

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroserforschung
Universität des Saarlandes
Zentrum für Experimentelle Orthopädie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. H. Madry

**Subchondrale Bohrlochdurchmesser
entsprechend dem physiologischen
Trabekelabstand führen zur
verbesserten Knorpeldefektreparatur:
Analysen im translationalen Schafmodell**

**Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2014

vorgelegt von: Mona Eldracher
geboren am: 28. März 1989 in Wiesbaden-Dotzheim

Für meine Eltern und Daniel.

A. Inhaltsverzeichnis

A.	Inhaltsverzeichnis	1
A.1	Abkürzungen	4
A.2	Abbildungen	5
A.3	Tabellen	6
B.	Kurzzusammenfassung/Abstract	7
B.1	Kurzzusammenfassung.....	7
B.2	Abstract	8
C.	Einleitung	9
C.1	Problematik und Überblick.....	9
C.2	Biologische Grundlagen des hyalinen Gelenkknorpels.....	10
C.3	Der Knorpelaufbau	11
C.4	Die osteochondrale Einheit.....	12
C.5	Einteilung der Knorpeldefekte	13
C.6	Klinische Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten.....	14
C.7	Markraumeröffnende Verfahren mit besonderem Blick auf die Pridie-Bohrung.....	16
C.7.1	Einfluss von markraumeröffnenden Verfahren auf die Knorpelreparatur.....	17
C.7.2	Einfluss von markraumeröffnenden Verfahren auf den subchondralen Knochen.....	18
C.7.3	Rehabilitation nach markraumeröffnenden Verfahren	19
C.7.4	Klinische Ergebnisse nach markraumeröffnenden Verfahren.....	19
C.8	Konzept der vorliegenden Arbeit	20
D.	Hypothese.....	21
E.	Studiendesign	21
F.	Material	22
F.1	Lösungen, Puffer und Medien	22
F.2	Chemikalien.....	23
F.3	Antikörper	24
F.4	Enzyme	24
F.5	Tierstämme	25
F.6	Geräte und Verbrauchsmaterialen	25
F.7	Computerprogramme.....	26
F.8	Operationsinstrumentarium und –materialien	26

F.9	Verbrauchsmaterialien.....	26
G.	Methoden.....	27
G.1	Großtiermodell	27
G.2	Anästhesie, Operation und postoperative Behandlung.....	28
G.3	Makroskopische Begutachtung der Explantate	30
G.4	Makroskopische Evaluation des angrenzenden Knorpels per Tuschefärbung	30
G.5	Hochauflösendes Mikro-CT	31
G.5.1	Mikro-CT Darstellung	31
G.5.2	Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten.....	32
G.5.3	Standardisierte Definition der „ <i>volumes of interest</i> “ (VOI)	33
G.5.4	Mikro-CT Parameter	33
G.6	Histologische Evaluation des Reparaturgewebes	34
G.6.1	Lagerung und Entkalkung	34
G.6.2	Entwässerung und Einbetten	34
G.6.3	Schneiden	35
G.6.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	35
G.6.5	Safranin-O-Färbung.....	35
G.6.6	Evaluation.....	35
G.7	Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes	38
G.7.1	Papain-Verdau	39
G.7.2	DNS-Bestimmung (Hoechst-33258-Test).....	39
G.7.3	Protein-Bestimmung (<i>bicinchoninic acid</i> Test; BCA-Test).....	40
G.7.4	Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test).....	40
G.7.5	Typ-I- und Typ-II-Kollagen Bestimmung (ELISA).....	41
G.8	Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I- und Typ-II-Kollagen	42
G.8.1	Evaluation der Immunreaktivität für Typ-I- und Typ-II-Kollagen.....	43
G.9	Korrelationen.....	44
G.10	Statistische Analysen.....	44
H.	Ergebnisse	45
H.1	Reparatur des Gelenkknorpels.....	45
H.1.1	Makroskopische Begutachtung	45
H.1.2	Histologische Auswertung des Reparaturgewebes.....	46
H.1.3	Immunhistochemischer Nachweis von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe	49

A. Inhaltsverzeichnis

H.1.4	Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe.....	49
H.1.5	Biochemie des Reparaturgewebes.....	51
H.1.6	Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels.....	57
H.2	Reparatur des subchondralen Knochens.....	62
H.2.1	Mikro-CT.....	62
H.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I-Kollagen.....	64
H.3	Korrelationen.....	67
H.3.1	Korrelation innerhalb des osteochondralen Defektareals.....	67
H.3.2	Korrelation des angrenzenden Knorpels.....	68
I.	Diskussion.....	69
I.1	Reparatur des Gelenkknorpels.....	69
I.1.1	Histologische Evaluation des Reparaturgewebes.....	69
I.1.2	Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes.....	70
I.1.3	Typ-II-Kollagen-Gehalt des Reparaturgewebes.....	71
I.1.4	Typ-I-Kollagen-Gehalt des Reparaturgewebes.....	71
I.1.5	Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Knorpels.....	72
I.2	Rekonstitution des subchondralen Knochens.....	72
I.2.1	Histologische Evaluation des subchondralen Knochens.....	72
I.2.2	Intraläsionale Osteophyten und subchondrale Knochenzysten.....	73
I.2.3	Veränderungen des subchondralen Knochens nach subchondraler Anbohrung.....	74
I.2.4	Veränderungen der subchondralen Knochenplatte.....	75
I.2.5	Veränderungen der subartikulären Spongiosa.....	76
I.3	Korrelationen.....	78
I.3.1	Korrelationen innerhalb des osteochondralen Defektareals.....	78
I.3.2	Korrelationen innerhalb des angrenzenden Knorpels.....	78
I.4	Limitierungen des gewählten Modells.....	79
I.5	Translationale Aspekte.....	80
I.6	Ausblick.....	80
J.	Zusammenfassung.....	81
K.	Literaturverzeichnis.....	82
L.	Publikationen und Vorträge.....	101
M.	Danksagung.....	102

A.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
aqua bidest	destilliertes Wasser
BMD	Knochenmineraldichte (<i>bone mineral density</i>)
BS/BV	Knochenoberfläche/Volumen (<i>bone surface/volume</i>)
BS/TV	Knochenoberflächendichte (<i>bone surface density</i>)
BV/TV	Knochenvolumenanteil (<i>bone volume fraction</i>)
bzw.	beziehungsweise
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
Ct.Th	kortikale Dicke (<i>cortical thickness</i>)
DA	Grad der Anisotropie (<i>degree of anisotropy</i>)
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	antikörperbasiertes Nachweisverfahren (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FD	Fraktale Dimension (<i>fractal dimension</i>)
h	Stunde
max.	maximal
Mikro-CT	Mikrofokus-Computertomographie
min	Minute
MW	Mittelwert
n.b.	nicht bestimmbar
n.e.	nicht erhoben
PG	Proteoglykane
ROI	Bereich von Interesse (<i>region of interest</i>)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SKA	Subchondrale Knochenplatte angrenzend
SKD	Subchondrale Knochenplatte Defekt
SKL	Subchondrale Knochenplatte lateral
SKM	Subchondrale Knochenplatte medial
SMI	<i>structure model index</i>
Spearman	Spearman's Korrelationskoeffizient
SSA	Subartikuläre Spongiosa angrenzend
SSD	Subartikuläre Spongiosa Defekt
SSL	Subartikuläre Spongiosa lateral
SSM	Subartikuläre Spongiosa medial
Tb.Sp	Trabekelabstand (<i>trabecular separation</i>)
Tb.Th	Trabekeldicke (<i>trabecular thickness</i>)
Tb.N	Trabekelanzahl (<i>trabecular number</i>)
Tb.Pf	trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (<i>trabecular pattern factor</i>)
ü.N.	über Nacht
VOI	Volumen von Interesse (<i>volume of interest</i>)

A.2 Abbildungen

Abbildung 1: Einteilung der Knorpeldefekte und Knorpelzonen.....	14
Abbildung 2: Kenneth Hampden Pridie	17
Abbildung 3: Auszug aus der Originalpublikation von K.H. Pridie	17
Abbildung 4: Übersicht über die angewendeten Methoden	27
Abbildung 5: Maßstabsgerechtes Schema der Bohrlochdurchmesser und des Defektareals	29
Abbildung 6: Schemazeichnung der Defektlokalisierung in der Trochlea ossis femoris	29
Abbildung 7: Beispiel eines mit Tusche gefärbten Präparats.....	31
Abbildung 8: Eichgerade zur Berechnung der Knochenmineraldichte	32
Abbildung 9: Veranschaulichung der ROIs	34
Abbildung 10: Beispiel einer Kalibrierungsgerade des Hoechst-Tests	40
Abbildung 11: Makroskopische Begutachtung der Knorpelreparatur nach Pridie-Bohrung	46
Abbildung 12: Ergebnisse der histologischen Begutachtung nach Sellers <i>et al.</i>	48
Abbildung 13: Schematische Darstellung der histologischen Gesamtpunktwerte	49
Abbildung 14: Darstellung der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen und Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe und Typ-I-Kollagen im subchondralen Knochen	50
Abbildung 15: Biochemischer Vergleich zwischen dem Reparaturgewebe und dem Originalknorpel (DNS, Proteoglykane)	52
Abbildung 16: Biochemischer Vergleich zwischen dem Reparaturgewebe und dem Originalknorpel (Typ-I Kollagen)	53
Abbildung 17: Biochemischer Vergleich zwischen dem Reparaturgewebe und dem Originalknorpel (Typ-II Kollagen)	54
Abbildung 18: Abbildung der Tuschefärbung.....	57
Abbildung 19: Biochemischer Vergleich zwischen dem angrenzenden Knorpel und dem Originalknorpel (DNS, Proteoglykane)	59
Abbildung 20: Biochemischer Vergleich zwischen dem angrenzenden Knorpel und dem Originalknorpel (Typ-I Kollagen)	60
Abbildung 21: Biochemischer Vergleich zwischen dem angrenzenden Knorpel und dem Originalknorpel (Typ-II Kollagen)	61
Abbildung 22: Veranschaulichung dreier intraläsionaler Osteophyten im Mikro-CT.	62
Abbildung 23: Knochenmineraldichte	63
Abbildung 24: Mikro-CT Abbildungen des subchondralen Knochens	64
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Bohrlochdurchmesser im Mikro-CT Bild.....	77

A.3 Tabellen

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien	22
Tabelle 2: Chemikalien	23
Tabelle 3: Antikörper	24
Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 5: Bewertungssystem zur makroskopischen Begutachtung der Knorpelreparatur nach Goebel <i>et al.</i>	30
Tabelle 6: Bewertungssystem für Knochenzysten nach Hoemann <i>et al.</i>	32
Tabelle 7: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers <i>et al.</i>	36
Tabelle 8: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Wakitani <i>et al.</i>	37
Tabelle 9: Bewertungssystem des angrenzenden Knorpels nach Little <i>et al.</i>	38
Tabelle 10: Schema zur Herstellung der Standardreihe des Hoechst-Tests	39
Tabelle 11: Schema zur Herstellung der Standardreihe im BCA-Test.....	40
Tabelle 12: Schema zur Herstellung der Standardreihe im DMMB-Test	41
Tabelle 13: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität	43
Tabelle 14: Interpretation des Korrelationskoeffizienten	44
Tabelle 15: Ergebnisse der makroskopischen Begutachtung	45
Tabelle 16: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Knorpeldefektreparatur mittels des Bewertungssystems nach Sellers <i>et al.</i>	47
Tabelle 17: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Knorpeldefektreparatur mittels des Bewertungssystems nach Wakitani <i>et al.</i>	47
Tabelle 18: Biochemische Ergebnisse (DNS, Proteoglykane, Typ-I- und Typ-II-Kollagen)	55
Tabelle 19: Biochemische Ergebnisse: Vergleich zwischen Originalknorpel, Reparaturgewebe und angrenzendem Knorpel	56
Tabelle 20: Ergebnisse der histologischen Evaluation des angrenzenden Knorpels nach Little <i>et al.</i>	58
Tabelle 21: Anzahl der subchondralen Knochenzysten und intraläsionalen Osteophyten	62
Tabelle 22: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa	65
Tabelle 23: Vergleich der Miko-CT Ergebnisse zwischen dem Defektareal und dem angrenzenden subchondralen Knochen.....	66
Tabelle 24: Korrelationen innerhalb des Defektareals	67
Tabelle 25: Korrelationen innerhalb des angrenzenden Knorpels.....	68

B. Kurzzusammenfassung/Abstract

B.1 Kurzzusammenfassung

HINTERGRUND: Die Pridie-Bohrung ist ein etabliertes Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten. Interessanterweise sind wesentliche Grundlagen der Pridie-Bohrung, insbesondere die Dimension der Bohrlöcher, bislang nicht systematisch untersucht. Dieser Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass subchondrale Bohrlochdurchmesser entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens nur geringgradig beeinträchtigen und demnach eine verbesserte Reparatur der osteochondralen Einheit resultiert.

METHODEN: In der Trochlea femoris von 14 ausgewachsenen Merinoschafen wurde ein vollschichtiger rechteckiger Knorpeldefekt erzeugt und mit je 6 subchondralen Bohrlöchern mit einem Durchmesser von entweder 1,0 mm (entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand) oder 1,8 mm therapeutisch angebohrt. Nach 6 Monaten wurde die Reparatur der osteochondralen Einheit mittels Mikro-CT sowie makroskopischer, histologischer, biochemischer und immunhistochemischer Bewertungssysteme und Methoden evaluiert.

ERGEBNISSE: Knorpelreparatur: Die makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen 1,0 mm- und 1,8 mm-Bohrlöchern. Die histologische Auswertung wies bei der 1,0 mm-Gruppe eine signifikant bessere Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Reparatur des subchondralen Knochens sowie Gesamtpunktwert (verglichen mit 1,8 mm-Bohrungen) auf. Das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Bohrlöcher war charakterisiert durch eine signifikant höhere Zellaktivität, eine signifikant höherwertige Qualität der extrazellulären Matrix sowie verbesserten biochemischen Parametern (DNS-, Proteoglykan-, Typ-II-Kollagen-Gehalt) im Vergleich zum gesunden Originalknorpel. Im Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe war die Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen signifikant höher und für Typ-I-Kollagen signifikant geringer als die der 1,8 mm-Gruppe. Innerhalb des Knorpelreparaturgewebes beider Gruppen korrelierte der Proteoglykan-Gehalt mit der Zellzahl und dem Typ-II-Kollagen-Gehalt. **Reparatur des subchondralen Knochens:** Die Mikro-CT Analyse zeigte, dass die Breite der subchondralen Knochenplatte (Ct.Th) nach 1,0 mm-Bohrungen eher dem Normwert entsprach und ein signifikant höheres Knochenvolumen (BV/TV) aufwies als die der 1,8 mm-Gruppe. Auch die subartikuläre Spongiosa zeigte nach 1,0 mm-Bohrungen ein signifikant höheres Knochenvolumen (BV/TV) charakterisiert durch zahlreichere (Tb.N), dünnere (Tb.Th) und stärker verzweigte (Tb.Pf) Trabekel. Darüber hinaus entsprach die Knochenmineraldichte (BMD) des Defektareals der 1,0 mm-Gruppe im gesamten subchondralen Knochen der des angrenzenden Knochens, während sie in der 1,8 mm-Gruppe signifikant reduziert war.

SCHLUSSFOLGERUNG: Bohrlochdurchmesser entsprechend dem natürlichen Trabekelabstand führten zu einer verbesserten Reparatur der osteochondralen Einheit im Vergleich mit größeren Bohrlöchern im Kniegelenk eines präklinischen Großtiermodells 6 Monate postoperativ. Diese Ergebnisse haben wichtige Konsequenzen für die klinische Durchführung der Markraumstimulation.

B.2 Abstract

Subchondral drill holes reflecting the physiological trabecular distance improve osteochondral repair

OBJECTIVE: Subchondral drilling is an established marrow stimulation technique. Here, we hypothesized that osteochondral repair is improved when the subchondral bone is perforated with a small drill bit reflecting the physiological subchondral trabecular distance.

METHODS: A rectangular full-thickness chondral defect was created in the trochlea of adult sheep and treated with 6 subchondral drillings of either 1.0 mm (reflective of the trabecular distance) or 1.8 mm. Osteochondral repair was assessed after 6 months *in vivo* by macroscopic, histological, immunohistochemical and biochemical analyses and micro-computed tomography.

RESULTS: Application of 1.0 mm subchondral drill holes led to significantly improved histological matrix staining, cellular morphology, subchondral bone reconstitution and average total histological score as well as higher immunoreactivity to type-II collagen and reduced immunoreactivity to type-I collagen in the repair tissue compared with 1.8 mm defects. Following 1.0 mm subchondral drilling, DNA and proteoglycan contents of the repair tissue were significantly higher compared to original cartilage. Analysis of OA changes in the cartilage adjacent to the defects revealed no significant differences between treatment groups. Restoration of the microstructure of the subchondral bone plate below the chondral defects was significantly improved after 1.0 mm compared to 1.8 mm drilling, as shown by higher bone volume (BV/TV) and reduced subchondral bone plate thickening. Likewise, the microarchitecture of the drilled subarticular spongiosa was better restored following 1.0 mm drilling, indicated by significantly higher BV/TV, and more and thinner trabeculae (Tb.Th, Th.N). Moreover, the bone mineral density (BMD) of the subchondral bone in 1.0 mm defects was similar to the adjacent subchondral bone, whereas it was significantly reduced in 1.8 mm defects. No significant correlations existed between cartilage and subchondral bone repair.

CONCLUSION: Small subchondral drill holes that reflect the physiological trabecular distance improve osteochondral repair in a translational model more effective than larger drill holes. These results have important implications for the clinical use of marrow stimulation techniques.

C. Einleitung

C.1 Problematik und Überblick

Hyaliner Knorpel ist essentiell für eine physiologische Gelenkfunktion^{78,205,207}. Die Ursachen von Knorpeldefekten sind vielfältig und reichen von arthrotischen Veränderungen und Traumata bis zu Erkrankungen des subchondralen Knochens, wie der Osteochondrosis dissecans oder der Osteonekrose, die sekundär zu Knorpelschäden führen^{78,93,148,205,207,249}. Trotz dieser vielfältigen Ätiologien resultieren sie alle in einer gestörten Gelenkfunktion mit Schmerzen, Gelenkschwellungen, Ergussbildungen und Bewegungseinschränkungen¹⁴⁵. Schreitet die Knorpelschädigung fort, kann sie unbehandelt zur sekundären Arthrose führen^{72,75,99,100,106,110,140,147,151,189,210,227,236,248}.

Aktuell ist keine Therapie verfügbar, die zur kompletten und dauerhaften Knorpelregeneration führt^{35,55,125,201}, d.h. einer Wiederherstellung des ursprünglichen hyalinen Gelenkknorpels^{142,148,188}. Vielmehr werden Knorpeldefekte durch ein Reparaturgewebe variabler Qualität ausgefüllt. Auch wenn dieses strukturelle Ähnlichkeiten mit dem gesunden Knorpel aufweist, so handelt es sich hierbei vorwiegend um Faserknorpel mit dauerhaft unzureichender mechanischer Belastbarkeit^{211,249}, sekundärer Mineralisationstendenz^{21,76,100} und einem hohen Typ-I-Kollagen-Anteil⁷³.

