 Therapie von Knorpelschäden

Von großer Bedeutung für die Therapie ist neben der Größe des Defekts die Frage, ob es sich um einen reinen Knorpeldefekt handelt oder ob die subchondrale Schicht bereits mitbeschädigt ist und somit ein osteochondraler Defekt vorliegt (Outerbridge Grad 4; ICRS Grad 4). Die subchondrale Schicht ist die oberste Knochenschicht unter dem Knorpel und bildet gemeinsam mit dem Knorpel eine Funktionseinheit. Die subchondrale Knochenlamelle ist dabei für die Formgebung des Gelenks und für die Ausdifferenzierung und Verankerung des neu entstandenen Knorpelgewebes verantwortlich und stellt eine grundlegende Voraussetzung einer erfolgreichen Knorpeltherapie dar (Radin und Rose 1986). Ohne Unterstützung der subchondralen Schicht würde eine Therapie von Knorpeldefekten zumeist scheitern (Gomoll et al. 2010). Unter diesen Gesichtspunkten sollte sowohl eine stadiengerechte Therapie (Braun et al. 2007) als auch eine Therapie, die die Größe des Defekts mit einbezieht, erfolgen (Proffen et al. 2012).

Es wurden bisher zahlreiche Therapien entwickelt, um Knorpeldefekte zu behandeln. Ältere Verfahren sind das Debridement (Magnuson 1946; 1974), die antegrade Anbohrung (Pridie 1959) und die Abrasionsarthroplastik (Johnson 1986; 2001).

Beim Debridement wird zerstörtes Knorpelgewebe entfernt, um den Heilungsprozess zu initiieren. Dieses Verfahren scheint allerdings keine besseren Ergebnisse zu erzielen als eine Placebo-Operation (Moseley et al. 2002).

Die Bohrung nach Pridie ist ein Vorläufer der später entwickelten Mikrofrakturierung. Dabei wird mit einem Bohrer der subchondrale Knochen angebohrt, um Blut und Stammzellen aus dem Knochenmark Zugang zur Gelenkfläche zu ermöglichen und dort eine Knorpelregeneration zu initiieren.

Bei der arthroskopisch durchgeführten Abrasionsarthroplastik wird die oberste Knochenschicht am Gelenk angefräst, was zu Blutungen aus dem intakten Knochen führt. Dabei soll die Stimulation des Knochenmarks zur Bildung von Faserknorpel anregen, der dann die künstlich erzeugten Verletzungen überwächst.

Neuere Verfahren sind die 1985 eingeführte Mikrofrakturierung (Steadman et al. 1999; 2001), die Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern (Bobic 1999; Bruckner et al. 2002; Horas und Schnettler 2002; Frosch et al. 2010) und die erstmals 1994 beschriebene autologe Chondrozyten-Transplantation (Brittberg et al. 1994).

Die Mikrofrakturierung entwickelte sich aus der früheren Pridie-Bohrung (Pridie 1959) und wird arthroskopisch durchgeführt. Es gehört wie die Abrasionsarthroplastik und die Pridie-Bohrung zu den Knochenmark-stimulierenden Therapien. Dabei wird die subchondrale Grenzlamelle perforiert und gleichzeitig werden kleine Mikrofrakturen im subchondralen Knochen erzeugt. Wie bei der Pridie-Bohrung gelangen Blut und Stammzellen aus dem Knochenmark an die Oberfläche. Das Ergebnis dieser Therapieformen besteht in der Bildung von Ersatz- bzw. Faserknorpel.

Bei der Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern werden zuerst Zylinder aus Knochen und dem darüber liegenden intakten Knorpel aus einer wenig belasteten Region im Kniegelenk entnommen. Bewährt haben sich hier der laterale beziehungsweise mediale Trochlearand, das interkondyläre Areal oder die dorsale mediale Femurkondyle (Frosch et al. 2010). Diese bis zu 1 cm großen Zylinder werden dann anschließend in entsprechend große ausgestanzte Öffnungen im geschädigten Knorpelbereich eingesetzt. Werden mehrere solcher Zylinder nebeneinander platziert, so spricht man von einer Mosaikplastik. Unter bestimmten Voraussetzungen ist auch die Transplantation von allogenen osteochondralen Material möglich (Meyers et al. 1989).

Eine der neueren Methoden ist die autologe Chondrozyten-Transplantation beziehungsweise -Implantation (ACT/ACI). Diese wird chronologisch in drei verschiedene Generationen unterteilt (Marlovits et al. 2004a; Strauss et al. 2011). Bei der ursprünglichen Form, auch als erste Generation bezeichnet, werden dem Patienten in einem operativen Eingriff Knorpelzellen von einer wenig belasteten Region des betroffenen Gelenks entnommen. Diese Knorpelzellen werden isoliert und anschließend für 3-4 Wochen kultiviert. In einer zweiten operativen Maßnahme wird der bestehende Knorpeldefekt mit einem Periostlappen zuerst verschlossen und dann der Hohlraum zwischen Gelenkfläche und Periostlappen mit den kultivierten Knorpelzellen bepflanzt (Zur genauen Durchführung dieses Verfahrens siehe die Veröffentlichung von Jones und Peterson 2006). Die ersten klinischen Ergebnisse dieser Arbeitsweise sind vielversprechend (Brittberg et al. 1994; Löhnert et al. 1999).

Auch die neuere Studienlage bestätigt, dass die ACI sowohl kurz- als auch langfristig zu guten klinischen Erfolgen führt (Peterson et al. 2010; Moseley et al. 2010; Vasiliadis et al. 2010).

Bei der zweiten Generation der ACI wird anstelle eines Periostlappens eine Kollagenmembran benutzt, um die transplantierten Chondrozyten zu bedecken (Filardo et al. 2011a). Dadurch kann eine Hypertrophie des Periostlappens als häufige Nebenwirkung verhindert werden. Zudem kann der Eingriff arthroskopisch durchgeführt werden (Marcacci et al. 2002).

Die neueste Form der ACI (3. Generation) ist die sogenannte Matrix-assoziierte ACI (Marlovits et al. 2004b). Dabei wird die geschädigte Knorpelzone entfernt und die dadurch entstandene Defekthöhle anschließend mit einem künstlich hergestellten Ersatzmaterial (*scaffold*) aufgefüllt. Als Ersatzmaterialien werden klinisch Membranen aus Hyaluronsäure, Kollagenen, Polymeren oder Kollagengele verwendet. Zur Etablierung eines hyalinen Knorpelregenerats erfolgt die *in vitro*-Kultivierung der Knorpelzellen ganz oder teilweise in dem Trägermaterial. Die Biomaterialien dienen dabei zum einen als Zellträger, haben andererseits aber auch Einfluss auf die Zelldifferenzierung (Marlovits et al. 2004b). Mehrere Untersuchungen bestätigen, dass ein Matrix-assoziiertes ACI-Verfahren zu guten klinischen Ergebnissen führen kann (Brittberg 2010; Ebert et al. 2011; Jacobi et al. 2011; Dai und Cai 2012).

Vergleicht man die Ergebnisse der ursprünglichen ACI, die mit einem Periostlappen als Trägermedium für die Chondrozyten durchgeführt wird, mit der ACI der neueren Generationen, so zeigt sich eine vergleichbare klinische Verbesserung der behandelten Patienten (Bartlett et al. 2005, Zeifang et al. 2010, Erggelet et al. 2010). Die Matrix-assoziierte ACI weist dabei operationstechnische und biologische Vorteile auf (Marlovits et al. 2009).

Es stellt sich die Frage, welche dieser genannten Therapien die besten Ergebnisse liefert. Um dies zu beantworten, muss beachtet werden, dass die ideale Therapiewahl für den Patienten von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Dazu zählen patientenspezifische Einflussgrößen wie Alter, Fehlstellungen und Begleitverletzungen des Kniegelenks, angestrebte Mobilität sowie defektspezifische Kriterien wie Größe, Tiefe und Lokalisation.

Die Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie empfiehlt bis zu einer Defektgröße von 2 cm² die Mikrofrakturierung, für Defekte zwischen 2 cm² und 4 cm² die Transplantation von

osteocondralen Zylindern und für größere Defekte ab 4 cm² die ACI (Behrens et al. 2004). Die Gültigkeit dieser Empfehlung konnte 2010 in einem Review bestätigt werden (Harris et al. 2010).

Sowohl für die Mikrofrakturierung als auch für die ACI gilt dabei, dass ihr Therapieerfolg von einer intakten subchondralen Schicht abhängig ist (Gomoll et al. 2010). Wenn dieses Kriterium nicht gegeben ist, führen diese Verfahren zu einem biomechanisch insuffizienten Faserknorpel. Für die ACI konnten aber mikroskopische Verbesserungen in der Knorpelqualität nachgewiesen werden (Russlies et al. 2002). Dennoch stellt die ACI vor allem ein Therapieverfahren für chondrale Defekte dar (Brittberg et al. 1994; 1996).

Für die Behandlung osteochondraler Defekte (Outerbridge Grad 4; ICRS Grad 4) stehen zurzeit lediglich zwei Therapieverfahren zur Verfügung, die tatsächlich zur Bereitstellung von hyalinem Knorpel führen. Die Transplantation von osteochondralen Zylindern (siehe oben) oder, bei sehr ausgeprägten Defekten, der posteriore Femurkondylentransfer (Imhoff et al. 1999b).

Der posteriore Femurkondylentransfer basiert auf derselben Grundidee wie die Transplantation von osteochondralen Zylindern, wobei hier nicht einzelne Zylinder, sondern meist der gesamte posteriore Femurkondylus gewonnen wird. Dieses autologe Knorpel-Knochen-Transplantat wird dann mit dem defekten Knorpel-Knochen-Bereich ausgetauscht.

Zwar führen diese Therapien zu hochwertigem hyalinen Knorpel, allerdings sind diese beiden Verfahren keineswegs als optimal anzusehen, da sie mit Nachteilen wie einer hohen Entnahmemorbidity und einer Limitierung der Defektgröße einhergehen (Imhoff et al. 1999a). So traten bei 20% der Patienten, die mit einer Transplantation von osteochondralen Zylindern therapiert wurden, Beschwerden an der Entnahmestelle auf (Imhoff und Oettl 1999).

Auch die Transplantation von sogenannten Mega-OATS (Brucker et al. 2002) aus dem posterioren Femurkondylus führt nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Neben einem großen operativen Aufwand und hohen Operationsrisiken kam es gehäuft zu erheblichen Beschwerden an der Entnahmestelle, so dass vom Patienten keine knieenden Tätigkeiten mehr ausgeübt werden können. Außerdem wird eine lange Rehabilitationsphase benötigt (Brucker et al. 2002).

Auch die ACI wird verwendet, um Knorpel-Knochendefekte zu therapieren, allerdings erreicht der entstehende Knorpel hierbei nicht die gewünschten Eigenschaften hyalinen Knorpels, führt klinisch jedoch zu einer Verbesserung der Symptome (Gillogly 2003). Vor allem die neueren Formen der ACI, die zu den Verfahren des *tissue engineering* zählen, gelten als aussichtsreiches Therapieverfahren (Martin et al. 2007; Kalson et al. 2010). Wichtig ist hierbei, den geschädigten subchondralen Knochen mitzuthrapieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auf der Oberfläche von mit Zellen bepflanzten Implantaten Knorpel entstehen kann, welcher hyalinem Knorpel ähnelt (Frosch et al. 2006). Auch die Entwicklung von Knorpel-Knochen-Ersatzmaterialien führt fortlaufend zu verbesserten und neuen Implantaten. Zudem kann die Matrix-assoziierte ACI im Vergleich zur ursprünglichen ACI arthroskopisch durchgeführt werden (Erggelet et al. 2008).

Die Verfahrensweise der Matrix-assoziierten ACI ist dabei mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So muss der für eine Anzucht von Knorpelzellen benötigte Gelenkknorpel in einem ersten operativen Eingriff zuerst gewonnen werden. In einem zweiten operativen Eingriff nach ca. 3 Wochen werden die kultivierten Knorpelzellen dann als ACI eingesetzt. Neben erheblichen Kosten und Risiken für den Patienten kommt es oft zu einer fibroblastären Degeneration des Transplantats. Die ursprünglich im Gelenkknorpel eingebetteten Knorpelzellen verlieren aufgrund der fehlenden äußeren Einwirkungen wie Scher- und Druckkräften ihre Spezialisierung und degenerieren daraufhin (Benya et al. 1978; Russlies et al. 2002; Lin et al. 2008). Bislang konnte keine vollständige Redifferenzierung der Knorpelzellen, weder *in vitro*, noch *in vivo* erzielt werden. Der so entstehende Regeneratknorpel erreicht nicht die gewünschten biologischen und mechanischen Eigenschaften des nativen hyalinen Knorpels (Lee et al. 2003; Buma et al. 2003).

Eine weitere Schwierigkeit des *tissue engineering* für die Therapie osteochondraler Defekte ist die Entwicklung eines Implantats, welches den zahlreichen Anforderungen gerecht wird. So sollte nach Rezwan et al. ein Implantat für das *tissue engineering* folgende Eigenschaften besitzen: Die mechanischen Eigenschaften des Materials müssen denen von echtem Knochen ähneln. Damit eine ausreichende Zell- und Gefäßimmigration gewährleistet werden kann, muss das Ersatzmaterial eine hohe Porosität mit untereinander verbundenen Poren aufweisen. Das Implantat sollte außerdem kontrolliert biologisch abbaubar sein. Eine weitere Bedingung ist eine hinreichende Integration der Implantate in den umliegenden Knochen (Rezwan et al.

2006). Denn nur Implantate, die in den Knochen integriert sind, stellen eine Basis für die Regeneration der subchondralen Schicht und des Knorpels dar (Frosch et al. 2006).

Benötigt wird also eine Therapieform osteochondraler Defekte, die auf der einen Seite zu hyalinem und somit hochwertigem Gelenkknorpel führt, und auf der anderen Seite mit einem geringeren Risiko und besseren Ergebnis als die bisherigen Therapien einhergeht.

1.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, tiefe osteochondrale Defekte des Kniegelenks im Tiermodell zur Ausheilung zu bringen. Dazu werden TruFit®-Implantate (smith&nephew TruFit CB Plug, Hamburg, Deutschland) als Knochen-Knorpel-Ersatzmaterial mit einer einzigen autologen Knorpelzelltransplantation kombiniert. Ein zusätzlicher Therapieeffekt soll erreicht werden, indem die Chondrozyten vor der Transplantation in Plättchen-reiches Plasma, sogenanntes *platelet-rich-plasma* (PRP), eingebracht werden.

1.6.1 TruFit®-Implantate

Die Idee, Knochendefekte aufzufüllen, um die Heilung zu unterstützen, ist kein neuer Therapieansatz. Zu diesem Zweck dienen autologer, allogener, xenogener und artifizierter Knochen (Damien und Parsons 1991). In der großen und stetig wachsenden Gruppe der artifizierten Implantate gibt es Ersatzmaterialien, die als reiner Knochenersatz dienen (Walsh et al. 2008; Yuan et al. 2010) und spezielle Implantate für die Therapie osteochondraler Defekte.

Das für dieses Experiment verwendete Implantat wurde 2006 von der Osteo Biologics Incorporation eingeführt (smith&nephew news, Ausgabe 02/2007; www.visio-online.de). Bei den TruFit®-Implantaten handelt es sich um zylindrische, poröse Zwei-Phasen-Implantate (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: TruFit®-Plugs; mit freundlicher Genehmigung der Smith & Nephew GmbH.

Die Plugs sind voll synthetisch und resorbierbar, aber dennoch biomechanisch stabil. Sie bestehen aus einem Komposit-Material aus Polymer und Keramik, dem sogenannten (PolyGraft®). Es setzt sich aus dem amorphen Copolymer Poly-(D,L-Laktid)-Glykolid (PDLG) zusammen. In dem Anteil, der im Knochen zu liegen kommt, ist Calciumsulfat zugesetzt, um die Knochenbildung zu fördern (nicht im Knorpel-Anteil des Plugs). Die zwei Phasen der Implantate (Knorpel- und Knochen-Phase) sind bezüglich Materialkomposition sowie mechanischen Eigenschaften auf den Einsatz für osteochondrale Defekte optimiert und ahmen den natürlichen Knorpel-Knochen-Übergang nach. Die Plugs werden in *press-fit*-Technik im zuvor eröffneten Knochen verankert. Durch Eröffnung des subchondralen Knochens haben Blut und Stammzellen aus dem Knochenmark Zugang zu den Poren des Implantats, dessen hydrophile Eigenschaften diesen Vorgang unterstützen sollen. Durch den Einstrom von Blut und Nährstoffen wird die Vaskularisierung gefördert. Insgesamt könnte somit eine ausreichende Osseointegration der Implantate gewährleistet werden.

Der obere "knorpelige" Anteil ohne Calciumsulfat ist plastisch verformbar und kann damit an die Form des angrenzenden Knorpels angepasst werden. Hierdurch kann eine Stufenbildung innerhalb des Gelenkknorpels vermieden werden.

1.6.2 Single-step ACI

Eine Besonderheit dieses Projektes ist die Transplantation von Knorpelzellen innerhalb einer einzigen Operation, also in einem sogenannten *single-step*-Verfahren. Solch eine Vorgehensweise ist bislang nur vereinzelt beschrieben worden (Lu et al. 2006; Jiang et al. 2007; Frisbie et al. 2009; Giannini et al. 2009; Buda et al. 2010; Chiang et al. 2010; Cole et al. 2011; Marmotti et al. 2012). Die Kombination eines

TruFit®-Plugs mit einer *single-step*-ACI ist in der Literatur bisher noch nicht untersucht worden.

Für dieses Projekt wurde im Labor eigens ein spezieller Kollagenase-Verdau entwickelt (Drengk et al. 2009). Dadurch ist es möglich, Chondrozyten aus nativem Knorpel zu gewinnen und anschließend so aufzureinigen, dass sie direkt für eine Transplantation zur Verfügung stehen. Der Vorgang der Zellisolation ist innerhalb einer Stunde möglich, wodurch die Operationszeit entscheidend limitiert werden kann. Eine zweite kostspielige und mit Risiken verbundene Operation wäre somit vermeidbar.

1.6.3 Platelet-rich-plasma (PRP)

Zusätzlich zur einzeitigen ACI werden die Chondrozyten vor der Transplantation in PRP eingebracht, welches einen positiven Einfluss auf Knorpel- und Knochenwachstum besitzt (Gruber et al. 2002; Akeda et al. 2006; Drengk et al. 2009; Sun et al. 2010). PRP ist ein Konzentrat aus autologem Blut mit einer großen Menge an Blutplättchen und an natürlichen Wachstumsfaktoren wie dem *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β 1, TGF- β 2), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *epithelial cell growth factor* (ECGF) (Sun et al. 2010). Die Wachstumsfaktoren fördern unter anderem die Chemotaxis, die Angiogenese und die Zellproliferation sowie -differenzierung. PRP wird am Tag der Operation durch mehrere Arbeitsschritte mittels Zentrifugation aus Eigenblut gewonnen. Aus diesem Grund ist es günstig herzustellen und birgt kein Risiko für die Übertragung von Krankheiten oder das Auslösen einer Immunreaktion. Zudem wurde beschrieben, dass durch die Verwendung von PRP bei der Therapie von tiefen osteochondralen Defekten Knorpelgewebe entsteht, welches eine große Menge an extrazellulärer Matrix und sogar Kollagen-II besitzt (Sun et al. 2010).

1.7 Vorteile gegenüber bestehenden Therapien

Zusammengefasst bietet das geplante Vorgehen also folgende Vorteile gegenüber den bisherigen Therapien:

- Die Therapie osteochondraler Defekte mit Methoden des *tissue engineering* ist bisher wenig erfolgreich, da die exakte Rekonstruktion der subchondralen Schicht nur ungenügend Berücksichtigung fand. Der Rekonstruktion der subchondralen

Schicht wird durch die verwendeten Implantate im vorliegenden Projekt deshalb besondere Beachtung geschenkt.

- Durch die Verwendung der TruFit®-Zylinder erübrigt sich die Entnahme von Knorpel-Knochen-Zylindern aus der Trochlea oder der dorsalen Femurkondyle. Dadurch verringert sich das Risiko der Entnahmemorbidität. Des Weiteren kann das Behandlungsspektrum zugunsten größerer Defekte ausgeweitet werden, da die Verfügbarkeit von autologen Knorpel-Knochen-Zylindern begrenzt ist.
- Durch die Schnellisolierung der Knorpelzellen kann die gesamte Therapie während eines einzigen Eingriffs stattfinden. Dadurch kann die sehr teure und aufwendige Entnahme und Vermehrung der Zellen in Kultur sowie ein Zweiteingriff zur Replantation vermieden werden.
- Durch die Schnellisolierung der Chondrozyten kann möglicherweise die fibroblastäre Dedifferenzierung der eingebrachten Zellen verhindert werden und die Ausbildung von hyalinem Knorpel somit unterstützt werden.
- Durch direktes Einbringen der Zellen in PRP kann dessen wachstumsfördernde Potenz möglicherweise eine schnelle Proliferation der Chondrozyten mit Ausbildung einer knorpelähnlichen Matrix, die reich an Kollagen-II und Aggrecan ist, unterstützen.

Laut Kessler und Grande ist eine erfolgreiche Knorpeltherapie von vier Faktoren abhängig (Kessler und Grande 2008): Zellen, Wachstumsfaktoren, Implantate und die mechanischen Einflüsse. In diesem Projekt bekommen diese Faktoren allesamt Beachtung. So können mithilfe der geplanten ACI differenzierte Chondrozyten transplantiert werden, um so die Entstehung einer neuen und hochwertigen Knorpelschicht zu gewährleisten. Durch Einbringen der Zellen in PRP wird die zweite Bedingung erfüllt, nämlich die Bereitstellung von verschiedenen Wachstumsfaktoren in hoher Konzentration. Die Verwendung der TruFit®-Implantate erfüllt die Bedingung eines hochwertigen Ersatzmaterials, das speziell für die Therapie osteochondraler Defekte konstruiert wurde. Die Implantate bieten eine mechanisch geschützte Umgebung. Durch die Resorption erfolgt der Belastungstransfer auf das neu entstandene Regeneratgewebe und damit dessen Konditionierung und Osseointegration.

1.8 Fragestellung

In diesem Experiment soll untersucht werden, ob durch die Verwendung von TruFit®-Implantaten in Kombination mit einer *single-step* ACI und/oder PRP eine Verbesserung der Regeneration osteochondraler Defekte erzielt werden kann. Als Versuchstiere in diesem Langzeittiermodell wurden dabei Kaninchen verwendet. Speziell soll die Frage beantwortet werden, welche Qualität und Quantität der neu entstandene Knochen und Knorpel besitzt. Außerdem soll getestet werden, inwiefern das Implantat in das umliegende Knochengewebe integriert wird und zu welchem Zeitpunkt dieser Prozess stattfindet.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

Nach Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die Tierschutzkommission des Landes Niedersachsen (Aktenzeichen 33.9.42502-04-073/09) wurden für das Forschungsprojekt 12 erwachsene Kaninchen (Chinchilla Bastard Rabbit, Charles River, Deutschland) verwendet. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 12 Monate. Die Haltung der Tiere wurde über den gesamten Versuchszeitraum von der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen übernommen. Während dieser Zeit war eine fachgerechte Betreuung der Versuchstiere durch Veterinäre und Tierpfleger gewährleistet.

Für die Untersuchung am Bewegungsapparat wurden die Versuchstiere in Bodenhaltung mit ausreichender Bewegungsfreiheit gehalten. Die Käfige, in denen die Tiere in Gruppen bis zu vier Kaninchen gehalten wurden, waren mit Stroh ausgelegt. Es standen jederzeit Haltungsfutter für Kaninchen (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Raumtemperatur betrug konstant 20 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55%. Die Tiere unterlagen dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus, da sie in ebenerdigen Räumlichkeiten mit Fenstern untergebracht waren. Sie zeigten über den gesamten Versuchszeitraum ein artgerechtes Verhalten, insbesondere waren keinerlei Anzeichen einer Patellaluxation festzustellen. Das Gewicht der Kaninchen betrug zu Beginn des Experiments durchschnittlich 3,75 kg (3,10 kg - 4,40 kg). Am Versuche betrug das mittlere Gewicht der Kaninchen 3,99 kg (3,20 kg – 4,50 kg). Dies entspricht einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 0,24 kg und spricht für eine stressfreie Haltung der Tiere.

Das Versuchsprotokoll beinhaltete die Verwendung beider Kniegelenke, sodass insgesamt 24 Kniegelenke zur Verfügung standen. Diese wurden per Zufall auf 4 verschiedene Versuchsgruppen verteilt, wonach jede Versuchsgruppe 6 Kniegelenke beinhaltete.

2.2 Operation

Vor der Operation wurden die Tiere 24 Stunden nüchtern gehalten und dabei mit Wasser *ad libitum* versorgt. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere mit Ketaminhydrochlorid (Ketamin10%®, medistar, Ascheberg, Deutschland) in der Dosierung 70 mg/kg Körpergewicht und Xylazin (Xylarium2%®, Riemser, Greifswald, Deutschland)

in der Dosierung 5 mg/kg Körpergewicht per intramuskulärer Injektion in die Oberschenkelmuskulatur anästhesiert. Nach der Narkoseeinleitung wurden die Kaninchen zur Aufrechterhaltung der Anästhesie mit einer Standard-Spritzenpumpe (B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) kontinuierlich mit folgender Medikation per intravenöser Gabe mittels einer Kanüle in der Ohrvene versorgt:

- 5 ml (100 mg) Xylazin
- 5 ml (500 mg) Ketamin
- 40 ml Natriumchlorid

Der Perfusor verabreichte die Mischlösung kontinuierlich in der Dosierung 1,7 ml pro kg KG pro Stunde. Dies entspricht einer Gabe von 3,4 mg pro kg KG pro Stunde Xylazin und 17 mg pro kg KG pro Stunde Ketamin.

Zu Beginn der Operation erfolgte die Rasur beider Oberschenkel bis zur Mitte des Unterschenkels. Anschließend wurde das Operationsfeld großflächig mit Iodlösung (Braunol®, B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Der Hautschnitt erfolgte medial neben der Patella. Das darunter liegende Kniegelenk wurde medial parapatellar eröffnet und die Patella nach lateral luxiert, wodurch der distale Femur mit beiden Kondylen dargestellt werden konnte. Das weitere Vorgehen war von der jeweiligen Versuchsgruppe abhängig (siehe 2.2.1 – 2.2.4). Nach ausgiebiger Spülung des Defekts und des Gelenks wurde die Patella reponiert und anschließend das Kniegelenk und die Haut schichtweise mit 4.0 Vicryl (Ethicon®, Johnson & Johnson Company, Langhorne, Pennsylvania, USA) wieder verschlossen.

Intraoperativ bekamen alle Tiere eine intramuskuläre *single-shot*-Antibiose (aniMedica GmbH, Senden-Bösesell, Deutschland) mit 200 mg Penicillin und 200 mg Streptomycin. Nach der Operation erhielten die Tiere für 3 Tage eine analgetische Behandlung mit Carprofen (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in der Dosierung 5 mg pro kg Körpergewicht per subkutaner Injektion.