Die Pridie-Bohrung²¹⁵ ist ein markraumeröffnendes operativ-rekonstruktives Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten. Es ist einfach durchführbar, kostengünstig, auch arthroskopisch möglich und erlaubt die Durchführung von Folgeeingriffen^{17,123,179,250}. Dieses Verfahren führt nicht zur Knorpelregeneration, sondern zur Bildung eines Faserknorpels^{142,148,188}. Bisher liegen nur wenige vergleichende Studien zur genauen technischen Durchführung der Pridie-Bohrung vor. Insbesondere bleibt die Frage nach dem optimalen Bohrlochdurchmesser, dem wohl bedeutsamsten operationstechnischen Aspekten, bis heute ungeklärt. Subchondrale Anbohrung schlug Smillie bereits im Jahre 1957 zur Behandlung der Osteochondrosis dissecans vor²⁴¹. Kenneth Hampden Pridie²¹⁵ (Abbildung 2²¹⁴) wendete diese nach ihm benannte Technik 1959 erstmals bei Patienten mit Arthrose an und wählte damals einen Viertel-Zoll-Bohrer (ca. 6,35 mm Durchmesser)^{108,179,215}. Obwohl klinisch Bohrer zwischen 1,25-4,5 mm Breite¹⁷⁹ verwendet werden und diverse Autoren große Bohrer empfehlen¹⁷⁹, um den mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark einen möglichst großen Zugang zum Knorpeldefekt zu ermöglichen^{113,166,215,232,246}, gibt es bislang keine

präklinische oder klinische Großtiermodell-Studie, die den Einfluss des Bohrlochdurchmessers auf die Knorpeldefektreparatur systematisch prüft.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher den Einfluss des Bohrlochdurchmessers auf die Reparatur der osteochondralen Einheit in einem translationalen Schafmodell. Speziell überprüften wir die Hypothese, dass kleinere subchondrale Bohrlöcher (1,0 mm; entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand) zur verbesserten Knorpeldefektreparatur sowie Reparatur der osteochondralen Einheit führen als große Bohrlöcher (1,8 mm).

Der subchondrale Trabekelabstand beträgt bei der humanen Femurkondyle $0,75 \pm 0,15$ mm^{59,109,134,230} und bei der Schafttrochlea $0,90 \pm 0,08$ mm⁵⁸ (ermittelt anhand des Mikro-CTs) unter der Voraussetzung, dass die Knochen trabekel hauptsächlich senkrecht zur Gelenkoberfläche verlaufen. Bohrlöcher entsprechend des natürlichen Trabekelabstandes könnten sich besser in die bestehende physiologische Mikroarchitektur des subchondralen Knochens integrieren, während große Anbohrungen die Knochenstruktur potentiell stärker beeinträchtigen und so die Reparatur der osteochondralen Einheit erschweren. Den physiologischen Trabekelabstand reflektierend, wählten wir daher einen Bohrlochdurchmesser von 1,0 mm. Dieser wurde mit einem Bohrlochdurchmesser von 1,8 mm (nicht physiologischer Trabekelabstand) verglichen.

C.2 Biologische Grundlagen des hyalinen Gelenkknorpels

Der gesunde Knorpel ist durch seinen Aufbau, die glatte Oberfläche und den geringen Reibungswiderstand in idealerweise an Belastung in Form von Stoß- und Druckkräften angepasst^{38,255}. Knorpelschädigungen entstehen durch Schub-, Scher- und Reibkräfte¹¹. Hyaliner Knorpel ist bradytroph, avaskulär, anerval und alymphatisch^{104,194}. Seine spezifischen Zellen sind die Chondrozyten, die durch Diffusion aus Synovialflüssigkeit³⁴ und durch Gefäße des subchondralen Raums ernährt werden¹⁶⁴. Chondrozyten sind in ein dichtes Netzwerk aus extrazellulärer Matrix eingebettet¹⁴, haben keine Zell-Zell-Kontakte³⁸ und ein Gewebsvolumen von lediglich 1-5%^{37,38,87}. Sie organisieren die komplexe Knorpelstruktur^{38,92} und produzieren die umliegende Matrix¹⁹³. Die individuelle metabolische Chondrozyten-Aktivität ist überraschend hoch, doch aufgrund der geringen Zelldichte ist die Gesamtaktivität des Gewebes niedrig³⁷. Ihre Aktivität und Anzahl ist altersabhängig und verringert sich nach der Wachstumsphase^{35,37,39,138,139,155}.

Die mechanischen Eigenschaften des Knorpels sind abhängig von der extrazellulären Matrix. Diese besteht zu 70% aus Wasser, den übrigen Anteil bildet ein Netzwerk aus

strukturellen Makromolekülen^{92,210} (50-60% der Knorpel-Trockenmasse bilden Kollagenfibrillen, 15-20% Nicht-Kollagen-Proteine sowie Glykoproteine, 30% Proteoglykane^{38,148}). Die hydrophilen Proteoglykane (Protein-Polysaccharide) lagern sich an Hyaluronsäure an und halten so den Wassergehalt des Knorpels aufrecht¹⁰⁴. Sie sorgen für einen hohen hydrodynamischen Druck und seine Elastizität^{104,194}. Im Gelenkknorpel überwiegt Aggrecan, das maßgeblich für die Verteilung der Belastung ist^{90,210}. Typ-II-Kollagen beträgt 90-95% des Gesamtkollagens im hyalinen Knorpel^{38,194,210}. Im kalzifizierten Knorpel findet man hauptsächlich Typ-X Kollagen^{38,148} und in der knöchernen kortikalen Endplatte überwiegt Typ-I-Kollagen. Letzteres ist auch ein Marker für fibröses Reparaturgewebe¹⁹⁴. Des Weiteren findet man im Knorpel Typ-V-, -VI-, -IX-, -X-, -XI-, -XIV-Kollagene und andere Makromoleküle wie beispielsweise COMP, Decorin, Fibronectin, Fibromodulin¹⁹⁴. Kollagenfibrillen bilden ein dreidimensionales Netzwerk, das dem Knorpel seine Form und Zugfestigkeit verleiht^{20,38}. Ihre Faserrichtung folgt den einwirkenden Druck-, Zug- und Scherkräften¹⁰⁴. In gesundem Knorpel herrscht ein dynamisches Gleichgewicht aus Neubildung und Abbau von Knorpelmatrix. Auch das Knochengewebe wird kontinuierlich umgebaut und passt sich so an veränderte biomechanische Beanspruchungen an³⁸.

C.3 Der Knorpelaufbau

Die vier Schichten des Knorpels unterscheiden sich nicht nur anhand ihres Gehalts an Wasser, Proteoglykanen und Kollagen, sondern auch bezüglich der Schichtdicke, enthaltenen Zellen, Funktion und Elastizität^{38,87,104}. Die oberflächliche Schicht fungiert als Barriere zwischen der Synovialflüssigkeit und dem Knorpel^{38,104,107,210,237}. Sie besteht aus zwei Zonen, der apikalen Lamina splendens (parallel verlaufenden Kollagenfibrillen ohne Zellen), die als selektive Begrenzung bei der trophischen Versorgung der Chondrozyten dient¹⁹⁴, und der basal davon verlaufenden Tangentialzone (feine Fibrillen, ellipsoidartige, abgeflachte Chondrozyten, die vorwiegend parallel zur Knorpeloberfläche stehen). Darunter befindet sich die Transitionalzone, eine Übergangszone zwischen der oberflächlichen und der mittleren radialen Schicht³⁷. Die dritte Schicht, auch Tangentialzone genannt, ist die dickste Zone³⁸. Sie enthält wenig Wasser, viele Proteoglykane^{37,104} und runde Chondrozyten, die senkrecht zur Oberfläche stehende Säulen bilden. Die ebenfalls senkrecht verlaufenden Kollagenfibrillen, vorwiegend vom Typ-II, kreuzen die *tidemark* (Grenze zwischen kalzifiziertem Knorpel und Tangentialzone) und verankern sich in der kalzifizierten Zone des Knorpels^{107,148,194}. In dieser tiefen Schicht sind die Chondrozyten komplett von kalzifiziertem Knorpel umgeben und weisen nur eine sehr geringe metabolische Aktivität auf³⁷. Die *cement line* (osteocondrale

Grenzzone) trennt die subchondrale Knochenplatte von der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels¹⁴⁸.

C.4 Die osteochondrale Einheit

Unterhalb der osteochondralen Grenzzone befindet sich der subchondrale Knochen, bestehend aus subchondraler Knochenplatte und subartikulärer Spongiosa⁶⁰. Die subchondrale Knochenplatte, auch kortikale Endplatte genannt, ist eine kortikale Lamelle, die durch die ungleichmäßige Oberfläche eng mit dem Knorpelgewebe verankert ist. Diese solide Verbindung erlaubt die Resistenz gegenüber Scherkräften während Kompressions- und Zugbelastungen⁶⁶. Die darunterliegende subartikuläre Spongiosa besteht aus einem Netzwerk zahlreicher vorwiegend senkrecht zur Gelenkoberfläche verlaufender Trabekel^{148,196}.

Gesunder subchondraler Knochen absorbiert ca. 30% der auf das Kniegelenk einwirkenden Belastung^{107,216,218}, Knorpel nur 1-3%^{30,104}. Die restliche Last tragen Muskeln und Knochen. Die belastungsabhängige physiologische Deformierung der osteochondralen Einheit ist zur Aufrechterhaltung ihrer Ernährung und Synthese von Matrixbestandteilen und Knochengewebe notwendig¹⁰⁴. Im subchondralen Knochen verlaufen zahlreiche Arterien, Venen und Nerven. Die Gefäße verlaufen durch Kanäle in der subchondralen Knochenplatte, strahlen in die kalzifizierte Knorpelzone ein und ermöglichen so die Ernährung tiefer Knorpelzonen^{19,135,148,164}. Dieses subchondrale Gefäßnetz ermöglicht die Zufuhr von Glukose, Sauerstoff und Wasser¹⁰⁴.

Die Dicke und Dichte der subchondralen Knochenplatte ist abhängig von Spezies und Gelenk und variiert zusätzlich innerhalb eines Gelenks^{8,40}. Beispielsweise ist das humane Tibiaplateau im Zentrum 7- bis 12-fach dicker als peripher^{48,60,164,165}. Die Knorpeldicke ist abhängig von der Belastungsverteilung¹⁷⁸. Zentral ($1,23 \pm 0,29$ mm im Schafmodell) ist der Knorpel dicker als peripher ($0,3 \pm 0,18$ mm im Schafmodell)⁷. Die durchschnittliche Knorpeldicke im humanen Knie beträgt ca. 2,2 (1,7-2,6) mm²³⁴ und 1,0 mm (0,5-1,5 mm) im Schafsknie¹. Die Gelenkskongruenz ist ein maßgeblicher Faktor für die Knorpeldicke. In Regionen mit niedriger Gelenkkongruenz findet man einen dickeren Knorpel im Vergleich zu Arealen hoher Kongruenz, die von einem dünneren Knorpel bedeckt sind²³⁴. Die Dichte- und Mineralisations-Verteilung korreliert mit der Stärke der subchondralen Knochenplatte und ist am höchsten in Hauptbelastungszonen^{6,61,80,174,175,187,192}. Folglich variieren Dichte-, Mineralisation- und Dicke-Verteilung der subchondralen Knochenplatte, als auch Knorpeldicke und Gefäßversorgung belastungsabhängig^{7,148,175-177}. Der subchondrale

Knochen unterstützt den Gelenkknorpel biomechanisch^{60,148}, gemeinsam bilden sie die osteochondrale Einheit^{104,143,220}.

C.5 Einteilung der Knorpeldefekte

Knorpeldefekte können nach ihrer Tiefe in chondrale und osteochondrale Defekte eingeteilt werden. Beide Formen schränken die mechanische Belastbarkeit ein und können zur Arthrose führen^{33,110,151,251}.

Chondrale Läsionen betreffen ausschließlich das Knorpelgewebe^{142,148,188}. Sie sind unterteilt in teilschichtige (*partial thickness*) Defekte, die den oberflächlichen Knorpel betreffen, und vollschichtige (*full thickness*) Läsionen, die sämtliche Knorpelschichten durchdringen und bis an den subchondralen Knochen reichen¹⁹⁴ (Abbildung 1). Diese Klassifikation hat klinische Relevanz und findet sich daher wieder in den arthroskopischen Klassifikationen nach Noyes und Stabler¹⁸⁸ sowie der *International Cartilage Research Society (ICRS)*²⁸. Im Vergleich zu der Klassifikation nach Outerbridge²⁰⁶ unterscheiden sich beide durch eine differenziertere Beschreibung der Defekttiefe. Chondrale Knorpeldefekte werden nur durch eingewanderte mesenchymale Synoviozyten aufgefüllt (keine Verbindung zum Knochenmark)^{100,101,142}. In Knorpelregionen, die dem Defekt angrenzen, steigen die Mitosenanzahl und die Proteoglykan-Synthese an. Eine Defektheilung ist nicht zu beobachten^{101,115,251}.

Bei osteochondralen Defekten ist der subchondrale Knochen mitbetroffen^{121,142,148,188}. Aufgrund der Verbindung zum Knochenmark bildet sich ein Blutgerinnsel im Defekt^{75,110,232}. Dieses enthält pluripotente undifferenzierte mesenchymale Stammzellen, die zu Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren^{201,232} und somit den Defekt füllen. Wachstumsfaktoren werden freigesetzt, die Zellen bilden Proteoglykane und Typ-I- und Typ-II-Kollagen^{194,210,233}. So kommt es zur Bildung eines knorpeligen Reparaturgewebes und dem subchondralen Knochen²³². Allerdings bilden die Zellen weniger Typ-II-Kollagen und Proteoglykane, auch die Struktur entspricht nicht der des gesunden hyalinen Knorpels²¹⁰.

Typische Lokalisationen von Knorpelläsionen sind die Hauptbelastungszonen wie die mediale Femurkondyle^{18,44,54,97} und das patellofemorale Gleitlager⁸⁴. Nur 5% aller Knorpelläsionen sind osteochondral¹⁶².

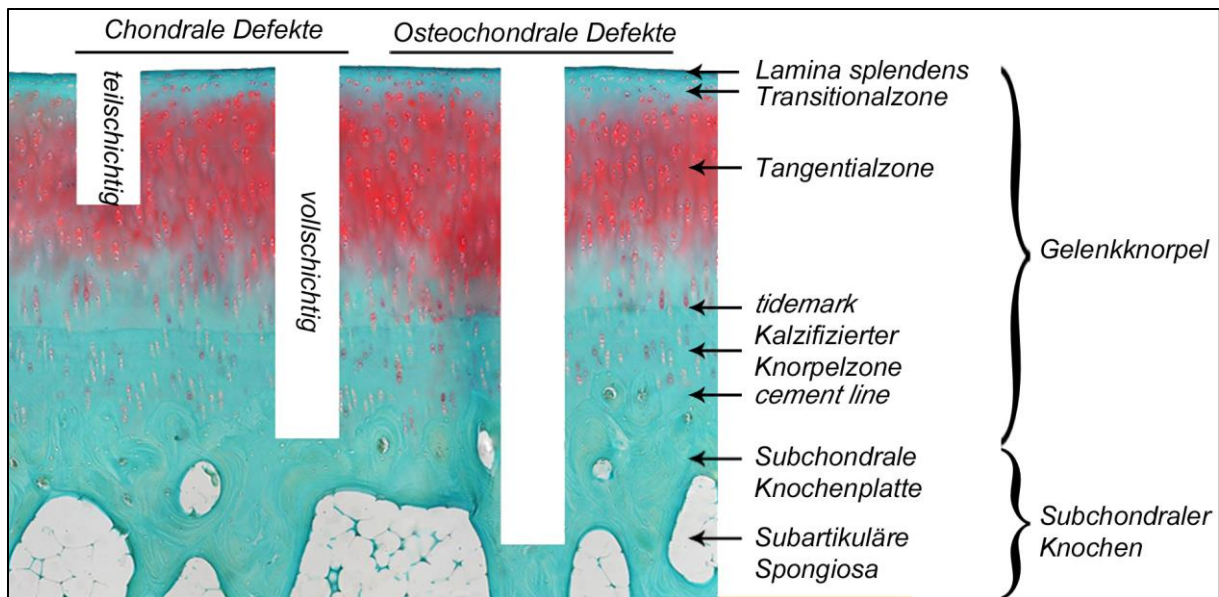


Abbildung 1: Einteilung der Knorpeldefekte und Knorpelzonen. Histologischer Schnitt eines Safranin-O gefärbten Präparats der lateralen Trochlea ossis femoris des Merinoschafes.

C.6 Klinische Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Trotz zahlreicher Studien bleibt unklar weshalb Knorpeldefekte beim Erwachsenen nicht regenerieren^{91,145}. Denkbar sind verschiedene Ursachen, wie beispielsweise die fehlende Blutversorgung des Knorpels, Degeneration aufgrund der aggressiven Synovialflüssigkeit, nicht ausreichende Reparatursignale und/oder frühzeitige Aktivierung kataboler Signalkaskaden und ein Ungleichgewicht zwischen der Reparaturfähigkeit des Knochen und des Knorpels^{38,83,210}.

Oftmals bleiben Knorpeldefekte asymptomatisch^{47,68,267}. Wenn Beschwerden auftreten, stehen grundsätzlich die konservative und die operative Behandlung zur Wahl. Das Ziel der konservativen Therapie ist die temporäre Schmerzreduktion⁷⁰, die Verbesserung der Gelenkfunktion sowie Lebensqualität^{5,247} und das Hinauszögern chirurgischer Maßnahmen^{128,145,227}. Operative Therapieansätze sind indiziert, wenn trotz konservativer Therapie anhaltende Beschwerden bestehen²⁵². Ihr Ziel ist die Bildung von Reparaturgewebe oder die Entlastung von geschädigten Gelenkknorpelanteilen. So kann die Gelenkfunktion verbessert, Beschwerden gelindert und sekundärer Arthrose vorgebeugt werden^{51,64,140,145}. Die Wahl des operativ-rekonstruktiven Verfahrens ist von der Ursache des Knorpelschadens, der Defektgröße, -anzahl und -lage sowie patientenspezifischen Besonderheiten wie Alter, individuelles Aktivitätsniveau, Körpermaßindex (BMI)^{9,170,173}, Nikotinkonsum¹¹¹, *compliance*¹⁴², Beinachse, Begleitpathologien und -läsionen¹⁵, systemischen

Gelenkerkrankungen und bisherigen Operationen abhängig^{18,24,26,84,91,131,132,144,145,150,169,179,242}. Zunächst sollte die am geringsten invasive Behandlungsoption in Betracht gezogen werden⁵¹, um die Implantation eines endoprothetischen Oberflächenersatzes hinauszuzögern¹⁴².

Die operativen Therapieoptionen können in zell- und gewebsbasierte Verfahren untergliedert werden. Zu den zellbasierten Methoden zählen alle markraumeröffnenden Verfahren. Sie umfassen die subchondrale Anbohrungen nach Pridie²¹⁵, die Abrasionsarthroplastik nach Johnson¹¹² und die Mikrofrakturierung nach Steadman^{245,246}. Das Prinzip aller markraumeröffnender Verfahren ist die Schaffung einer Verbindung zum Markraum, um die konsekutive Migration von Knochenmarkszellen zu ermöglichen. Diese bilden im Defekt ein Blutgerinnsel und bilden somit die zelluläre Grundlage für das Reparaturgewebe^{79,248}. Anschließend folgt die klassische Wundreparatur-Kaskade mit akuter Entzündungsreaktion und Zellchemotaxis⁵². Das gebildete vaskularisierte Granulationsgewebe beinhaltet pluripotente mesenchymale Vorläuferzellen, die zu Osteoblasten und Chondroblasten differenzieren können^{52,140,240}. Ähnlich der enchondralen Ossifikation^{79,232,246} formieren sich Knochen- und Reparaturgewebe zeitgleich in verschiedenen Zonen. Nach einigen Monaten besteht das oberflächliche Reparaturgewebe hauptsächlich aus Faserknorpel, der hyalinem Knorpel strukturell und biochemisch unterlegen ist^{79,110}. Ein weiteres zellbasiertes Verfahren ist die autologe Chondrozytentransplantation²⁷ (ACT; auch autologe Chondrozytenimplantation, ACI). Dieses Verfahren unter Verwendung von Prinzipien des *tissue engineering*^{114,147} führt zur Bildung eines relativ belastbaren⁷⁷ Reparaturgewebes^{211,213,221}.

Gewebsbasierte Verfahren stellen die zweite Gruppe der Behandlungsoptionen dar. Dazu gehören das Débridement, die Transplantation chondrogener periostaler¹⁹⁰ oder perichondraler⁴¹ Gewebe, die Methoden der autologen oder allogenen osteochondralen Transplantation^{23,88,89,182,235,268} wie das *osteochondral-autograft-transfer-system* (OATS), die Mosaikplastik^{106,229}, der Kondylentransfer¹⁰⁵ und der Mega-OATS³¹. Die autologe osteochondrale Transplantation²²⁹ ist derzeit das einzige Verfahren, das den Defekt mit hyalinem Knorpel füllt^{23,209,269}.

Zusammenfassend werden bei kleinen Defekten (< 1,0 cm²) die osteochondrale Transplantation bevorzugt. Die Hauptindikation markraumeröffnender Verfahren sind fokale Knorpeldefekte von maximal 4 cm²^{18,84,167}, optimalerweise < 2 cm²^{9,67,84,103,114,132,169,224,244,246} (0,5-2,5 cm²) bei jungen, sportlich aktiven Patienten^{84,103,122,169,224}. Die ACT stellt bei vollschichtigen, großen Knorpeldefekten (> 2,5 bis ≤ 12 cm²) im jungen, aktiven Patienten die

erste Wahl dar^{13,16,84,91,114,147,172,186,191,207,212,263}. Letzteres Verfahren wird auch bei Versagen anderer Eingriffe vorgezogen^{24,122,142,147,167}.

Bei einer unikompartimentalen Gonarthrose können zell- oder gewebsbasierte Verfahren nicht mehr sinnvoll eingesetzt werden. In diesen Fällen kann eine kniegelenksnahe Osteotomie indiziert sein^{145,182} (Korrektur der pathologischen Beinachse, um durch Entlastung geschädigter Knorpelanteile weitere Degeneration zu verhindern^{2,74,116,130,265}). Sind arthrotische Veränderungen schon bikompartimental und fortgeschritten, bleibt als *ultima ratio* nur noch die bikondyläre Kniegelenksendoprothese. Diese ist jedoch nur in absoluten Ausnahmen bei jungen Patienten indiziert^{36,37,73,105,106}.

C.7 Markraumeröffnende Verfahren mit besonderem Blick auf die Pridie-Bohrung

Markraumeröffnende Verfahren werden sehr häufig angewendet²⁹. Bei Behandlung umschriebener chondraler Defekte bis zu 3 cm² Fläche werden in 60-80% der Patienten gute klinische Ergebnisse beschrieben^{123,170,243}. Markraumeröffnende Verfahren umfassen die subchondrale Pridie-Bohrungen²¹⁵, die Abrasionsarthroplastik¹¹² und die Mikrofrakturierung^{245,246}, die alle dem gleichen Prinzip folgen (siehe C.6) und meistens arthroskopisch durchgeführt werden. Die Defektpräparation einschließlich kompletten Abtragens des kalzifizierten Knorpels ist bei allen drei Verfahren gleich^{62,207}.

Die Abrasionsarthroplastik ist insbesondere bei retropatellaren Defekten sinnvoll^{112,113}. Bei der Pridie-Bohrung²¹⁵, auch subchondrale Anbohrung genannt, und der Mikrofrakturierung^{245,246} wird die subchondrale Knochenplatte mit mehreren versetzten Bohrlöchern bzw. Mikrofrakturierungen penetriert, bis eine Einblutung sichtbar ist²⁰⁷. Das Resultat sind mehrere pilzförmige ausgefüllte Bohrkanäle¹⁴², die ein homogen konfluierendes Reparaturgewebe bilden sollen. Eine mögliche Komplikation der Pridie-Bohrung ist der Bohrerbruch¹⁴². Die Annahme, es könnte zu Hitzenekrosen an der Bohrer Spitze³ kommen, wurde widerlegt^{46,64}. Durch Verwendung eines Kirschner-Drahtes, der im klinischen Alltag insbesondere arthroskopisch angewandt werden kann, ist das Risiko eines Verwindungsbruchs der Bohrspindel minimiert¹⁷⁹. Während bei einer Bohrerspindel die Gewebsfragmente durch die wendelförmigen Spannuten nach außen befördert werden, wird das Knochengewebe bei Anwendung des Kirschner-Drahtes zur Seite verdrängt⁴⁶. Allerdings ist das entstandene Knochenmehl wahrscheinlich nach 6 Monaten resorbiert.



Abbildung 2: Kenneth Hampden Pridie; Orthopäde und erfolgreicher englischer Leichtathlet (*1906-1963†).

Die Mikrofrakturierung^{245,246} bietet im Vergleich zur Pridie-Bohrung den Vorteil, dass durch die Verwendung eines abgewinkelten Pfriems schwer zugängliche Knorpelareale besser erreichbar sind^{142,157,245,246}. Die Bohrlöcher bzw. Mikrofrakturierungen müssen senkrecht zur Gelenkoberfläche in ca. 3-4 mm Abstand gesetzt werden und dürfen nicht ineinander brechen oder die subchondrale Knochenplatte destabilisieren^{84,142,243}. Zu enge Bohrlochabstände bzw. Mikrofrakturierungen oder zu starke Ausdünnung des subchondralen Knochens bergen die Gefahr der subchondralen Fraktur. Selten kommt es postoperativ zu Kniegelenksergüssen und -infekten¹⁴².

A method of resurfacing osteoarthritic knee joints—*Mr K. H. Pridie* (Bristol) had noticed that, after extensive “ debridement ” of knee joints in the manner described by Magnuson, the raw areas of bone became covered with smooth fibro-cartilage. Examination of serial sections of joints suggested that the articular cartilage derived its nutrition from the cancellous bone deep to it. When this subchondral bone became sclerotic the cartilage necrosed and the bare bone was exposed. If these sclerotic bone areas were drilled and the holes were not too far apart, smooth fibro-cartilage would spread over the surface. Four knee joints which were subsequently re-explored showed this to have happened, and it was emphasised that these four were explored only because they presented the worst results; the others must have been even better. *Mr G. Gordon* (Whitehaven) said that osteotomy to correct varus or valgus produced benefit because it increased the vascularity. *Mr Pridie* agreed that osteotomy was sometimes helpful.

Abbildung 3: Auszug aus der Originalpublikation von K.H. Pridie aus dem *Journal of Bone and Joint Surgery (British Volume)* 1959; 41: 618-619.

C.7.1 Einfluss von markraumeröffnenden Verfahren auf die Knorpelreparatur

Nach markraumeröffnenden Verfahren füllt sich der Defekt mit einem Blutgerinnsel, in das mesenchymale Stammzellen einwandern (siehe C.6). Nach 1 – 2 Wochen werden spindelförmige fibroblastenartige Zellen im Reparaturgewebe sichtbar, in der extrazellulären Matrix dominiert Typ-I-Kollagen und Proteoglykane sowie Typ-II-Kollagen sind vermindert. Dies sind charakteristische Merkmale des Faserknorpels^{17,142,171,179,232}. Nach 1 – 2 Monaten ist eine knorpelige Matrix mit erhöhtem Typ-II-Kollagen-Gehalt aufgebaut^{53,75,117,142,149}. Das Reparaturgewebe ist im Vergleich zu hyalinem Knorpel weniger elastisch und geringer

belastbar^{17,179}. Es stützt und stabilisiert den hyalinen Knorpel am Randbereich des Defekts und bedeckt den Knochen^{17,142}. Im Laufe der Zeit wird die vertikale Integrationszone zwischen dem Reparaturgewebe und dem angrenzenden Knorpel zellärmer, es tritt eine Apoptose der ortsständigen Chondrozyten ein²³² und die mesenchymalen Knochenmarkszellen sorgen allein für die Defektreparatur²³². In 92% der Patienten entsteht ein Riss in der vertikalen Integrationszone¹⁷⁰. Schon nach einigen Monaten treten Degenerationen im minderwertigen Ersatzgewebe und dessen angrenzenden Knorpel auf, sie können der mechanischen Belastung oftmals nicht standhalten^{75,110,148,232}. Zellverlust, Fibrillationen und Verlust von Typ-II-Kollagen werden sichtbar¹⁴⁸. Der Knorpeldefekt kann nach einiger Zeit wieder symptomatisch werden^{17,179}.

C.7.2 Einfluss von markraumeröffnenden Verfahren auf den subchondralen Knochen

Nach einem markraumeröffnenden Verfahren zeigen 30-50% der Patienten Veränderungen des subchondralen Knochens¹⁷⁰, doch dessen exakter Reparaturmechanismus ist noch unbekannt^{94,148,196,217}. Zwei Wochen nach Markraumeröffnung entwickeln sich mesenchymale Zellen zu hypertrophen Chondrozyten, die zu Osteoblasten differenzieren und zunächst unreifen subchondralen Knochen bilden¹⁴⁸. Für eine erfolgreiche Reparatur des Gelenkknorpels scheint die biomechanische Unterstützung durch einen intakten subchondralen Knochen unentbehrlich^{56,110,141,148}.

Etwa ab der sechsten postoperativen Woche verlagern sich der rekonstituierte subchondrale Knochen und die *tidemark* in Richtung des Gelenkspalts. Die Folge ist ein ausgedünntes knorpeliges Reparaturgewebe, das einer dicken und steifen subchondralen Knochenplatte aufliegt. Das Verhältnis innerhalb der osteochondralen Einheit wird somit zu Ungunsten des Knorpels hin verschoben, wobei das Gesamtvolumen des Reparaturgewebes beibehalten wird^{95,148,152,195,217}. Dadurch ist die osteochondrale Einheit weniger elastisch und anfälliger für auf den Gelenkknorpel einwirkende Scherkräfte^{11,42,148}.

Markraumeröffnende Verfahren penetrieren den subchondralen Knochen und induzieren intraläsionale Osteophyten und subchondrale Knochenzysten¹⁹⁶. Diese können zur Degeneration^{50,69,132,167,170,196,262} und Schwächung der gesamten osteochondralen Einheit beitragen¹⁹⁸. Demnach ist auch eine erfolgreiche Knochenreparatur ausschlaggebend für eine dauerhafte Knorpelreparatur und beugt sekundären Veränderungen vor^{148,217}.

Obwohl oft große Bohrkanäle mit der Idee einer Mobilisation möglichst vieler Knochenmarkszellen empfohlen werden^{113,215,232,246}, liegen diesbezüglich keine gesicherten

Daten vor - insbesondere vor dem Hintergrund des vermehrten Umbaus des subchondralen Knochens.

C.7.3 Rehabilitation nach markraumeröffnenden Verfahren

Die postoperative Rehabilitation ist essentiell für das Ergebnis nach markraumeröffnenden Verfahren und beinhaltet prinzipiell eine sechswöchige Entlastungsphase der operierten Extremität^{84,171,246}. Das Reparaturgewebe ist nach dem Eingriff zunächst noch weich und reift im Laufe der Zeit langsam aus. Die jeweilige Rehabilitationsphase differiert abhängig von der Defektlokalisierung und -größe sowie dem gewählten Verfahren^{102,246,256}. Das Behandlungsziel hingegen ist gleich: der Patient soll postoperativ zügig den vollständigen und zugleich schmerzfreien Bewegungsumfang des Gelenkes bei voller Muskelkraft und -koordination wieder erreichen^{245,246}.

C.7.4 Klinische Ergebnisse nach markraumeröffnenden Verfahren

Die Mehrzahl aktueller Publikationen untersuchen die Mikrofrakturierung stellvertretend für markraumeröffnende Verfahren^{3,9,18,64,81,84,86,123,124,127,129,131,145,163,168-170,242,243,246,250,254,261,263}. Studien über die Pridie-Bohrung findet man seltener^{64,142,144,145,215}.

Mithoefer *et al.*¹⁷⁰ berichteten, dass die Gelenkfunktion nach markraumeröffnenden Verfahren mit der Defektfüllung (im MRT) korreliert. Sie stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Zustand des subchondralen Knochens und dem klinischen Ergebnis dar^{57,154,264}, wohingegen ein qualitativ hochwertiges Reparaturgewebe kein gutes klinisches Resultat garantiert^{123,124}. Dem ungeachtet scheint ein schlechtes Reparaturgewebe meist in einem schlechten klinischen Ergebnis zu resultieren^{169,263}. Im Vergleich zu unbehandelten chondralen Defekten profitieren Patienten von markraumeröffnenden Verfahren^{18,242}: Schmerz und Schwellung sind reduziert, alltägliche Arbeiten und sportliche Aktivitäten können sie postoperativ besser ausüben^{3,142,243,251}.

Die Patientenauswahl ist für den Erfolg der Behandlung entscheidend (vergleiche C.7). Von markraumeröffnenden Verfahren profitieren insbesondere junge Patienten (< 30-40 Jahren)^{3,9,18,81,123,124,131,145,163,243} mit einem solitären²⁴² fokalen Knorpeldefekt (< 2-4 cm²)^{3,18,64,86,123,124,254}, möglicherweise aufgrund altersabhängig erniedrigter Anzahl und Aktivität pluripotenter Knochenmarkszellen^{3,142,144,243,250,251}. Neben der Lokalisation³ ist auch der Behandlungszeitraum ausschlaggebend; eine frühzeitige Behandlung innerhalb eines Jahres nach Auftreten des Defekts wird empfohlen^{170,226,261}. Ein geringes Aktivitätsniveau^{18,123,124,145}, BMI > 35 kg/m²^{9,25,170,173} und Nikotinkonsum¹¹¹ verringern den

klinischen Erfolg. Weiteren Einfluss hat das Rehabilitationsprogramm^{3,84,246}. Bei sportlich aktiven Patienten erzielt die ACT bessere postoperative Ergebnisse als markkraumeröffnende Verfahren^{18,123,124,127,129,168}, wobei das Verhältnis zwischen hyalinem Knorpel und Faserknorpel bei beiden Verfahren ähnlich ist^{123,124}.

C.8 Konzept der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Durchmessers der subchondralen Bohrlöcher auf die Knorpeldefektreparatur untersucht. Den Ausgangspunkt bildete die Hypothese, dass die Reparatur der osteochondralen Einheit optimiert werden kann, wenn die Bohrlochdurchmesser dem physiologischen trabekulären Abstand entsprechen (Abbildung 25). Im präklinischen Schafmodell (n = 14; ausgewachsene weibliche Merinoschafe) wurde ein vollschichtiger Knorpeldefekt (4 x 8 mm) in der Trochlea femoris des linken Beines erzeugt und einzeitig mittels subchondraler Anbohrung behandelt (6 Bohrlöcher). Der Bohrlochdurchmesser betrug entweder 1,0 mm oder 1,8 mm. Nach 6 Monaten wurden die Rekonstitution des subchondralen Knochens im Mikro-CT und die Reparatur des Gelenkknorpels mittels makroskopischer, histologischer, biochemischer und immunhistochemischer Methoden evaluiert.

Das Ziel dieser experimentellen Studie war es, den Einfluss des Bohrlochdurchmessers im Großtiermodell zu untersuchen, wobei der natürliche Trabekelabstand als Orientierung für die Bohrungsgröße dient. In der vorliegenden Arbeit werden kleinere (1,0 mm) Bohrlöcher entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand mit dicken (1,8 mm) Durchmessern verglichen.

D. Hypothese

Wir überprüfen die Hypothese, dass kleinere subchondrale Bohrlöcher (1,0 mm; entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand) zur verbesserten Knorpeldefektreparatur sowie Reparatur der osteochondralen Einheit im Schafmodell führen als große Bohrlöcher (1,8 mm; nicht physiologischer Trabekelabstand).

E. Studiendesign

Zuerst wurde der physiologische Trabekelabstand der Trochlea des Schafes bestimmt (n = 3). Im präklinischen Schafmodell (n = 14) wurde ein vollschichtiger, rechtwinkliger Knorpeldefekt mit einer standardisierten Stanze (4 x 8 mm) in der Trochlea femoris des linken Kniegelenks erzeugt und einzeitig mittels subchondraler Anbohrung behandelt. Es wurden jeweils 6 Bohrlöcher pro Defekt mit einer standardisierten Tiefe von 10 mm erzeugt. Der Bohrl Lochdurchmesser betrug entweder 1,0 mm (n = 7; im Nachfolgenden als 1,0 mm-Gruppe bezeichnet) oder 1,8 mm (n = 7; im Nachfolgenden als 1,8 mm-Gruppe bezeichnet).

Nach 6 Monaten wurden die Rekonstitution des subchondralen Knochens im Mikro-CT und die Reparatur des Gelenkknorpels mittels makroskopischer, histologischer, biochemischer und immunhistochemischer Methoden evaluiert. Als intraindividuelle Kontrollgruppe²⁰² diente die angrenzende osteochondrale Einheit sowie der gesunde Knorpel, der beim Kreieren des Defekts reseziert wurde.

F. Material

F.1 Lösungen, Puffer und Medien

Die Lösungen wurden mit aqua bidest. angesetzt.

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien.

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

	NaIO ₃	10 g
	KAl(SO ₄) ₂	200 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
HCl-Lösung	HCl (40%)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Papain-Lösung	Papain	5 mg
	PBS	ad 40 ml
PBE	Na ₂ HPO ₄	7,1 g
	EDTA	1,86 g
	H ₂ O	500 ml
PBS	KCl (pH 7,2)	2,7 mM
(Phosphat gepufferte Salzlösung)	K ₂ HPO ₄	1,7 mM
	NaCl	136 mM
	Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	10 mM
Safranin-Orange-Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25%)	800 ml
	PBS	ad 200 ml
Trypsin-Stammlösung	Trypsin	25% (V/V)
	PBS	75% (V/V)
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (0,3%)	H ₂ O ₂	0,6 ml
	H ₂ O	200 ml

F.2 Chemikalien

Laborchemikalien für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden generell von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen weiterer Chemikalien:

Tabelle 2: Chemikalien

Produkt	Hersteller
ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Echtgrün (FCF)	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

HRP-Verdünnungsmittel	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Hämatoxylin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Konjugat Konzentration	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Konjugat-Verdünnungsmittel	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
MD-1-Assay-Verdünnungsmittel	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Papain	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Paraffin-Granulat „Roti Plast“	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pierce-BCA-Protein-Assay-Reagent-A	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Standard-DNS-Lösung (10 µg/ml; Kalbsthymus)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Stop-Lösung	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Streptavidin-HRP Konzentration	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Substrat	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Tusche, schwarz	Pelikan (Hannover, Deutschland)
Typ-I-Kollagen Standard	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Typ-II-Kollagen Standard	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Waschpuffer-Konzentrat (10X)	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylol	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)

F.3 Antikörper

Es wurden folgende monoklonale Antikörper für die immunhistochemische Färbung für Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe verwendet:

Tabelle 3: Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Maus-IgG (biotiniliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)

F.4 Enzyme

Bei der immunhistochemischen Färbung wurde Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das entnommene Knorpelgewebe wurde mit Hilfe von Papain (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verdaut.

F.5 Tierstämme

Die ausgewachsenen weiblichen Merinoschafe ($n = 14$; Alter 36 ± 12 Monate, durchschnittliches Körpergewicht 72 ± 17 kg) wurden aus Bad Langensalza (Deutschland) bezogen.

F.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abgesehen von allgemeinen Laborgeräten, wurden zusätzlich folgende Geräte verwendet:

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Canon Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Gerlingern-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74°C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana, Italien)
GENios microplate reader	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37°C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetrührer RH basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikrofokus-Computertomographie-Scanner	Skyscan (Kontich, Belgien)
Mikrofokus-Computertomographie-Röntgenröhre	Hamamatsu (Hamamatso City, Japan)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CK-2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mischplatte	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Plattenabdeckung	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Plattenschüttler LabNet Orbit LS	Labnet (Woodbridge, NJ, USA)
Tischzentrifuge Qualitron Mikrozentrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Typ-I-Kollagen Mikroplatte	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Typ-II-Kollagen Mikroplatte	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Vortex Reagenzglasnischer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Waage EW-600-2M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62°C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wärmeschrank 37°C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad HI 1210 (für histologische Schnitte)	Leica (Nussloch, Deutschland)
Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen; F-Profil	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
OptiPlate-96 Black	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)

F.7 Computerprogramme

Das Programm analySIS (Soft Imaging System, Münster, Deutschland) wurde für die Auswertung digitaler Bilder verwendet. Die statistischen Analysen und die Korrelationen wurden mit Hilfe von OriginPro 8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) und XLSTAT (Addinsoft Deutschland, Andernach, Deutschland) für Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Die Bilder des Mikro-CTs wurden mit der Software NRecon (Skyscan, Kontich, Belgien) rekonstruiert, mit dem Programm DataViewer (Skyscan) betrachtet und mit dem Programm CT-Analyzer (Skyscan) ausgewertet.