2.2.1 Versuchsgruppe 1: Leerdefekt

Zuerst wurden, wie oben beschrieben, die distalen Femurkondylen dargestellt. Danach wurde mit einer wassergekühlten Diamantfräse (diamond bone cutting system, MedArtis, München, Deutschland) ein im Durchmesser 4,5 mm breiter und 5 mm tiefer Defekt in die mediale Femurkondyle gefräst (siehe hierzu Abbildung 3).

Nach anschließender Spülung wurde die Patella reponiert und das Kniegelenk, wie oben beschrieben, schichtweise wieder verschlossen.

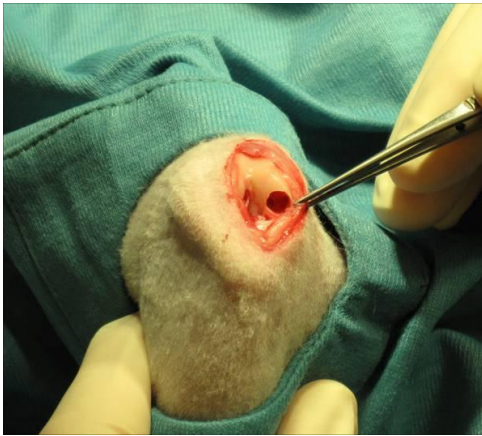


Abbildung 3: Leerdefekt in einer medialen Femurkondyle

2.2.2 Versuchsgruppe 2: TruFit®-Implantate

Die Operation erfolgte zunächst analog zur Versuchsgruppe 1. Nach Fertigstellung der Defekte wurden diese durch einen TruFit®-Plug (smith&nephew TruFit CB Plug, Hamburg, Deutschland) in *press-fit*-Technik ausgefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Oberfläche der Implantate knapp (ca. 0,5 mm) unterhalb der Gelenkoberfläche platziert wurde (siehe hierzu Abb. 4).



Abbildung 4: Mit einem TruFit®-Plug aufgefüllter Defekt

Die Implantate waren im Durchmesser 5 mm breit und etwa 5 mm lang, entsprechend der genau abgemessenen Tiefe des gesetzten Defekts. TruFit®-Plugs bestehen aus dem Komposit-Material PolyGraft®, welches sich aus einem Polymeranteil und

einem Keramikanteil zusammensetzt. Die genaue Materialzusammensetzung eines Plugs lautet wie folgt:

- 50% Co-Polymer (PLGA) bestehend aus 85% *poly[D,L-lactid]* und 15% *glycolid acid* (deutsch: PDLG = Poly-(D,L-Laktid)-Glykolid)
- 40% Calciumsulfat (außer im Knorpelanteil des Plugs)
- 10% *polyglycolide acid fibers* (= *PGA fibers*; deutsch: Polyglykolsäurefasern)
- Spuren von Tensiden

Nach anschließender Spülung wurde die Patella reponiert und anschließend das Kniegelenk schichtweise wie oben beschrieben wieder verschlossen.

2.2.3 Versuchsgruppe 3: TruFit®-Implantate und PRP

Die hergestellten Defekte wurden, wie bei der Versuchsgruppe 2 beschrieben, mit TruFit®-Implantaten versorgt und anschließend das Gelenk ausgespült. Danach wurde der oberflächige "knorpelige" Anteil des Plugs mit 50 µl autologem, thrombozytenangereichertem Fibrin (PRP, *platelet-rich-plasma*) behandelt. Die Herstellung des PRP erfolgte dabei wie folgt:

Den Kaninchen, die eine Behandlung mit PRP erhalten haben, wurde im anästhesierten Zustand zwischen 2,0 und 4,0 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Dieses Blut wurde in einer 5-ml-Monovette mit Natriumcitrat (3,8%) im Verhältnis Blut:Citrat 9:1 vermischt. Das Citratblut wurde dann in einer Standard-Laborzentrifuge (Labofuge 400, Heraeus, Buckinghamshire, England) für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Plasma über den Erythrozyten wurde in ein 5-ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 2800 rpm zentrifugiert. Die obere Plasmafraktion wurde verworfen, die untere zellreiche Plasmafraktion entspricht dem PRP. Im Operationssaal wurde zur Aktivierung des PRP pro 0,05 ml PRP, 2,5 µl 10%iges Calciumchlorid zugegeben. Anschließend wurde die Patella reponiert und das Kniegelenk schichtweise wieder verschlossen.

2.2.4 Versuchsgruppe 4: TruFit®-Implantate, PRP und Knorpelzellen

Die Defekte wurden wie bei der Versuchsgruppe 2 mit TruFit®-Implantaten ausgefüllt. Zusätzlich wurde der oberflächige "knorpelige" Anteil des Plugs mit 21.000 ± 8.000 autologen Chondrozyten beimpft, die zuvor mit 50 µl PRP vermischt wurden. Die Chondrozyten wurden durch einen speziellen Kollagenase-Schnellverdau

gewonnen (Drengk et al. 2009). Dazu wurde mit Hilfe eines Ringskalpells Gelenkknorpel von der Stelle entnommen, die kurz darauf als osteochondrale Defektstelle verwendet wurde. Diese Knorpelstückchen wurden mit 30 mg/ml Kollagenase Typ 2 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) vermengt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der verdaute Gelenkknorpel für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, um die Knorpelzellen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgesaugt und das zurückgebliebene Pellet mit 0,2 ml Phosphatpuffer vermischt und aufgenommen. Hiervon wurden 0,01 ml mit 0,01 ml Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) vermischt und in einer Neubauer Zählkammer (Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) ausgezählt. Der restliche Anteil wurde für 5 min bei 1000 rpm erneut zentrifugiert. Erst im OP-Saal wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 50 µl aktiviertes PRP aufgenommen.

2.2.5 Zusammenfassung der Versuchsgruppen

Zusammenfassend wurden die 24 gesetzten Defekte wie folgt versorgt:

- 6 Defekte blieben unversorgt (Versuchsgruppe: **Leer**)
- 6 Defekte wurden mittels TruFit®-Implantat versorgt (Versuchsgruppe: **TFP**)
- 6 Defekte wurden mittels TruFit®-Implantat und PRP versorgt (Versuchsgruppe: **TFP+PRP**)
- 6 Defekte wurden mittels TruFit®-Implantat, PRP und Knorpelzellen versorgt (Versuchsgruppe: **TFP+PRP+C**)

2.3 Polychrome Sequenzmarkierung

Während der zweiten Hälfte der Versuchsdauer erfolgte zur Markierung des neugebildeten Knochens eine polychrome Sequenzmarkierung (= intravitale Fluoreszenzmarkierung) durch Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen (Rahn 1976; Balcarek et al. 2010). Die intravitale Fluoreszenzmarkierung erlaubt die zeitliche Darstellung und Beurteilung der Osseointegration und Osteokonduktion der implantierten Zylinder.

Die Markierung begann 6 Monate nach der Operation per subkutaner Injektion und wurde alle 23 Tage wiederholt (siehe Abbildung 5). Insgesamt fanden 8 Markierungen statt, wobei jeweils jeder der vier Farbstoffe (Merck, Darmstadt, Deutschland) zweimal verwendet wurde:

- Xylenol-Orange (90 mg/kg Körpergewicht)
- Calcein-Grün (10 mg/kg Körpergewicht)
- Alizarin-Komplexon (30 mg/kg Körpergewicht)
- Tetracyclin (25 mg/kg Körpergewicht)

Schema der polychromen Sequenzmarkierung

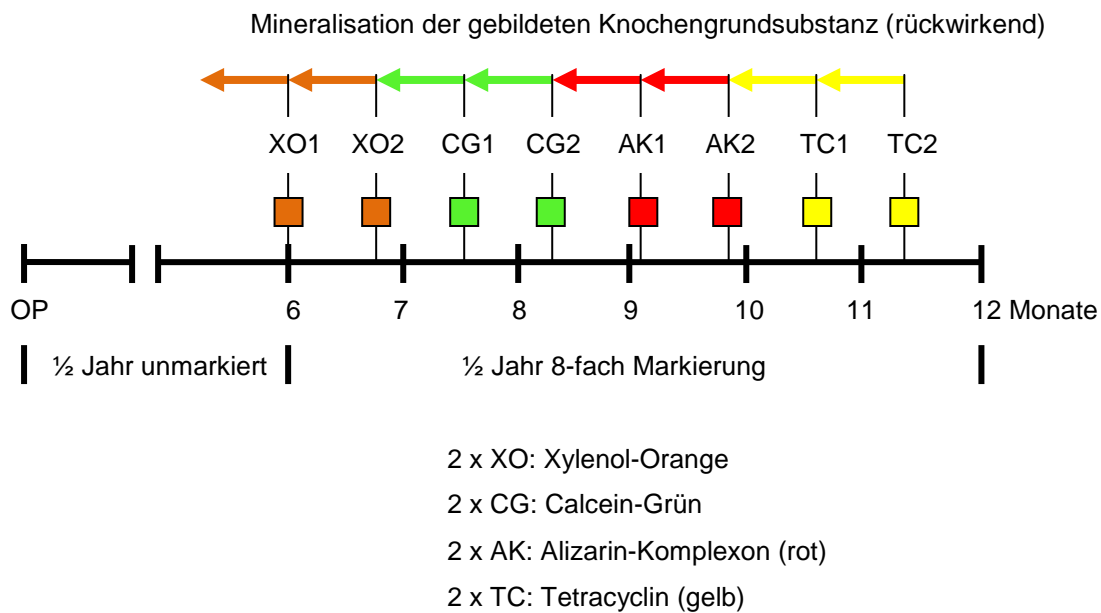


Abbildung 5: Schema der polychromen Sequenzmarkierung

2.4 Präparatgewinnung

Um die Femora der Tiere zu gewinnen, wurden sie zunächst auf die unter 2.2 beschriebene Art und Weise anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere per Injektion in die Ohrvene mit Kaliumchlorid (1 ml 20%iger Lösung pro kg KG) getötet. Im Anschluss wurde das Kniegelenk sowie das Hüftgelenk eröffnet und die Bandstrukturen zur Tibia bzw. Hüftgelenkspfanne durchtrennt. Danach wurde das Femur von proximal nach distal von den umgebenden Weichteilen gelöst und oberhalb der Patella abgesetzt. Die Präparate wurden hiernach bei einer Temperatur von -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.5 Makroskopische Aufnahmen

Nachdem die Knochen von sämtlichen Weichteilen frei präpariert waren, erfolgte eine fotografische Aufnahme beider medialen Femurkondylen mit einer Digitalkamera (DMC-FX30, Panasonic, Wiesbaden, Deutschland). Diese Aufnahmen dienten der späteren makroskopischen Beurteilung der Defektheilung der verschiedenen Versuchsgruppen.

2.6 Präparat-Aufbereitung

Die Femurkondylen wurden nach Präparation zunächst mittels aufsteigender Alkoholreihe entfettet (Yang et al. 2003), siehe hierzu Tabelle 2. Anschließend erfolgte die Einbettung in Technovit®9100NEU (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Mit diesem Einbettmedium ist es möglich, verschiedene Schichtdicken (150 µm für die Mikroradiographien; 5 µm für die histologischen Färbungen) anzufertigen.

Die Einbettung erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 2: Technovit®9100Neu-Einbettverfahren; PMMA = Polymethylmethacrylat; Härter 1 = Peroxidverbindung, Derivat des Dibenzolperoxids; h = hour; RT = Raumtemperatur; genauere Informationen zum Schema des Einbettverfahrens sind unter www.kulzer-technik.de dargestellt.

Stufe	Lösung	Konz.	Zeit	Temp.
Entwässerung 1	Ethanol	70%	1h	RT
Entwässerung 2	Ethanol	80%	1h	RT
Entwässerung 3	Ethanol	96%	1h	RT
Entwässerung 4	Ethanol	96%	1h	RT
Entwässerung 5	Ethanol	100%	1h	RT
Entwässerung 6	Ethanol	100%	1h	RT
Entwässerung 7	Ethanol	100%	1h	RT
Intermedium 1	Xylol		1h	RT
Intermedium 2	Xylol		1h	RT
Präinfiltration 1	Xylol/Technovit®9100Neu 50% Basislsg.		1h	10 °C

Stufe	Lösung	Konz.	Zeit	Temp.
Präinfiltration 2	Technovit®9100Neu			
	Basislsg. + Härter 1		1h	4 °C
Präinfiltration 3	Technovit®9100Neu			
	Basislsg. + Härter 1		1h	4 °C
Infiltration	Technovit®9100Neu			
	Basislsg. + Härter 1 +			
	PMMA-Pulver		1-72h	4 °C

2.7 Aufbereitung für die Mikroradiographie

Nach Aushärtung wurden die in Plastik eingegossenen Präparate bis zur Hälfte des ursprünglichen Defekts (siehe Abbildung 6) mit einer speziellen Innenlochsäge (Leica-Sägemikrotom SP1600, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 150 (± 10) μm dicke Scheiben quer zu den Implantaten geschnitten und anschließend auf Objektträgern eingedeckt. Zur Bestimmung der Knochendichte und Quantität des eingewachsenen Knochens wurde von den Schnitten im Faxitron-Röntgengerät (Hewlett Packard, San Diego, USA) eine Mikroradiographie auf Industrex SR45 Film (Kodak, Rochester, USA) angefertigt. Die Röhrenspannung betrug 10 kV bei einer Stromstärke von 0,3 mA und einer Belichtungszeit von 3 min.

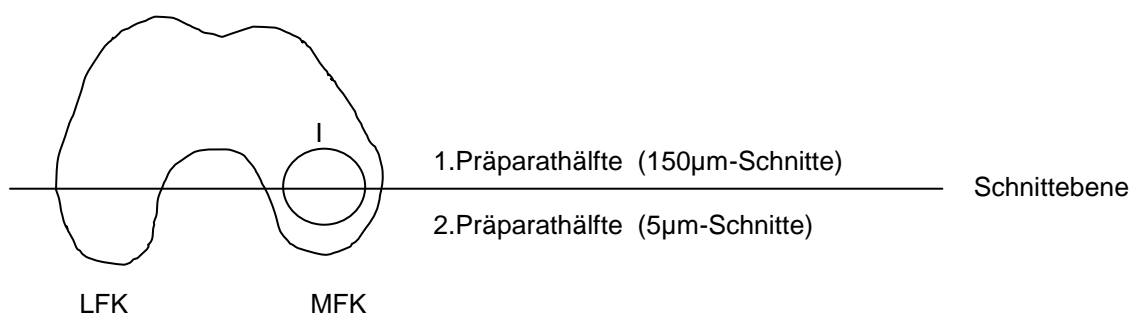


Abbildung 6: Übersicht Schnittebene; Ansicht von distal; LFK: Laterale Femurkondyle; MFK: Mediale Femurkondyle; I: Implantat.

2.8. Histologische Aufbereitung

2.8.1 Färbung mit Toluidinblau-O

Die zweite Hälfte der Präparate (siehe Abbildung 6) wurde mit einem Rotationsmikrotom (Leica-RM, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Da diese zuvor in Plastik (Technovit®9100Neu) eingebettet wurden, mussten die Schnitte vor der Färbung zuerst vom Plastik gelöst werden. Dies wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 3: Entplastung

Arbeitsschritt	Vorgang
1	3x Einlegen in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland); je 20 min; nach ca. 50 Schnitten Xylol wechseln
2	1x Einlegen in 2-Methoxyethylacetat (Merck); 20 min; nach ca. sechsmaliger Benutzung Alkohol (MEA) wechseln
3	2x Einlegen in reinem Aceton (Merck); je 5 min
4	1x Einlegen in entionisiertem Wasser

Nach dem Entplasten wurden die Schnitte nach folgendem Schema mit Toluidinblau-O gefärbt:

Tabelle 4: Färbung mit Toluidinblau-O

Arbeitsschritt	Vorgang
1	30 sec Einlegen in eine Mischlösung aus: 1g Toluidinblau-O (Merck), 1 g Natriumtetraborat (Merck), 100 ml Aqua dest.; vor dem Einlegen die Lösung 2x filtrieren
2	Waschen mit Aqua dest.
3	1 min Einlegen in Ethanol (70%) um die metachromatischen Farbeffekte zu differenzieren
4	5 min Einlegen in Ethanol (100%)

Arbeitsschritt	Vorgang
5	5 min Einlegen in Xylol (Merck)
6	Eindecken mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland)

Das Ergebnis der Färbung stellt sich folgendermaßen unter dem Mikroskop dar:

- mineralisierte Hartgewebematrix - ungefärbt, blassblau
- Zellen, Weichgewebe - blau
- Knorpel, Mastzellgranula metachr. - rotviolett
- verkalkter Knorpel - dunkelblau

2.8.2 Färbung mit Safranin-O

Zunächst wurden die Schnitte wie unter 2.8.1 beschrieben entplastet. Hiernach wurden sie mit Safranin-O gefärbt. Zu diesem Zweck wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt:

Tabelle 5: Lösungen für die Safranin-O Färbung

Lösung	Inhaltsstoffe
Weigert's Hämatoxylin-Lsg.	Lösung A und B im Verhältnis 1:1
Lösung A	1 g Hämatoxylin; 100 ml Alkohol (95%)
Lösung B	4 ml hydriertes Eisenchlorid (29%); 95 ml Aqua dest; 1 ml konz. Salzsäure
Echtgrün-Lösung (0,001%)	0,01 g Echtgrün Fcf, rein, Farbzahl 42053 (Waldeck-Division Chroma, Münster, Deutschland); 1000 ml Aqua dest.
Essigsäure-Lösung (1%)	1 ml Essigsäure; 100 ml Aqua dest.
Safranin-O-Lösung (0,1%)	0,1 g Safranin-O, wasserlöslich, Farbzahl 50240 (Waldeck-Division Chroma, Münster, Deutschland); 100 ml Aqua dest.

Nach der Herstellung der oben genannten Lösungen erfolgte die Färbung nach folgendem Schema:

Tabelle 6: Färbung mit Safranin-O

Arbeitsschritt	Vorgang
1	Einlegen der entplasteten Schnitte in Aqua dest.
2	10 min in Weigert's Hämatoxylin-Lösung anfärben
3	10 min unter fließendem Wasser waschen
4	5 min in Echtgrün-Lösung färben
5	zügig für 10-15 sec mit Essigsäure-Lösung abspülen
6	5 min in Safranin-O-Lösung färben
7	Entwässerung der Schnitte für jeweils 2 x 2 min in Alkohol (95%), Alkohol (100%) und zuletzt in Xylol
8	Eindecken der Schnitte mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland)

Das Ergebnis der Färbung stellt sich wie folgt unter dem Mikroskop dar:

- Zellkerne - schwarz
- Zytoplasma - graugrün
- Knorpel, Muzine, Mastzellgranula - orange, rot

2.9 Auswertungen

Die Auswertung wurde verblindet durchgeführt. Das bedeutet, dass dem Untersucher, der alle Messungen durchführte, die Gruppenzugehörigkeit eines Präparates nicht bekannt war.

2.9.1 Makroskopische Auswertung

Die Auswertung der makroskopischen Aufnahmen wurde deskriptiv durchgeführt.

Folgende Fragestellungen dienten dabei als Orientierung:

- In welchem Maße wurde der Defekt aufgefüllt?
- Liegt die Oberfläche des Defekts im Niveau zur unbehandelten Gelenkfläche?

- Wie ist die Beschaffenheit der Gelenkoberfläche?
- Wie dick ist das Oberflächengewebe ausgebildet?

2.9.2 Mikroradiographie

Die Auswertung der Mikroradiographie erfolgte in Anlehnung an frühere Arbeiten aus der Abteilung Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (Sehmisch et al. 2009).

Die angefertigten Filme wurden zunächst mit dem Leica-Stereomakroskop MZ 7-5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) betrachtet. Um alle Schnitte unter konstanten Bedingungen auszuwerten, wurden folgende Einstellungen am Makroskop gewählt: Als Objektiv wurde ein 10er Objektiv gewählt. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtlampe (Leica KL 1500 LCD, Bensheim, Deutschland). Die Temperatur der Halogenlampe wurde konstant auf Schalterposition 3000 K eingestellt. Die mechanische Blende der Kaltlichtlampe wurde stets auf Schalterposition B eingestellt, was einer mäßigen Helligkeit entspricht (A: geringste Helligkeit; E: maximale Helligkeit). Mittels einer Kamera (Leica DFC 490, Bensheim, Deutschland) konnten die Bilder auf einen Computer (Intel Pentium 4; 2,6 GHz) übertragen werden. Die anschließende Bildbearbeitung und Datengewinnung erfolgte mit dem Software-Programm Leica QWin Standard 2006, Version 3.5.1 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die auf dem Computer abgebildeten Schnitte konnten in ihrer Helligkeit variiert werden. Als standardisierte Einstellung wurde eine Belichtungszeit von 126,3 ms bei einer 3,7 fachen Verstärkung gewählt. Da die Schnittdicke der 150 µm-Schnitte leicht variierte, wurde zum Ausgleich die Belichtungszeit von 126,3 ms um ± 20 ms verändert. Somit erschienen alle Schnitte auf dem Computer als gleich hell. Zur Datengewinnung wurde ein eigens für diesen Versuch programmierter Algorithmus verwendet.

2.9.2.1 Datengewinnung

Zunächst wurden die Schnitte, wie oben beschrieben, unter standardisierten Bedingungen im Software-Programm Leica QWin digitalisiert dargestellt (Abbildung 7).

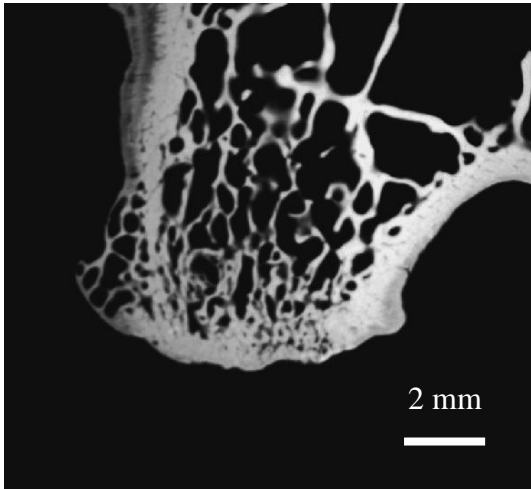


Abbildung 7: Digitalisierte Aufnahme einer medialen Femurkondyle

Der nächste Schritt beinhaltete die Einstellung eines Messrahmens für die mediale Femurkondyle. Dieser Messrahmen war 3,5 mm breit und 5 mm lang (siehe hierzu Abbildung 8).

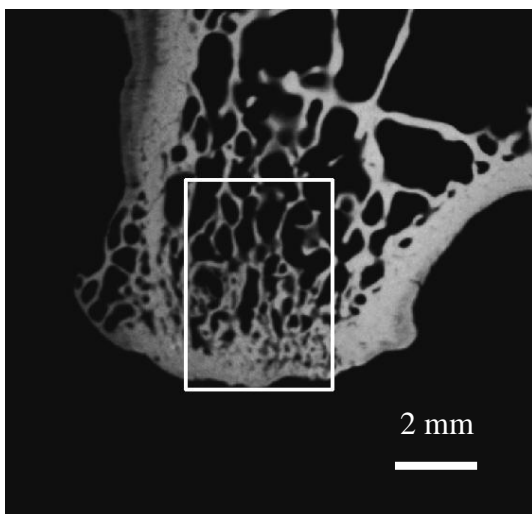


Abbildung 8: Mediale Femurkondyle mit eingestelltem Messrahmen; Größe des Messrahmens: 3,5 mm x 5,0 mm.

Somit war der Messrahmen um 1,0 mm schmaler als der gesetzte Defekt. Der Grund hierfür war die von Natur aus schmalere laterale Femurkondyle, die als Referenz für die Messwerte der medialen Femurkondyle diente. Bei einer Breite des Messrahmens von 4,5 mm würden bei den meisten Schnitten die mediale, die laterale und die zum Gelenk gerichtete Kortikalis der lateralen Femurkondyle im Messbereich liegen. Bei der medialen Femurkondyle würde hingegen nur die zum Gelenk

gerichtete Kortikalis zum Messbereich gehören. Um diesem Effekt entgegenzuwirken wurde der Messrahmen etwas schmaler gewählt.

Der zweite Schritt beinhaltete die Graudetektion. Das Softwareprogramm erkannte automatisch alle Knochenanteile und färbte diese blau an (siehe hierzu Abbildung 9).

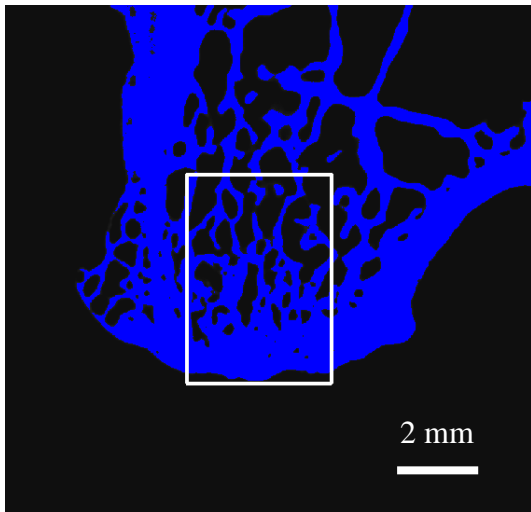


Abbildung 9: Graudetektion aller Knochenanteile

Anschließend war eine manuelle Variation der Detektionssensitivität möglich. Somit konnten gegebenenfalls vom Programm nicht erkannte Knochenbereiche ebenfalls blau gefärbt werden. Im Zweifel wurde bei allen Schnitten eine leichte Überdetektion toleriert. Zu Beginn einer jeden Messphase wurde die Messgenauigkeit der Untersuchung evaluiert. Zu diesem Zweck wurden per Zufall für drei bereits ausgewertete Schnitte erneut alle Parameter bestimmt. Die Schwankung der Messwerte war hierbei nie größer als 4 %.

Folgende quantitativen Knochenparameter konnten auf diese Weise ermittelt werden:

- Knöcherne Gesamtfläche innerhalb des Messrahmens (mm^2)
- Mittlere Trabekeldicke aller Trabekel innerhalb des Messbereichs (μm)
- Dichte der Trabekelkreuzungen = mittlere Anzahl der Trabekelkreuzungen pro mm^2 (Anzahl / mm^2)

Die Messwerte wurden jeweils für die mediale und laterale Femurkondyle ermittelt. Die unbehandelte laterale Femurkondyle (LFK) diente dabei als Referenz für die Messwerte der behandelten medialen Femurkondyle. Die Messparameter wurden

sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum der ehemaligen Defektzone bestimmt. (siehe hierzu Abbildung 10).

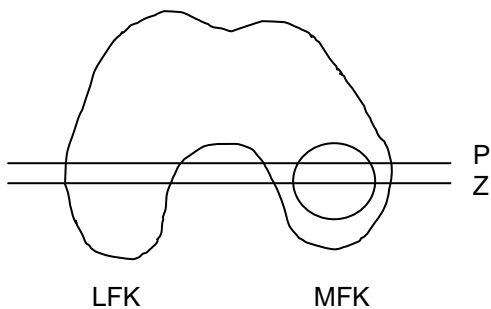


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Femurkondyle; Blick von distal; P: periphere Schnittebene; Z: zentrale Schnittebene; LFK: laterale Femurkondyle; MFK: mediale Femurkondyle.

Des Weiteren wurde anhand der mikroradiographischen Schnitte die Rekonstruktion der subchondralen Knochenschicht untersucht. Zu diesem Zweck wurde im peripheren und zentralen Defektbereich und jeweils für 2 verschiedene mikroradiographische Schnitte ermittelt, ob die knöchernen Gelenkfläche vollständig regeneriert und in einem Niveau mit der umliegenden Gelenkfläche liegt. Bei Vorhandensein dieser beiden Kriterien wurde die Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur bejaht, andernfalls wurde sie verneint.

2.9.3 Histologische Auswertung

Die Begutachtung der Toluidinblau-O- und Safranin-O-Schnitte erfolgte mit dem Auflichtmikroskop Leica DM RXE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Auswertung der Knorpel- sowie der Knorpel-Knochen-Regeneration erfolgte nach den Scores von Wakitani (Wakitani et al. 1994; Tabelle 7) und von O'Driscoll (O'Driscoll et al 1988; Tabelle 8). Bewertet wurde jeweils der zentrale Bereich eines Defektes beziehungsweise des Implantats (siehe Abbildung 10).

Tabelle 7: Modifizierter Wakitani-Score

Kategorie	Bewertung	Punkte
1. Zell-Morphologie	hyaliner Knorpel	4
	überwiegend hyaliner Knorpel	3
	überwiegend Faserknorpel	2
	überwiegend kein Knorpel	1
	kein Knorpel	0
2. Metachromasie der Matrix	normal	3
	leicht reduziert	2
	überwiegend reduziert	1
	keine Metachromasie	0
3. Oberflächen-Charakteristika	glatt ($> \frac{3}{4}$)	3
	mittelmäßig ($> \frac{1}{2} - \frac{3}{4}$)	2
	unregelmäßig ($\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$)	1
	sehr unregelmäßig ($< \frac{1}{4}$)	0
4. Knorpeldicke in Bezug zum gesunden Knorpel	$> \frac{2}{3}$	2
	$\frac{1}{3} - \frac{2}{3}$	1
	$< \frac{1}{3}$	0
5. Bindung zum Gelenkknorpel	beide Kanten integriert	2
	eine Kante integriert	1
	Kanten nicht integriert	0
6. Rekonstruktion der subchondralen Schicht	komplett, im Niveau	4
	komplett, Niveau herabgesetzt	3
	unvollständig (>50%)	2
	unvollständig (25–50%)	1
	unvollständig (<25%)	0
7. Osseointegration des Implantats	komplett	2
	unvollständig (<50% Knochenkontakt)	1
	keine Osseointegration	0
Maximale Punktzahl		20

Tabelle 8: O'Driscoll-Score

Kategorie	Bewertung	Punkte	
1. Zelluläre Morphologie	hyaliner Gelenkknorpel	4	
	unvollst. differenziertes Mesenchym	2	
	fibröses Gewebe oder Knochen	0	
2. Anfärbung der Matrix	normal oder annähernd normal	3	
	mäßig	2	
	gering	1	
	keine	0	
3. Oberflächenbeschaffenheit	glatt und intakt	3	
	oberflächige horizontale Schichtung	2	
	Fissuren, 25% - 100% der Dicke	1	
	Unterbrechungen/Aufsplitterungen	0	
4. Strukturelle Integrität	normal	2	
	leichte Unterbrechungen, Zysten	1	
	starke Zertrümmerung	0	
5. Dicke	100% des normalen Knorpels	2	
	100% - 50% des normalen Knorpels	1	
	50% - 0% des normalen Knorpels	0	
6. Verbindung zum umliegenden Knorpel	beidseitig mit Transplantat verbunden	2	
	einseitig/beidseitig teilweise verbunden	1	
	nicht verbunden	0	
7. Hypozellularität	normale Zellularität	3	
	leichte Hypozellularität	2	
	mäßige Hypozellularität	1	
	starke Hypozellularität	0	
8. Chondrozyten-Gruppenbildung (Clustering)	keine Cluster	2	
	< 25% der Zellen in Clustern	1	
	25% - 100% der Zellen in Clustern	0	
9. Abwesenheit degenerativer Veränderungen im angrenzenden Knorpel	normale Zellularität, keine Cluster, normale Färbung	3	
	normale Zellularität, geringe Clusterbildung, mäßige Färbung	2	
	geringe bis mäßige Hypozellularität, geringe Färbung	1	
	hochgradige Hypozellularität, schwache/keine Färbung	0	
	Maximale Punktzahl		24

2.9.4 Auswertung der fluoreszenzmarkierten Präparate

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Präparate erfolgte anhand zentraler 150 µm-Schnitte. Betrachtet wurden die Schnitte unter dem Auflichtmikroskop Leica DM RXE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Als Lichtquelle diente eine Fluoreszenzlampe (Leica Typ 301-185.003/8150, Bensheim, Deutschland). Zur besseren Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe und für eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Schnitte erfolgte die Digitalisierung der Abbildungen. Zu diesem Zweck wurde die mediale Femurkondyle der Präparate zunächst unter dem Mikroskop zentriert (Objektiv: Leica N PLAN 2,5x/0,07; Okular: Leica L PLAN 10,0x/25). Anschließend wurden die Bilder mit einer Kamera (Leica DFC 490, Bensheim, Deutschland) auf einen Computer (Intel Pentium 4; 2,6 GHz) übertragen und somit digitalisiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Software-Programm Leica QWin Standard 2006, Version 3.5.1 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Folgende Einstellungen lieferten Bilder mit optimaler Farbintensität: Belichtungszeit 25-30 sec; 2-fache bis 4-fache Verstärkung; 1,0-fache bis 1,5-fache Farbsättigung. Je nach Schnittdicke mussten die Einstellungen geringfügig angepasst werden, um optimale Belichtungsverhältnisse zu erhalten. Die Auswertung der Bilder erfolgte deskriptiv, indem folgende Kriterien zur Beurteilung herangezogen wurden:

- Wie ist die allgemeine Knochendurchbauung der Defektzone?
- In welcher zeitlichen Abfolge sind die Knochen trabekel erstmals entstanden?
- Inwieweit wurde die knöchernen Gelenkkontur regeneriert?
- Inwiefern wurde der Knochen nach der Entstehung umgebaut?
- Wann wurden die zentralen Anteile des Defekts mit Knochen durchbaut?

2.9.5 Statistik

Die Aufarbeitung sowie die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm GraphPad Prism (Version 4.00a, April 2003, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte, Standardabweichung und Spannweite dargestellt. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch eine Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) gefolgt von Dunnets-post-hoc Test zur Bestimmung von Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $\alpha \leq 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Makroskopische Aufnahmen

Die makroskopischen Aufnahmen (siehe 3.1.1 – 3.1.4) zeigen die medialen Femurkondylen am Ende der Versuchsdauer, also 12 Monate nach der Operation. Dargestellt sind jeweils 4 repräsentative Kniegelenke jeder Versuchsgruppe mit einer anschließenden Beschreibung.

Die Auswertung der makroskopischen Bilder deutet auf eine heterogene Regeneration innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen hin. Jede Versuchsgruppe beinhaltet Kniegelenke mit größtenteils sehr erfolgreicher Regeneration (Abb. 11a, 12a, 13a, 14a). Zugleich finden sich in jeder Versuchsgruppe aber auch Gelenke mit makroskopisch schlechter erscheinender Defektheilung (Abb. 11c+d, 12d, 13c+d, 14d). Makroskopisch konnte man demnach keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Eine zusammenfassende Schlussfolgerung bezüglich des makroskopischen Erscheinungsbildes einer jeden Versuchsgruppe ist somit nicht möglich.

Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit hat insgesamt eine gute Regeneration stattgefunden, wobei innerhalb eines Gelenks die Heilung sehr unterschiedlich abgelaufen ist (Abb. 11d, 12c, 13b+c, 14b). Innerhalb des ursprünglichen Implantatbereichs variieren das Höhenniveau, die Erhabenheit und das Gewebematerial der Oberfläche sehr stark.

Die Mehrzahl der Kniegelenke weist überwiegend eine gute Defektauffüllung auf. Das Niveau der Gelenkfläche liegt häufig auf Höhe des gesunden Knorpels und geht teilweise auch bündig in dieses über (Abb. 11a+c, 12c, 13a, 14a). Es gibt jedoch auch viele kleinere Restdefekte, die als Dellen und Einkerbungen imponieren und das Niveau somit stellenweise herabsetzen (Abb. 11a+c, 12d, 14b+c). Bei einigen Femurkondylen ist nur eine periphere Regeneration erfolgt, sodass größere und tiefreichende Defekte vor allem in den zentralen Anteilen zurückgeblieben sind (Abb. 11d, 12c, 13c+d, 14d).

Die Beschaffenheit der Oberfläche besitzt etwa in gleichem Anteil glatte und unregelmäßig geformte Gebiete, wobei innerhalb eines Gelenks die Oberflächenbeschaffenheit zumeist stark variiert.

Das Material der Gelenkoberfläche ähnelt gebietsweise dem unversehrten Gelenkknorpel (Abb. 11a+c, 12c, 13a, 14a+d). Einige Oberflächen sind vergleichbar mit den

umgebenden fibrösen Strukturen, wie den Bändern und der Gelenkkapsel (Abb. 11b, 12d, 14c).

Die Dicke des Oberflächengewebes ist ebenfalls sehr unterschiedlich. Es gibt sowohl dickere Gebiete als auch Gebiete mit einem sehr dünnen Gelenküberzug, die den darunterliegenden Knochen durchschimmern lassen (Abb. 12a, 13a+b).

3.1.1 Versuchsgruppe: Leerdefekt

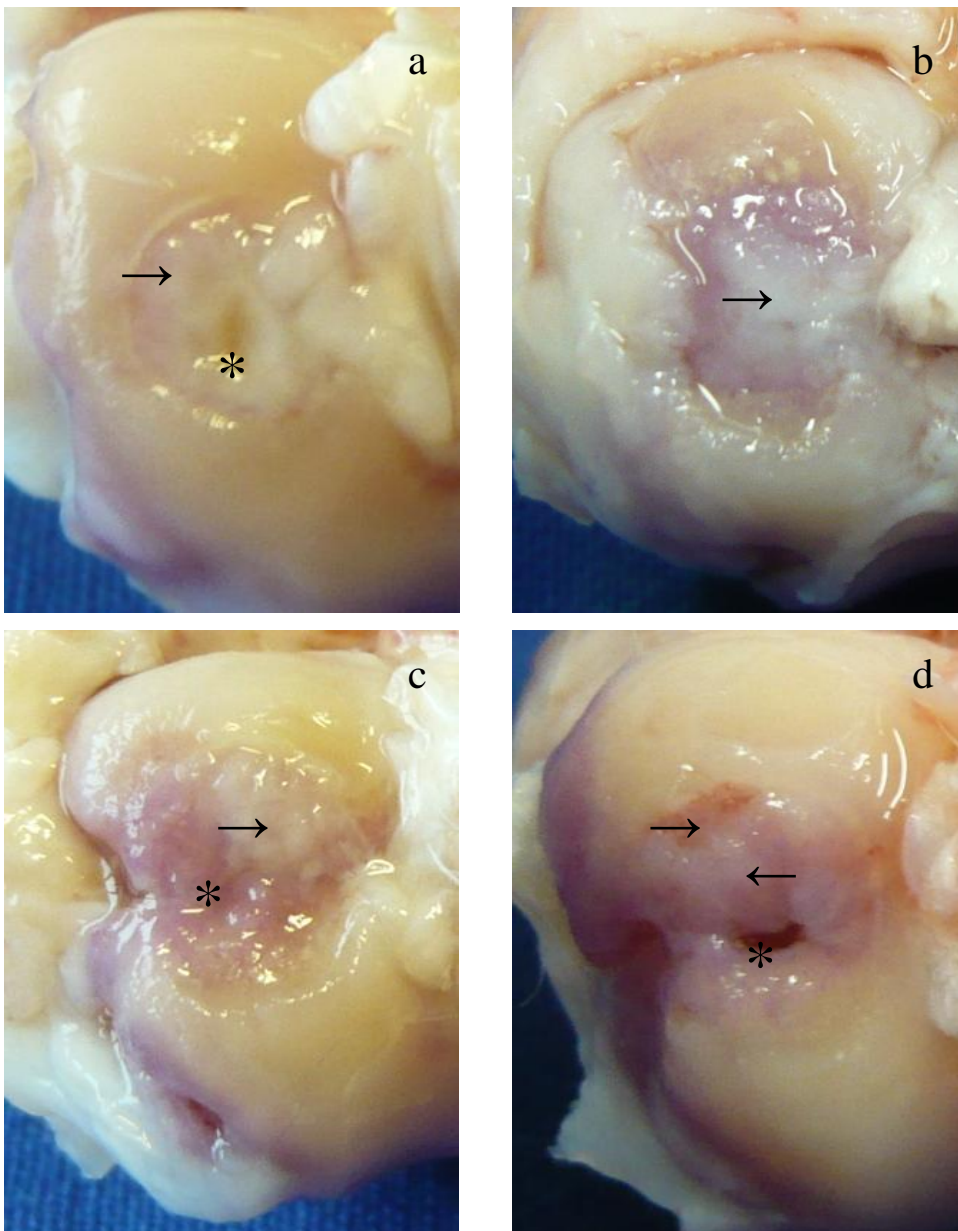


Abbildung 11a-d: Makroskopische Aufnahmen Gruppe Leer;

Abb. 11a zeigt eine im Niveau liegende Oberfläche, deren Geweberegenerat teilweise dem gesunden Knorpel ähnelt (→). Lediglich ein kleiner zentraler Restdefekt unterbricht die Oberflächenkontinuität (*).

Das nächste Kniegelenk (**Abb. 11b**) besitzt vor allem im Zentrum eine gute Defektauffüllung, wohingegen sich die peripheren Defektbereiche scheinbar schlechter regeneriert haben. Die zentral neu gebildete Gelenkfläche liegt auf einer Höhe mit der umgebenden unbehandelten Gelenkfläche. Die überwiegend glatte Oberfläche wird von minderwertig erscheinendem Gewebe gebildet (→), da sie eher den umliegenden Band- und Kapselstrukturen als dem gesunden Knorpel ähnelt.

Abb. 11c zeigt eine Femurkondyle mit herabgesetzter und unregelmäßiger Oberfläche (*), die von einem inhomogenen Überzug gebildet wird. Gebietsweise gleicht dieser dem unversehrten Knorpel (→).

In der folgenden Aufnahme (**Abb. 11d**) fällt die stark abgesenkte Oberfläche mit einem zentralen tiefen Defekt auf (*). Das Oberflächengewebe scheint sich hier teils schlechter (→) und teils besser (←) regeneriert zu haben.

3.1.2 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug

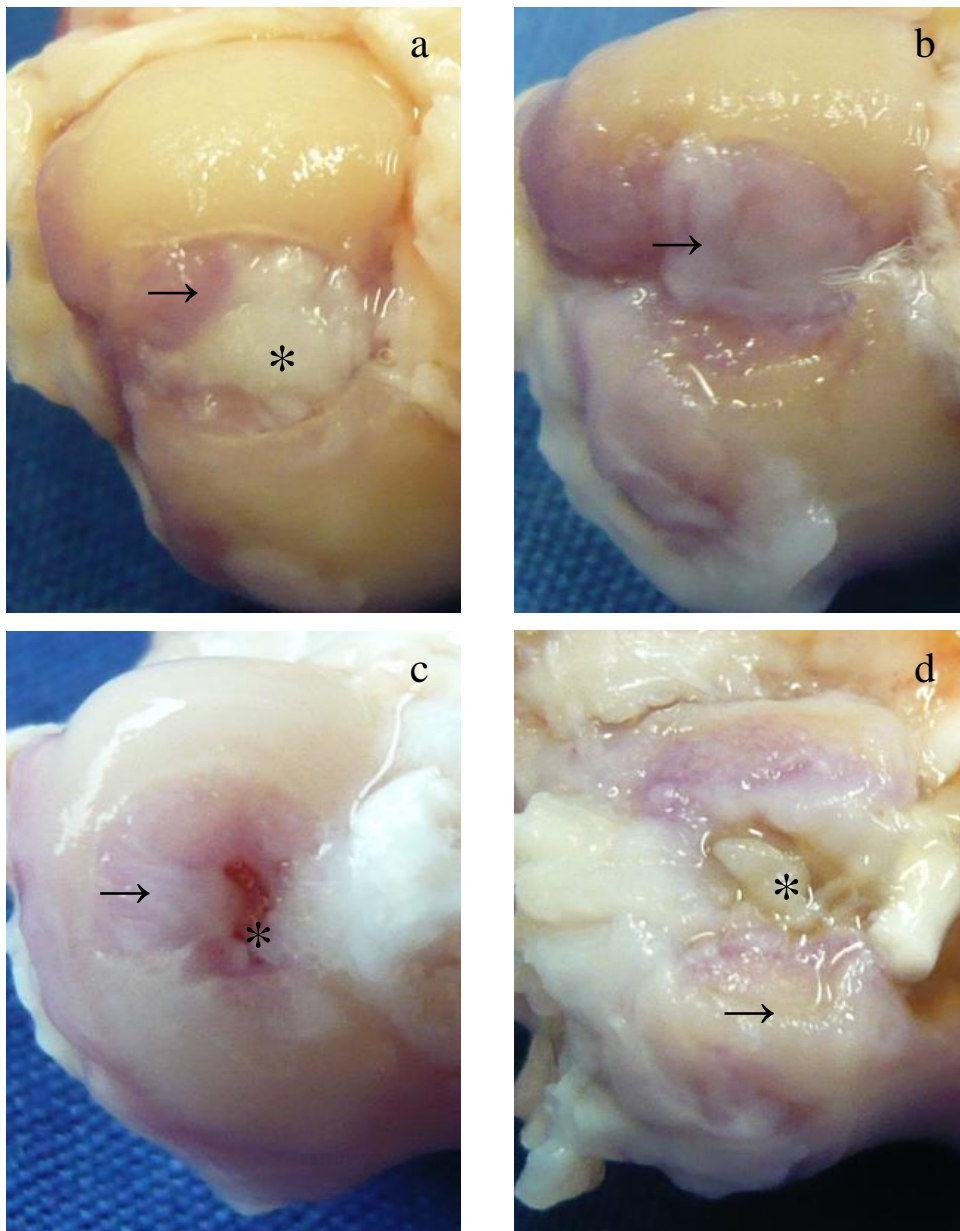


Abbildung 12a-d: Makroskopische Aufnahmen Gruppe TFP;

In **Abb. 12a** erkennt man eine glatte und im Niveau liegende Oberfläche. Diese besteht größtenteils aus einer dicken und relativ hellen Gewebeschicht (*). Teilweise hat eine schlechte Geweberegeneration mit Sicht auf die knöcherne Gelenkfläche stattgefunden (→).

Das nächste Bild (**Abb. 12b**) zeigt eine zum Großteil ebene Gelenkfläche, bestehend aus einem überwiegend homogenem Überzug (→).

Auf der folgenden Aufnahme (**Abb. 12c**) sieht man in der Peripherie eine sehr gut erfolgte Regeneration mit hochwertiger planer Oberfläche (→). Zum Zentrum hin zeigt sich aber eine Verschlechterung der Regeneration, mit tief reichendem Restdefekt (*).

Das abschließende Foto der Versuchsgruppe TFP (**Abb. 12d**) gleicht einer Destruktion der Kondyle und zeigt eine unregelmäßige Oberfläche, bestehend aus einem eher minderwertigem Geweberegenarat (*). Insgesamt ist bei dieser Kondyle sehr viel Bindegewebe vorhanden, daher ist eine Abgrenzung zum gesunden Knorpel schwierig (→).

3.1.3 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP

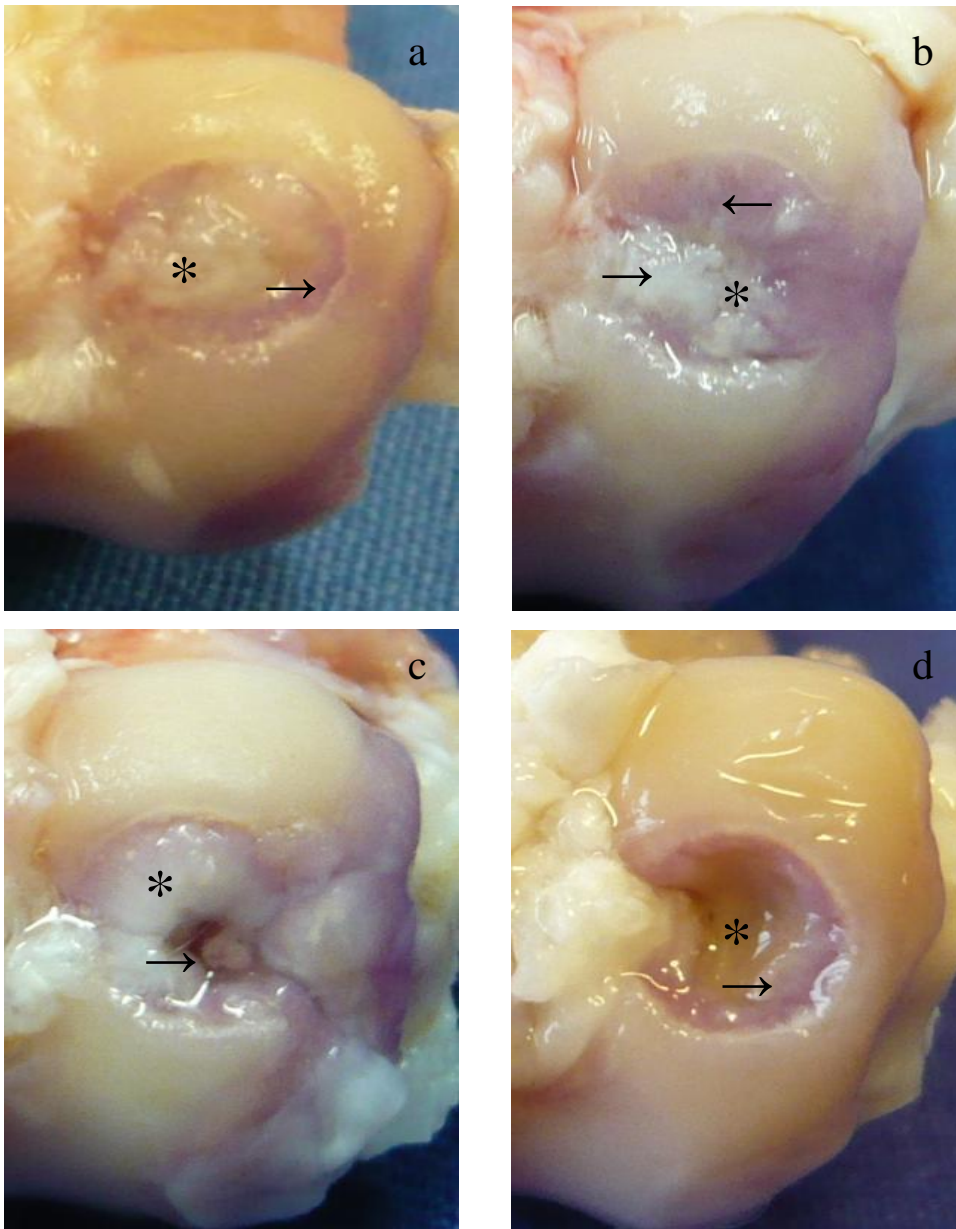


Abbildung 13a-d: Makroskopische Aufnahmen Gruppe TFP+PRP;

Bei dem ersten Gelenk (**Abb. 13a**) hat insgesamt eine gute Regeneration stattgefunden. Zentral ähnelt die Gelenkoberfläche dem gesunden Knorpel (*). Peripher besteht gebietsweise nur ein dünnerer Gewebeüberzug (→).

Auf **Abb. 13b** sieht man eine leicht höhengeminderte und unregelmäßige Oberfläche (*). Etwa die Hälfte des ursprünglichen Defekts ist von einer relativ dicken Bindegewebsschicht bedeckt (→). Die andere Hälfte weist ein wesentlich dünneres Geweberegenerat auf (←).

Die nächste Aufnahme (**Abb. 13c**) zeigt peripher eine gute Regeneration der Gelenkfläche (*), zentral ist jedoch ein tiefer Restdefekt zurückgeblieben (→).

Die Femurkondyle in **Abb. 13d** zeigt einen im Niveau herabgesetzten großen Defekt (*). Auch peripher hat nur eine geringe Regeneration stattgefunden (→).

3.1.4 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP + Zellen

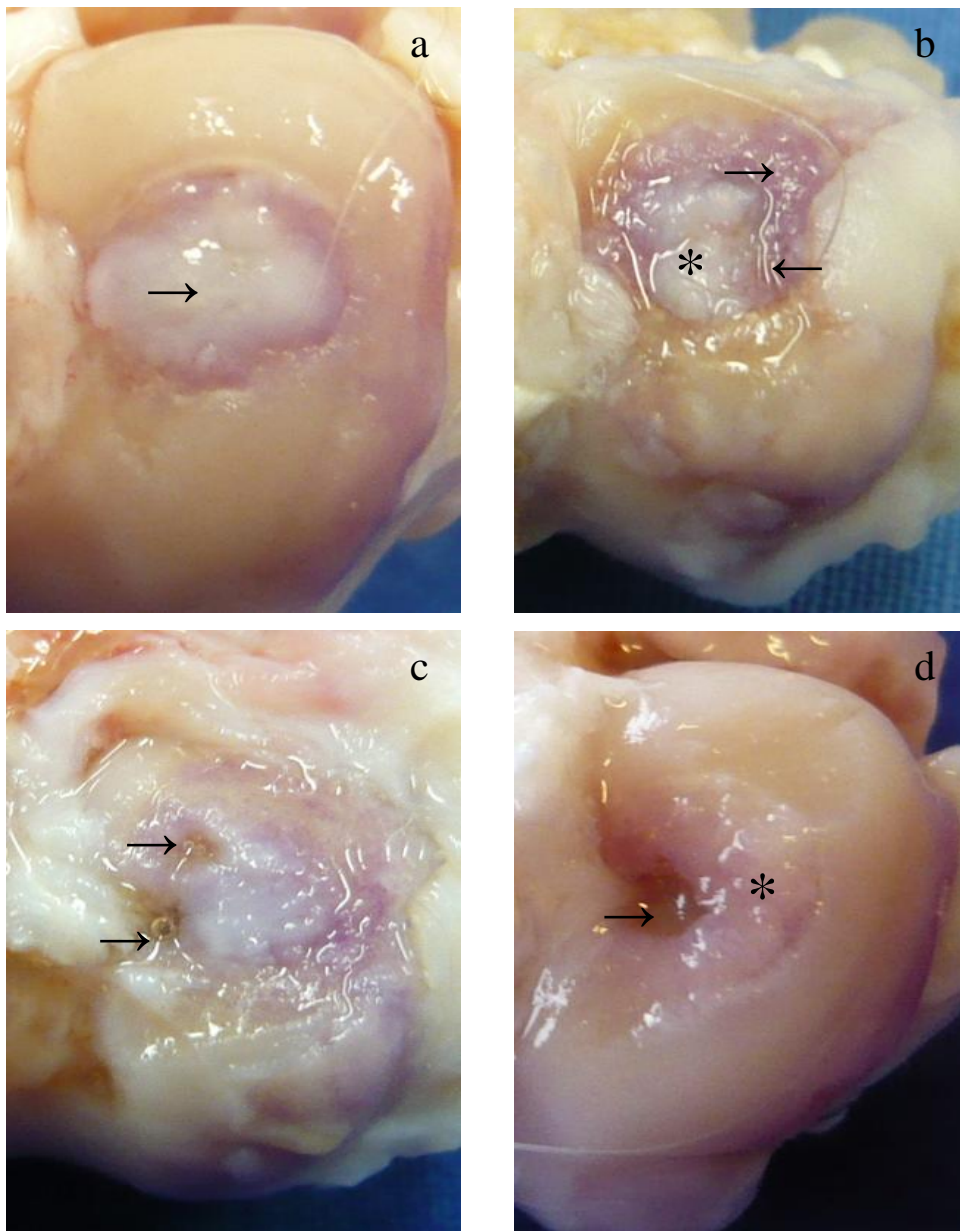


Abbildung 14a-d: Makroskopische Aufnahmen Gruppe TFP+PRP+C;

Abb. 14a zeigt ein Gelenk eines gut regenerierten Defekts mit glatter Oberfläche. Diese besteht aus einem hellen und möglicherweise knorpelähnlichen Gewebe (→). Im nächsten Bild (**Abb. 14b**) erkennt man eine überwiegend im Niveau liegende, unregelmäßige Gelenkoberfläche (←). In der Mitte ist eine bessere (*), am Rand eine weniger gute Regeneration erfolgt (→).