F.8 Operationsinstrumentarium und -materialien

Der Knorpeldefekt wurde mit einer speziell angefertigten Stanze (4 x 8 mm, rechtwinklig) erzeugt. Die subchondralen Bohrlöcher wurden mit Kirschner-Drähten (Durchmesser 1,0 mm und 1,8 mm; Firma CL-Medical, Merchweiler, Deutschland) angelegt. Nahtmaterial, Spritzen und Nadeln wurden von Braun (Melsungen, Deutschland) bezogen. Weitere chirurgische Instrumente stammten von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz).

F.9 Verbrauchsmaterialien

Die Objektträger und Deckgläser für histologische Auswertung sowie die Metallkassetten und Plastikabdeckungen für die Paraffin-Einbettung stammen von Roth (Karlsruhe, Deutschland). Von der Firma Leica (Nussloch, Deutschland) wurden Klingen für das Rotationsmikrotom bezogen. Sämtliche Plastikartikel und Glasbehälter lieferte Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland).

G. Methoden

G.1 Großtiermodell

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem nationalen Recht für Tierschutz und den NIH Richtlinien für die Achtung und den Schutz von Versuchstieren („*guidelines for the care and use of laboratory animals*“, NIH Veröffentlichung 85-23, Rev. 1985) und mit Genehmigung der saarländischen Tierschutz-Kommission durchgeführt. Zur Klärung der Fragestellung wurden gesunde, ausgewachsene, weibliche Merinoschafe (zwischen 2-4 Jahre; durchschnittliches Körpergewicht 72 ± 17 kg) verwendet. Präoperativ wurde eine Arthrose der Kniegelenke radiologisch ausgeschlossen. Alle Schafe erhielten Wasser *ad libitum*, wurden nach einem standardisierten Ernährungsplan gefüttert und durch einen Veterinärmediziner klinisch überwacht.

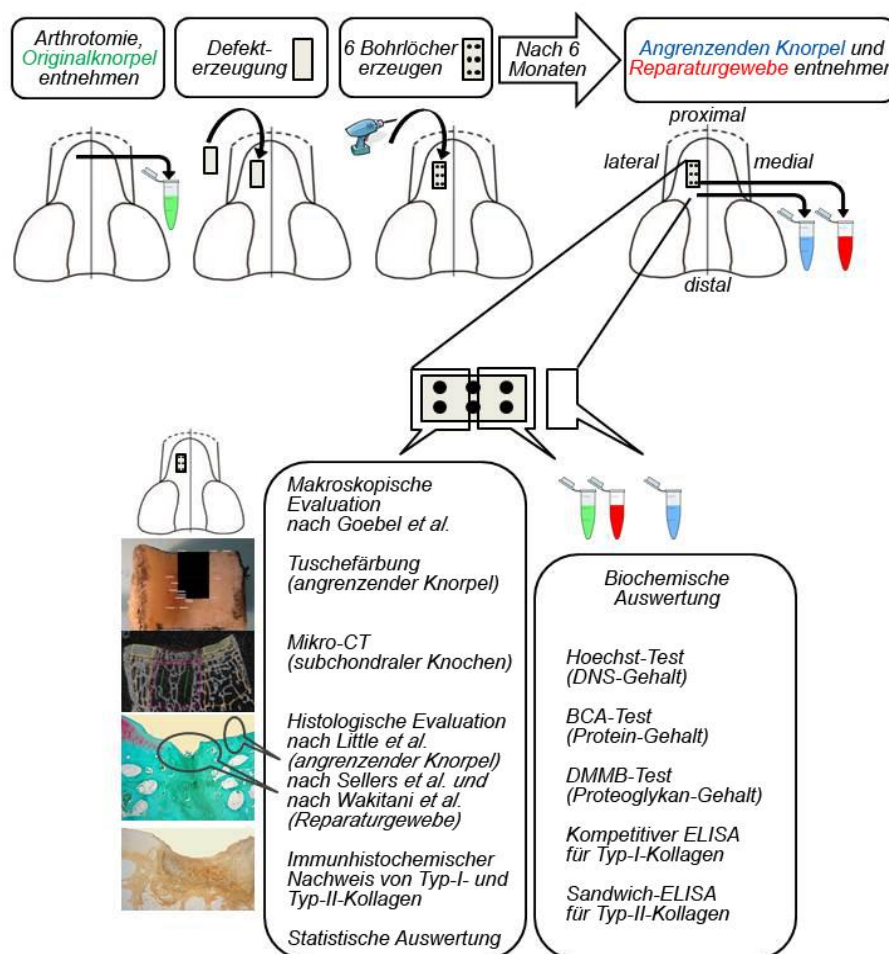


Abbildung 4: Übersicht über die angewendeten Methoden.

G.2 Anästhesie, Operation und postoperative Behandlung

Nach 12 h Fastenzeit, wurden die Schafe mit 2% Rompun (Bayer, Leverkusen, Deutschland) pro 0,05 mg/kg Körpergewicht sediert und nach intravenöser Verabreichung von 20 ml pro 2% Propofol (AstraZeneca, Wedel, Deutschland) und Caprofol (1,4 mg/kg Körpergewicht; Pfizer, Berlin, Deutschland) endotracheal intubiert. Aufrechterhalten wurde die Narkose durch Inhalation von 1,5% Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) und intravenöser Gabe von Propofol (6-12 mg/kg Körpergewicht/h). Die Tiere wurden von Prof. Dr. H. Madry operiert. Das linke Kniegelenk wurde durch einen medialen parapatellaren Zugang eröffnet. Die Patella wurde nach lateral gehalten ohne sie aus dem Gleitlager zu luxieren und das Knie 90° flektiert. Es wurde ein vollschichtiger Knorpeldefekt mit einer standardisierten, speziell angefertigten Stanze (4 x 8 mm) auf der lateralen Facette der Trochlea ossis femoris erzeugt. Im Defektareal wurde der kalzifizierte Knorpel vollständig entfernt. Anschließend wurden 6 subchondrale Bohrlöcher kreiert (Tiefe 10 mm; Durchmesser 1,0 mm: Fläche = $\pi \cdot r^2 = 0,79 \text{ mm}^2$; Volumen = $\pi \cdot r^2 \cdot h = 7,85 \text{ mm}^3$; Durchmesser 1,8 mm: Fläche = $2,54 \text{ mm}^2$; Volumen = $25,45 \text{ mm}^3$; Abbildung 5). Eine Blutung aus dem Bohrkanaal war stets sichtbar. Das Kniegelenk wurde nach gründlichem Spülen schichtweise verschlossen. Postoperativ erfolgte eine Antibiotikaprophylaxe mit Amoxicillin/Clavulansäure (Pfizer; 30 mg/kg Körpergewicht). Jedes Tier erhielt 3 ml Fentanyl/Levomethadon 0,25% (MSD, Unterschleißheim, Deutschland) und über einen Zeitraum von 2 Wochen 1,8 mg/kg Körpergewicht Caprofen subkutan. Es erfolgte keine Entlastung oder Ruhigstellung der operierten Gelenke. Aufgrund einer therapierefraktären Infektion wurde ein Tier von der Studie ausgeschlossen. Die verbleibenden 13 Merinoschafe wurden 6 Monate nach der Operation in Narkose eingeschläfert. Die Kniegelenke wurden eröffnet, makroskopisch begutachtet und die Defektareale fotodokumentiert (Canon Powershot A480 mit Makrolinse; Neu-Isenburg, Deutschland). Das distale Femur wurde entnommen und die Defektzone in einer standardisierten Methode extrahiert. Der proximale Anteil des Defekts (4x4 mm) wurde für 24 h in 4%igem Formalin fixiert und anschließend in 70%igem Ethanol für die Mikro-CT-Analyse aufbewahrt. Der distale Anteil diente der Durchführung von histologischen, biochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen.

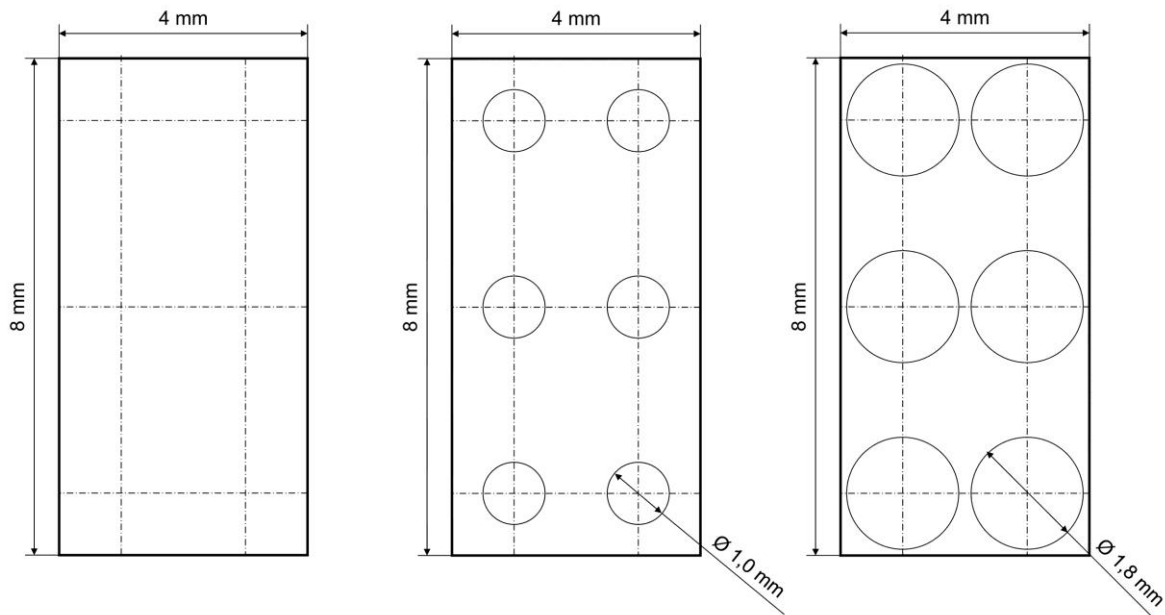


Abbildung 5: Maßstabgerechtes Schema der Bohrlochdurchmesser (1,0 mm; 1,8 mm) und des Defektareals (4 x 8 mm).

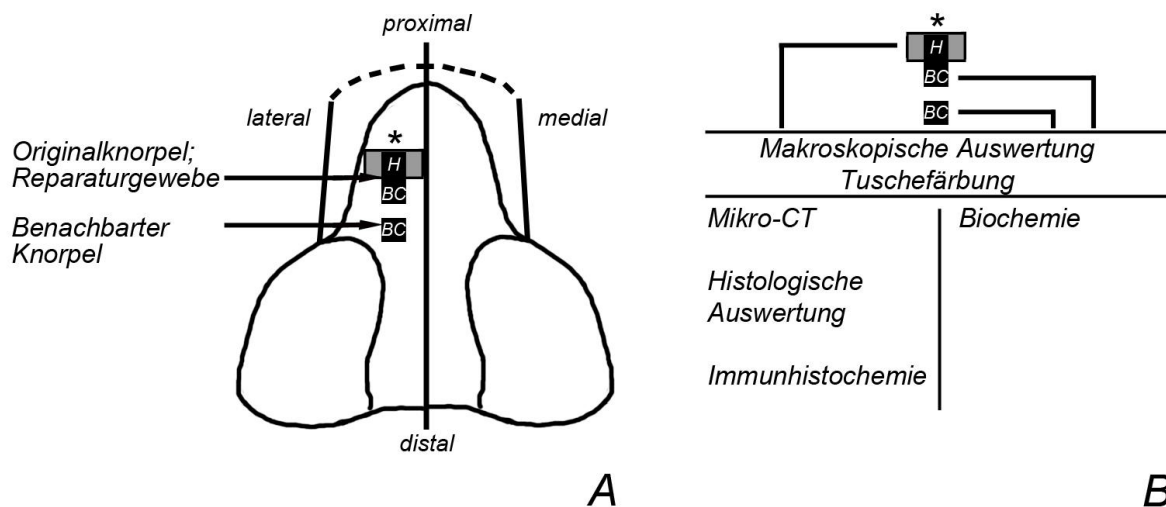


Abbildung 6: Schemazeichnung der Defektlokalisierung in der Trochlea ossis femoris. A: Aus dem Defektareal (*) erfolgte die Entnahme des Reparaturgewebes zur histologischen (H) und biochemischen (BC) Analyse. Die dem Defektareal (H) angrenzende Region (graue Fläche) dient der histologischen Auswertung von degenerativen Schäden des umgebenen Knorpels (Abbildung²⁰⁰). Für die biochemische Evaluation des Gelenkknorpels wurden drei Proben entnommen: Originalknorpel (präoperativ; ursprünglicher, gesunder Knorpel), Reparaturgewebe (6 Monate postoperativ aus dem Defektareal) und benachbarter Knorpel (6 Monate postoperativ aus dem angrenzenden Knorpel). Originalknorpel und Reparaturgewebe wurden an der gleichen Lokalisation entnommen. B: Überblick der durchgeführten Methoden mit dem dazugehörigen Probe-Entnahmegebiet.

G.3 Makroskopische Begutachtung der Explantate

Sechs Monate postoperativ wurden die Defektareale fotografiert⁸². Die makroskopische Begutachtung erfolgte verblindet (4 verschiedene Beobachter) anhand des Bewertungssystems nach Goebel *et al.*⁸² (max. 20 Punkte; fehlende Knorpelreparatur: 20 Punkte, komplette Knorpelreparatur: 0 Punkte; Tabelle 5).

Tabelle 5: Bewertungssystem zur makroskopischen Begutachtung der Knorpelreparatur nach Goebel et al..

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

G.4 Makroskopische Evaluation des angrenzenden Knorpels per Tuschefärbung

Tusche färbt unregelmäßige, aufgeraute Knorpel-Oberflächen (arthrotische Degenerationen) schwarz^{159,271}. Das an den Defekt angrenzende Areal wurde mit einem in Tusche getauchten

Pinsel (Pelikan, Hannover, Deutschland) schwarz gefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit einem weichen Papiertuch entfernt. Die standardisierte Beurteilung der Präparate erfolgte nach Digitalisierung der Fotodokumentation (analySIS): das Defektareal wurde am Computer virtuell geschwärzt, ein standardisierter 2,5 mm breiter Rahmen um den Defekt definiert. Arthrotische Areale wurden manuell umfahren und deren Gesamtfläche (mm^2) kalkuliert (Abbildung 7).

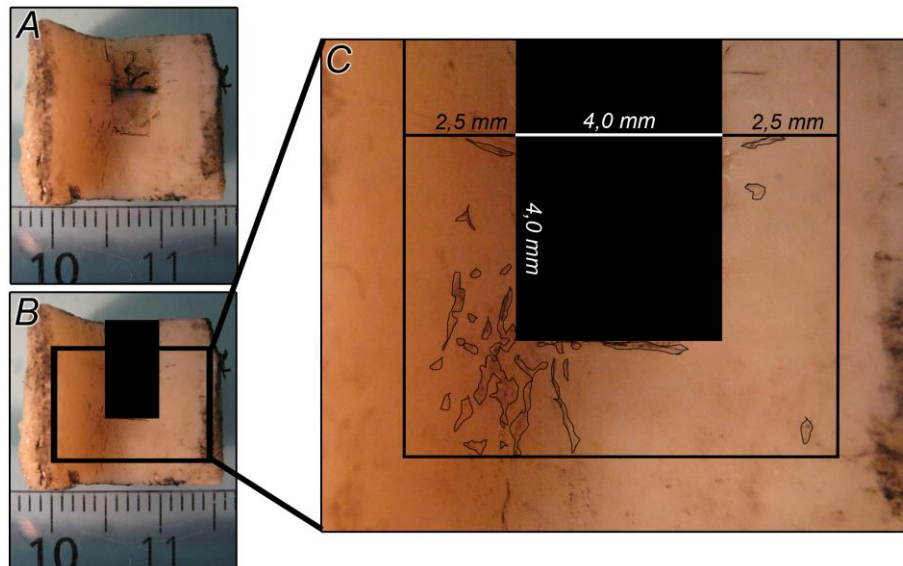


Abbildung 7: Beispiel eines mit Tusche gefärbten Präparats (A). Der Defekt wurde geschwärzt (B) und mit einem 2,5 mm breiten Rahmen versehen, innerhalb dessen die Fläche ($42,5 \text{ mm}^2$) degenerativ veränderter Areale kalkuliert wurde (C).

G.5 Hochoflösendes Mikro-CT

G.5.1 Mikro-CT Darstellung

Die Schaf-Trochleas ($n = 13$) wurden in einem Mikro-CT-Scanner (Skyscan 1172) analysiert. Das Gerät ist mit einer drehbaren Abtastbühne, einer beweglichen 10 Mp Kamera sowie mit einer Mikrofokus-Röntgenröhre (Spotgröße $< 5 \mu\text{m}$; Hamamatsu, Japan) ausgestattet, die eine größtmögliche Auflösung von $0,8 \mu\text{m}$ ermöglicht. Pro Probe (in 70%igem Ethanol gelagert) wurden zwischen 900-1200 16 bit Röntgenbilder erstellt (Röhrenspannung 70 kV, Stromstärke $139 \mu\text{A}$, räumliche Auflösung $15 \mu\text{m}$). Ein $0,5 \text{ mm}$ Aluminium/Kupfer-Filter wurde zwischen Röntgenstrahlenquelle und Detektor platziert. Die Kamera rotierte pro Röntgenbild $0,4^\circ$ um die Probe (Belichtungszeit 2400 ms). Die Parameter *frame averaging*, *random movement* und *ring artifact correction* wurden entsprechend empirischer Vorversuche am Schafmodell mit 3, 15, 7 (jeweils ohne Einheit) gewählt. Die Rekonstruktion der Bilder erfolgte durch einen modifizierten *Feldkamp Cone-Beam Algorithmus* (NRecon, Skyscan)⁶⁵.

Für die Einstellung binärer Bilder wurden Graustufen-Schwellenwerte von 8 bzw. 255 gewählt. Vorversuche hatten gezeigt, dass diese Schwellenwerte den Knochen im Vergleich zu den unbearbeiteten Rohbildern bestmöglich nachahmen. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*; BMD) wurde anhand der ermittelten Grauwerte (Abschwächungskoeffizienten) errechnet. Zwei Calciumhydroxyapatit (CaHA)-Phantome (in 70%igem Ethanol) mit bekannten BMD-Werten von 250 und 750 mg CaHA/cm³ dienten als Eichparameter (Abbildung 8).

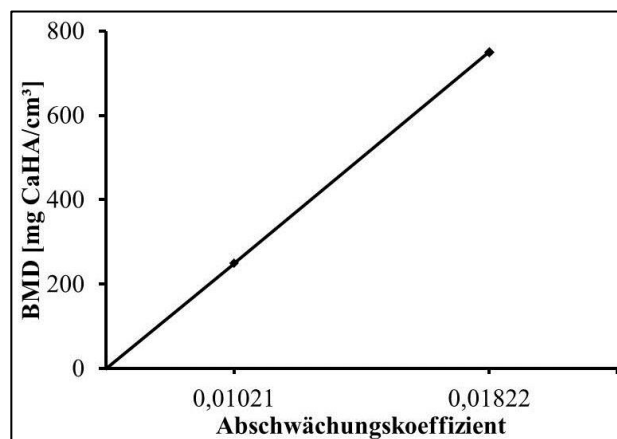


Abbildung 8: Eichgerade zur Berechnung der Knochenmineraldichte (BMD).

G.5.2 Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten

Das Vorhandensein und der Durchmesser von Knochenzysten und intraläsionalen Osteophyten wurde bestimmt (CT-Analyzer). Orth *et al.*¹⁹⁸ definierten subchondrale Knochenzysten, um die Unterscheidung zwischen einem Bohrkanal und einer pathologischen Zyste zu ermöglichen. Der horizontale Durchmesser einer Knochenzyste sollte demnach mindestens den dreifachen horizontalen Durchmesser eines Bohrkanals bemessen (1,0 mm-Gruppe: > 3,0 mm horizontaler Durchmesser; 1,8 mm-Gruppe: > 5,4 mm). Das modifizierte Bewertungssystem nach Hoemann *et al.*⁹⁸ erlaubt die genaue Klassifikation einer Knochenzyste, wobei der horizontale Durchmesser an die Bohrung angepasst den Punktwert festlegt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Bewertungssystem für Knochenzysten nach Hoemann *et al.*.

horizontaler Zysten-Durchmesser		Punkte
1,0 mm-Gruppe	1,8 mm-Gruppe	
3,0 mm - 4,0 mm	5,4 mm - 6,4 mm	1
< 5,0 mm	< 7,4 mm	2
< 6,0 mm	< 8,4 mm	3
> 6,0 mm	> 8,4 mm	4

Intraläsionale Osteophyten sind definiert als Knochenneubildungen, die über das Niveau der osteochondralen Grenzzone hinausragen und bis in die darüber liegende Knorpelschicht reichen¹⁹⁶. Ihre Lokalisation ist entweder peripher (zwischen Bohrkanal und intakter subchondraler Knochenplatte) oder zentral (zwischen zwei Bohrlöchern).