Die Femurkondyle in **Abb. 14c** besitzt größtenteils eine im Niveau befindliche, allerdings teils unebene Oberfläche mit kleinen Einkerbungen (→). Das Oberflächenmaterial ist heterogen und unterschiedlich dick.

Auf **Abb. 14d** sieht man peripher eine sehr gut abgelaufene Regeneration. Die hochwertige Oberfläche ist hier glatt und liegt auf Höhe mit dem gesunden Knorpel (*). Zentral befindet sich ein tiefer Restdefekt (→).

3.2 Mikroradiographien

3.2.1 Knochenfläche

Die TFP-Gruppe zeigt im peripheren Bereich eine signifikant erhöhte Knochenfläche (12,5% größer) im Vergleich zur LFK ($p < 0,05$), siehe Abbildung 15. Auch die beiden anderen Gruppen, die mit einem TruFit®-Plug therapiert wurden (TFP+PRP und TFP+PRP+C), weisen peripher eine höhere Knochenfläche als die LFK auf. Hier sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Die Leerdefekte zeigten in den peripheren Bereichen ebenfalls einen guten Heilverlauf ohne signifikanten Unterschied zur LFK.

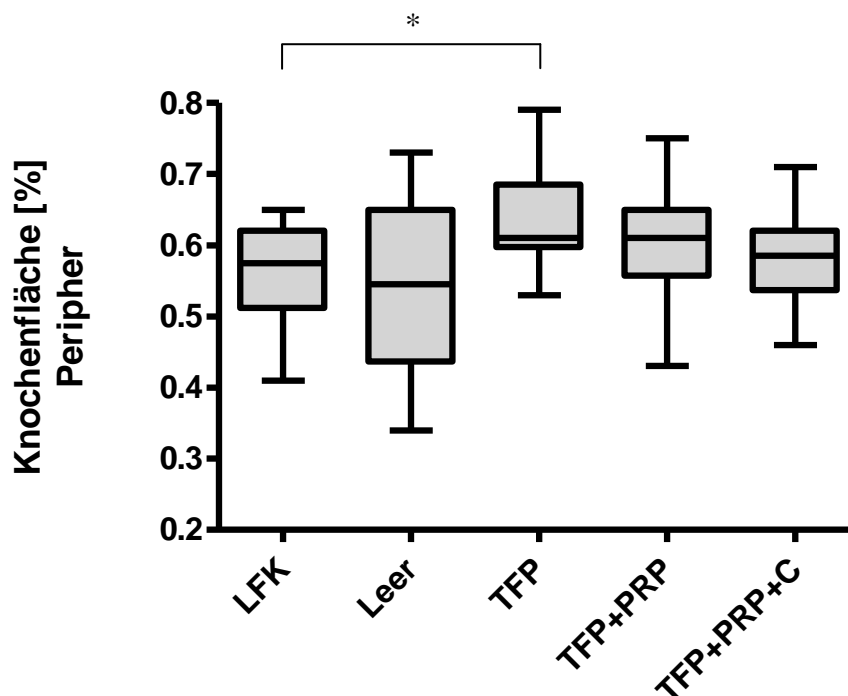


Abbildung 15: Knochenfläche peripher;

* : signifikante Unterschiede zwischen LFK und TFP.

Im zentralen Defektbereich treffen die Beobachtungen, die im peripheren Defektbereich gemacht wurden, nicht mehr zu (Abb. 16). Hier besitzt die LFK in Bezug zu den anderen Versuchsgruppen die größte Knochenfläche.

Eine deutlich erniedrigte Knochenfläche findet sich bei der Gruppe Leer ($p < 0,01$). Die Knochenfläche ist bei dieser Versuchsgruppe gegenüber der LFK um 18% geringer ausgebaut. Die Knochenfläche der therapierten Versuchsgruppen ist zwar tendenziell geringer als bei der LFK, allerdings sind diese Unterschiede nicht signifikant.

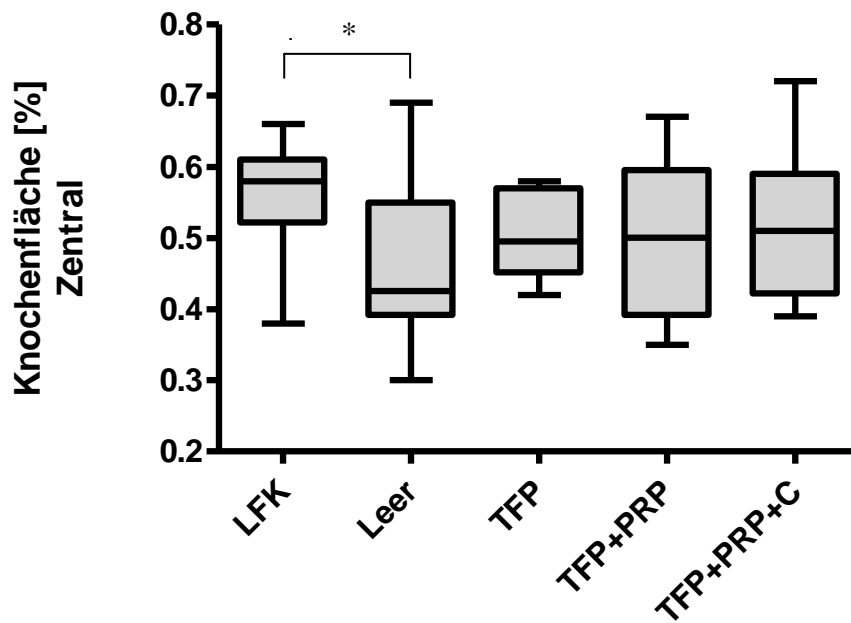


Abbildung 16: Knochenfläche zentral;
 * : signifikante Unterschiede zwischen LFK und Leer.

3.2.2 Trabekuläre Dicke

Bei der Untersuchung der Trabekeldicke im peripheren Defektareal ließen sich keine Signifikanzen ermitteln (Abb. 17).

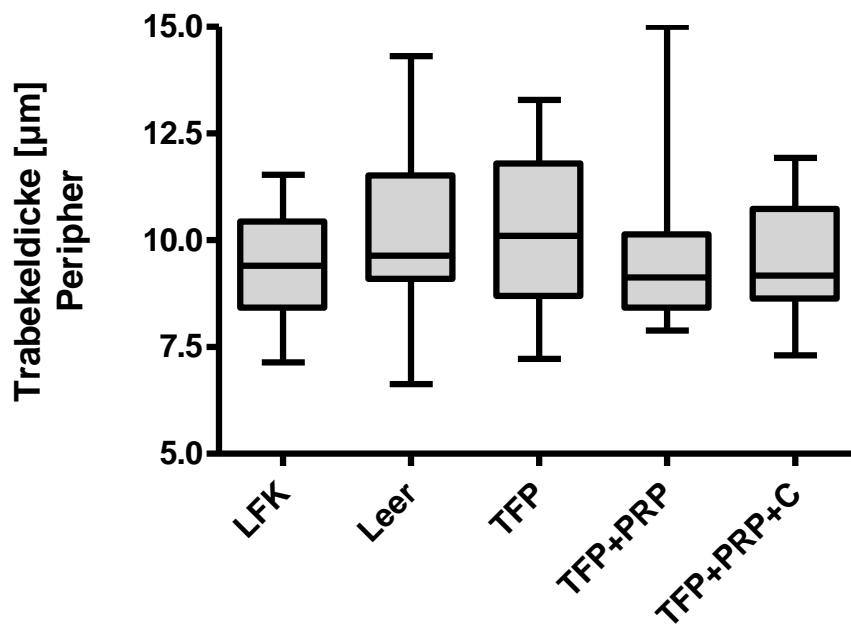


Abbildung 17: Trabekeldicke peripher

Betrachtet man hingegen den zentralen Bereich (Abb. 18) so ergibt sich für die TFP+PRP-Gruppe eine reduzierte Trabekeldicke (15% geringer) im Vergleich zu der LFK ($p < 0,01$). Die TFP- und die TFP+PRP+C-Gruppen verhalten sich hingegen ähnlich wie die Gruppe Leer und LFK.

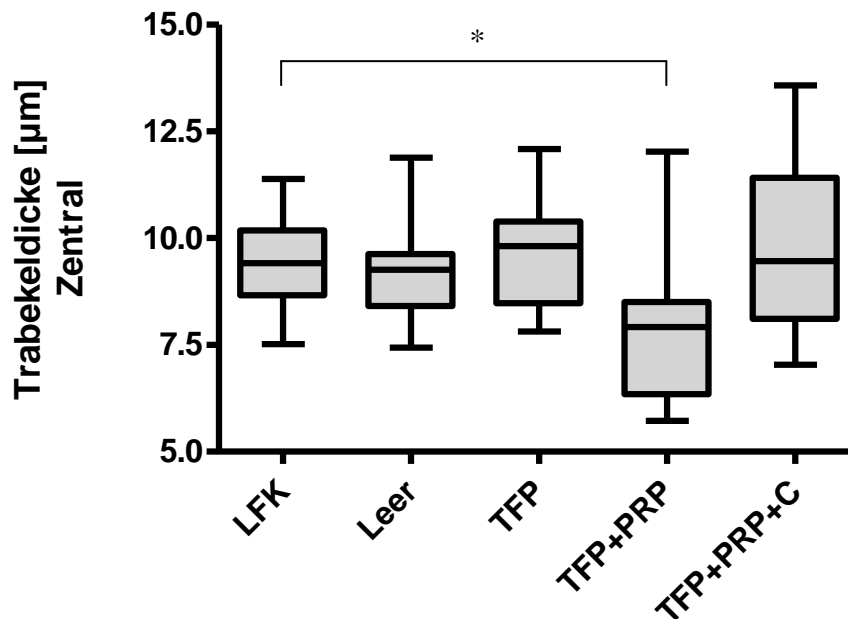


Abbildung 18: Trabekeldicke zentral;

* : signifikante Unterschiede zwischen LFK und TFP+PRP.

3.2.3 Anzahl trabekulärer Verbindungen

Bei der Betrachtung der peripheren Trabekelverbindungen zeigen sich für die Gruppe Leer deutlich weniger Trabekelkreuzungen als bei der LFK ($p < 0,05$), siehe Abbildung 19. Die 3 TruFit®-Plug-Versuchsgruppen (TFP, TFP+PRP und TFP+PRP+C) besitzen hingegen allesamt erhöhte Durchschnittswerte in Bezug zur LFK. Signifikant sind diese Unterschiede dabei nicht.

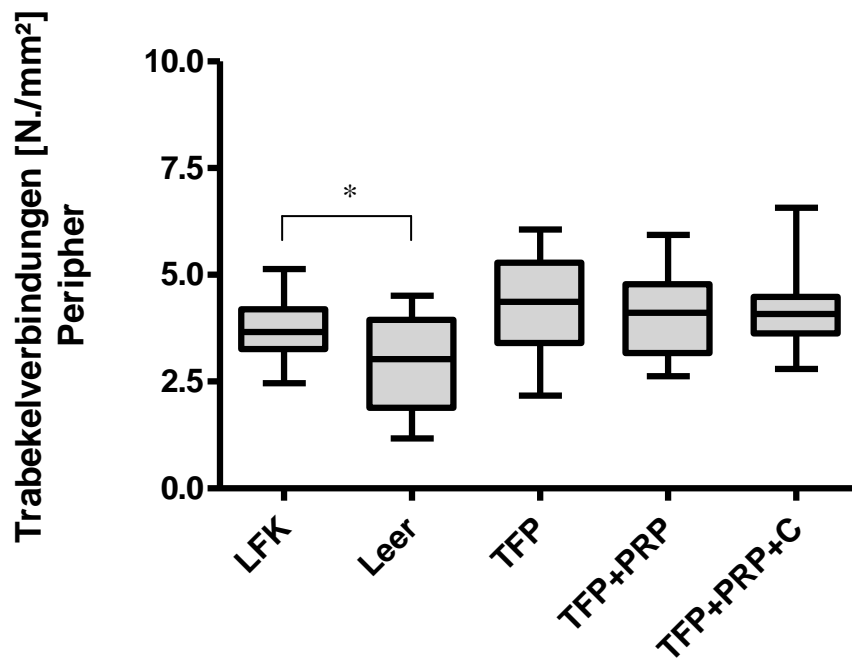


Abbildung 19: Trabekelverbindungen peripher;

* : signifikante Unterschiede zwischen LFK und Leer; [N./mm²] = Anzahl Trabekelverbindungen pro Quadratmillimeter.

Die Analyse im Zentrum des Defekts (Abb. 20) zeigt für die TFP+PRP-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl an trabekulären Verbindungen ($p < 0,05$). Die Summe der Trabekelkreuzungen ist hier durchschnittlich um 23% höher als die der Gruppe LFK. Die Leer-Gruppe besitzt zentral tendenziell die geringste Summe an Trabekelkreuzungen ($p > 0,05$).

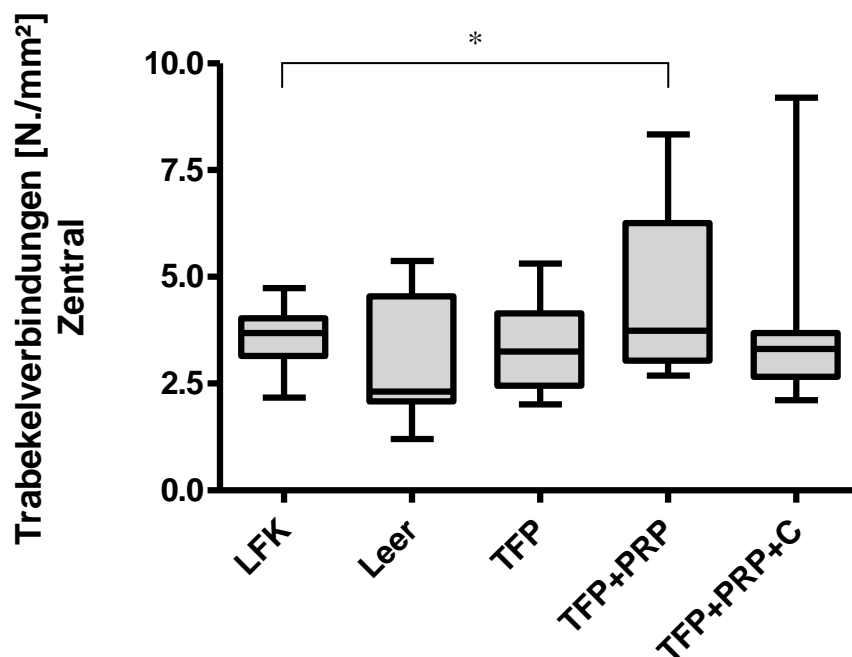


Abbildung 20: Trabekelverbindungen zentral;

* : signifikante Unterschiede zwischen LFK und TFP+PRP; [N./mm²] = Anzahl Trabekelverbindungen pro Quadratmillimeter.

3.2.4 Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur

Die Untersuchung der mikroradiographischen Schnitte in Bezug auf die Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur ergab die in Tabelle 9 aufgelisteten Werte. Im peripheren Implantatbereich erfolgte die Regeneration der knöchernen Gelenkfläche im Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen annähernd gleich gut. Die knöchernen Gelenkkontur der TFP+PRP-Gruppe war in der Tendenz allerdings weniger gut durchbaut. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Im zentralen Bereich war die Rekonstruktion der Gelenkkontur bei allen Versuchsgruppen schlechter ausgeprägt. Die Gruppen Leer, TFP und TFP+PRP+C ergaben ähnliche Messwerte. Bei der TFP+PRP-Gruppe hingegen war die Wiederherstellung der knöchernen Gelenkfläche tendenziell häufiger unvollständig. Insgesamt war dieser Unterschied aber nicht signifikant. Der größte Unterschied zeigte sich zwischen den Versuchsgruppen Leer und TFP+PRP ($p = 0,11$).

Betrachtet man die Regeneration in der Peripherie im Vergleich zum Zentrum zusammenfassend, so zeigt sich bei allen Gruppen eine deutlich schlechtere Fähigkeit die subchondrale Schicht zentral zu regenerieren.

Tabelle 9: Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur; p-Wert peri/zent = p-Wert peripher/zentral in Bezug zur Gruppe Leer.

	peripher	p-Wert peri	zentral	p-Wert zent
Leer	11 / 12	-	8 / 12	-
TFP	12 / 12	(0,79)	7 / 12	(0,95)
TFP+PRP	9 / 12	(0,31)	3 / 12	(0,11)
TFP+PRP+C	12 / 12	(0,79)	7 / 12	(0,95)
Gesamt	44 / 48	-	25 / 48	-

3.2.5 Zusammenfassung der Mikroradiographie

Zusammenfassend lassen sich mithilfe der mikroradiographischen Schnitte folgende Aussagen zur knöchernen Regeneration machen.

Bezüglich der Knochenfläche (3.2.1) besitzt die Gruppe TFP im peripheren Defektbereich (Abb. 15) signifikant höhere Messwerte als die Vergleichsgruppe LFK (im Durchschnitt um 12,5%). Im Zentrum des Defekts (Abb. 16) ist die Knochenfläche der Gruppe Leer signifikant erniedrigt (um 18%).

Bei Betrachtung der Trabekeldicke (3.2.2) ergeben sich für die Gruppen in der Peripherie (Abb. 17) keine größeren Unterschiede und somit keinerlei Signifikanzen. Im Zentrum (Abb. 18) besitzt die Trabekeldicke der Gruppe TFP+PRP allerdings um 15% erniedrigte Messwerte.

Hinsichtlich der Anzahl an Trabekelverbindungen (3.2.3) besitzt die Gruppe Leer im peripheren Defektareal (Abb. 19) signifikant reduzierte Messwerte. Im zentralen Areal weist die Gruppe TFP+PRP eine signifikant erhöhte Anzahl trabekulärer Verbindungen auf, die im Schnitt 23% höher ist als in der Gruppe LFK (Abb. 20).

Die Untersuchung der knöchernen Gelenkkontur (3.2.4) zeigt, dass peripher eine deutlich bessere Regeneration stattgefunden hat als zentral. Peripher konnten demnach 92% der Gelenkflächen als regeneriert eingestuft werden, zentral nur 52%.

Während sich die Versuchsgruppen Leer, TFP und TFP+PRP+C in der Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur in etwa entsprachen, zeigte die Gruppe TFP+PRP sowohl peripher als auch zentral, ein deutlich schlechteres Regenerationsverhalten.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind unter 3.2.6 ausgewählte mikroradiographische Aufnahmen von zentralen Schnitten dargestellt. Es zeigen sich hier einige Charakteristika der einzelnen Versuchsgruppen. So sind beispielsweise bei

der Gruppe Leer (Abb. 21a) eine geringere Anzahl Trabekel erkennbar, die letztlich zu einer entsprechend geringen zentralen Knochenfläche geführt haben. Die Gruppe TFP (Abb. 21b) weist eine gute Knochendurchbauung auf, hier allerdings mit einer zentralen Trabekelaussparung. Abb. 21c zeigt die typischen Auffälligkeiten der Versuchsgruppe TFP+PRP, nämlich eine große Anzahl dünner Trabekelstrukturen. Die Aufnahme der Gruppe TFP+PRP+C (Abb. 21d) demonstriert eine gute Regeneration der subchondralen Schicht, wobei eine große Knochenzyste innerhalb der Kondyle zu sehen ist.

Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Mikroradiographie ist im Anhang (Tabelle 12 und 13) unter 6.1 dargestellt.

3.2.6 Mikroradiographische Aufnahmen

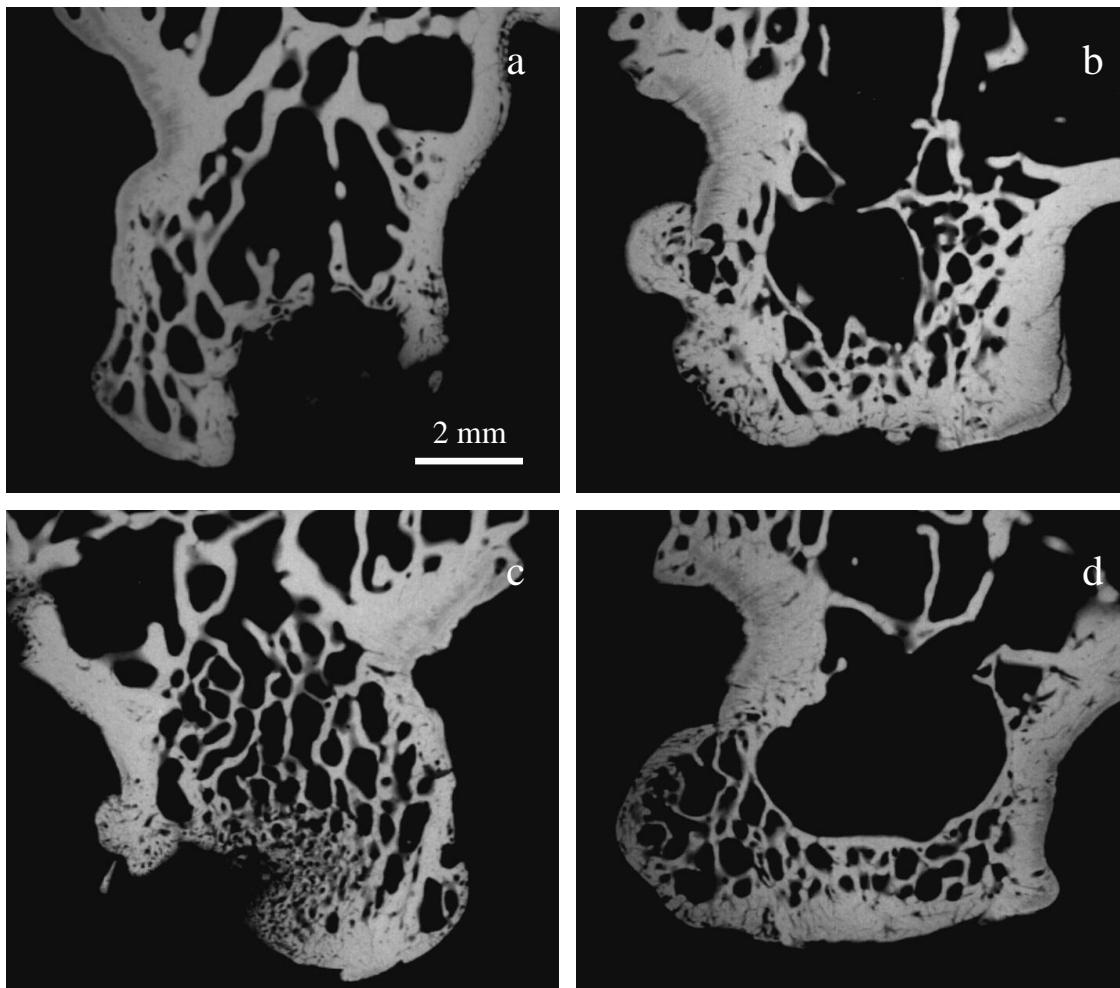


Abbildung 21a-d: Zentrale mikroradiographische Aufnahmen; Referenzstrecke = 2 mm;

In **Abb. 21a** sieht man eine unvollständige knöcherne Rekonstruktion der Kondyle eines Präparates der Versuchsgruppe Leer. Zum einen ist die knöcherne Oberflächenkontur kaum rekonstruiert, zum anderen finden sich auch im Zentrum wenige Trabekelstrukturen.

Abb. 21b zeigt ein Präparat der Gruppe TFP. Man erkennt eine weitestgehend gute knöcherne Durchbauung, aber auch eine unregelmäßige Wiederherstellung der knöchernen Gelenkfläche und eine zentrale Trabekelaussparung.

Bei der Versuchsgruppe TFP+PRP in **Abb. 21c** erkennt man eine unvollständige Rekonstruktion der Gelenkfläche mit medialem Restdefekt. Auffallend ist hier eine große Anzahl dünner Trabekel.

Die Gruppe TFP+PRP+C (**Abb. 21d**) zeigt eine gute knöcherne Rekonstruktion der Gelenkfläche. Zentral ist jedoch eine große subchondrale Zyste verblieben.

3.3 Scores

Bei der Beurteilung der osteochondralen Regeneration ergaben sich weder im Score nach Wakitani, noch im O'Driscoll-Score, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (siehe Abbildung 22 und 23). Dabei konnte die Gruppe TFP+PRP+C in beiden Scores tendenziell höhere Punktzahlen erzielen. Die Gruppen TFP und TFP+PRP erreichten jeweils die geringste Punktzahl. Auch bei der Streuung der erzielten Messwerte sind die Ergebnisse der beiden Scores deckungsgleich. Hier besitzt die Versuchsgruppe Leer die größte, und die Gruppe TFP+PRP+C die kleinste Standardabweichung.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Scores findet sich in Tabelle 14 unter 6.2. Die erreichten Punkte in den einzelnen Bewertungskriterien der Scores sind in Tabelle 15 und 16 unter 6.3 aufgeführt.

3.3.1 Wakitani-Score

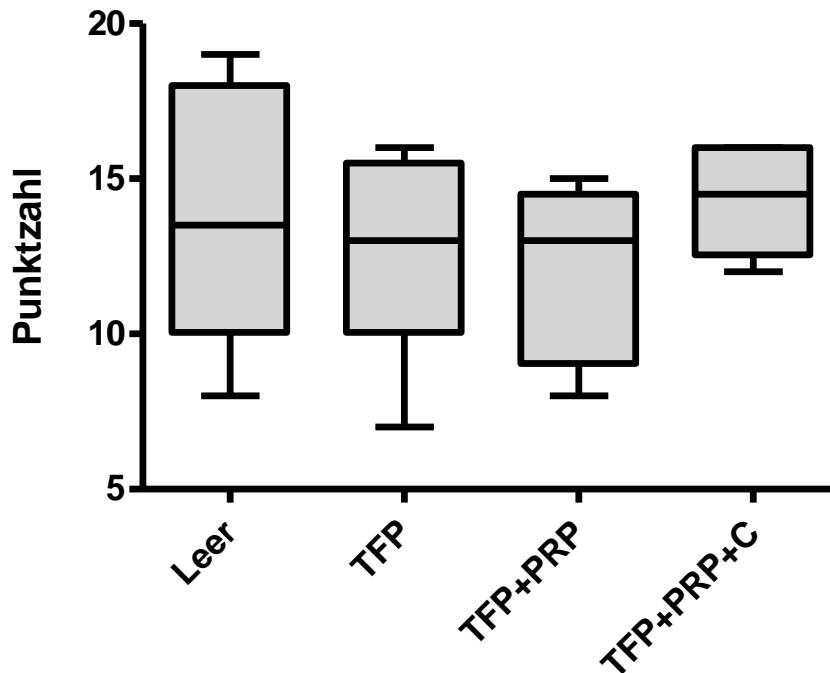


Abbildung 22: Punktzahlen Wakitani-Score

Tabelle 10: Punktzahlen der Kniegelenke im Wakitani-Score; Mittelw. = Mittelwert; Std.abw. = Standardabweichung; p-Wert = p-Wert in Bezug zur Gruppe Leer.

Kniegelenk	1	2	3	4	5	6	Mittelw.	Std.abw.	p-Wert
Leer	8	19	17	14	12	13	13,8	3,9	-
TFP	13	16	13	13	7	15	12,8	3,1	0,88
TFP+PRP	15	14	13	10	13	8	12,2	2,6	0,64
TFP+PRP+C	16	15	14	16	12	13	14,3	1,6	0,98

3.3.2 O'Driscoll-Score

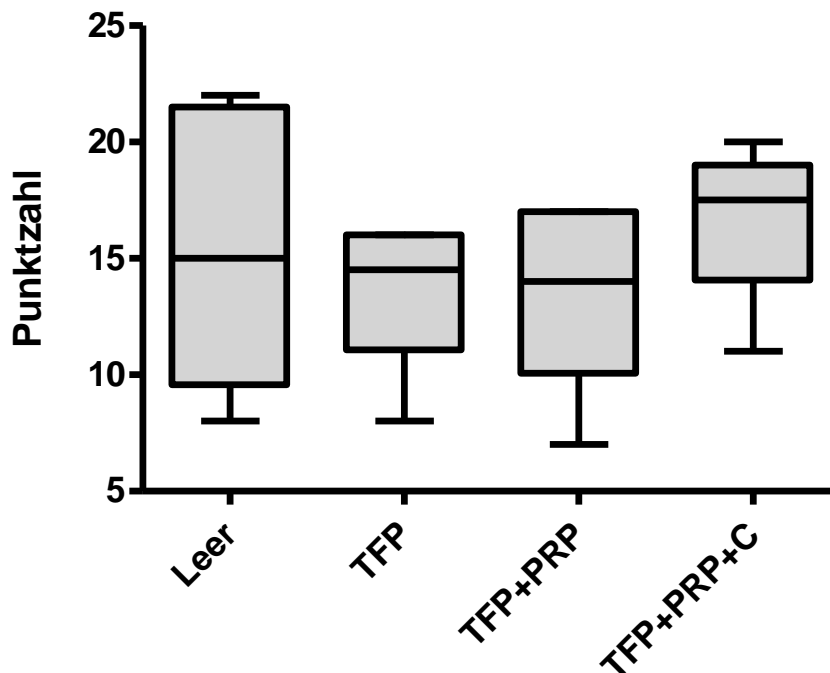


Abbildung 23: Punktzahlen O'Driscoll-Score

Tabelle 11: Punktzahlen der Kniegelenke im O'Driscoll-Score; Mittelw. = Mittelwert; Std.abw. = Standardabweichung; p-Wert = p-Wert in Bezug zur Gruppe Leer.

Kniegelenk	1	2	3	4	5	6	Mittelw.	Std.abw.	p-Wert
Leer	8	22	21	16	11	14	15,3	5,5	-
TFP	14	15	16	14	8	16	13,8	3,0	0,85
TFP+PRP	17	17	14	13	14	7	13,7	3,7	0,81
TFP+PRP+C	18	17	20	18	11	17	16,8	3,0	0,85

3.4 Fluoreszenzmarkierung

Dargestellt sind die digitalisierten Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Präparate mit einer anschließenden Beschreibung (siehe 3.4.1 – 3.4.4). Für jede Versuchsgruppe wurde exemplarisch ein zentraler Schnitt von 4 verschiedenen Kniegelenken ausgewählt.

Insgesamt haben die Kaninchen die Fluoreszenzfarbstoffe gut aufgenommen und in den Knochen integriert. In der Regel sind diese Farbstoffe gut voneinander zu unterscheiden, auch wenn sie sich häufig miteinander vermischen. Die praktische

Durchführung der Fluoreszenzmarkierung war somit erfolgreich. Zusammengefasst können daher folgende Aussagen zur zeitlichen Abfolge der Knochenregeneration gemacht werden:

Die proximal gelegenen Trabekelstrukturen sind tendenziell am ehesten entstanden, etwa in den ersten 5 Monaten des Tierversuchs. Ebenso die Trabekel lateral und medial (siehe beispielsweise Abb. 24c). Sie sind ebenfalls überwiegend in den ersten 5 Monaten der Versuchsdauer gebildet worden und somit unmarkiert. Dennoch besitzen sie auf ihrer Oberfläche fast allesamt Fluoreszenzfarbstoffe, als Zeichen dass die Knochenstrukturen im zweiten Halbjahr einem weiteren Umbau unterlagen. Bei den lateralen und medialen Anteilen der subchondralen Schicht verhält es sich ähnlich (Abb. 26d). Sie sind zumeist früh entstanden (überwiegend im 1. Halbjahr) und nur sehr gering markiert worden. Diese geringe Markierung weist, wie bei den oberflächlich gefärbten Trabekelstrukturen, auf spätere Umbauvorgänge hin. Das Zentrum des ehemaligen Defekts beziehungsweise des Implantats sowie die distalen Anteile der subchondralen Schicht sind insgesamt zeitlich am jüngsten. Diese Bereiche haben als ersten Farbstoff meist Calcein-Grün aufgenommen und sind somit frühestens kurz vor dem 7. Monat entstanden (siehe Abb. 27a). Der Farbstoff Xylenol-Orange als Zeichen einer noch früheren Regeneration der zentralen Areale ist selten erkennbar (zum Beispiel auf Abb. 24c und 25c). Allerdings könnte dieser orange wirkende Farbeffekt auch aus einer Durchmischung der Farbstoffe Tetracyclin und Alizarin-Komplexon entstanden sein. Häufig hat in den zentralen und distalen Bereichen der Knochenaufbau bis zum Ende der Versuchsdauer stattgefunden, erkennbar an dem gelben Farbstoff Tetracyclin (siehe Abb. 24d, 26a+b). Vorwiegend sind diese Areale selten einfarbig, sondern weisen verschiedene Fluoreszenzmarkierungen auf als Zeichen zahlreicher Umbauvorgänge des Knochens im Anschluss an die ursprüngliche Entstehung.

Bei einigen Präparaten lässt sich gut nachvollziehen, wie die Regeneration zeitlich konstant von proximal, medial und lateral nach zentral und distal stattgefunden hat, erkennbar an der Bandenfärbung grün, rot und gelb (siehe Abb. 26a+b). Diese konstante bzw. zeitlich kontinuierliche Regeneration hat aber keinen erkennbar positiven Einfluss auf die allgemeine Knochendurchbauung.

Unterschiede in der zeitlichen Abfolge der Knochenneubildung zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen waren nicht erkennbar. Jede Versuchsgruppe enthält etwa in gleichem Maße Präparate mit früher und später Knochen-

regeneration. Auch lässt sich keine allgemein gültige Aussage darüber treffen, ob eine frühere Regeneration für die allgemeine Knochendurchbauung von Vorteil ist. Es gibt jedoch Tendenzen, die zeigen, dass eine im Randbereich des Implantats frühe Knochenneubildung zu einer guten Heilung des zentralen Implantatgebietes und dessen Oberfläche führt. Als Beispiel hierfür dienen Abb. 24c, 25b, 26d und 27a.

3.4.1 Versuchsgruppe: Leerdefekt

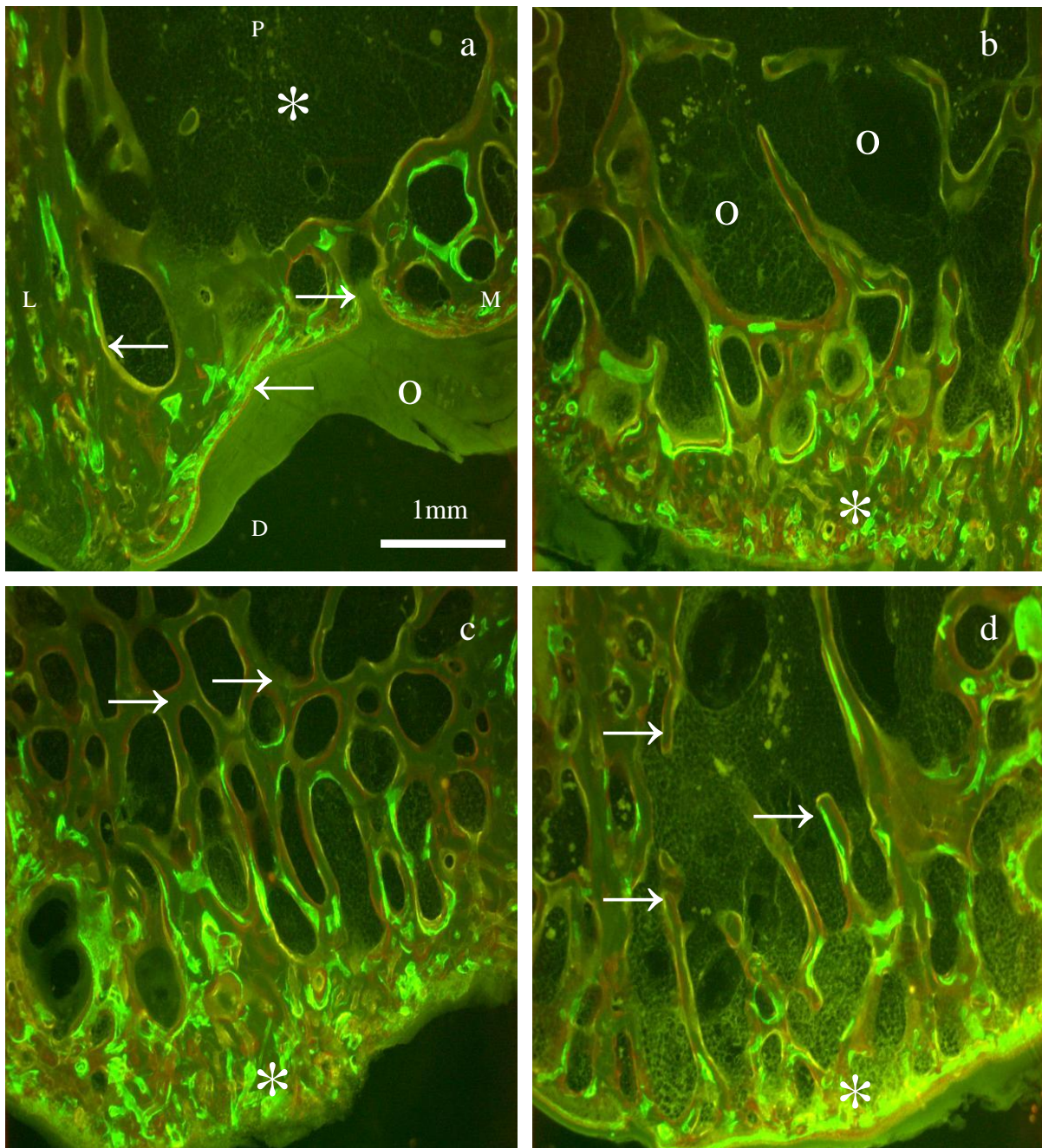


Abbildung 24a-d: Fluoreszenzmarkierung Gruppe Leer; Referenzstrecke = 1 mm; die Größe der Aufnahmen entspricht jeweils 4,0 x 4,4 mm, also in etwa der Defektgröße; D = distal; L = lateral; M = medial; P = proximal; In **Abb. 24a** sieht man eine mäßige knöcherne Regeneration mit einer im Niveau herabgesetzten subchondralen Knochenschicht. In dieser ist eine kleine Lücke erkennbar (→). Weiter proximal liegt eine große Zyste (*). An der Gelenkoberfläche befindet sich eine relativ dicke Gewebeschicht (O). Der größte Anteil an Knochen ist im ersten halben Jahr entstanden und daher unmarkiert. Im zweiten Halbjahr fand vor allem Umbau an der Trabekel- und Gelenkoberfläche statt (←). Beim Gelenk in **Abb. 24b** erkennt man insgesamt eine gute Knochendurchbauung mit stark durchbauter subchondraler Schicht, die fast vollständig im zweiten Halbjahr der Versuchsdauer entstanden ist (*). Proximal befinden sich eher mäßig ausgeprägte Trabekel. Zwischen diesen befinden sich kleinere Zysten (O).

Das Gelenk in **Abb. 24c** zeigt eine sehr gute Knochenregeneration mit ebenfalls sehr gut ausgeprägter subchondraler Knochenschicht, die in der zweiten Hälfte des Experiments entstanden ist (*). Proximal finden sich zahlreiche zeitlich eher entstandene Trabekelstrukturen (→).

Das nächste Präparat (**Abb. 24d**) besitzt eine relativ spät entstandene und vergleichsweise dünne subchondrale Knochenschicht (*). Weiter proximal gibt es relativ wenige Trabekel mit geringer Anzahl von Trabekelverbindungen (→).

3.4.2 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug

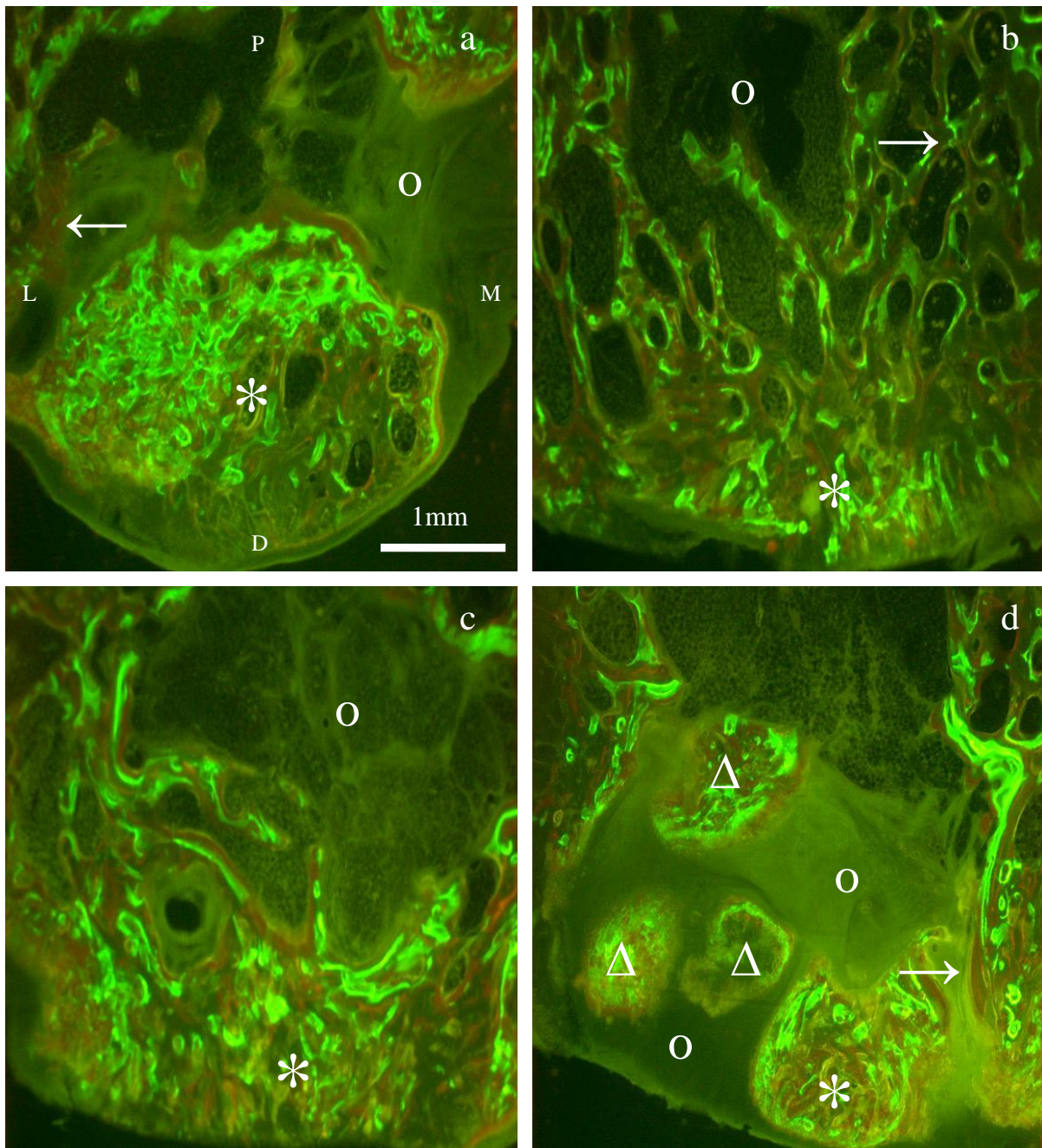


Abbildung 25a-d: Fluoreszenzmarkierung Gruppe TFP; Referenzstrecke = 1 mm; die Größe der Aufnahmen entspricht jeweils 4,0 x 4,4 mm, also in etwa der Defektgröße; D = distal; L = lateral; M = medial; P = proximal; Die erste Aufnahme (**Abb. 25a**) zeigt eine mäßige knöcherne Durchbauung mit einem großen Knochenkern, der die Gelenkfläche bildet (*). Der distale Anteil des Knochenkerns wurde zeitlich früher gebildet als der proximale Anteil. Dieser ist medial bindegewebig (o) und lateral teilweise knöchern mit den weiter oben liegenden Knochenstrukturen verbunden (←). Im folgenden Präparat (**Abb. 25b**) hat insgesamt eine sehr gute Knochenregeneration stattgefunden. Es ist eine dicke subchondrale Schicht vorhanden (*), proximal befinden sich viele untereinander verbundene Trabekel (→). Lediglich eine kleine Zyste unterbricht die Trabekelstrukturen (O). Die Farbverteilung in diesem Präparat ist homogen.

Auch beim Gelenk in **Abb. 25c** sieht man eine gute Knochendurchbauung mit gut ausgebauter subchondraler Schicht (*). Proximal gibt es aufgrund einer Zyste eher weniger Trabekel (O). Eine besondere zeitliche Abfolge der Knochenbildung ist nicht zu erkennen.

In **Abb. 25d** erkennt man eine schlechte Knochenregeneration mit zahlreichen Knocheninseln (Δ). Diese sind bindegewebig miteinander verbunden (O). Eine einheitliche subchondrale Knochenschicht ist nicht vorhanden, lediglich der mediale Knochenkern bildet eine solche Schicht aus (*). Medial entstand am Versuche eine Knochenbrücke zwischen der Knocheninsel und dem angrenzenden Knochen (\rightarrow), erkennbar an der Bandenfärbung rot und gelb.

3.4.3 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP

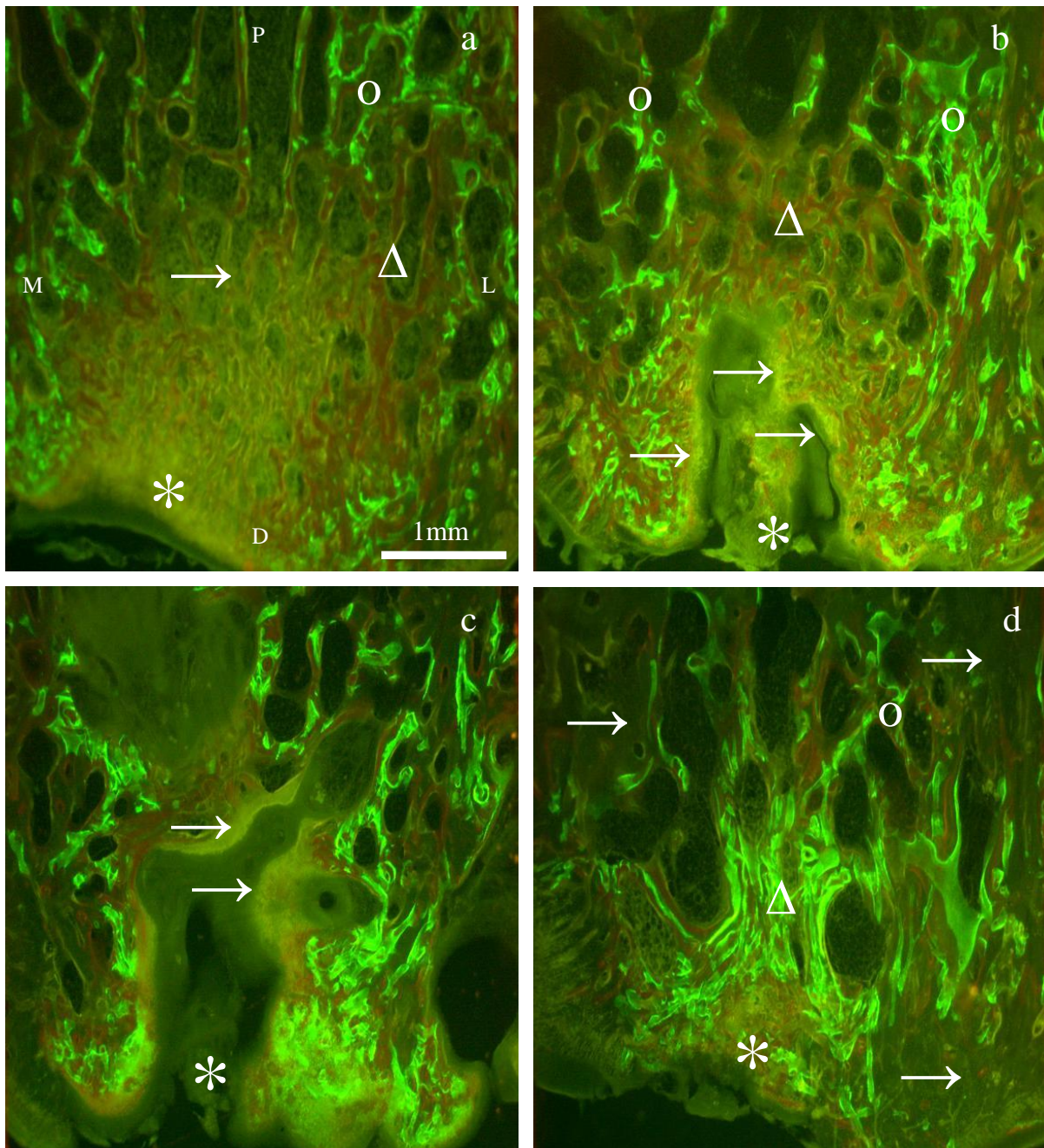


Abbildung 26a-d: Fluoreszenzmarkierung Gruppe TFP+PRP; Referenzstrecke = 1 mm; die Größe der Aufnahmen entspricht jeweils 4,0 x 4,4 mm, also in etwa der Defektgröße; D = distal; L = lateral; M = medial; P = proximal;

Auf **Abb. 26a** sieht man insgesamt eine sehr gute Knochenregeneration mit durchgängiger subchondraler Schicht (*). Bei diesem Gelenk ist eine konzentrische Farbaufteilung zu erkennen: Grün größtenteils medial, lateral und proximal (O); zum Zentrum hin zunehmend Rot (Δ); distal vor allem Gelb. Dies entspricht einer konstanten Knochenbildung von außen nach innen. Ein Großteil der subchondralen Schicht ist erst kürzlich entstanden und befindet sich weiter im Aufbau, erkennbar an der gelben Färbung (*). Auffallend sind die zahlreichen kleinen Trabekel, besonders im Zentrum des ehemaligen Defekts (\rightarrow).

Bei dem nächsten Kniegelenk (**Abb. 26b**) fiel die Knochendurchbauung eher mäßig aus, mit einem größeren Defekt in der subchondralen Knochenschicht (*). Wie im

Präparat zuvor ist hier ein Farbmuster erkennbar: Außenbereiche vornehmlich grün gefärbt (O); zum Zentrum und zur Gelenkoberfläche zunehmend Rot (Δ); distal vor allem Gelb. Der Knochen an den Rändern des Defektspaltes wurde erst kürzlich gebildet (\rightarrow). Auch in diesem Gelenk dominieren zahlreiche kleinere Trabekel.

Abb. 26c zeigt ein Gelenk mit schlechter Knochenheilung und einer großen Unterbrechung der subchondralen Schicht (*). Die gelb gefärbte Knochenoberfläche im Defektspalt deutet auf stattfindenden Knochenaufbau hin (\rightarrow).

In der folgenden Aufnahme (**Abb. 26d**) sieht man eine gute Regeneration der Trabekelstruktur (o). In der ansonsten gut ausgeprägten subchondralen Schicht befindet sich ein oberflächlicher Restdefekt (*). Der zentrale Defektbereich ist auffallend grün gefärbt und wurde somit in der zweiten Hälfte des Jahres gebildet (Δ). Die peripheren Bereiche sind zeitlich früher entstanden (\rightarrow).