G.5.3 Standardisierte Definition der „*volumes of interest*“ (VOI)

Um die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens zu ermitteln, wurden sechs verschiedene zweidimensionale *regions of interest* (ROIs) definiert, die nach dreidimensionaler Extrapolation in sechs *volumes of interest* (VOIs) resultieren. Die Grenzen der VOIs orientieren sich an den anatomischen Strukturen subchondrale Knochenplatte, *cement line* und subartikuläre Spongiosa. Das Programm CT-Analyzer (Skyscan)²³⁹ wurde zur Bearbeitung der Mikro-CT Bilder verwendet. Zur standardisierten Bewertung der Mikro-CT Bilder wurden je Probe jeweils drei VOIs in der subchondralen Knochenplatte und drei weitere in der subartikulären Spongiosa definiert (Abbildung 9). In der subchondralen Knochenplatte wurden folgende VOIs bestimmt: „subchondrale Knochenplatte Defekt“ (SKD), diese repräsentiert die Defektzone und schließt den apikalen Anteil des Bohrkanals ein (4 mm breit, analog der Breite des Knorpeldefekts). Die medial an die Defektzone angrenzende subchondrale Knochenplatte wurde als „subchondrale Knochenplatte medial“ (SKM) und die lateral anliegende Region als „subchondrale Knochenplatte lateral“ (SKL) definiert. Zusammengefasst werden SKM und SKL zur VOI „subchondrale Knochenplatte angrenzend“ (SKA). Die Unterteilung der subartikulären Spongiosa folgt analog derer der subchondralen Knochenplatte, wobei „subartikuläre Spongiosa Defekt“ (SSD) die Bohrkanäle umfasst und medial bzw. lateral dazu die VOIs „subartikuläre Spongiosa medial“ (SSM) bzw. „subartikuläre Spongiosa lateral“ (SSL) anschließen (Abbildung 9). Letztere bilden gemeinsam die „subartikuläre Spongiosa angrenzend“ (SSA). Da die Eindringtiefe der Bohrlöcher 10 mm beträgt, überschreiten zwei übereinanderliegende VOIs diesen Wert nicht. Eine Überschneidung der Regionen wurde vermieden und die Grenzen der nebeneinanderliegenden VOIs verliefen parallel zueinander. Insgesamt wurden 78 VOIs (13 operierte Schafe mit je sechs VOIs) definiert.

G.5.4 Mikro-CT Parameter

Für jede VOI wurden die folgenden dreidimensionalen Parameter mit der Software des Herstellers (CTAnalyzer, Skyscan) berechnet: Knochenmineraldichte (BMD),

Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochenoberfläche/Volumen Verhältnis (BS/BV) und Knochenoberflächendichte (BS/TV). Die kortikale Dicke (Ct.Th) wurde nur in der subchondralen Knochenplatte bestimmt wohingegen die Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelabstand (Tb.Sp), trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (Tb.Pf), Trabekelanzahl (Tb.N), *structure model index* (SMI), Grad der Anisotropie (DA) und Fraktale Dimension (FD) ausschließlich im subartikulären Knochen bestimmt wurde.

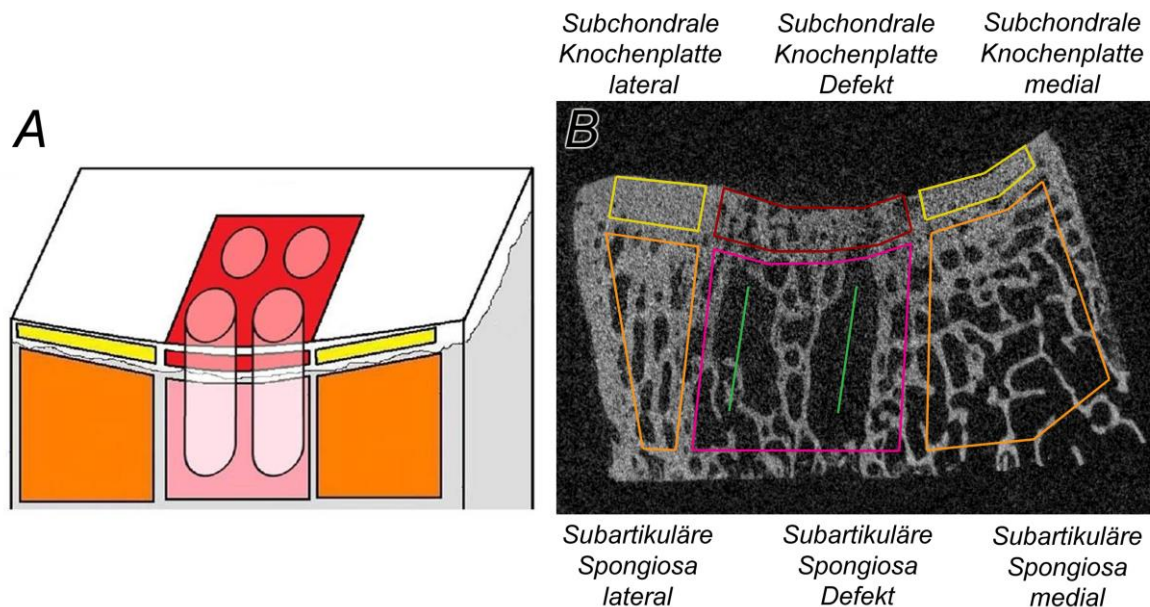


Abbildung 9: Veranschaulichung der ROIs. Dreidimensionale Schemazeichnung der ROIs (A) und ein Mikro-CT Bild mit eingezeichneten ROIs (grüne Linie: Bohrkanal; B).

G.6 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

G.6.1 Lagerung und Entkalkung

Die in 70%igem Ethanol gelagerten Proben wurden entkalkt (insgesamt 2 Monate; nach den ersten 12 Tagen wurden die Proben mit dem Skalpell halbiert und das EntkalkermEDIUM gewechselt).

G.6.2 Entwässerung und Einbetten

Die Proben wurden in aqua bidest gewaschen (2x 1 h und 1x ü.N.), dehydriert (aufsteigende Ethanolreihe: 70%, 2x 95%, 1x 100%, jeweils 1 h und 100% ü.N. und 1 h 100%), in Xylol gelagert (2x 1 h) und in flüssiges Paraffin (62°C; 1 h und ü.N.) überführt. Am Folgetag wurden die Proben in mit flüssigem Paraffin gefüllte Metallkassetten einbettet und ü.N. ausgehärtet.

G.6.3 Schneiden

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom 4 µm dick geschnitten (je Probe 30 Schnitte), in ein Wasserbad überführt (24°C), auf Lysin-beschichtete Objektträger gebracht, auf eine Wärmeplatte überführt (42°C, 20 min) und ü.N. zur Aushärtung gebracht (62°C).

G.6.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Proben wurden entparaffiniert (in 2x 5 min Xylol) und hydriert (absteigende Ethanolreihe: 2x 100%, 2x 95%, 1x 80%, jeweils 2,5 min). Hämatoxylin, ein natürlicher Farbstoff, färbt saure bzw. basophile Strukturen (beispielsweise DNS, Zellkern) blau, wobei Eosin, ein synthetischer Farbstoff, basische bzw. azidophile Strukturen rot (beispielsweise Proteine des Zellplasmas) markiert. Die Schnitte wurden in Leitungswasser gewaschen, in Hämatoxylin-Lösung nach Harris gefärbt (10 min), unter Leitungswasser abgespült, in 1%iger Salzsäure differenziert und in Wasser (4 min, 60°C) gebläut. Die Proben wurden erneut in Hämatoxylin (2-3 min) gefärbt, gespült (Leitungswasser), in Eosinlösung (1-2 min) koloriert, entwässert (aufsteigende Ethanolreihe), in Xylol gebadet (2x 5 min), mit Roti-Histokitt II eingedeckt und ü.N. zum Austrocknen gebracht.

G.6.5 Safranin-O-Färbung

Die Präparate wurden entparaffiniert und hydriert (siehe G.6.4). Die Safranin-Orange-Färbung (im Folgenden als Safranin-O-Färbung bezeichnet) wurde gemäß einem etablierten Protokolls¹¹⁹ durchgeführt: die Schnitte wurden in Hämatoxylin-Lösung (10 min) gefärbt, in Leitungswasser gewaschen, in Echtgrün Lösung (0,02%; 4 min) gebadet, 3x kurz in 1%ige Essigsäure getaucht, in 1%ige Safranin-O-Lösung (5 min) überführt, dehydriert und eingedeckt (siehe G.6.4). Safranin-O stellt selektiv Glykosaminoglykane dar, wobei die Farbintensität direkt proportional zum Glykosaminoglykangehalt des Gewebes ist. Glykosaminoglykane, auch Mucopolysaccharide genannt, werden orange-rot angefärbt, die Zellkerne erscheinen violett-schwarz, das Zytoplasma und Kollagen färbt sich grün.

G.6.6 Evaluation

Zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur wurden die Schnitte mit Safranin-Orange und Echtgrün gefärbt.

G.6.6.1 Evaluation des Reparaturgewebes

Die Evaluation des Reparaturgewebes erfolgte mittels zweier etablierter Bewertungssysteme²⁰³. Es wurden das komplexe Bewertungssystem nach Sellers *et al.*²³¹ (max. 31 Punkte: leerer Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe; 0 Punkte: komplette Reparatur mit hyalinem Knorpel; Tabelle 7) und das einfache Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*²⁶⁶ (max. 14 Punkte: fehlende Knorpelreparatur; 0 Punkte: vollständige Knorpelreparatur mit normalem Knorpel; Tabelle 8) verwendet. Bei 13 Proben wurden insgesamt 130 Schnitte (10 Schnitte/Probe) je Bewertungssystem verblindet evaluiert (20-, 40- und 100-fache Vergrößerung).

Tabelle 7: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers et al..

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung in Relation zum angrenzenden gesunden Knorpel	91 – 110%	0
	76 – 90% oder 111 – 125%	1
	51 – 75%	2
	26 – 50%	3
	< 25%	4
2. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	normale Kontinuität	0
	verminderte Zellularität	1
	Spalte auf einer Seite	2
	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O	normal	0
	leicht vermindert	1
	mittelstark vermindert	2
	stark vermindert	3
	keine Anfärbbarkeit	4
4. Zellmorphologie	(a) normal	0
	(b) vorwiegend runde Zellen, Chondrozytenmorphologie, 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
	25 – 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	(c) 50% runde Zellen, Chondrozytenmorphologie, 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	25 – 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
	(d) vorwiegend Fibroblastenähnliche Zellen	5
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	normal	0
	1 – 3 kleine Defekte	1
	1 – 3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse/Spalten	4

6. Oberflächenarchitektur	normal	0
Fibrillation = Auffaserung	leichte Fibrillationen	1
der Oberfläche	mittelstarke Fibrillationen	2
	starke Fibrillationen	3
7. Neubildung des subchondraler	90 – 100%	0
Knochens unterhalb des	75 – 89%	1
Knorpelreparaturgewebes	50 – 74%	2
	25 – 49%	3
	< 25%	4
8. <i>tidemark</i>	vollständig	0
Ossifikationsfront;	75 – 89%	1
Übergangszone zwischen	50 – 74%	2
transitorischem und	25 – 49%	3
verkalktem Knorpel	< 25%	4

Tabelle 8: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Wakitani et al..

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

G.6.6.2 Evaluation von degenerativen Schäden im angrenzenden Knorpel

Die Evaluation des angrenzenden Knorpels erfolgte mittels des etablierten Bewertungssystems nach Little *et al.*¹³⁷ (max. 25 Punkte: restlos aufgebrauchter Knorpel; 0 Punkte: normaler Knorpel; Tabelle 9). Pro Tier wurden 6 Schnitte beurteilt (je 3 Schnitte lateral und 3 medial des Defekts).

Tabelle 9: Bewertungssystem des angrenzenden Knorpels nach Little et al..

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Struktur	Normal	0
(Beurteilung des schlechtesten Areal)	Leichte Oberflächen-Irregularitäten (Oberfläche kaum zerrissen)	1
	Moderate Oberflächen-Irregularitäten(raue Oberfläche)	2
	Massive Oberflächen-Irregularitäten (Riss, Fissur/Fibrillation <10% Tiefe)	3
	Fissuren bis zur Transitionalzone	4
	Fissuren bis zur radialen Zone	5
	Fissuren bis zur kalzifizierten Zone	6
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	7
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	8
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur kalzifizierten Zone (gesamte Tiefe)	9
	Erosionen oder massive Fibrillationen bis zur Subchondralen Knochen	10
2. Chondrozyten Dichte	Normal	0
(Beurteilung des gesamten Areal)	Erhöht oder leicht erniedrigt	1
	Moderat erniedrigt	2
	Massiv erniedrigt	3
	Keine Zellen	4
3. Zellklone	Normal	0
(Beurteilung des gesamten Areal)	Einzelne Duplets	1
	Viele Duplets	2
	Duplets und Triplets	3
	Multiple Zellnester oder keine Zellen	4
4. Safranin-O-Färbung	Normal	0
(Beurteilung des schlechtesten Areal)	Erniedrigte Färbung bis zu mittleren Zone (1/3 Tiefe)	1
	Erniedrigte Färbung bis zu tiefen Zone (2/3 Tiefe)	2
	Erniedrigte Färbung bis zu kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	3
	Keine Färbung	4
5. <i>tidemark</i> / kalzifizierter Knorpel/ subchondraler Knochen (Beurteilung des schlechtesten Areal)	Intakte Subchondraler Knochenplatte + eine <i>tidemark</i>	0
	Intakte Subchondraler Knochenplatte + doppelte <i>tidemark</i>	1
	Blutgefäße penetrieren die subchondrale Knochenplatte bis zur kalzifizierten Zone	2
	Blutgefäße penetrieren die <i>tidemark</i>	3

G.7 Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes

Zur biochemischen Beurteilung wurden drei Regionen in der Trochlea unterschieden: Originalknorpel, Reparaturgewebe und benachbarter Knorpel (Abbildung 6). Die mit Originalknorpel bezeichneten Proben wurden *in toto* aus dem gesunden Originalknorpel extrahiert, in dem später der Defekt erzeugt wurde. Reparaturgewebe und der benachbarte Knorpel wurden 6 Monate postoperativ direkt nach Sektion der Tiere vollständig entnommen. Das Reparaturgewebe stammt aus dem Defektareal, wohingegen der benachbarte Knorpel aus dem distal vom Defekt liegenden angrenzenden Knorpel gewonnen wurde (Abbildung 6). Die

insgesamt 39 Proben (13 Tiere, je 3 Proben) wurden der biochemischen Auswertung zur Bestimmung von Zellzahl (DNS-Test; Hoechst-33258-Test), Proteoglykan-Gehalt (Dimethylmethylenblau [DMMB]-Test) und Protein-Anteil (*Bicinchoninic acid* [BCA]-Test) unterzogen. Der Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Gehalt wurde anhand verschiedener „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA; antikörperbasiertes Nachweisverfahren) ermittelt.

G.7.1 Papain-Verdau

Die Papain-Lösung (25 mg/ml) wurde mit PBS auf 0,5 mg/ml verdünnt, jeder Probe (n = 39) wurde 400 µl der verdünnten Lösung zugesetzt und ü.N. inkubiert (60°C).

G.7.2 DNS-Bestimmung (Hoechst-33258-Test)

In einer schwarzen Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde die Standardreihe A-F in Doppelbestimmung angelegt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Schema zur Herstellung der Standardreihe des Hoechst-Tests.

Standard	A	B	C	D	E	F
DNS Standard	0 µl	5 µl	10 µl	20 µl	50 µl	90 µl
TNE	100 µl	95 µl	90 µl	80 µl	50 µl	10 µl
DNS-Gehalt	0 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	900 ng

In jede Vertiefung wurde 10 µl der verdauten Probe pipettiert, je 90 µl TNE-Puffer hinzugefügt. Hoechst 33258 wurde im Verhältnis von 1:500 mit TNE verdünnt (vor Licht geschützt; Bisbenzimid Hoechst 33258 interkaliert mit der DNS durch Bindung an das Basenpaar Adenin/Thymin^{32,194}) und jeder Probe 100 µl des verdünnten Farbstoffes zugefügt (zeit- und lichtabhängige Reaktion). In einem GENios plate reader wurde bei der Exzitationswellenlänge von 365 nm die Emissionen der Wellenlänge 458 nm detektiert. Bei bekanntem DNS-Gehalt der Standards (Tabelle 10) konnte die Kalibrierungsgerade mit unten angegebener Formel (Abbildung 10) ermittelt und der DNS-Gehalt jeder Probe errechnet werden. Anschließend wurde bei einem durchschnittlichen DNS-Gehalt von 7,7 pg DNS pro Zelle¹²⁰ auf die Zellzahl im Knorpelgewebe extrapoliert.

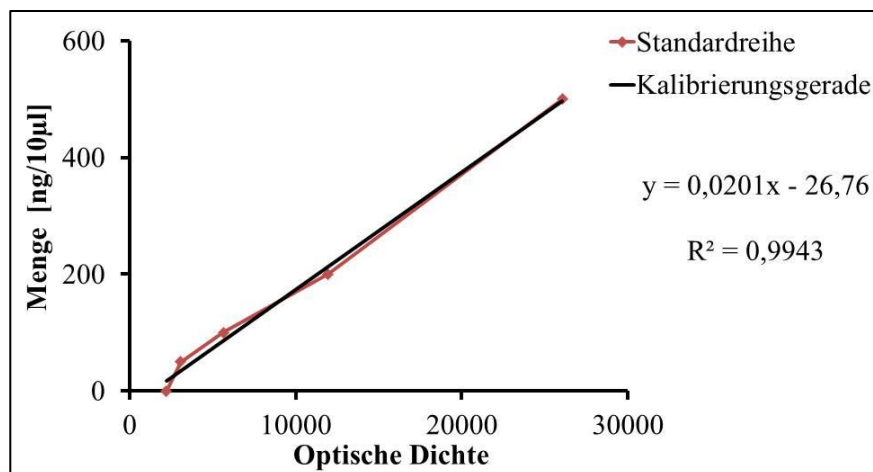


Abbildung 10: Beispiel einer Kalibrierungsgerade des Hoechst-Tests.

G.7.3 Protein-Bestimmung (*bicinchoninic acid Test*; **BCA-Test**)

In einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde eine Standardreihe A-I in Doppelbestimmung angelegt (je Vertiefung 25 µl der jeweiligen Standardlösung; Tabelle 11).

Tabelle 11: Schema zur Herstellung der Standardreihe im BCA-Test. Stammlösung: 2 mg BSA/ml

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

In jede Vertiefung wurde 3 µl verdaute Probe pipettiert, 200 µl des nach Herstellerangaben vorbereitete Arbeitsreagenz hinzugefügt, auf einem Plattenschüttler gemischt (30 s), abgedeckt inkubiert (37°C; 30 min), auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Aus den Absorptionswerten der Standardreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt und die Protein Konzentration jeder Probe berechnet.