3.4.4 Versuchsgruppe: TruFit®-Plug + PRP + Zellen

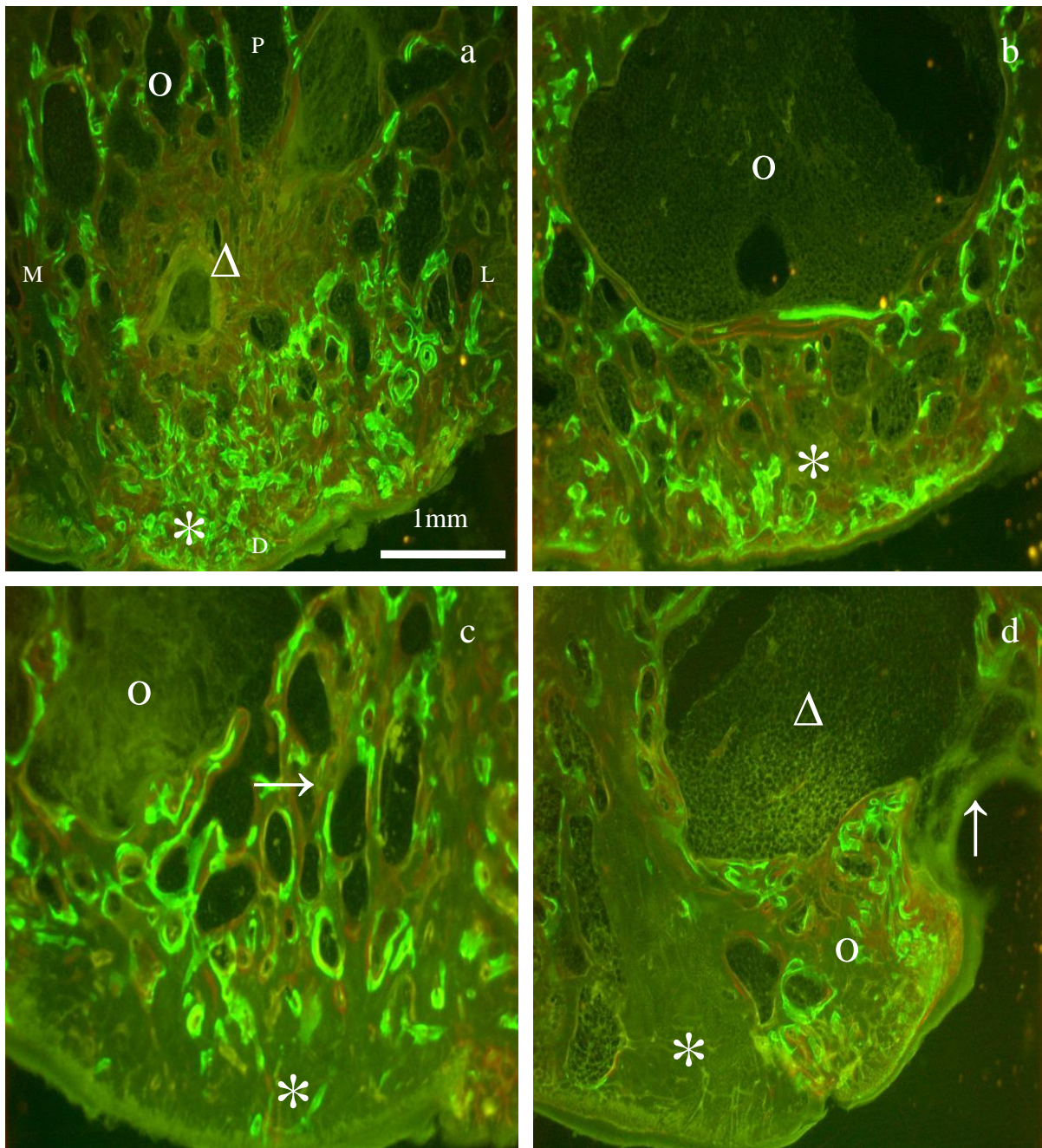


Abbildung 27a-d: Fluoreszenzmarkierung Gruppe TFP+PRP+C; Referenzstrecke = 1 mm; die Größe der Aufnahmen entspricht jeweils 4,0 x 4,4mm, also in etwa der Defektgröße; D = distal; L = lateral; M = medial; P = proximal;

Auf **Abb. 27a** ist eine gut ausgeprägte Knochenstruktur mit dicker subchondraler Schicht (*) und zahlreichen Trabekeln (O) zu sehen. Das einstige Implantatzentrum ist zeitlich am jüngsten, erkennbar an der gelben Färbung (Δ). Es ist eine konzentrische Farbanordnung von außen nach innen vorhanden.

Im nächsten Bild (**Abb. 27b**) hat zum Großteil eine gute Knochenregeneration stattgefunden. Das Gelenk besitzt eine breite subchondrale Knochenschicht (*) und eine sehr große Gelenkzyste (O). Aus diesem Grund sind proximal kaum Trabekel vorhanden. Der zeitliche Ablauf der Knochenheilung verlief hier ohne Besonderheiten.

In der folgenden Aufnahme (**Abb. 27c**) erkennt man eine gut stattgefundene Knochenheilung mit einer relativ früh entstandenen subchondralen Knochenschicht (*) und gut ausgebildeten Trabekeln (→). Lediglich eine kleinere Zyste unterbricht die Trabekelstrukturen (O).

Das letzte Präparat (**Abb. 27d**) stammt von einem Gelenk mit mäßiger Knochen-durchbauung und einer größeren Gelenkzyste (Δ). Die subchondrale Schicht ist medial früh entstanden (*), wohingegen die lateralen Anteile erst später gebildet wurden (o). Eine Lücke unterbricht die knöchernen Gelenkkontinuität (↑).

4. Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Tiermodell

Für die vorliegende Studie wurden 12 erwachsene Kaninchen (24 Kniegelenke) verwendet. Das Kaninchen hat sich unter Berücksichtigung des Tierschutzes als Versuchstier bewährt und ist bei Untersuchungen von Knorpeldefekten am Kniegelenk ein sehr häufig verwendetes Tier (Gomar-Sancho und Gastaldi Orquin 1987; Im et al. 2001; Müller et al. 2006; Yan und Yu 2007), wobei die Gründe hierfür vielfältig sind.

Die einfache Handhabung der Tiere ist ein bestimmender Gesichtspunkt für die Wahl. Speziell die einfache Möglichkeit, den Tieren ausreichend Bewegungsfreiraum bereitzustellen, prädestiniert sie für Untersuchungen am Bewegungsapparat.

Die Beschränkung auf adulte Tiere liegt in der Tatsache begründet, dass im Wachstum befindliche Kaninchen eine höhere Heilungstendenz aufweisen und somit die Ergebnisse der untersuchten Knochen- sowie Knorpelregeneration verfälschen könnten (Wei et al. 1997).

Die Versuchsdauer von 12 Monaten wurde gewählt, da aus tierexperimentellen Studien bei der Zelltherapie von Knorpeldefekten bekannt ist, dass besonders in den ersten 6 Monaten ein zunehmender Umbau von zunächst entstehender faserartiger Matrix zu hyalinem Knorpel stattfindet (Breinan et al. 2001). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass nach 12 Monaten das Knorpelregenerat keinem relevantem Umbauprozess mehr unterliegt.

Für dieses Experiment wurde ein vollschichtiger Knorpel-Knochendefekt, also ein Defekt mit vollständiger Zerstörung des Knorpels und der darunter liegenden Knorpelschicht, gewählt. Solche osteochondralen Defekte gehen in Gegensatz zu Defekten mit intakter subchondraler Schicht mit anderen Eigenschaften und Therapieoptionen einher (siehe hierzu 1.5). Zudem wurde mit einem Defektdurchmesser von 4,5 mm, bezogen auf die mediale Femurkondyle eines Kaninchens, ein sogenannter *critical-size-defect* gesetzt, welcher nur mit einer geringen spontanen Heilungstendenz einhergeht (Yan und Yu 2007). In einigen anderen Untersuchungen mit adulten Kaninchen zeigten auch kleinere Defekte mit einem Durchmesser von 3 mm lediglich schlechte Spontanheilungstendenzen (Messner und Gillquist 1993; Wei et al. 1997).

Die Ergebnisse dieses Tiermodells am Kaninchen können Hinweise für die Therapie von Knorpel-Knochendefekten liefern. Sie sind allerdings wie alle Tierversuche mit Einschränkungen zu bewerten, da keine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen möglich ist.

4.1.2 Implantat

TruFit®-Implantate wurden im Herbst 2006 in Deutschland eingeführt. Die ursprüngliche Indikation bestand in der Füllung von Defekten, die bei der Transplantation von osteochondralen Zylindern entstehen, wie von Barber und Chow beschrieben (Barber und Chow 2006). Demnach könnte die Entnahmemorbidität nach Transplantation von autologen osteochondralen Zylindern reduziert werden (Bedi et al. 2010; Voß 2010).

Mittlerweile sind TruFit®-Plugs auch für kleine chondrale oder osteochondrale Defekte indiziert (Filardo et al. 2013). Ein Vorteil der TruFit®-Plugs ergibt sich in der Möglichkeit, sie für eine *single-step*-basierte Knorpelzelltherapie zu nutzen (Filardo et al. 2013). Außerdem konnten *in vitro*-Ergebnisse zeigen, dass eine Matrix, die aus einem Gemisch von PLA und PGA und zusätzlichen PGA-Fasern besteht, mechanisch optimal für den Gebrauch als Knorpelersatzmaterial dienen kann (Slivka et al. 2001). Allerdings werden die Therapieergebnisse dieser *scaffolds* kontrovers diskutiert. Seit Mitte des Jahres 2014 werden TruFit®-Implantate nicht mehr von der Smith&Nephew GmbH Deutschland vertrieben.

Dhollander et al. postulierten, dass eine reine TruFit®-Therapie ohne weitere Begleittherapie kurzfristig nur einen fraglichen Nutzen mit sich bringt (Dhollander et al. 2012). In ihrer Pilotstudie mit 20 Patienten, deren fokale Knorpelschäden des Kniegelenks mit TruFit®-Plugs therapiert wurden, konnten sie nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten klinisch kaum eine Verbesserung der Symptome feststellen. Als möglichen Grund nennen sie eine limitierte postoperative Rehabilitation. Des Weiteren beschreiben sie, dass sich die Plugs auch nach 12 Monaten noch im Umbau befanden und somit gegebenenfalls die Regeneration noch nicht abgeschlossen war.

Joshi et al. empfehlen in ihrer Arbeit keine Therapie mit TruFit®-Plugs für osteochondrale Defekte der Patella (Joshi et al. 2012). Bei ihren Untersuchungen an 10 Patienten über 24 Monate konnten sie eine klinische Verbesserung der Symptome nach 6 Monaten beobachten. Dabei verzeichneten sie eine Verschlechterung nach

18 Monaten klinischem *follow-up*. Als Grund nennen sie einen Mangel an subchondraler Knochenbildung. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die biologischen Bedingungen der Patella sein, die anders als im Fall der Femurkondylen ein geringeres Einströmen von Stammzellen in das Implantat gewährleisten. Andererseits zeigen alle derzeit zur Verfügung stehenden Verfahren zur Knorpelregeneration der Patella ein relativ häufiges Versagen der operativen Therapie (Noyes und Barber-Westin 2013). Dieser Umstand liegt mutmaßlich in der exponierten Beschaffenheit des patellofemorales Gelenks mit erheblichen Druck- und Scherkräften begründet und wird oftmals durch die knöchernen Fehlentwicklung der Trochlea (Trochleadysplasie) verstärkt (Jungmann et al. 2013).

Williams und Niederauer beschreiben in ihrer Fallstudie eine erfolgreiche Therapie mittels TruFit®-Implantat (Williams und Niederauer 2007). 18 Monate nachdem der fokale Knorpelschaden der Trochlea mit einem Plug therapiert worden war, war der Patient asymptomatisch und konnte wieder aktiv Sport betreiben. Weitere Untersuchungen von Williams an Schafen zeigten ebenfalls eine erfolgreiche Therapie. So lieferte die Auffüllung osteochondraler Defekte mittels TruFit®-Plug nach 12 Monaten gute Ergebnisse mit hyalinähnlicher Knorpelbildung und Verbindung zum subchondralen Knochen. Auch ihre ersten klinischen Ergebnisse an Patienten seien erfolgreich (Williams und Gamradt 2008). Vundelinckx et al. beschreiben in ihrer Fallstudie ebenso eine erfolgreiche Therapie. Sie füllten einen osteochondralen Defekt am Femurkopf eines 34-jährigen Patienten mit einem TruFit®-Plug auf und konnten nach 12 Monaten klinisch und mittels MRT eine Verbesserung feststellen (Vundelinckx et al. 2012).

Eine weitere Frage ergibt sich aus dem Mangel an Langzeitergebnissen (Filardo et al. 2013). Carmont et al. raten in einem Fallbericht zur Geduld bei der Therapie mit TruFit®-Plugs. Ein möglicher Langzeiteffekt der Implantate sollte abgewartet und nicht zu früh ein unwiderrufbarer Verfahrenswechsel wie die Transplantation von osteochondralen Zylindern durchgeführt werden (Carmont et al. 2009). Ähnliche Ansichten vertreten auch Bedi et al., die mittels MRT-Untersuchungen an 26 Patienten über einen Zeitraum von durchschnittlich 21 Monaten eine Verbesserung der Defektfüllung und der Knorpelqualität nach 16 Monaten feststellen konnten (Bedi et al. 2010).

4.1.3 PRP

Wie unter 1.6.3 beschrieben, enthält PRP zahlreiche Wachstumsfaktoren mit verschiedenen Wirkungen. Der Einfluss des PRP auf die Knorpel- und Knochenregeneration sollte daher auch differenziert betrachtet werden.

Die verschiedenen Effekte einzelner Wachstumsfaktoren auf regenerierendes Knorpelgewebe wurden bereits mehrfach untersucht. Fortier et al. fassen in ihrem Review die einzelnen Effekte der Faktoren zusammen (Fortier et al. 2011). Drengk et al. zeigten in einem *in vitro*-Experiment dass PRP zur Proliferation von mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten führen kann (Drengk et al. 2009). Bei den Untersuchungen von Sun et al. konnte ebenfalls ein positiver Effekt des PRP im Tiermodell festgestellt werden (Sun et al. 2010). In dem Experiment wurden osteochondrale Defekte im femoropatellaren Gleitlager von Kaninchen mit PLGA aufgefüllt, wobei in einer Versuchsgruppe PRP hinzugefügt worden war. Die Knorpelqualität wurde nach 4 und 12 Wochen mittels des O'Driscoll-Scores bewertet. Sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen, erhielt die Gruppe PLGA+PRP signifikant mehr Punkte als die Gruppe PLGA. Auch am Menschen gibt es Hinweise für einen positiven Einfluss des PRP auf die Knorpelregeneration. Filardo et al. verabreichten 90 Patienten mit degenerativen Knorpelschäden drei Mal PRP (zu Versuchsbeginn, nach 3 Wochen und nach 6 Wochen) per intraartikulärer Knieinjektion und beobachteten den klinischen Effekt der Therapie über einen Zeitraum von 24 Monaten. So bewirke das PRP nach 12 Monaten eine klinische Verbesserung in Hinsicht auf Schmerzen und die Kniefunktion (Filardo et al. 2011b). Auch Dhollander et al. konnten in ihrer Untersuchung einen positiven Langzeiteffekt des PRP feststellen (Dhollander et al. 2011). Sie therapierten 5 Patienten mit osteochondralen Defekten der Patella mit einer Kollagenmatrix und dem Zusatz von PRP. Während des Beobachtungszeitraumes von 24 Monaten kam es zu einer klinischen Verbesserung der Beschwerden. Der mittels MRT-Untersuchungen durchgeführte MOCART-Score zeigte hingegen keine Verbesserungen.

Betrachtet man den Effekt des PRP auf die Regeneration von Knochen, so finden sich in der Literatur verschiedene Einsatzgebiete. Gruber et al. erforschten den *in vitro*-Einfluss von PRP auf Osteoblasten und fanden heraus, dass PRP die mitogene Aktivität von Osteoblasten stimuliert und demzufolge zur Regeneration von mineralisiertem Gewebe beitragen kann (Gruber et al. 2002).

Ein weiteres Einsatzgebiet *in vivo* ist die Zugabe von PRP nach autogener Knochen-
transplantation. Marx et al. beschrieben einen positiven Effekt von TGF- β und PDGF,
indem sie die Rate an Knochenneubildung, und somit die Quantität des Knochens
nach autogener Knochen-*transplantation* beim Menschen erhöht (Marx. et al. 1998).
Ähnliche Beobachtungen konnten Fennies et al. im Tierversuch machen. Demnach
führt eine Zugabe von PRP nach autogener Knochen-*transplantation* im Unterkiefer
von Schafen zu einer besseren Knochenheilung (Fennies et al. 2004). Die Gruppen
die mit PRP behandelt wurden zeigten mikroskopisch jedoch ein häufigeres Vor-
kommen von Osteoklasten. Diese Erkenntnis deckt sich auch mit den Aussagen von
Hock und Canalis, wobei PDGF neben Osteoblasten auch Osteoklasten stimuliert
(Hock und Canalis 1994). Wiltfang et al. untersuchten die Regenerationsfähigkeit
autogenen Knochens an der Stirn von Schweinen und beschrieben ebenfalls eine
erhöhte Reossifikationsrate bei Zugabe von PRP (Wiltfang et al. 2004).

Ein weiteres Einsatzgebiet von PRP ist die Zugabe bei Knochendefektfüllungen mit
Knochenersatzmaterialien. So untersuchten Kasten et al. im Kaninchenmodell die
Heilung von *critical-size*-Defekten des Radius. Dabei führte der Zusatz von PRP im
Gegensatz zu keramischen Implantaten ohne PRP zu einer histologisch und mittels
Mikrocomputertomographie ermittelten signifikant besseren Knochenbildung (Kasten
et al. 2008). Auch Sun et al. zeigten in ihrem Kaninchenmodell neben den oben
geschilderten Einflüssen auf die Knorpelregeneration, dass auch die Knochenheilung
positiv beeinflusst wird. So bewirkte PRP ein Einwachsen neuen Knochens in den
Defekt und eine Verstärkung der subchondralen Knochenschicht (Sun et al. 2010).
Diese Beobachtungen konnten von Malthotra et al. bestätigt werden. In ihrem Review
empfehlen sie den Zusatz von PRP zu einem synthetischen Knochenersatzmaterial
für die Knochenheilung. Die alleinige Gabe von PRP ohne weitere Therapie wird hier
nicht empfohlen (Malthotra et al. 2013). Auch die Daten der eigenen Studie belegen
einen langfristigen Effekt des PRP auf die subchondrale Knochenregeneration, die
sich durch eine erhöhte Anzahl dünner Knochen-trabekel auszeichnete.

Der Einsatz von PRP ist allerdings limitiert und bringt nicht nur positive Effekte mit
sich. In Bezug auf die Knorpelregeneration beschrieben Drengk et al., dass es neben
einer Proliferation von Chondrozyten durch TGF- β und PDGF zu einem negativen
Einfluss auf die Kollagen-II mRNA-Expression der Chondrozyten kommt. Ursache
hierfür sei die hohe Proliferationsrate der Zellen, die eine Differenzierung der Zellen

behindere (Drengk et al. 2009). Demzufolge könnte eine verminderte Synthese von Kollagen-II der Bildung von hyalinem Knorpelgewebe im Wege stehen.

Serra et al. konnten in ihrem Kaninchenmodell, bei dem sie Knorpeldefekte (5 mm Durchmesser; 4 mm Tiefe) in der medialen Femurkondyle mit PRP oder einer Salzlösung therapierten, nach 19 Wochen keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellen. In beiden Gruppen bildete sich fibröser Knorpel (Serra et al. 2012).

Hinsichtlich der Knochenheilung führt PDGF neben der von Hock und Canalis beschriebenen Osteoklastenaktivierung auch zu einer Inhibierung von IGF, einem wichtigen Wachstumsfaktor bei der Knochenregenerierung (Hock und Canalis 1994). Vor allem der Einsatz nach autogener Knochen transplantation bleibt umstritten (Malthotra et al. 2013). Mehrere Untersuchungen im Tiermodell zeigten hier keinen positiven Effekt auf die Knochenheilung (Aghallo et al. 2002; Mooren et al. 2007; Mooren et al. 2010). Weitere Limitierungen für den Gebrauch von PRP sind laut Foster et al. die zurzeit unbekannte Applikationskonzentration. Eine Überdosierung führe unter anderem zur Zellproliferation und behindere folglich eine Differenzierung von Zellen, die sich in der richtigen Zelllinie befinden. Eine weitere Einschränkung liegt in der uneinheitlichen Gewinnung von PRP. So führen verschiedene Herstellungsformen zu unterschiedlichen Mengen an Blutplättchen und Wachstumsfaktoren. Aus diesem Grund lassen sich Ergebnisse von unterschiedlichen Experimenten nur schwer miteinander vergleichen. Des Weiteren könnte die Gabe von Wachstumsfaktoren kanzerogene Prozesse fördern (Foster et al. 2009).

4.1.4 Einzeitige Knorpeltransplantation

Für die ursprüngliche zweizeitige Knorpeltransplantation konnte die Entstehung von hyalinem Knorpelgewebe bereits erreicht werden (Brittberg et al. 1996). Auch in Hinblick auf Langzeitergebnisse scheint die ACI ein erfolgreiches Therapieverfahren zu sein (Peterson et al. 2010). Um die für eine ACI erforderliche Zellkultivierung zu umgehen, finden sich in der Literatur verschiedene Lösungsansätze.

Ein Ansatz besteht in der Verwendung von autologen Knorpelfragmenten. Bereits 2006 konnten Lu et al. zeigen, dass mechanisch zerkleinerter Knorpel in einem *single-step*-Verfahren als Quelle für eine zellbasierte Knorpeltherapie dienen kann. Diese Verfahrensweise führte im Schafmodell zu hyalinartigem Knorpelgewebe (Lu

et al. 2006). Demnach wäre eine *ex vivo*-Zellkultivierung nicht nötig. Weitere Untersuchungen mit Knorpelfragmenten führten Frisbie et al. an Pferden durch. Sie verglichen die normale ACI mit einer Therapie, bestehend aus autologen Knorpelfragmenten, einem *scaffold* aus Polydioxanone und einer Deckschicht Fibrinkleber. Solch eine Therapie wird auch als *cartilage autograft implantation system* (CAIS) bezeichnet. Die Ergebnisse der Knorpelqualität nach 12 Monaten ergaben nur geringe Unterschiede der beiden Versuchsgruppen (Frisbie et al. 2009). Marmotti et al. verwendeten in ihrem Kaninchenmodell eine Kombination aus autologen Knorpelfragmenten, einem *scaffold* aus Hyaluronsäure und einer Schicht aus menschlichem Fibrinkleber mit PRP. Sie therapierten hiermit osteochondrale Defekte (Durchmesser 4,5 mm; Tiefe 4,0 mm) in der Trochlea des Kniegelenks. Nach 3 Monaten zeigte die Leerdefektversuchsgruppe im O'Driscoll-Score die besten Werte. Nach 6 Monaten waren die Ergebnisse der Versuchsgruppen mit *scaffold* und Knorpelfragmenten jedoch am besten und zeigten hyalinähnlichen Knorpel. Die Ergebnisse waren im Vergleich signifikant besser als die Ergebnisse der Versuchsgruppen, die ohne den Zusatz von autologen Knorpel behandelt wurden (Marmotti et al. 2012). Eine erfolgreiche CAIS-Therapie am Menschen wurde von Cole et al. beschrieben. Sie behandelten 29 Patienten mit fokalen Knorpelschäden (Defektdurchmesser etwa 3 cm²; ICRS-Stadium 3A-4A) der Trochlea beziehungsweise Femurkondyle. Dabei kombinierten sie einen *scaffold* aus Polycaprolacton oder Polyglykolsäure mit der Beigabe von Knorpelfragmenten. Die klinischen Ergebnisse dieses Verfahrens anhand von Scores sind vielversprechend und im Vergleich der Mikrofrakturierung überlegen (Cole et al. 2011).

Ein anderer Ansatz liegt in der Verwendung von Knochenmarkkonzentrat. Solch ein Ansatz führte in Untersuchungen am Menschen ebenfalls zu vielversprechenden Ergebnissen. Buda et al. therapierten 20 Patienten mit osteochondralen Defekten der Femurkondylen per arthroskopischer Defektdeckung mit einer Membran aus Hyaluronsäure als *scaffold* und einem Knochenmarkkonzentrat mit PRP. Das Knochenmarkkonzentrat wurde im selben Eingriff aus einer Beckenkammbiopsie gewonnen und anschließend aufgereinigt und zentrifugiert, um den Anteil an Stammzellen zu erhöhen. *Follow-up*-Untersuchungen nach 24 Monaten ergaben eine signifikante klinische Verbesserung und die durchgeführten MRT-Untersuchungen deuteten auf ein gutes Knochen- sowie Knorpelwachstum hin. Histologische Kontrollbiopsien zeigten regeneriertes Knorpelgewebe in einer fortgeschrittenen Umbau-

phase und ein immunhistochemisches Vorkommen von Proteoglykanen und Kollagen-II (Buda et al. 2010). Auch Giannini et al. konnten bei 48 Patienten in einer *single-step*-Prozedur mit einer Kombination aus einem *scaffold* und Knochenmarkkonzentrat fokale osteochondrale Defekte im Talus erfolgreich therapieren. *Follow-up*-Untersuchungen nach 24 Monaten zeigten eine klinische Verbesserung und ein histologisches Vorhandensein von hyalinartigem Knorpelgewebe (Giannini et al. 2009).

Ein weiterer Lösungsansatz, um eine Zellkultivierung zu vermeiden, ist die Nutzung eines Verfahrens zur Schnellisolierung von Chondrozyten. Ein solches Verfahren verwendeten Jiang et al. in ihren Untersuchungen an Schweinen. Osteochondrale Defekte der Femurkondyle wurden mit einer TruFit®-ähnlichen biphasischen Matrix aufgefüllt und mit einer im selben Eingriff durchgeführten ACI kombiniert. Dazu wurde zuerst Knorpel von der späteren Defektregion abgetragen, anschließend mechanisch zerkleinert und dann enzymatisch mit Kollagenase und Hyaluronidase gespalten. Die auf diese Weise isolierten Chondrozyten wurden dann in die Knorpelphase des zylindrischen Implantates injiziert. Die Safranin-O-Färbung und Immunhistochemie für Kollagen-II zeigte nach 6 Monaten das Vorhandensein von hyalinem Knorpel. Die Kontrollgruppe, die nur mit einem Implantat therapiert worden war, zeigte hingegen nur fibrösen Knorpel (Jiang et al. 2007). Ein ähnliches Experiment führten einige Jahre später Chiang et al. erneut an Schweinen durch. Der von der Gelenkoberfläche gewonnene Knorpel wurde zuerst pulverisiert und danach enzymatisch gespalten, um die Chondrozyten aus dem Knorpelverbund zu lösen. Je nach Versuchsgruppe wurden diese Zellen kultiviert oder direkt auf einen biphasischen *scaffold* aus PLGA und Tricalciumphosphat aufgetragen. Die molekularbiologischen und histochemischen Untersuchungen nach 6 Monaten ergaben das Vorhandensein von hyalinem Knorpel in beiden Versuchsgruppen. Sie zeigten damit, dass eine Zellkultivierung zu keinen entscheidenden Vorteilen bezüglich der Knorpelqualität führt und somit eine ACI auch in einem Schritt möglich ist (Chiang et al. 2010).

Da unsere Abteilung bereits Erfahrung in der Schnellisolierung von Chondrozyten besitzt (Drengk et al. 2009), wählten wir für unser Vorhaben ebenfalls diesen Ansatz für eine *single-step*-basierte Zelltherapie.

4.2 Analyse der Ergebnisse

4.2.1 Ergebnisse der Makroskopie

Aufgrund der sehr stark variierenden Regeneration sowohl innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen als auch innerhalb der einzelnen Kniegelenke, ist eine differenzierte makroskopische Bewertung hinsichtlich der Knorpel- und Knochenregeneration zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen schwierig. Dieses Phänomen der örtlich heterogenen Regeneration konnte in histomorphometrischen Untersuchungen im Tiermodell bereits zuvor beobachtet werden (Nehrer et al. 1998) und lässt sich auch auf das makroskopische Erscheinungsbild der Präparate übertragen.

Die Beobachtung einer allgemein guten Defektfüllung der Präparate trifft überraschenderweise auch auf die Leerdefekt-Gruppe zu. Die von Yan et al. gemachte Beobachtung, dass Defekte mit einem Durchmesser von 4,5 mm nur eine sehr geringe Heilungstendenz besitzen, konnte in Hinblick auf das makroskopische Erscheinungsbild demnach nicht bestätigt werden (Yan et al. 2007). Eine solch gute Regeneration von Leerdefekten ist beim Kaninchen bisher vor allem für kleinere Defekte (Durchmesser 3 mm) beschrieben worden (Shapiro et al. 1993).

Die hier angewendete deskriptive Auswertung der makroskopischen Aufnahmen stellt demzufolge eine Zusammenfassung des Gelenkzustandes dar. Eine alleinige Beurteilung anhand der Makroskopie ist somit nicht möglich, und die Ergänzung durch eine mikroskopische Beurteilung bleibt aus diesem Grund unerlässlich.

4.2.2 Ergebnisse der Mikroradiographie

Die mit den TruFit®-Plugs behandelten osteochondralen Defekte zeigen nach 12 Monaten eine ossäre Regeneration, die in den Parametern Trabekelfläche, Trabekeldicke und Anzahl an trabekulären Verbindungen weitestgehend denen der unbehandelten lateralen Femurkondylen entsprechen. Die Gruppe Leer besitzt in den gemessenen Knochenparametern häufig weniger gute Ergebnisse. Folglich hat das TruFit®-Implantat die Knochenneubildung positiv beeinflusst. Ähnliche Daten veröffentlichten auch Niederauer et al.. Sie erforschten im Ziegenmodell die Heilung osteochondraler Defekte der medialen Femurkondyle, die mit einer TruFit®-ähnlichen Matrix aufgefüllt wurden. Die multiphasische Matrix bestand aus PLGA, PGA-Fasern und Calciumsulfat. Dies führte histologisch zu einer guten Knochenregeneration und hyalinartigem Knorpelgewebe. Ein Zusatz von autologen Rippenchondrozyten konnte in dem Experiment die Knochen- und Knorpel-

regeneration nicht zusätzlich verbessern. Als möglichen Grund nennen Niederauer et al. eine hauptsächlich von dem gesunden Knochen- und Knorpelgewebe ausgehende Regeneration, die das Mitwirken der hinzugefügten Zellen am Heilungsprozess maskiert (Niederauer et al. 2000). Auch Jiang et al. verwendeten in ihrem Schweinmodell eine TruFit®-ähnliche Matrix und konnten neben den unter 4.1.4 beschriebenen positiven Effekten auf die Knorpelregeneration, auch in Hinblick auf die Knochengenesung, gute Ergebnisse erzielen. So zeigte sich nach 6 Monaten Versuchszeit in der Peripherie des ehemaligen Implantats eine gute Spongiosaausbildung, wohingegen das Implantat im Zentrum noch nicht vollständig knöchern umgebaut wurde. Subchondral fand sich meist eine regenerierte Knochenschicht vor (Jiang et al. 2007). Nagura et al. verwendeten ebenfalls eine Matrix auf der Basis von PLGA, um osteochondrale Defekte (Durchmesser 5 mm; Tiefe 5 mm) der Femurtrochlea im Kaninchenmodell zur Ausheilung zu bringen. Nach 24 Wochen Versuchsdauer zeigte sich eine erfolgreiche Knochenrekonvaleszenz, die sich histologisch in einer gut ausgebildeten subchondralen Knochenschicht und Trabekelstruktur widerspiegelte, die denen des unbehandelten Knochens entsprach. Dies zeigte sich auch im Wakitani-Score, da hier die Testgruppe nach 6, 12 und 24 Wochen signifikant bessere Werte erhielt als die unbehandelte Kontrollgruppe. Demnach scheint eine erfolgreiche Therapie osteochondraler Defekte unter bestimmten Bedingungen auch ohne den Zusatz von Zellen oder Wachstumsfaktoren möglich zu sein (Nagura et al. 2007).

Auch die subchondrale Knochenschicht zeigte ein gutes Regenerationsverhalten in den TruFit®-Gruppen, wobei hier erneut zwischen dem peripheren und zentralen Defektareal unterschieden werden muss. In der Gruppe Leer wurde die subchondrale Schicht zumeist ebenso gut ausgebildet. Sie war allerdings in der Regel nicht so dick wie bei den Versuchsgruppen mit Implantat. Das Implantat scheint also die Regeneration der subchondralen Knochenschicht positiv beeinflusst zu haben. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen (Niederauer et al. 2000; Jiang et al. 2007; Nagura et al. 2007). Die Bedeutung der subchondralen Schicht für die Knorpelheilung ist aktuell wieder im Fokus von Untersuchungen und der Einsatz von zweiphasischen Ersatzmaterialien scheint ein wichtiger Lösungsansatz dieser Problematik zu sein (Gomoll et al. 2010).

Eine Ausnahme in Bezug auf die Knochenrekonvaleszenz stellt die Versuchsgruppe TFP+PRP dar. In dieser Gruppe wurden besonders zahlreiche, relativ kleine Tra-

bekel gebildet. Solch eine Wirkung auf die Knochenregeneration findet sich in der Literatur bislang nicht. Hier könnten die Wachstumsfaktoren vor allem zu einer erhöhten Proliferationsrate der Trabekel geführt haben, ohne dass sich diese in Hinblick auf ihre Dicke physiologisch ausbilden konnten.

Jedoch war die Rekonstruktion der subchondralen Schicht in der Versuchsgruppe TFP+PRP weniger gut ausgeprägt. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Sun et al., die eine Verstärkung der subchondralen Schicht durch Zugabe von PRP beschrieben (Sun et al. 2010). PRP scheint somit auch langfristig die Qualität des sich regenerierenden Knochens zu beeinflussen. In der Gruppe TFP+PRP+C konnte der genannte Effekt des PRP auf den Knochen hingegen nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist die bevorzugte Wirkung des PRP auf die zugegebenen Chondrozyten.

4.2.3 Ergebnisse der Scores

Beide durchgeführten Scores liefern vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Knorpelqualität. So konnte durch die einzeitige autologe Knorpeltransplantation keine signifikante Verbesserung im Langzeittierversuch erreicht werden. In beiden Bewertungssystemen zeigte sich lediglich eine Tendenz zu verbesserter knorpeliger Regeneration bei den mit Knorpelzellen behandelten Defekten (Gruppe TFP+PRP+C). Erstaunlicherweise erhielt die Gruppe Leer in den zwei Scores durchschnittlich die zweitbesten Punktwerte.

Ein wichtiger Faktor bei der Transplantation von Chondrozyten ist deren Gesamtzahl in Bezug zur Defektgröße. Laut der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (Behrens et al. 2004) sollten für eine ACI mindestens ca. 1 Million Zellen pro 1 cm² Defektfläche transplantiert werden. Diese Anwendung führte in früheren Arbeiten zu guten Ergebnissen (Brittberg et al. 1994; Peterson et al. 2002; Bentley et al. 2003). Jones und Peterson nutzen für ihre ACI mit 2 Millionen Zellen pro 1 cm² die doppelte Anzahl an kultivierten Knorpelzellen (Jones und Peterson 2006). Die Menge der Zellen wird dabei vor allem durch die Kultivierung erreicht, die zu einer etwa 10-20-fachen Zellzunahme führt (Brittberg et al. 1994). Allerdings muss durch die mehrwöchige Kultivierung von einer fibroblastären Degeneration vieler Chondrozyten ausgegangen werden (Benya et al. 1978; Russlies et al. 2002; Lin et al. 2008). Dies trifft vor allem auf die ursprüngliche Form der Kultivierung zu, bei der die Chondrozyten in einer

Monoschicht kultiviert werden. Bei neueren Kultivierungsformen mithilfe eines dreidimensionalen Gerüsts, wie beispielsweise bei der 2. und 3. ACI-Generation, fällt dieser Effekt kleiner aus (Lin et al. 2009). Über die tatsächliche Menge an qualitativ hochwertigen Knorpelzellen am Ende der Kultivierung können daher nur schwer Aussagen getroffen werden. Die Qualität der Knorpelzellen scheint aber ein wichtiger Faktor für das klinische Resultat einer ACI zu sein (Niemeyer et al. 2012).

In diesem Projekt wurden bei einer Defektgröße von 0,20 cm² etwa 20.000 Chondrozyten transplantiert, also zehnmal weniger Zellen, als für die zweizeitige ACI empfohlen. Chiang et al. hatten bei ihren Untersuchungen an Schweinen für die einzeitige ACI bei einer Implantatoberfläche von 0,64 cm² etwa 700.000 Zellen transplantiert und erfüllten damit die Empfehlungen, die für die zweizeitige ACI gelten (Chiang et al. 2010). Jiang et al. verwendeten in ihrem Experiment 300.000 Zellen bei einer Defektfläche von 0,64 cm² (Jiang et al. 2007).

Andererseits zeigten Willers et al. im Kaninchenmodell, dass bei einer MACI mit unterschiedlichen Zelldichten die Zellzahl keine Auswirkung auf die histologische Qualität des Knorpels hat. Sie verwendeten dabei Zellzahlen von 10.000/cm² – 1.000.000/cm². Demzufolge dürfte die geringere Anzahl an Zellen in diesem Experiment nur zum Teil ursächlich für die nicht signifikante Verbesserung der Knorpelqualität sein (Willers et al. 2005).

Eine Ursache könnte die von Niederauer et al. beschriebene Theorie sein, dass die Heilung, die vom umgebenen gesunden Gewebe ausgeht, den zusätzlichen Heilungseffekt durch die zugeführten Zellen in den Hintergrund stellt (Niederauer et al. 2000). Geht man jedoch von dieser Theorie aus, so müssten die TruFit®-Gruppen ohne Zelltherapie eine bessere Knorpelqualität aufweisen, als in unserem Experiment beobachtet wurde. In Anbetracht der besseren Knorpelregeneration der Versuchsgruppe Leer im Vergleich zu den Gruppen TFP und TFP+PRP muss davon ausgegangen werden, dass der TruFit®-Plug alleine und in Kombination mit PRP nicht zu einer besseren Knorpelheilung beigetragen hat. Dies steht in Gegensatz zu Publikationen, die einen positiven Effekt von TruFit®-Implantaten auf die Knorpelregeneration beschreiben (Williams und Niederauer 2007, Williams und Gamradt 2008, Bedi et al. 2010). Gleichmaßen steht dies in Widerspruch zu Arbeiten, die einen positiven Effekt des PRP auf die Knorpelheilung beschreiben (siehe 4.1.3) wie etwa die Untersuchungen von Sun et. al (Sun et al. 2010).

Auch zu diskutieren ist, dass für die Bewertung der Scores lediglich die zentralen Schnitte der ehemaligen Implantatzone verwendet wurden. Vielleicht hätte eine zusätzliche periphere Bewertung wie bei der Mikroradiographie zu differenzierteren Ergebnissen geführt. Durch die Beurteilung des Kollagen-I- und Kollagen-II- Gehalts des Knorpelregenerats wäre eine weitere ergänzende qualitative Auswertung der Ergebnisse möglich gewesen. Auch in dieser Arbeit wurde eine solche Kollagenfärbung durchgeführt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten konnte diese allerdings nicht zur mikroskopischen Beurteilung herangezogen werden. Durch das Entplasten verloren die dünnen 5 µm-Schnitte einen gewissen Anteil ihrer Stabilität. Durch zahlreiche weitere Arbeitsschritte der Kollagenfärbung und das anschließende Eindecken auf Objektträgern waren die Schnitte für eine Bewertung zu stark in ihrer Struktur deformiert. Aus diesem Grund konnte in diesem Versuch die Qualität des Knorpels nur durch eine histologische Analyse mithilfe der Scores erfolgen.

Ein Faktor, der die Beurteilung der Knorpelregeneration beeinflusst, ist der Ort des ehemaligen Defekts, an dem die Bewertung vorgenommen wird. So zeigen die makroskopischen Aufnahmen eine durchweg inhomogene Regeneration des Oberflächengewebes mit einer zum Zentrum hin schlechteren Regeneration. Die Bewertung der zentralen Schnitte stellt somit nur eine Stichprobe der Knorpelregeneration dar.

4.2.4 Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung

Neben den ständig ablaufenden Umbauvorgängen des bereits gebildeten Knochens, die sich anhand von Fluoreszenzfarbstoffen auf der Oberfläche vieler Trabekel darstellen lassen, gibt es in der Implantatzone auch Bereiche, in denen Knochenneubildung stattfindet. Hierunter fallen häufig auch Anteile der subchondralen Knochenschicht, die trotz der langen Versuchsdauer von 12 Monaten noch nicht ossär regeneriert wurden. Folglich war eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines hochwertigen Knorpelregenerats nicht immer gegeben. In allen untersuchten Präparaten wurde der TruFit®-Plug aber vollständig abgebaut und durch neues Gewebe ersetzt. Der umliegende Knochen ging stets kontinuierlich in das ehemalige Implantatgebiet über, so dass eine Abgrenzung zwischen ursprünglichem Knochen und neugebildetem Knochen kaum möglich ist. Diese Beobachtung konnten auch Williams und Niederauer machen. Sie zeigten, dass ein biodegradierbares Implantat im Kaninchenmodell nach 12 Monaten durchbaut ist

(Williams und Niederauer 2007). Somit konnten in diesem Experiment, auch unter Berücksichtigung der mikroradiographischen Ergebnisse, die guten osteokonduktiven Eigenschaften von TruFit®-Implantaten bestätigt werden.

4.3 Schlussfolgerungen

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass ein synthetisches, biologisch abbaubares Knorpel-Knochen-Ersatzmaterial die Knochenregeneration im Langzeit-tierversuch positiv beeinflussen kann. Das neu entstandene Knochengewebe ist in seiner Struktur vergleichbar mit gesundem Knochengewebe. Der Zusatz von PRP hat in diesem Versuch bewirkt, dass es zu einer unphysiologischen Knochenneubildung gekommen ist, die sich in einer größeren Anzahl kleiner Trabekel widerspiegelt. Dies könnte durch den proliferativen Effekt des PRP erklärt werden.

Die Auswertung bezüglich des neu entstandenen Knorpelgewebes zeigte in allen Versuchsgruppen eine annähernd vergleichbare Qualität. Wie erwartet, erhielt die Versuchsgruppe, die mit Knorpelzellen therapiert wurde, in beiden Scores die meisten Punkte. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Versuchsgruppe TFP erreichte trotz einer guten knöchernen Durchbauung im Vergleich nur mittelmäßige Punktwerte in den Knorpelscores. Im Durchschnitt erhielt diese Gruppe, trotz mikroradiographisch besserer Knochenregeneration, sogar weniger Punkte als die Gruppe der Leerdefekte. Demnach konnte allein durch den TruFit®-Plug die Knorpelregeneration nicht verbessert werden. Ein besonderer Effekt von PRP auf die Knorpelregeneration konnte ebenso nicht beobachtet werden.

4.4 Ausblick

Die heutzutage in Europa am häufigsten verwendete Methode zur Therapie von Knorpeldefekten des Kniegelenks von Defekten bis zu 3 cm² ist die Mikrofrakturierung und das Debridement. Für größere Defekte herrscht weiterhin Uneinigkeit über die optimale Methode, wobei am häufigsten die ACI, gefolgt von der Mikrofrakturierung, durchgeführt wird (Salzmann et al. 2011). Die bevorzugte Wahl der Mikrofrakturierung als Therapieverfahren kann durch mehrere Vorteile begründet werden. So setzt dieses Verfahren nur eine geringe präoperative Planung voraus, und es wird keine spezielle Ausrüstung benötigt. Zudem schließt eine durchgeführte Mikrofrakturierung eine anschließende ACI oder die Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern nicht aus (Magnussen et al. 2008), wobei eine ACI nach durch-

geführter Mikrofrakturierung zu schlechteren Ergebnissen führt (Minas et al. 2009). Die Mikrofrakturierung stellt allerdings nur für kleine Defekte das Verfahren der Wahl dar. Als Komplikationen sind eine limitierte Haltbarkeit des Regeneratknorpels und intraläsionale Osteophytenbildungen beschrieben worden. Auch die ACI geht mit eingriffsspezifischen Komplikationen, wie beispielsweise der Hypertrophie des regenerierten Knorpels und der fehlenden Integration in den Umgebungsknorpel, einher. Nach der Transplantation mit Knorpel-Knochen-Zylindern spielt vor allem die Entnahmemorbidität als Einschränkung für den Therapieeinsatz eine große Rolle (Niemeyer et al. 2011). Besonders problematisch ist speziell die Therapie von großen vollschichtigen Knorpeldefekten. Nach Rodriguez-Merchan zeigen vergleichende klinische Studien bei größeren Defekten jedoch einen Langzeitvorteil der ACI gegenüber der Mikrofrakturierung (Rodriguez-Merchan 2013).

Die Behandlung von osteochondralen Defekten mittels synthetischen Ersatzmaterials und einer einzeitigen autologen Knorpeltransplantation besitzt großes Therapiepotenzial (Filardo et al. 2013). Die Forschungsbemühungen in diesem Gebiet steigen seit den letzten Jahren kontinuierlich an. Dennoch fehlen zurzeit Langzeitergebnisse und Arbeiten, die die verschiedenen Therapieoptionen in groß angelegten klinischen Studien miteinander vergleichen. Insbesondere die Datenlage zur einzeitigen autologen Knorpeltransplantation ist in dieser Hinsicht bislang rar. Hier sind weitere Untersuchungen zu erwarten, da dieses Verfahren im Vergleich zur ursprünglichen ACI, für die der Nutzen auch im Langzeitversuch nachgewiesen werden konnte (Peterson et al. 2010), sowohl mit geringeren Risiken für den Patienten als auch mit geringeren Kosten einhergeht. Die *single-step*-ACI wird in Zukunft sicherlich eine große Rolle bei der Behandlung von Knorpeldefekten einnehmen.

Auch stehen Untersuchungen aus, die weitere Fragen dieses neuen Verfahrens beantworten. So gibt es derzeit für die einzeitige autologe Knorpelzelltransplantation noch keine Therapieempfehlung in Bezug auf das Knorpel-Knochen-Ersatzmaterial sowie die Anzahl der transplantierten Knorpelzellen und mögliche Zusätze wie Wachstumshormone und -faktoren.

5. Zusammenfassung

Knorpeldefekte des Kniegelenks zeichnen sich durch eine sehr begrenzte spontane Heilungstendenz aus und führen im Verlauf häufig zur Arthrose. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnte bisher keine neue Therapieoption eine zufriedenstellende Alternative zu den bisherigen Therapien hervorbringen. Eine ACI in Kombination mit einem künstlich hergestellten Knorpel-Knochen-Ersatzmaterial scheint jedoch großes Potential für die Therapie von Knorpel-Knochen-Schäden zu besitzen.

Im vorliegenden Langzeittiersversuch mit Kaninchen wurde eine einzeitige ACI mit einem biphasischen Ersatzmaterial (TruFit®) und *platelet-rich-plasma* (PRP) kombiniert. Zu diesem Zweck wurde in der medialen Femurkondyle ein *critical-size*-Defekt mit einem Durchmesser von 4,5 mm gesetzt. In der ersten Versuchsgruppe blieb der Defekt unbehandelt (Leer). Bei der zweiten Gruppe wurde die Defekthöhle mit einem TruFit®-Zylinder aufgefüllt (TFP). Gruppe drei erhielt zusätzlich PRP (TFP+PRP) und Gruppe vier wurde darüber hinaus mit einer einzeitigen ACI kombiniert (TFP+PRP+C), bei der Chondrozyten mit Hilfe eines speziellen Kollagenase-Schnellverdaus isoliert werden konnten.

Die Auswertung der Knorpel-Knochen-Regeneration erfolgte nach 12 Monaten durch eine Mikroradiographie, eine intravitale Fluoreszenzmarkierung des Knochens und durch Toluidinblau-O- und Safranin-O-Färbungen. Verwendet wurden die Scores nach Wakitani und O'Driscoll.

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine TruFit®-Therapie die Knochenregeneration positiv beeinflussen kann. Die Zugabe von PRP bewirkte die Bildung von zahlreichen dünnen Trabekeln mit einer erhöhten Anzahl trabekulärer Verbindungen, allerdings auch eine schlechtere Rekonvaleszenz der subchondralen Knochenschicht. Bezüglich der Knorpelheilung schnitt die Gruppe TFP+PRP+C am besten ab, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren. Insgesamt zeigten alle Versuchsgruppen eine unzureichende osteochondrale Regeneration, so dass für die Therapie am Menschen zunächst weitere Studien nötig sind, die sowohl ossär als auch chondral eine verbesserte Heilungspotenz demonstrieren können. Bisher fehlen groß angelegte Studien um Therapieempfehlungen bezüglich des Ersatzmaterials, der genauen Durchführung der einzeitigen ACI und Zusätzen wie Wachstumsfaktoren zu machen.

6. Anhang

6.1 Zusammenfassungen der Ergebnisse der Mikroradiographie

Die folgenden beiden Tabellen fassen die Ergebnisse der Mikroradiographie zusammen. Für jede Versuchsgruppe und jeden Messparameter werden jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (Tab. 12, Tab. 13).

Tabelle 12: Ergebnisse der Mikroradiographie für den peripheren Bereich; Tr. Ar. Peri = trabekuläre Fläche peripher; Tr. Wi. Peri = trabekuläre Dicke peripher; Tr. Nd. Peri = Trabekelverbindungen peripher; p-Wert = p-Wert in Bezug zur LFK (signifikante Werte sind fett gedruckt).

	Tr. Ar. Peri [%]	p-Wert	Tr. Wi. Peri [μm]	p-Wert	Tr. Nd. Peri [N./mm ²]	p-Wert
LFK	0,56 \pm 0,06	-	9,41 \pm 1,22	-	3,69 \pm 0,60	-
Leer	0,53 \pm 0,13	0,63	9,99 \pm 2,19	0,63	2,92 \pm 1,20	0,04
TFP	0,64 \pm 0,08	0,02	10,08 \pm 1,9	0,50	4,36 \pm 1,16	0,08
TFP+PRP	0,61 \pm 0,09	0,25	9,79 \pm 2,11	0,88	4,10 \pm 1,06	0,42
TFP+PRP+C	0,58 \pm 0,07	0,85	9,57 \pm 1,40	0,99	4,24 \pm 1,14	0,19

Tabelle 13: Ergebnisse der Mikroradiographie für den zentralen Bereich; Tr. Ar. Zent = trabekuläre Fläche zentral; Tr. Wi. Zent = trabekuläre Dicke zentral; Tr. Nd. Zent = Trabekelverbindungen zentral; p-Wert = p-Wert in Bezug zur LFK (signifikante Werte sind fett gedruckt).

	Tr. Ar. Zent [%]	p-Wert	Tr. Wi. Zent [μm]	p-Wert	Tr. Nd. Zent [N./mm ²]	p-Wert
LFK	0,56 \pm 0,07	-	9,34 \pm 1,00	-	3,58 \pm 0,65	-
Leer	0,46 \pm 0,11	0,003	9,15 \pm 1,16	0,91	3,14 \pm 1,47	0,66
TFP	0,50 \pm 0,06	0,13	9,69 \pm 1,32	0,94	3,37 \pm 1,04	0,96
TFP+PRP	0,50 \pm 0,12	0,11	7,92 \pm 1,83	0,003	4,62 \pm 2,01	0,04
TFP+PRP+C	0,52 \pm 0,11	0,34	9,76 \pm 2,04	0,866	3,83 \pm 2,06	0,93

6.2 Zusammenfassungen der Ergebnisse der Scores

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse beider Scores zusammen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Scores; angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert = p-Wert in Bezug zur Gruppe Leer.

Gruppe	Wakitani-Score	p-Wert	O'Driscoll-Score	p-Wert
Leer	13,8 \pm 3,9	-	15,3 \pm 5,5	-
TFP	12,8 \pm 3,1	0,88	13,8 \pm 3,0	0,85
TFP+PRP	12,2 \pm 2,6	0,64	13,7 \pm 3,7	0,81
TFP+PRP+C	14,3 \pm 1,6	0,98	16,8 \pm 3,0	0,85

6.3 Bewertungskategorien der Scores

Die folgenden beiden Tabellen stellen die Mittelwerte dar, die die 6 Kniegelenke einer Versuchsgruppe in den einzelnen Bewertungskategorien der Scores erreichten (Tabelle 15 und 16).

Tabelle 15: Bewertungskategorien des Wakitani-Score; dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; in der rechten Spalte sind jeweils die p-Werte in Bezug zur Versuchsgruppe Leer angegeben.

Zell-Morphologie	Leer	1,67 \pm 1,21	-
	TFP	1,50 \pm 0,84	0,98
	TFP+PRP	1,33 \pm 0,82	0,87
	TFP+PRP+C	2,17 \pm 0,75	0,67
Metachromasie	Leer	1,50 \pm 0,84	-
	TFP	1,50 \pm 0,55	>0,99
	TFP+PRP	1,50 \pm 1,05	>0,99
	TFP+PRP+C	1,83 \pm 0,41	0,78
Oberfläche	Leer	2,67 \pm 0,52	-
	TFP	2,17 \pm 1,17	0,62
	TFP+PRP	2,17 \pm 0,75	0,62
	TFP+PRP+C	2,33 \pm 0,82	0,84
Knorpeldicke	Leer	1,17 \pm 0,75	-
	TFP	1,17 \pm 0,75	>0,99
	TFP+PRP	1,50 \pm 0,84	0,77
	TFP+PRP+C	1,50 \pm 0,55	0,77
Knorpelbindung	Leer	1,83 \pm 0,41	-
	TFP	1,67 \pm 0,52	0,88
	TFP+PRP	1,67 \pm 0,52	0,88
	TFP+PRP+C	1,67 \pm 0,52	0,88
Subchondrale Schicht	Leer	3,00 \pm 0,89	-
	TFP	2,83 \pm 0,98	0,98
	TFP+PRP	2,00 \pm 0,89	0,15
	TFP+PRP+C	2,83 \pm 0,75	0,98
Osseointegration	Leer	2,00 \pm 0	-
	TFP	2,00 \pm 0	>0,99
	TFP+PRP	2,00 \pm 0	>0,99
	TFP+PRP+C	2,00 \pm 0	>0,99

Tabelle 16: Bewertungskategorien des O'Driscoll-Score; dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; in der rechten Spalte sind jeweils die p-Werte in Bezug zur Versuchsgruppe Leer angegeben (signifikante Werte sind fett gedruckt).