G.7.4 Proteoglykan-Bestimmung (**DMMB-Test**)

Zur Herstellung der gepufferten DMMB (Dimethylmethylenblau) Lösung wurden 16 mg DMMB in 5 ml 95%igem Ethanol gelöst, 3 ml Ameisensäure sowie 25,6 ml 1 M Natriumhydroxid zugegeben und bis auf 1 l Gesamtvolumen mit aqua bidest aufgefüllt¹⁸⁰

(pH-Wert 3,5; lichtgeschützt). DMMB bindet Proteoglykane und Chondroitinsulfate, die photometrische Detektion beider Substanzen ist vergleichbar^{63,194}. Drei Lösungen wurden vorbereitet: Lösung A aus 0,05 g D-Cysteinhydrochloridmonohydrat und 30 ml PBE, Lösung B aus 0,053 g Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz und 1 ml Lösung A, Lösung C aus 24,95 ml Lösung A und 0,05 ml Lösung B. In einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde eine Standardreihe A-F (40 µl Standard/Vertiefung) in Doppelbestimmung angelegt (Tabelle 12) und jeweils 250 µl DMMB Färbelösung zugefügt. Je verdauter Probe wurden 10 µl/Vertiefung pipettiert und 30 µl Lösung A sowie 250 µl DMMB Lösung appliziert. Im GENios plate reader wurde die Absorption der Blaufärbung bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardwerte wurde die Kalibrierungsgerade ermittelt und die Konzentration jeder Probe errechnet.

Tabelle 12: Schema zur Herstellung der Standardreihe im DMMB-Test.

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

G.7.5 Typ-I- und Typ-II-Kollagen Bestimmung (ELISA)

Zur Bestimmung des Anteils an Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Gehalts wurde ein quantitativer ELISA genutzt. Bei dem spezifischen Nachweis von Typ-I-Kollagen handelt es sich um einen kompetitiven Immuntest (indirekt proportionale Beziehung zwischen Messsignal und Kollagen Konzentration; je höher das Messsignal, desto niedriger die Konzentration des Analyten). Zum Nachweis des Typ-II-Kollagen-Gehalts kam ein *sandwich-ELISA* zur Anwendung (direkt proportionale Menge an Enzym-markiertem Antikörper und gebundenem Antigen).

G.7.5.1 Typ-I-Kollagen ELISA

Die Reagenzien wurden nach Herstellerangaben vorbereitet, in jede Vertiefung der Mischplatte wurde 10 µl Probe verdünnt in 98 µl PBE pipettiert sowie 108 µl Standard. Die Standardreihe A-F wurde in Doppelbestimmung angelegt. Konjugat (12 µl/Vertiefung; biotinylierte Anti-Kollagen-Typ-I-Antikörper enthalten) wurde appliziert, jeweils 100 µl jeder Vertiefung der Mischplatte wurde in die Typ-I-Kollagen-beschichtete Mikrotiterplatte

überführt und auf einem Plattenschüttler inkubiert (2 h; 400-450 Umdrehungen pro Minute, Raumtemperatur), 3x mit Waschpuffer (200 µl/Vertiefung) gespült, die Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch kräftig ausgeschlagen, das Enzym Streptavidin-HRP (100 µl/Vertiefung) hinzugefügt und auf einem Plattenschüttler inkubiert (30 min; Raumtemperatur). Es wurde erneut 3x gespült und ausgeschlagen, Substrat hinzugefügt (100 µl/Vertiefung), 10 min lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion wurde durch Applikation von Stopp Lösung (100 µl/Vertiefung) beendet. Die Absorption wurde im GENios plate reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Anhand der Standardreihe wurde die Kalibrierungsgerade erstellt und die Typ-I-Kollagen Konzentrationen errechnet.

G.7.5.2 Typ-II-Kollagen ELISA

Die Reagenzien wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Verdaute Proben (100 µl/Vertiefung) sowie Standards wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Standardreihe A-H wurde in Doppelbestimmung angelegt, inkubiert (2 h; Raumtemperatur), 6x mit Waschpuffer (200 µl/Vertiefung) gespült, auf einem Papiertuch kräftig ausgeschlagen, Konjugat (je 100 µl; enthält biotinylierte Anti-Kollagen-Typ-II-Sekundäntikörper) hinzugefügt, inkubiert (2 h; Raumtemperatur). Es wurde erneut 6x gespült und ausgeschlagen, das Enzym Streptavidin-HRP (100 µl/Vertiefung) wurde appliziert, 30 min lichtgeschützt inkubiert (Raumtemperatur), 6x gespült und ausgeschlagen, Substrat beigefügt (100 µl/Vertiefung) und lichtgeschützt inkubiert (20 min; Raumtemperatur). Nach Applikation der Stopp Lösung (100 µl/Vertiefung) wurde die Absorption im GENios plate reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen, die Kalibrierungsgerade erstellt und die Typ-II-Kollagen Konzentration berechnet.

G.8 Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I- und Typ-II-Kollagen

Die Proben wurden entparaffiniert (in 2 x 5 min Xylol) und hydriert (absteigende Ethanolreihe: 2 x 100%, 2 x 95%, 2 x 80%, jeweils 1 min). Die Präparate wurden 2 x 1 min in Leitungswasser gewaschen, in 0,3%ige Wasserstoff-Peroxid Lösung (H₂O₂, 30 min bei Raumtemperatur) überführt, 2 x mit PBS-Lösung gespült, in 0,1%iger Trypsin-Lösung angedaut (bei 37° C 10 min inkubiert), erneut mit PBS-Lösung (je 5 min) gespült und in Blockierungspuffer (30 min bei Raumtemperatur) überführt. Die Präparate wurden in eine Nasskammer gelegt, mit monoklonalen primären Anti-Typ-I-Kollagen-Antikörpern

(Verdünnung 1:90 in Blockierungspuffer) bzw. Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörpern (Verdünnung 1:45 in Blockierungspuffer) bedeckt und inkubiert (1 h bei Raumtemperatur). Die Objektträger wurden 2 x mit PBS abgespült, mit sekundären Antikörpern (biotinyliert; Verdünnung 1:200 in PBS) versehen, in einer feuchten Kammer inkubiert (1 h bei Raumtemperatur) und den Überschuss mit PBS (3 x 5 min) abgespült. Das nach Herstellerangaben vorbereitete ABC-Reagenz wurde appliziert, die Schnitte inkubiert (30 min bei Raumtemperatur), mit PBS gespült (3 x 5 min), mit der nach Herstellerangaben zubereiteten DAB-Lösung versehen (7 min bei Raumtemperatur), 3 x in PBS gewaschen, 1 min in aqua bidest gespült, entwässert und eingedeckt (siehe G.6.4). Das Anheften der Peroxidase des ABC-Reagenz an sekundären Antikörpern bewirkt eine braune Farbreaktion. Die Intensität der lokalen Braunfärbung entspricht der Konzentration des entsprechenden Kollagens.

G.8.1 Evaluation der Immunreaktivität für Typ-I- und Typ-II-Kollagen

Zur Beurteilung der Immunreaktivität auf Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem angewandt (die Intensität der Braunfärbung entspricht der Kollagendichte im Präparat¹⁹⁴). Die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen wurde im Reparaturgewebe sowie im subchondralen Knochen evaluiert. Bei der für Typ-I-Kollagen spezifischen Färbung diente der subchondrale Knochen als Positivkontrolle und der normale Gelenkknorpel als Negativkontrolle. Die Evaluation der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen erfolgte im Reparaturgewebe. Zur Beurteilung des Typ-II-Kollagens fungierte der subchondrale Knochen als Negativkontrolle und der normale Gelenkknorpel als Positivkontrolle. Die Immunreaktivität wurde anhand der Intensität der Braunfärbung beurteilt (Tabelle 13). Je Tier wurde ein Schnitt bei 20- und 40-facher Vergrößerung von einem Untersucher verblindet evaluiert.

Tabelle 13: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität.

Punkte	Intensität der Braunfärbung entsprechend der Immunreaktivität (stets im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle)
0	keine Immunreaktion
1	signifikant weniger Immunreaktion
2	moderat weniger Immunreaktion
3	gleiche Immunreaktion
4	höhere Immunreaktion

G.9 Korrelationen

Die folgenden Ergebnisse des Defektareal wurden auf Korrelationen geprüft: 1) Mikro-CT Parameter (subchondrale Knochenplatte Defekt und subartikuläre Spongiosa Defekt: BMD, BV/TV) und Histologie (nach Sellers *et al.*²³¹ und nach Wakitani *et al.*²⁶⁶); 2) Mikro-CT Parameter und Typ-I- bzw. Typ-II-Kollagen (Reparaturgewebe); 3) Biochemie (Reparaturgewebe; Zellzahl, Proteoglykane, Typ-I- und Typ-II-Kollagen) untereinander; 4) Biochemie und Histologie; 5) Makroskopie (einzelne Parametern und Gesamtpunktwert) und Histologie (einzelne Parametern und Gesamtpunktwert). Im angrenzenden Knorpel wurden folgende Korrelationen geprüft: 1) Histologie nach Little *et al.*¹³⁷ (einzelne Parametern und Gesamtpunktwert) und Biochemie (angrenzender Knorpel; Zellzahl, Proteoglykane); 2) Biochemie untereinander. Mit Hilfe des Computerprogramms OriginPro 8G wurde der Spearman Korrelationskoeffizient ermittelt (r ; nicht normalverteilte Werte; non-parametrisch; Tabelle 14).

Tabelle 14: Interpretation des Korrelationskoeffizienten (r)²⁰³.

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

G.10 Statistische Analysen

Um die 1,0 mm mit der 1,8 mm-Gruppe zu vergleichen, wurden der Mann-Whitney-U-Test (auch Wilcoxon-Rangsummentest genannt) für unabhängige, nicht normalverteilte Werte verwendet. Zu den statistischen Analysen innerhalb einer Gruppe (innerhalb der Tieren mit 1,0 mm-Bohrkanälen bzw. innerhalb 1,8 mm der Gruppe) wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige, nicht normalverteilte Werte herangezogen. Ein P -Wert $< 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied gewertet. Alle Berechnungen wurden mit OriginPro 8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) und XLSTAT (Addinsoft Deutschland, Andernach, Deutschland) für Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt.

H. Ergebnisse

H.1 Reparatur des Gelenkknorpels

H.1.1 Makroskopische Begutachtung

Sechs Monate postoperativ wurden die Kniegelenke makroskopisch begutachtet. Bei einem Tier (1,0 mm-Gruppe) zeigte sich ein Kniegelenkserguss. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisbar (Tabelle 15; Abbildung 11). Der Defekt sowie der angrenzende Knorpel waren stets identifizierbar. Die Farbe des Reparaturgewebes variierte zwischen transparent und weiß. Die Anzahl der Blutgefäße, Oberflächenbeschaffenheit und Füllung des Defekts (nahezu leere Defektzone bis über Niveau hinausragendes Reparaturgewebe) unterschieden sich zwischen den Tieren.

Tabelle 15: Ergebnisse der makroskopischen Begutachtung.

Kategorie	Bohrlochdurchmesser; MW \pm SD		X-facher Unterschied	P
	1,0 mm-Gruppe	1,8 mm-Gruppe		
Farbe des Reparaturgewebes	0,86 \pm 0,90	1,17 \pm 0,98	1,4	0,478
Sichtbare Blutgefäße	1,00 \pm 1,53	1,33 \pm 1,03	1,3	0,435
Oberflächenbeschaffenheit	1,14 \pm 0,90	1,50 \pm 0,84	1,3	0,392
Defektfüllung	1,14 \pm 0,90	1,50 \pm 0,84	1,3	0,392
Degeneration des angrenzenden Knorpels	1,00 \pm 0,82	1,17 \pm 0,98	1,2	0,557
Summe (max. 20 Punkte)	5,14 \pm 3,13	6,67 \pm 3,08	1,3	0,242

X-facher Unterschied gibt an, um welches Vielfache eine Gruppe der anderen überlegen ist; 20 Punkte: makroskopisch fehlende Knorpelreparatur; 0 Punkte: komplette Reparatur.

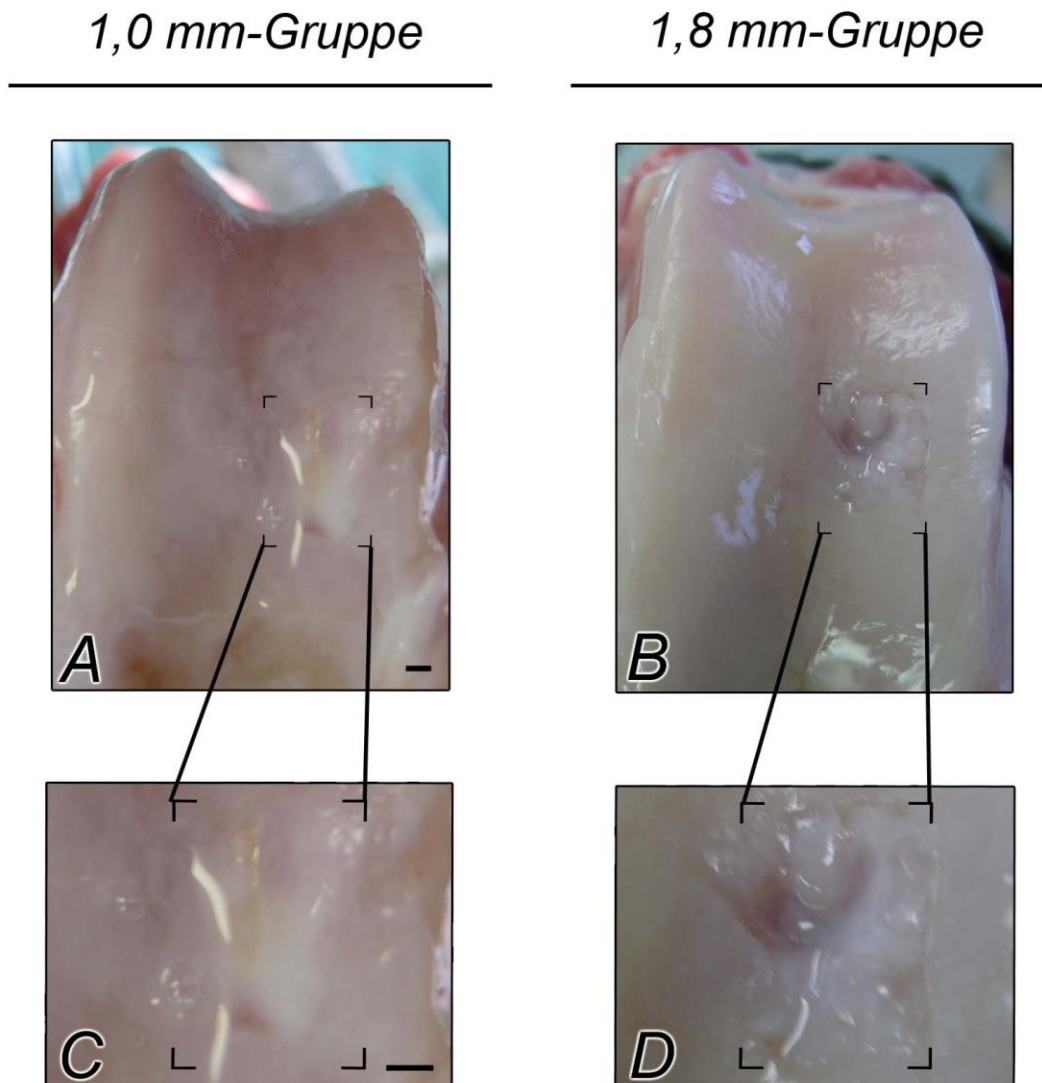


Abbildung 11: Makroskopische Begutachtung der Knorpelreparatur nach Pridie-Bohrung. Die Daten beider Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Der Defekt sowie der angrenzende Knorpel waren stets identifizierbar, das Reparaturgewebe war transparent bis weiß, <25% des Reparaturgewebes wies Blutgefäße auf, die Oberfläche war glatt, inhomogen (1,0 mm-Gruppe; A; C) oder zeigte Fibrillationen (1,8 mm-Gruppe; B; D), der Defekt war >50% (1,0 mm-Gruppe) oder <50% (1,8 mm-Gruppe) gefüllt. Die Bilder entsprechen dem Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Maßstabsbalken: 1 mm.

H.1.2 Histologische Auswertung des Reparaturgewebes

In beiden Gruppen war der Defekt stets identifizierbar. Bei beiden Bohrlochdurchmessern war das Reparaturgewebe meist nur auf einer Seite mit dem angrenzenden Knorpel integriert, es beinhaltete mindestens drei große Defekte bis hin zu Rissen und Spalten (vorwiegend in der 1,8 mm-Gruppe), die irreguläre Oberfläche war von mittelstarken Auffaserungen durchsetzt und die *tidemark* größtenteils nicht wiederhergestellt. Das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Bohrlöcher war gekennzeichnet durch eine stark verminderte Matrixanfärbbarkeit, >76%

Defektfüllung, >50% der Zellen waren rund, ähnelten Chondrozyten und >25% formierten sich in Säulen. Der Defekt war vorwiegend mit Faserknorpel ausgefüllt. Der subchondrale Knochen war zu >75% regeneriert. Das Reparaturgewebe der 1,8 mm-Bohrlöcher zeigte eine ungefärbte Matrix, <50% Defektfüllung bestehend aus vorwiegend Fibroblasten-ähnlichen Zellen. Der subchondrale Knochen war zu 50-75% wiederhergestellt.

Zusammenfassend zeichnete sich das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Bohrlöcher durch eine signifikant bessere Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie und Rekonstitution des subchondralen Knochens aus. Der Gesamtpunktwert der 1,0 mm-Gruppe zeigte eine signifikant bessere Knorpel- und Knochenreparatur verglichen mit der 1,8 mm-Gruppe (Abbildung 12; Abbildung 13; Tabelle 16; Tabelle 17).

Tabelle 16: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Knorpeldefektreparatur mittels des Bewertungssystems nach Sellers et al.

Kategorie	Bohrlochdurchmesser; MW \pm SD		P
	1,0 mm-Gruppe	1,8 mm-Gruppe	
Defektfüllung	1,19 \pm 1,37	2,90 \pm 1,49	0,059
Integration	1,86 \pm 0,80	2,00 \pm 0,92	0,746
Matrixanfärbbarkeit	3,10 \pm 0,76	3,83 \pm 0,38	0,047
Zellmorphologie	3,03 \pm 1,43	4,57 \pm 0,85	0,017
Defektarchitektur	3,10 \pm 1,11	3,50 \pm 1,02	0,302
Oberflächenarchitektur	2,37 \pm 0,87	2,33 \pm 0,80	0,925
Subchondraler Knochen	0,66 \pm 0,85	2,30 \pm 1,48	0,041
<i>tidemark</i>	3,91 \pm 0,37	4,00 \pm 0,00	0,270
Summe	19,21 \pm 4,80	25,43 \pm 3,73	0,016

Tabelle 17: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Knorpeldefektreparatur mittels des Bewertungssystems nach Wakitani et al..

Kategorie	Bohrlochdurchmesser; MW \pm SD		P
	1,0 mm-Gruppe	1,8 mm-Gruppe	
Zellmorphologie	2,36 \pm 0,85	3,40 \pm 0,67	0,015
Matrixanfärbbarkeit	2,30 \pm 0,55	2,83 \pm 0,38	0,049
Oberflächenbeschaffenheit	2,13 \pm 0,90	2,32 \pm 0,85	0,647
Knorpeldicke	0,84 \pm 0,79	1,38 \pm 0,88	0,258
Integration	0,86 \pm 0,80	1,00 \pm 0,92	0,746
Summe	8,49 \pm 2,91	10,93 \pm 2,34	0,094

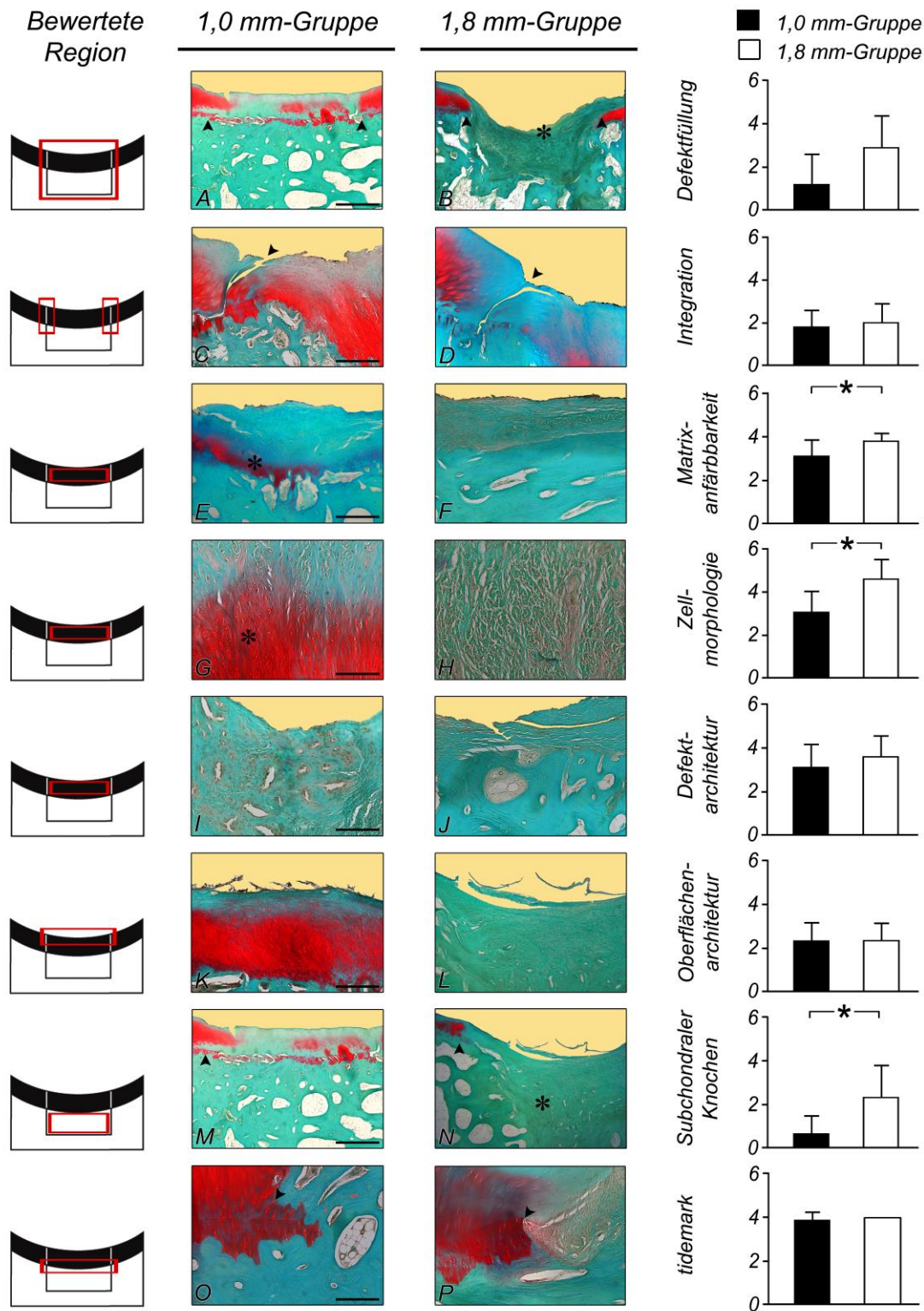


Abbildung 12: Ergebnisse der histologischen Begutachtung nach Sellers et al.. Linke Spalte: Schemazeichnung, mittlere Spalte: Abbildung gewählt anhand des Gruppen-Mittelwertes (Pfeilspitze: Defektgrenze; Maßstabsbalken: 1000 μm [A, B, M, N]; 500 μm [C - F; I - L; O, P]; 200 μm [G, H]), rechte Spalte: statistische Auswertung (*: $P < 0,05$). Die 1,0 mm-Gruppe zeigte im Vergleich zur 1,8 mm-Gruppe eine erfolgreichere Defektfüllung (A; B*), Matrixanfärbarkeit (E*; F), Zellmorphologie (mehr Zellen mit chondrozytenähnlicher Morphologie; G*, H), Rekonstitution des subchondralen Knochens (M; in der 1,8 mm-Gruppe war der Knochen vermehrt durch Bindegewebe ersetzt; N*) sowie einen signifikant besseren Gesamtpunktwert.

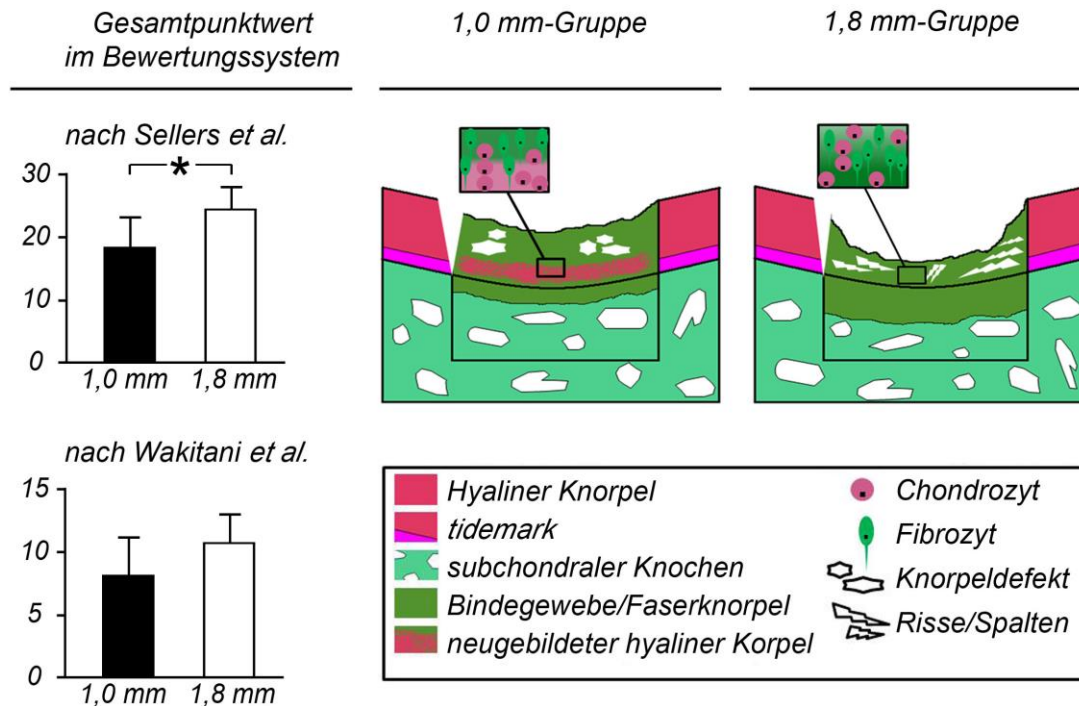


Abbildung 13: Schematische Darstellung der histologischen Gesamtpunktwerte. Links: Gesamtpunktwert im Bewertungssystem nach Sellers et al. (oben; *: $P < 0,05$) und Wakitani et al. (unten); rechts: zusammenfassende Schemazeichnung. 1,0 mm-Gruppe: bessere Defektfüllung und Matrixanfärbbarkeit, Chondrozyten-ähnliche Zellmorphologie, erfolgreichere Rekonstitution des subchondralen Knochens. 1,8 mm-Gruppe: insuffizient gefülltes Defektareal, fehlende Matrixanfärbbarkeit, weniger Chondrozyten-ähnliche Zellen, bindegewebige Umwandlung des subchondralen Knochens.

H.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe

Das Reparaturgewebe kleiner Bohrlöcher zeigte eine signifikant höhere Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Vergleich zur 1,8 mm-Gruppe ($P = 0,035$; Abbildung 14 A, B). Die 1,8 mm-Gruppe zeigte nahezu keine ($0,33 \pm 0,52$), die 1,0 mm-Gruppe moderat weniger ($1,86 \pm 1,35$) Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen als das umliegende Knorpelgewebe.

H.1.4 Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe

Das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe zeigte eine signifikant niedrigere Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen im Vergleich zur 1,8 mm-Gruppe ($P = 0,0047$; Abbildung 14 C, D). Die 1,8 mm-Gruppe zeigte eine höhere ($4,00 \pm 0,00$), die 1,0 mm-Gruppe die gleiche ($2,86 \pm 0,90$) Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen als das umliegende Knorpelgewebe.

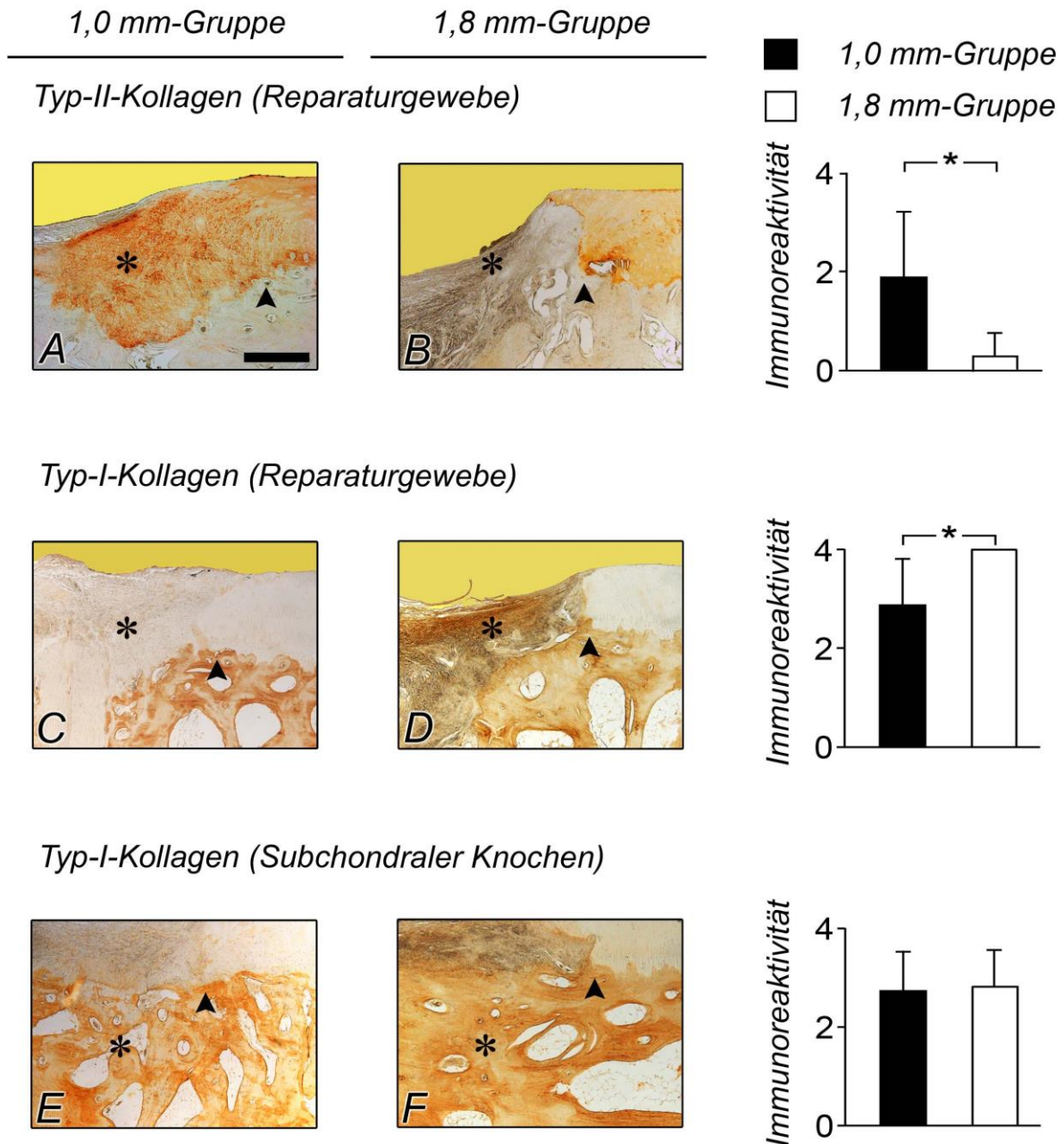


Abbildung 14: Darstellung der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen (A, B) und Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe (C, D) und Typ-I-Kollagen im subchondralen Knochen (E, F). Das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe (*A) wies eine signifikant höhere Reaktivität für Typ-II-Kollagen auf als das der 1,8 mm-Gruppe (*B). Das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe zeigte eine signifikant niedrigere Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen (*C) als das der 1,8 mm-Gruppe (*D). Der subchondrale Knochen des Defektareals zeigte in beiden Gruppen eine ähnliche Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen wie der angrenzende subchondrale Knochen (*E; *F) *: $P < 0,05$. Pfeilspitze: Defektgrenze; Maßstabsbalken: 500 μm (A - F).

H.1.5 Biochemie des Reparaturgewebes

Der Vergleich des Reparaturgewebes beider Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahl (DNS), dem Proteoglykan-Gehalt und dem Proteoglykan/DNS-Verhältnisses auf (Tabelle 18). Im Vergleich des Reparaturknorpels gegenüber dem Originalknorpel innerhalb der Gruppen zeigten sich dennoch Differenzen (Tabelle 19). In der 1,0 mm-Gruppe war die Zellzahl und der Proteoglykan-Gehalt im Reparaturgewebe (im Vergleich zum Originalknorpel) signifikant angestiegen (Abbildung 15 A, C). Proteoglykane/DNS waren balanciert (waagrechte Gerade; Abbildung 15 E). In der 1,8 mm-Gruppe waren die Zellzahl und die Matrixsynthese (Proteoglykane) nicht signifikant verändert. Proteoglykane/DNS fielen leicht ab (Abbildung 15 B, D, F).

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Typ-I-Kollagen-Gehalts, Typ-I-Kollagen/DNS sowie Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen. Bei beiden Gruppen war Typ-I-Kollagen und Typ-I-Kollagen/DNS im Reparaturgewebe signifikant höher als im Originalknorpel, wobei Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen ausschließlich in der 1,8 mm-Gruppe signifikant erhöht war (Tabelle 19; Abbildung 16 G - J). Der Typ-II-Kollagen-Gehalt, Typ-II-Kollagen/DNS und Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen des Reparaturgewebes und des Originalknorpels waren in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich; beide Bohrlochgruppen wiesen im Reparaturgewebe ein signifikant vermindertes Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen-Verhältnis auf (Tabelle 19; Abbildung 16 K - N). Dennoch beinhaltete das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe 2,4-mal mehr Typ-II-Kollagen und 1,5-mal mehr Typ-II-Kollagen/DNS als das der 1,8 mm-Gruppe (Tabelle 18).

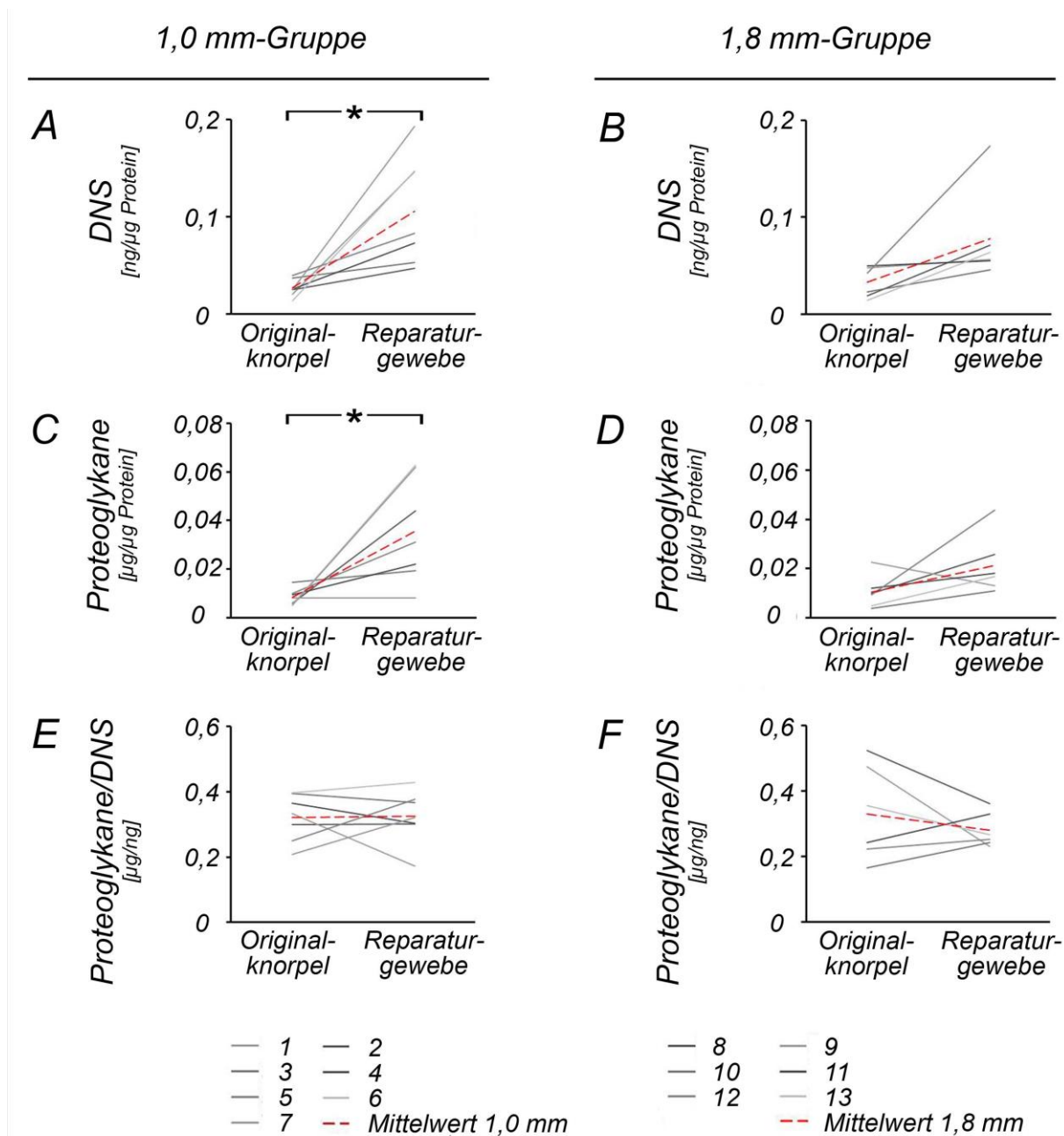


Abbildung 15: Biochemischer Vergleich zwischen dem Reparaturgewebe und dem Originalknorpel (DNS, Proteoglykane). Im Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe war die Zellzahl und der Proteoglykan-Gehalt signifikant höher als im Originalknorpel (A; C). Das Proteoglykane/DNS-Verhältnis der 1,0 mm-Gruppe war balanciert (E), während es in der 1,8 mm-Gruppe abfiel (F). Die Nummern 1 - 13 repräsentieren die einzelnen Tiere. *: $P < 0,05$