Zell-Morphologie	Leer	2,00 \pm 1,79	-
	TFP	1,67 \pm 0,82	0,93
	TFP+PRP	1,67 \pm 0,82	0,93
	TFP+PRP+C	2,67 \pm 1,03	0,65
Anfärbung der Matrix	Leer	1,33 \pm 0,52	-
	TFP	1,50 \pm 0,55	0,93
	TFP+PRP	1,33 \pm 0,82	>0,99
	TFP+PRP+C	1,83 \pm 0,41	0,35
Oberfläche	Leer	2,50 \pm 0,55	-
	TFP	1,33 \pm 0,82	0,04
	TFP+PRP	1,17 \pm 0,75	0,02
	TFP+PRP+C	2,00 \pm 0,89	0,54
Strukturelle Integrität	Leer	1,33 \pm 0,52	-
	TFP	1,00 \pm 0,63	0,58
	TFP+PRP	0,83 \pm 0,41	0,27
	TFP+PRP+C	1,50 \pm 0,55	0,90
Knorpeldicke	Leer	0,83 \pm 0,75	-
	TFP	1,00 \pm 0,89	0,97
	TFP+PRP	1,33 \pm 0,82	0,60
	TFP+PRP+C	1,33 \pm 0,82	0,60
Knorpelbindung	Leer	1,83 \pm 0,41	-
	TFP	1,67 \pm 0,52	0,88
	TFP+PRP	1,67 \pm 0,52	0,88
	TFP+PRP+C	1,67 \pm 0,52	0,88
Hypozellularität	Leer	1,50 \pm 1,38	-
	TFP	2,00 \pm 0,89	0,80
	TFP+PRP	2,00 \pm 1,27	0,80
	TFP+PRP+C	2,00 \pm 1,10	0,80

Clustering	Leer	2,00 ± 0	-
	TFP	2,00 ± 0	>0,99
	TFP+PRP	1,83 ± 0,41	0,86
	TFP+PRP+C	1,67 ± 0,82	0,46
Angrenzender Knorpel	Leer	2,00 ± 0,63	-
	TFP	1,50 ± 0,55	0,36
	TFP+PRP	1,83 ± 0,75	0,93
	TFP+PRP+C	2,17 ± 0,41	0,93

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Outerbridge-Klassifikation.....	5
Tabelle 2: Technovit®9100Neu-Einbettverfahren.....	23
Tabelle 3: Entplastung.....	25
Tabelle 4: Färbung mit Toluidinblau-O	25
Tabelle 5: Lösungen für die Safranin-O Färbung	26
Tabelle 6: Färbung mit Safranin-O	27
Tabelle 7: Modifizierter Wakitani-Score.....	32
Tabelle 8: O’Driscoll-Score.....	33
Tabelle 9: Rekonstruktion der knöchernen Gelenkkontur.....	46
Tabelle 10: Punktzahlen der Kniegelenke im Wakitani-Score	49
Tabelle 11: Punktzahlen der Kniegelenke im O’Driscoll-Score.....	50
Tabelle 12: Ergebnisse der Mikroradiographie für den peripheren Bereich.....	77
Tabelle 13: Ergebnisse der Mikroradiographie für den zentralen Bereich	78
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Scores.....	78
Tabelle 15: Bewertungskategorien des Wakitani-Score	79
Tabelle 16: Bewertungskategorien des O’Driscoll-Score	80

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ICRS-Klassifikation.....	6
Abbildung 2: TruFit®-Plugs	13
Abbildung 3: Leerdefekt in einer medialen Femurkondyle.....	19
Abbildung 4: Mit einem TruFit®-Plug aufgefüllter Defekt.....	19
Abbildung 5: Schema der polychromen Sequenzmarkierung.....	22
Abbildung 6: Übersicht Schnittebene	24
Abbildung 7: Digitalisierte Aufnahme einer medialen Femurkondyle.....	29
Abbildung 8: Mediale Femurkondyle mit eingestelltem Messrahmen.....	29
Abbildung 9: Graudetektion aller Knochenanteile.....	30
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Femurkondyle	31
Abbildung 11: Makroskopische Aufnahmen Gruppe Leer	37
Abbildung 12: Makroskopische Aufnahmen Gruppe TFP.....	38
Abbildung 13: Makroskopische Aufnahmen Gruppe TFP+PRP	39
Abbildung 14: Makroskopische Aufnahmen Gruppe TFP+PRP+C.....	40
Abbildung 15: Knochenfläche peripher.....	41
Abbildung 16: Knochenfläche zentral	42
Abbildung 17: Trabekeldicke peripher	42
Abbildung 18: Trabekeldicke zentral	43
Abbildung 19: Trabekelverbindungen peripher.....	44
Abbildung 20: Trabekelverbindungen zentral	45
Abbildung 21: Zentrale mikroradiographische Aufnahmen.....	47
Abbildung 22: Punktzahlen Wakitani-Score.....	49
Abbildung 23: Punktzahlen O’Driscoll-Score.....	50
Abbildung 24: Fluoreszenzmarkierung Gruppe Leer	53
Abbildung 25: Fluoreszenzmarkierung Gruppe TFP	55
Abbildung 26: Fluoreszenzmarkierung Gruppe TFP+PRP	57
Abbildung 27: Fluoreszenzmarkierung Gruppe TFP+PRP+C	59

9. Literaturverzeichnis

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG (2002): Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60, 1176-1181

Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ, Lenz ME, Sah RL, Masuda K (2006): Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1272-1280

Alford JW, Cole BJ (2005): Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med* 33, 295-306

Balcarek P, Kuhn A, Weigel A, Walde TA, Ferlemann KG, Sturmer KM, Frosch KH (2010): Impact of monopolar radiofrequency energy on subchondral bone viability. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18, 673-680

Barber FA, Chow JC (2006): Arthroscopic chondral osseous autograft transplantation (COR procedure) for femoral defects. *Arthroscopy* 22, 10-16

Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G: (2005): Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br* 87, 640-645

Bedi A, Foo LF, Williams RJ, Potter HG, Warren RF, Rodeo SA, Hannafin JA, Marx R, Allen AA, Wickiewicz T et al. (2010): The Maturation of Synthetic Scaffolds for Osteochondral Donor Sites of the Knee: An MRI and T2-Mapping Analysis. *Cartilage* 2010 1, 20-28

Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM (2004): Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft „Geweberegeneration und Gewebeersatz“ zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop* 2004 142, 529-539

Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2009« Robert Koch Institut 2011

Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J (2003): A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. J Bone Joint Surg Br 85, 223-230

Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978): Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. Cell 15, 1313-1321

Bobic V (1999): Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. Orthopade 28, 19-25

Bös L, Ellermann A (2003): Arthroscopic diagnosis and classification of articular cartilage lesions. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 54, Nr. 6 (2003), 181-183

Braun S, Vogt S, Imhoff AB (2007): Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation. Orthopade 36, 589-599

Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M (2001): Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. J Orthop Res 19, 482-492

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331, 889-895

Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L (1996): Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. Clin Orthop Relat Res 326, 270-283

Brittberg M, Winalski CS (2003): Evaluation of cartilage injuries and repair. J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2, 58-69

Brittberg M (2010): 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 38, 1259-1271

Brucker P, Agneskirchner JD, Burkart A, Imhoff AB (2002): Mega-OATS. Technique and outcome. Unfallchirurg 105, 443-449

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998a): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect 47, 487-504

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998b): Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis Rheum 41, 1331-1342

Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S (2010): Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. J Bone Joint Surg Am 92 Suppl 2, 2-11

Buma P, Pieper JS, Tienen T, Van Susante JL, Van der Kraan PM, Veerkamp JH, Van den Berg WB, Veth RP, Van Kuppevelt TH (2003): Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects - a study in rabbits. Biomaterials 24, 3255-3263

Burkart A, Imhoff AB (1999): Therapie des Knorpelschadens: Heute und Morgen. Arthroskopie 12, 279-288

Carmont MR, Carey-Smith R, Saithna A, Dhillon M, Thompson P, Spalding T (2009): Delayed incorporation of a TruFit plug: perseverance is recommended. Arthroscopy 25, 810-814

Chiang H, Liao CJ, Wang YH, Huang HY, Chen CN, Hsieh CH, Huang YY, Jiang CC (2010): Comparison of articular cartilage repair by autologous chondrocytes with and without in vitro cultivation. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 291-300

Cole BJ, Farr J, Winalski CS, Hosea T, Richmond J, Mandelbaum B, De Deyne PG (2011): Outcomes After a Single-Stage Procedure for Cell-Based Cartilage Repair: A Prospective Clinical Safety Trial With 2-year Follow-up. *Am J Sports Med* 39, 1170-1179

Coletti JM Jr, Akeson WH, Woo SL (1972): A comparison of the physical behavior of normal articular cartilage and the arthroplasty surface. *J Bone Joint Surg Am* 54, 147-160

Cotta H (1977): Acute traumatic cartilage damage. Experimental studies and their practical consequences. *Langenbecks Arch Chir* 345, 415-422

Dai XS, Cai YZ (2012): Matrix-induced autologous chondrocyte implantation addressing focal chondral defect in adolescent knee. *Chin Med J (Engl)* 125, 4130-4133

Damien CJ, Parsons JR (1991): Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2, 187-208

Dhollander AA, De Neve F, Almqvist KF, Verdonk R, Lambrecht S, Elewaut D, Verbruggen G, Verdonk PC (2011): Autologous matrix-induced chondrogenesis combined with platelet-rich plasma gel: technical description and a five pilot patients report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19, 536-542

Dhollander AA, Liekens K, Almqvist KF, Verdonk R, Lambrecht S, Elewaut D, Verbruggen G, Verdonk PC (2012): A pilot study of the use of an osteochondral scaffold plug for cartilage repair in the knee and how to deal with early clinical failures. *Arthroscopy* 28, 225-233

Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, Sturmer KM, Frosch KH (2009): Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 189, 317-326

Ebert JR, Robertson WB, Woodhouse J, Fallon M, Zheng MH, Ackland T, Wood DJ (2011): Clinical and magnetic resonance imaging-based outcomes to 5 years after matrix-induced autologous chondrocyte implantation to address articular cartilage defects in the knee. *Am J Sports Med* 39, 753-763

Erggelet C, Holz J, Lahm A, Kreuz P, Mrosek E (2008): Matrix-augmented autologous chondrocyte implantation in the knee-arthroscopic technique. *Oper Orthop Traumatol* 20, 199-207

Erggelet C, Kreuz PC, Mrosek EH, Schagemann JC, Lahm A, Ducommun PP, Ossendorf C (2010): Autologous chondrocyte implantation versus ACI using 3D-bioresorbable graft for the treatment of large full-thickness cartilage lesions of the knee. *Arch Orthop Trauma Surg* 130, 957-964

Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA (2004): Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33, 48-55

Filardo G, Kon E, Di Martino A, Iacono F, Marcacci M (2011a): Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation: a prospective 7-year follow-up study. *Am J Sports Med* 39, 2153-2160

Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M (2011b): Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19, 528-535

Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Martino A, Marcacci M (2013): Scaffold-Based Repair for Cartilage Healing: A Systematic Review and Technical Note. *Arthroscopy* 29, 174-186

Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ (2011): The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 469, 2706-2715

Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA (2009): Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 37, 2259-2272

Frentz B, Kirchner R (2003): The role of magnetic resonance imaging (MRI) in the diagnosis of hyaline cartilage defects of the knee. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, Jahrgang 54, Nr. 6, 178-180

Frisbie DD, Lu Y, Kawcak CE, Di Carlo EF, Binette F, McIlwraith CW (2009): In vivo evaluation of autologous cartilage fragment-loaded scaffolds implanted into equine articular defects and compared with autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med* 37 Suppl 1, 71S-80S

Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K (2006). Cartilage repair in the knee joint. *Unfallchirurg* 109, 563-574

Frosch KH, Drengk A, Krause P, Viereck V, Miosge N, Werner C, Schild D, Sturmer EK, Sturmer KM (2006): Stem cell-coated titanium implants for the partial joint resurfacing of the knee. *Biomaterials* 27, 2542-2549

Frosch KH, Voss M, Walde T, Balcarek P, Ferlemann K, Wachowski M, Sturmer EK, Sturmer KM (2010): A minimally invasive dorsal approach to the medial femoral condyle as a donor site for osteochondral transfer procedures. *Oper Orthop Traumatol* 22, 212-220

Gardner DL (1994): Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat* 184 (Pt 3), 465-476

Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B (2009): One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res* 467, 3307-3320

Gillogly SD (2003): Treatment of large full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *Arthroscopy* 19 Suppl 1, 147-153

Gomar-Sancho F, Gastaldi Orquin E (1987): Repair of osteochondral defects in articular weightbearing areas in the rabbit's knee. The use of autologous osteochondral and meniscal grafts. *Int Orthop* 11, 65-69

Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, Van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E (2010): The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18, 434-447

Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G (2002): Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 13, 529-535

Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC (2010): Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am* 92, 2220-2233

Heir S, Nerhus TK, Rotterud JH, Loken S, Ekeland A, Engebretsen L, Aroen A (2010): Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery. *Am J Sports Med* 38, 231-237

Hock JM, Canalis E (1994): Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 134, 1423-1428

Horas U, Schnettler R (2002): Chondral Defects of the Knee Treated by Transplantation of Autogenous Osteochondral Plugs. *Operat Orthop Traumatol* 14, 237-252

<http://www.cartilage.org>

<http://www.gbe-bund.de>

<http://www.kulzer-technik.de>

<http://www.visio-online.de>

Im GI, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH (2001): Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg Br* 83, 289-294

Imhoff AB, Oetli GM (1999): Arthroscopic and open techniques for transplantation of osteochondral autografts and allografts in various joints. *Surg Technol Int* 8, 249-252

Imhoff AB, Oetli GM, Burkart A, Traub S (1999a): Autologous osteochondral transplantation on various joints. *Orthopade* 28, 33-44

Imhoff AB, Burkart A, Oetli GM (1999b): Transfer of the posterior femoral condyle. First experience with a salvage operation. *Orthopade* 28, 45-51

Jacobi M, Villa V, Magnussen RA, Neyret P (2011): MACI - a new era? *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 3, 10

Jiang CC, Chiang H, Liao CJ, Lin YJ, Kuo TF, Shieh CS, Huang YY, Tuan RS (2007): Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *J Orthop Res* 25, 1277-1290

Johnson LL (1986): Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2, 54-69

Johnson LL (2001): Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res* 391 Suppl, S306-317

Jones DG, Peterson L (2006): Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Am* 88, 2502-2520

Joshi N, Reverte-Vinaixa M, Diaz-Ferreiro EW, Dominguez-Oronoz R (2012): Synthetic resorbable scaffolds for the treatment of isolated patellofemoral cartilage defects in young patients: magnetic resonance imaging and clinical evaluation. *Am J Sports Med* 40, 1289-1295

Jungmann PM, Tham SC, Liebl H, Nevitt MC, McCulloch MC, Lynch J, Link TM (2013): Association of trochlear dysplasia with degenerative abnormalities in the knee: data from the Osteoarthritis Initiative. *Skeletal Radiol* 42, 1383-1392

Kalson NS, Gikas PD, Briggs TW (2010): Current strategies for knee cartilage repair. *Int J Clin Pract* 64, 1444-1452

Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbuhl R, Szalay K (2008): The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 29, 3983-3992

Kessler S, Guenther KP, Puhl W (1998): Scoring Prevalence and Severity in Gonarthrosis: the Suitability of the Kellergreen and Lawrence Scale. *Clin Rheumatol* 17, 205-209

Kessler MW, Grande DA (2008): Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis* 4, 28-32

Lee JH, Kisiday J, Grodzinsky AJ (2003): Tissue-engineered versus native cartilage: linkage between cellular mechano-transduction and biomechanical properties. *Novartis Found Symp* 249, 52-69

Lin Z, Fitzgerald JB, Xu J, Willers C, Wood D, Grodzinsky AJ, Zheng MH (2008): Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res* 26, 1230-1237

Lin YJ, Yen CN, Hu YC, Wu YC, Liao CJ, Chu IM (2009): Chondrocytes culture in three-dimensional porous alginate scaffolds enhanced cell proliferation, matrix synthesis and gene expression. *J Biomed Mater Res* A 88, 23-33

Löhnert J, Ruhnau K, Gossen A, Bernsmann K, Wiese M (1999): Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) im Kniegelenk: Erste klinische Ergebnisse. *Arthroskopie* 1999, 12, 34-42

Lu Y, Dhanaraj S, Wang Z, Bradley DM, Bowman SM, Cole BJ, Binette F (2006): Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J Orthop Res* 24, 1261-1270

Magnuson PB (1946): Technic of debridement of the knee joint for arthritis. *Surg Clin North Am* 1946 Feb, 249-266

Magnuson PB (1974): The classic: Joint debridement: surgical treatment of degenerative arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 101, 4-12

Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP (2008): Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 466, 952-962

Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR (2013): Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg* 133, 153-165

Mankin HJ (1982): The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64, 460-466

Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E, Visani A, Iacono F, Loretto I (2002): Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10, 154-159

Marlovits S, Vecsei V (2000a): Current Concepts in Surgical Treatment of Articular Cartilage Defects - Part 1: Basic Science of Cartilage Biology and Cartilage Healing. *Acta Chir Austriaca* 32, 124-129

Marlovits S, Vecsei V (2000b): Current Concepts in Surgical Treatment of Articular Cartilage Defects - Part 2: Surgical Treatment Options for Biologic Cartilage Repair. *Acta Chir Austriaca* 32, 185-194

Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vecsei V (2004a): Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint. Techniques and results. *Radiologe* 44, 763-772

Marlovits S, Nürnberger S, Kolonja A, Singer P, Zeller P, Mandl I, Vécsei V (2004b): Matrixgekoppelte autologe Knorpelzelltransplantation: Biomaterialien als Träger-substanzen/Biologische Eigenschaften. *Trauma Berufskrankh* 2004, 6, 314-323

Marlovits S, Aldrian S, Tichy B, Albrecht C, Nurnberger S (2009): Biomaterial for autologous chondrocyte transplantation. *Orthopäde* 38, 1045-1052

Marmotti A, Bruzzone M, Bonasia DE, Castoldi F, Rossi R, Piras L, Maiello A, Realmuto C, Peretti GM (2012): One-step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite scaffold. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20, 2590-2601

Martin I, Miot S, Barbero A, Jakob M, Wendt D (2007): Osteochondral tissue engineering. *J Biomech* 40, 750-765

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998): Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85, 638-646

Messner K, Gillquist J (1993): Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomaterials* 14, 513-521

Meyers MH, Akeson W, Convery FR (1989): Resurfacing of the knee with fresh osteochondral allograft. *J Bone Joint Surg Am* 71, 704-713

Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T (2009): Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med* 37, 902-908

Mooren RE, Merkx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ (2007): The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36, 626-631

Mooren RE, Dankers AC, Merkx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ (2010): The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous bone and Bio-Oss: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39, 371-378

Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP (2002): A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 347, 81-88

Moseley JB Jr, Anderson AF, Browne JE, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Fu F, Erggelet C (2010): Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients. *Am J Sports Med* 38, 238-246

Müller PE, Schimpf F, Milz S, Kircher J, Durr HR, Wegener B, Pellengahr C, Jansson V (2006): Repair of osteochondral defects in the knee by resorbable bioimplants in a rabbit model. *Acta Orthop* 77, 981-985

Nagura I, Fujioka H, Kokubu T, Makino T, Sumi Y, Kurosaka M (2007): Repair of osteochondral defects with a new porous synthetic polymer scaffold. *J Bone Joint Surg Br* 89, 258-264

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1998): Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 19, 2313-2328

Niederauer GG, Slivka MA, Leatherbury NC, Korvick DL, Harroff HH, Ehler WC, Dunn CJ, Kieswetter K (2000): Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials* 21, 2561-2574

Niemeyer P, Koestler W, Sudkamp NP (2011): Problems and complications of surgical techniques for treatment of full-thickness cartilage defects. *Z Orthop Unfall* 149, 45-51

Niemeyer P, Pestka JM, Salzmann GM, Sudkamp NP, Schmal H (2012): Influence of cell quality on clinical outcome after autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med* 40, 556-561

Noyes FR, Barber-Westin SD (2013): Advanced patellofemoral cartilage lesions in patients younger than 50 years of age: is there an ideal operative option? *Arthroscopy* 29, 1423-1436

O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1988): Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 70, 595-606

Outerbridge RE (1961): The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br* 43 B, 752-757

Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A (2002): Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 30, 2-12

Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A (2010): Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 38, 1117-1124

Pridie K (1959): A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. J Bone Joint Surg Br 41, 618-619

Proffen B, Von Keudell A, Vavken P (2012): Evidence-based therapy for cartilage lesions in the knee - regenerative treatment options. Z Orthop Unfall 150, 280-289

Radin EL, Burr DB (1984): Hypothesis: joints can heal. Semin Arthritis Rheum 13, 293-302

Radin EL, Rose RM (1986): Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. Clin Orthop Relat Res 1986, 213, 34-40

Rahn BA (1976): Biomechanical aspects of implantation in bone. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd 86, 946-953

Rehart S, Lehnert H (2008): Arthrosis update. Z Rheumatol 67, 305-314

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006): Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 27, 3413-3431

Rodriguez-Merchan EC (2013): Regeneration of articular cartilage of the knee. Rheumatol Int 33, 837-845

Rudert M, Wirth CJ (1998): Cartilage regeneration and substitution. Orthopade 27, W309-321

Russlies M, Behrens P, Wunsch L, Gille J, Ehlers EM (2002): A cell-seeded biocomposite for cartilage repair. Ann Anat 184, 317-323

Salzmann GM, Niemeyer P, Steinwachs M, Kreuz PC, Sudkamp NP, Mayr HO (2011): Cartilage repair approach and treatment characteristics across the knee joint: a European survey. Arch Orthop Trauma Surg 131, 283-291

Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int* 20, 1999-2008

Serra CI, Soler C, Caill JM, Sopena JJ, Redondo JI, Cuqat R (2012): Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21, 1730-1736

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

Slivka MA, Leatherbury NC, Kieswetter K, Niederauer GG (2001): Porous, resorbable, fiber-reinforced scaffolds tailored for articular cartilage repair. *Tissue Eng* 7, 767-780

Smith & Nephew GmbH (Hrsg.) (2007): Innovative Rekonstruktionstherapie bei osteochondralen Defekten und Knorpelschäden: OBI TruFit Implantate bieten ideale Therapieoption. *smith&nephew news*, Ausgabe 02/2007, 1-2 (Ausgabe nicht mehr im freien Netz verfügbar; Exemplar wurde beim Verfasser archiviert)

Spahn G (2006): Cartilage Lesions and gonarthrosis, Part 1: Physiology and Pathophysiology of Cartilage and knee. *Akt Traumatol* 36, 1-13

Spahn G, Wittig R, Kahl E, Klinger HM, Mückley T, Hofmann GO (2007): Diagnostik von Knorpelschäden des Kniegelenks: Validität der klinischen, radiologischen und kernspintomographischen Diagnostik im Vergleich zur Arthroskopie. *Unfallchirurg* 110, 414-424

Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999): The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade* 28, 26-32

Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001): Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* 391 Suppl, S362-369

Strauss EJ, Fonseca LE, Shah MR, Yorum T (2011): Management of focal cartilage defects in the knee - Is ACI the answer? Bull NYU Hosp Jt Dis 69, 63-72

Sulzbacher I (2000): Arthrose – Histologie und pathogenetische Ansätze. Radiologe 40, 1126–1133

Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG (2010): The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. Int Orthop 34, 589-597

Swoboda B (2001): Epidemiological arthrosis research. Orthopade 30, 834-840

Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L (2010): Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging technique. Am J Sports Med 38, 943-949

Voß M (2010): Klinische und kernspintomographische Ergebnisse nach Implantation von artifiziellen TruFit-Zylindern in die Entnahmedefekte bei der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation. Dissertation Göttingen 2010

Vundelinckx B, De Mulder K, De Schepper J (2012): Osteochondral defect in femoral head: TruFit implantation under fluoroscopic and arthroscopic control. Acta Orthop Belg 78, 796-799

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994): Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 76, 579-592

Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, Yu Y, Irie H, Bruce W (2008): Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. Biomaterials 29, 266-271

Wei X, Gao J, Messner K (1997): Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res* 34, 63-72

Willers C, Chen J, Wood D, Xu J, Zheng MH (2005): Autologous chondrocyte implantation with collagen bioscaffold for the treatment of osteochondral defects in rabbits. *Tissue Eng* 11, 1065-1076

Williams RJ III, Niederauer GG (2007): Articular Cartilage Resurfacing Using Synthetic Resorbable Scaffolds. *Cartilage Repair Strategies* 2007, 115-135

Williams RJ, Gamradt SC (2008): Articular cartilage repair using a resorbable matrix scaffold. *Instr Course Lect* 57, 563-571

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA (2004): Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* 15, 187-193

Woolf AD (2000): The bone and joint decade 2000-2010. *Ann Rheum Dis* 59, 81-82

Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81, 646-656

Yan H, Yu C (2007): Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 23, 178-187

Yang R, Davies CM, Archer CW, Richards RG (2003): Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater* 6, 57-71

Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, De Boer J, Barradas AM, De Ruitter A, Walsh WR, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD (2010): Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13614-13619

Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H (2010): Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med* 38, 924-933

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Klaus Michael Stürmer als Abteilungsleiter der Unfallchirurgie für die Möglichkeit bedanken, eine experimentelle Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. med. Peter Balcarek als Initiator des Projekts für die hervorragende Betreuung und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Durch seine ständige Präsenz und Erreichbarkeit sowie seine stets konstruktiven Erläuterungen und Korrekturen hat er ganz wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Er ermöglichte zudem die Veröffentlichung unserer Ergebnisse auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2011 in Gießen.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors Dr. rer. nat. Marina Komrakova, Annette Witt, Fritz Kauer und vor allem Ramona Castro-Machguth für ihre ständige Unterstützung und Hilfestellung bei jeglichen Problemen.

Außerdem danke ich Dr. med. Thomas Rack für die Programmierung der Software zur Auswertung der Mikroradiographien sowie Dr. med. Jan Philipp Schüttrumpf für die Beteiligung bei der Operation der Versuchstiere.

Mein Dank gilt außerdem der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen für die professionelle Betreuung und Haltung der Tiere.

Lebenslauf

Mein Name ist Milosch Michalak, ich wurde am 12.01.1986 als Sohn von Ewa und Waldemar Michalak in Posen geboren. Mein Bruder Thomas Michalak wurde am 16.10.1981 ebenfalls in Posen geboren. Im Februar des Jahres 1988 siedelte meine Familie nach Bremerhaven und anschließend nach Bremen um, wo ich bis zum Studium wohnte. Am 04.04.1991 wurde meine Schwester Maria Michalak in Bremen geboren.

Meine Schulausbildung begann an der Grundschule St.-Pius in Bremen. Hieran schloss sich ein Besuch der Orientierungsstufe St.-Marien und der Mittelstufe St.-Johann an. Meine Hochschulreife erlangte ich schließlich 2005 an der Oberstufe des Hermann-Böse-Gymnasiums Bremen. Anschließend an das Abitur absolvierte ich meinen neunmonatigen Zivildienst im Altenpflegeheim Haus Huchting und ein dreimonatiges Pflegepraktikum im Roten Kreuz Krankenhaus Bremen.

Im Oktober 2006 nahm ich mein Studium an der Georg-August-Universität zu Göttingen auf. Im September 2008 legte ich dort die Erste Ärztliche Prüfung ab. Im anschließenden klinischen Studienabschnitt absolvierte ich Famulaturen im Bereich Innere Medizin (03/2009 Rotes Kreuz KH Bremen), Anästhesiologie (08/2009 St.-Joseph-Stift Bremen), Allgemeinchirurgie (09/2009 St.-Joseph-Stift Bremen), Unfallchirurgie (03/2010 Ev. KH Göttingen-Weende), Zentrale Notaufnahme (08/2010 Ev. KH Göttingen-Weende) sowie in der diagnostischen Radiologie (03/2011 Ev. KH Göttingen-Weende). Nach erfolgreichem Abschluss des klinischen Studienabschnitts begann ich mein Praktisches Jahr im September 2011 in der Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Als Wahlfach wählte ich die Anästhesiologie, Intensiv- und Rettungsmedizin und führte dieses im St.-Joseph-Stift Bremen durch. Mein drittes Tertial absolvierte ich im Klinikum Bremerhaven Reinkenheide in der Abteilung für Innere Medizin. Die Zweite Ärztliche Prüfung konnte ich dann im November 2012 erfolgreich ablegen.

Meine Dissertation begann ich im Oktober 2010 in der Abteilung Unfallchirurgie an der Georg-August-Universität. Die Ergebnisse veröffentlichten wir 2011 auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien in Gießen. Seit April 2013 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie im Klinikum Bremen-Mitte beschäftigt.