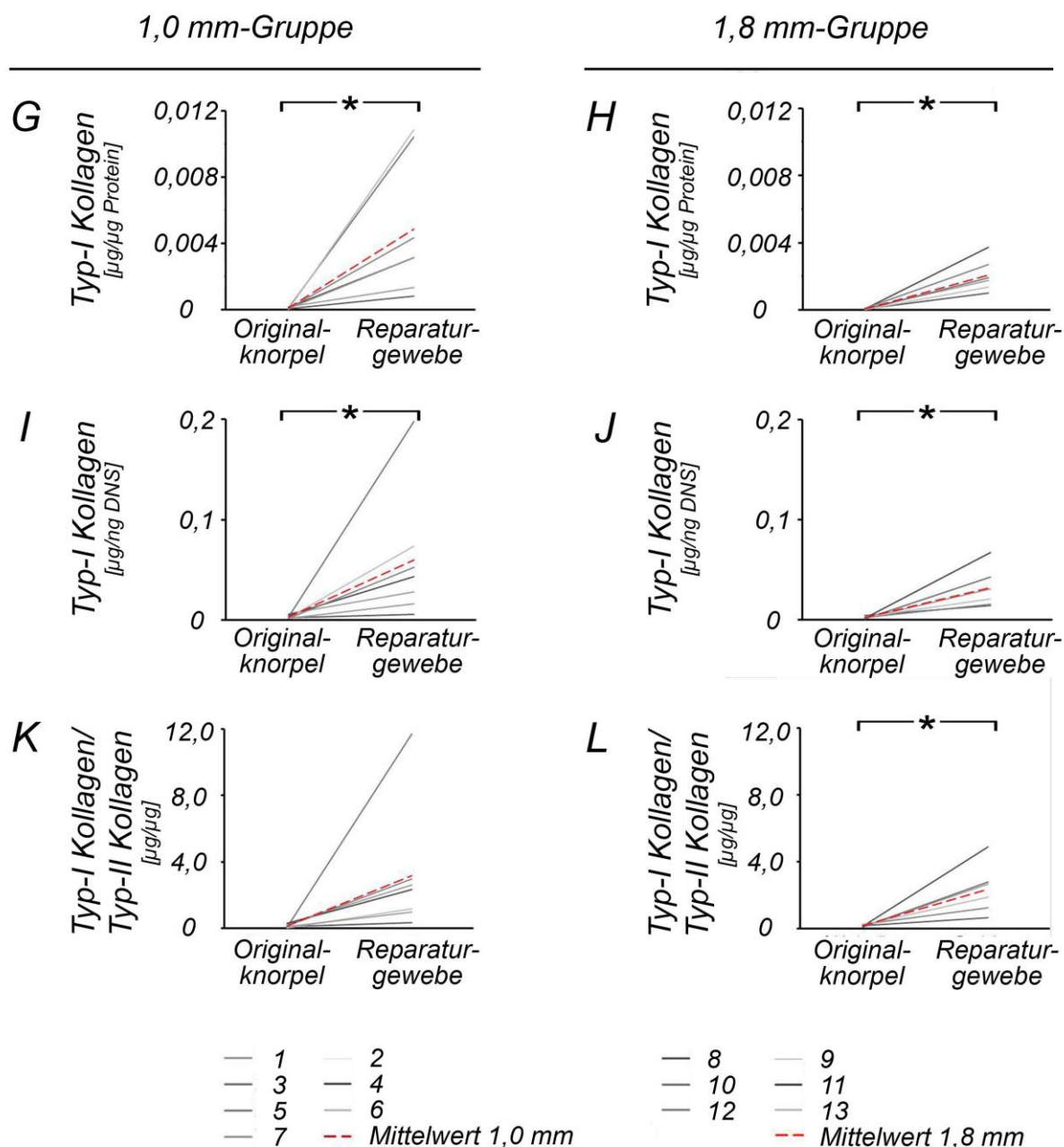


Abbildung 16: Biochemischer Vergleich zwischen dem Reparaturgewebe und dem Originalknorpel (Typ-I Kollagen). Nach Pridie-Bohrung war der Typ-I-Kollagen Gehalt sowie Typ-I Kollagen/DNS im Reparaturgewebe signifikant höher als im Originalknorpel (G - J). Während im Reparaturgewebe der 1,8 mm-Gruppe im Vergleich zum Originalknorpel das Typ-I Kollagen/Typ-II Kollagen Verhältnis signifikant angestiegen war, zeigte sich dieser Anstieg nicht in der 1,0 mm-Gruppe (K, L). Die Nummern 1 - 13 repräsentieren die einzelnen Tiere. *: $P < 0,05$

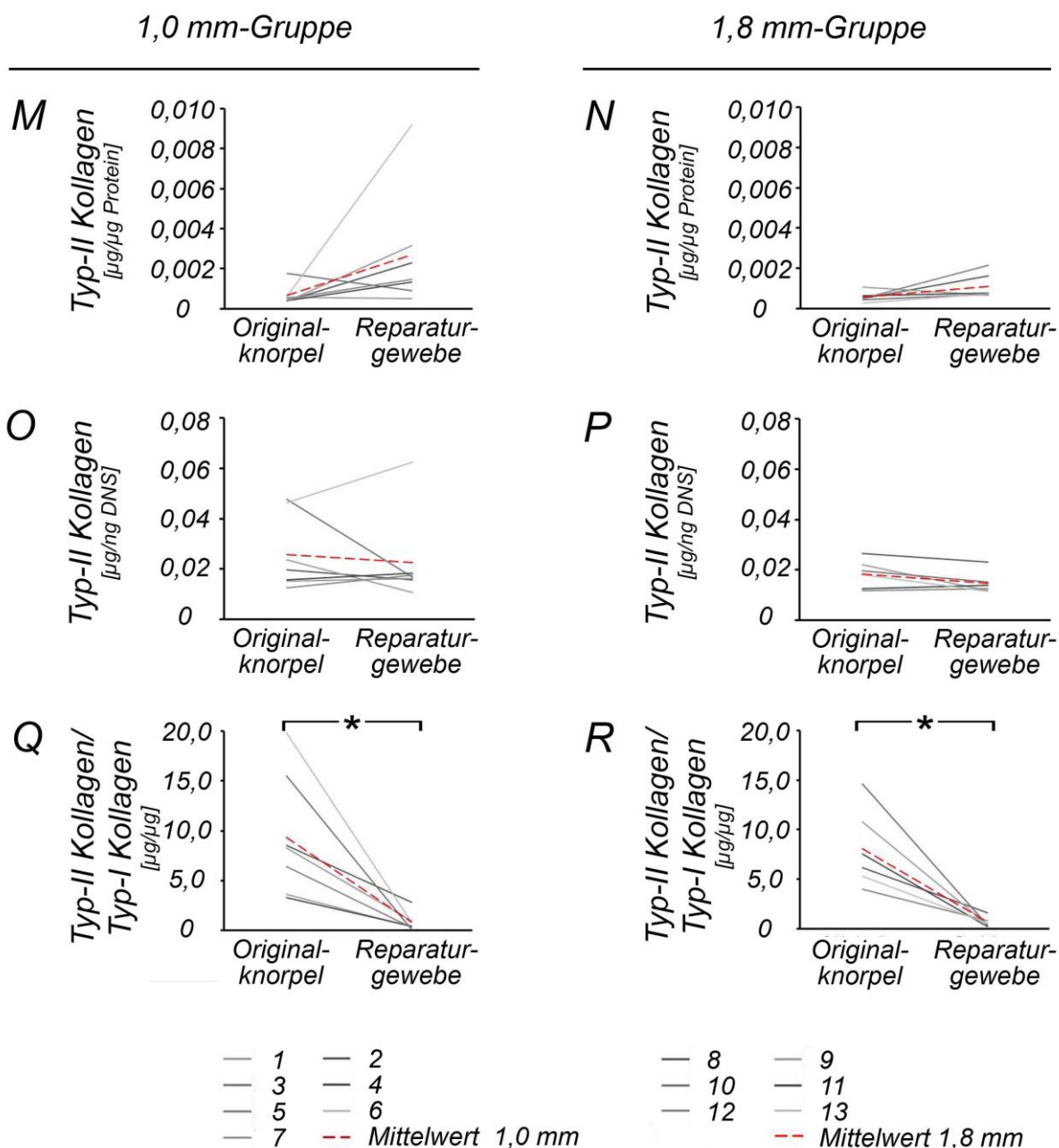


Abbildung 17: Biochemischer Vergleich zwischen dem Reparaturgewebe und dem Originalknorpel (Typ-II Kollagen). In beiden Gruppen zeigte sich keine signifikante Veränderung im Reparaturgewebe verglichen mit dem Originalknorpel bezüglich des Typ-II Kollagen Gehaltes sowie des Typ-II Kollagen/DNS Verhältnisses (M - P). Dennoch beinhaltete das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe 2,4-mal mehr Typ-II-Kollagen und 1,5-mal mehr Typ-II-Kollagen/DNS als das der 1,8 mm-Gruppe ($P > 0,05$). Typ-II Kollagen/Typ-I Kollagen war nach Pridie-Bohrung in beiden Gruppen signifikant vermindert (Q, R). Die Nummern 1 - 13 repräsentieren die einzelnen Tiere. *: $P < 0,05$.

Tabelle 18: Biochemische Ergebnisse (DNS, Proteoglykane, Typ-I- und Typ-II-Kollagen).

Probe		MW \pm SD		X-facher Unterschied	P
		1,0 mm-Gruppe	1,8 mm-Gruppe		
Original- knorpel	DNS	$2,7^{-2} \pm 0,9^{-2}$	$3,3^{-2} \pm 1,6^{-2}$	1,2x	0,435
	Proteoglykane	$8,4^{-3} \pm 3,3^{-3}$	$10,5^{-3} \pm 6,7^{-3}$	1,3x	0,514
	Proteoglykane/DNS	$3,2^{-1} \pm 0,7^{-1}$	$3,3^{-1} \pm 1,5^{-1}$	1,0x	0,878
	Typ-I-Kollagen	$0,8^{-4} \pm 0,5^{-4}$	$0,8^{-4} \pm 0,3^{-4}$	1,1x	0,741
	Typ-I-Kollagen/DNS	$0,3^{-2} \pm 0,2^{-2}$	$0,3^{-2} \pm 0,1^{-2}$	1,2x	0,455
	Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen	$1,6^{-1} \pm 9,2^{-2}$	$1,5^{-1} \pm 6,1^{-2}$	1,1x	0,907
	Typ-II-Kollagen	$6,7^{-4} \pm 5,0^{-4}$	$5,6^{-4} \pm 2,7^{-4}$	1,2x	0,644
	Typ-II-Kollagen/DNS	$2,6^{-2} \pm 1,5^{-2}$	$1,8^{-2} \pm 0,6^{-2}$	1,4x	0,261
	Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen	$9,4 \pm 5,7$	$8,1 \pm 3,6$	1,2x	0,662
Reparatur- gewebe	DNS	$10,5^{-2} \pm 5,6^{-2}$	$7,7^{-2} \pm 4,8^{-2}$	1,4x	0,344
	Proteoglykane	$35,6^{-3} \pm 21,3^{-3}$	$21,4^{-3} \pm 12,1^{-3}$	1,7x	0,162
	Proteoglykane/DNS	$3,2^{-1} \pm 0,8^{-1}$	$2,8^{-1} \pm 0,5^{-1}$	1,2x	0,271
	Typ-I-Kollagen	$48,6^{-4} \pm 41,2^{-4}$	$20,8^{-4} \pm 9,85^{-4}$	2,3x	0,127
	Typ-I-Kollagen/DNS	$6,0^{-2} \pm 6,5^{-2}$	$3,2^{-2} \pm 2,0^{-2}$	1,9x	0,324
	Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen	$3,2 \pm 3,6$	$2,4 \pm 1,4$	1,3x	0,637
	Typ-II-Kollagen	$26,9^{-4} \pm 30,0^{-4}$	$11,0^{-4} \pm 6,4^{-4}$	2,4x	0,215
	Typ-II-Kollagen/DNS	$2,3^{-2} \pm 1,8^{-2}$	$1,5^{-2} \pm 0,4^{-2}$	1,5x	0,287
	Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen	$8,5^{-1} \pm 8,7^{-1}$	$6,5^{-1} \pm 4,7^{-1}$	1,3x	0,650
Angrenzender Knorpel	DNS	$6,9^{-2} \pm 1,2^{-2}$	$6,6^{-2} \pm 1,7^{-2}$	1,1x	0,679
	Proteoglykane	$18,7^{-3} \pm 3,3^{-3}$	$18,6^{-3} \pm 4,2^{-3}$	1,0x	0,968
	Proteoglykane/DNS	$2,8^{-1} \pm 0,6^{-1}$	$2,9^{-1} \pm 0,6^{-1}$	1,1x	0,668
	Typ-I-Kollagen	$38,3^{-4} \pm 27,3^{-4}$	$44,4^{-4} \pm 28,0^{-4}$	1,2x	0,701
	Typ-I-Kollagen/DNS	$5,5^{-2} \pm 3,5^{-2}$	$6,9^{-2} \pm 4,2^{-2}$	1,3x	0,532
	Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen	$4,9 \pm 3,8$	$5,2 \pm 3,6$	1,1x	0,890
	Typ-II-Kollagen	$8,7^{-4} \pm 3,5^{-4}$	$9,3^{-4} \pm 3,4^{-4}$	1,1x	0,752
	Typ-II-Kollagen/DNS	$1,3^{-2} \pm 0,6^{-2}$	$1,4^{-2} \pm 0,4^{-2}$	1,1x	0,596
	Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen	$3,5^{-1} \pm 2,3^{-1}$	$3,2^{-1} \pm 2,0^{-1}$	1,1x	0,826

DNS [ng/ μ g Gesamtprotein]; Proteoglykane [μ g/ μ g Gesamtprotein]; Proteoglykane/DNS [μ g/ng]; Typ-I-Kollagen [μ g/ μ g Gesamtprotein]; Typ-I-Kollagen/DNS [μ g/ng]; Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen [μ g/ μ g]; Typ-II-Kollagen [μ g/ μ g Gesamtprotein]; Typ-II-Kollagen/DNS [μ g/ng]; Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen [μ g/ μ g];

Tabelle 19: Biochemische Ergebnisse: Vergleich zwischen Originalknorpel, Reparaturgewebe und angrenzendem Knorpel.

			P								
			DNS	Proteoglykane	Proteoglykane/ DNS	Typ-I- Kollagen	Typ-I- Kollagen/ DNS	Typ-I- Kollagen/ Typ-II- Kollagen	Typ-II- Kollagen	Typ-II- Kollagen/ DNS	Typ-II- Kollagen/ Typ-I- Kollagen
1,0 mm-Gruppe											
Original- knorpel	<i>versus</i>	Reparatur- gewebe	0,010	0,015	0,935	0,022	0,020	0,062	0,128	0,722	0,004
Original- knorpel	<i>versus</i>	Angrenzender Knorpel	<0,001	<0,001	0,252	0,011	0,008	0,011	0,399	0,064	0,002
Reparatur- gewebe	<i>versus</i>	Angrenzender Knorpel	0,136	0,082	0,250	0,595	0,877	0,447	0,161	0,208	0,197
1,8 mm-Gruppe											
Original- knorpel	<i>versus</i>	Reparatur- gewebe	0,072	0,089	0,452	<0,001	0,016	0,005	0,096	0,223	0,001
Original- knorpel	<i>versus</i>	Angrenzender Knorpel	0,006	0,037	0,562	0,012	0,011	0,011	0,063	0,196	0,001
Reparatur- gewebe	<i>versus</i>	Angrenzender Knorpel	0,596	0,610	0,737	0,099	0,092	0,133	0,565	0,920	0,177

DNS [ng/µg Gesamtprotein]; Proteoglykane [µg/µg Gesamtprotein]; Proteoglykane/DNS [µg/ng]; Typ-I-Kollagen [µg/µg Gesamtprotein]; Typ-I-Kollagen/DNS [µg/ng]; Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen [µg/µg]; Typ-II-Kollagen [µg/µg Gesamtprotein]; Typ-II-Kollagen/DNS [µg/ng]; Typ-II-Kollagen/Typ-I-Kollagen [µg/µg];

H.1.6 Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels

H.1.6.1 Makroskopische Evaluation des angrenzenden Knorpels per Tuschefärbung

Jedes Explantat zeigte im benachbarten Knorpel Areale mit unregelmäßiger Oberfläche. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde nicht nachgewiesen (1,0 mm-Gruppe: insgesamt 57,3 mm² degenerative Veränderungen; 1,8 mm-Gruppe: 36,2 mm²; 1,6-facher Unterschied; $P = 0,731$; Abbildung 18).

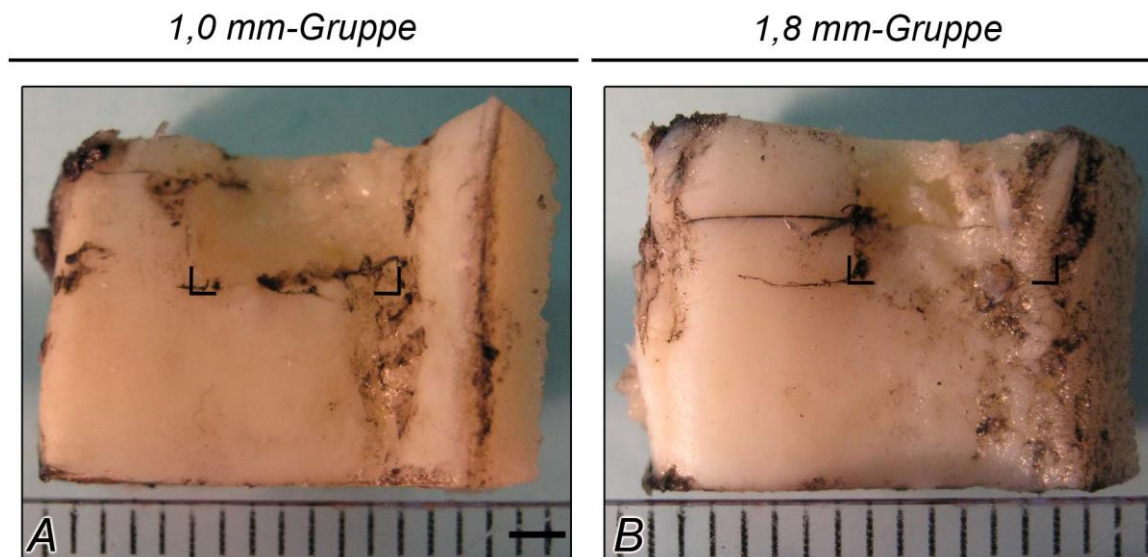


Abbildung 18: Abbildung der Tuschefärbung. Zwischen der 1,0 mm- und 1,8 mm-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Bilder wurden anhand der Mittelwerte (1,0 mm: 8,75 mm²; 1,8 mm: 6,82 mm²) der jeweiligen Gruppe ausgewählt. Defektgrenzen markiert. Maßstabsbalken: 1 mm.

H.1.6.2 Histologische Evaluation des angrenzenden Knorpels

Der angrenzende Knorpel beider Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Er war von massiven Oberflächen-Irregularitäten bis hin zu Fissuren bis zur Transitionalzone durchsetzt. Die Chondrozytenzahl waren leicht vermindert, Duplets und Triplets waren vorhanden und die Safranin-O-Färbung war herabgesetzt oder fehlte vollständig. Die *tidemark* war verdoppelt. Der kalzifizierte Knorpel und der subchondrale Knochen waren intakt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnisse der histologischen Evaluation des angrenzenden Knorpels nach Little et al..

Kategorie	MW ± SD						X-facher Unterschied	P (1,0 mm versus 1,8 mm)	P (medial versus lateral)
	1,0 mm lateral	1,0 mm medial	1,0 mm gesamt	1,8 mm lateral	1,8 mm medial	1,8 mm gesamt			
Struktur	2,0 ± 2,2	4,1 ± 2,8	3,0 ± 2,7	0,9 ± 0,3	6,8 ± 3,2	3,9 ± 3,8	1,28	0,797	0,015
Chondrozyten	1,1 ± 0,8	1,1 ± 1,4	1,1 ± 0,6	0,9 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,14	0,410	0,194
Zellklone	3,0 ± 0,7	2,4 ± 1,0	2,7 ± 0,9	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,6 ± 0,6	1,03	0,719	0,085
Safranin-O-F.	3,2 ± 0,9	2,6 ± 1,3	2,9 ± 1,1	3,9 ± 0,3	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,5	1,27	0,076	0,082
tidemark/k./s.	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,9	1,3 ± 0,6	1,07	0,938	0,672
Summe	10,5 ± 3,0	11,2 ± 4,5	10,9 ± 3,7	9,8 ± 0,4	15,5 ± 4,3	12,6 ± 4,2	1,16	0,316	0,117

Die histologische Evaluation des angrenzenden Knorpels zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Chondrozyten = Chondrozyten-Dichte; Safranin-O-F. = Safranin-O-Färbung; tidemark/k./s. = tidemark/ kalzifizierter Knorpel/ subchondraler Knochen; „X-facher Unterschied“ bezieht sich auf den Vergleich 1,0 mm-Gruppe versus 1,8 mm-Gruppe.

H.1.6.3 Biochemie des angrenzenden Knorpels

Der angrenzende Knorpel beider Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 18). Nach Pridie-Bohrung war die Zellzahl (DNS) und die Proteoglykan-Synthese des benachbarten Knorpels signifikant höher als im Originalknorpel (Tabelle 19; Abbildung 19 A - D). Das Proteoglykan/DNS-Verhältnis war in beiden Gruppen unverändert (Abbildung 19 E, F). Beide Gruppen zeigten einen signifikant erhöhten Typ-I-Kollagen-Gehalt sowie signifikant höheres Typ-I-Kollagen/DNS Verhältnis im angrenzenden Knorpel verglichen mit dem Originalknorpel (Tabelle 19; Abbildung 20 G - J). Dagegen glich der Typ-II-Kollagen-Gehalt des angrenzenden Knorpels dem des Originalknorpels (Abbildung 20 K - N).

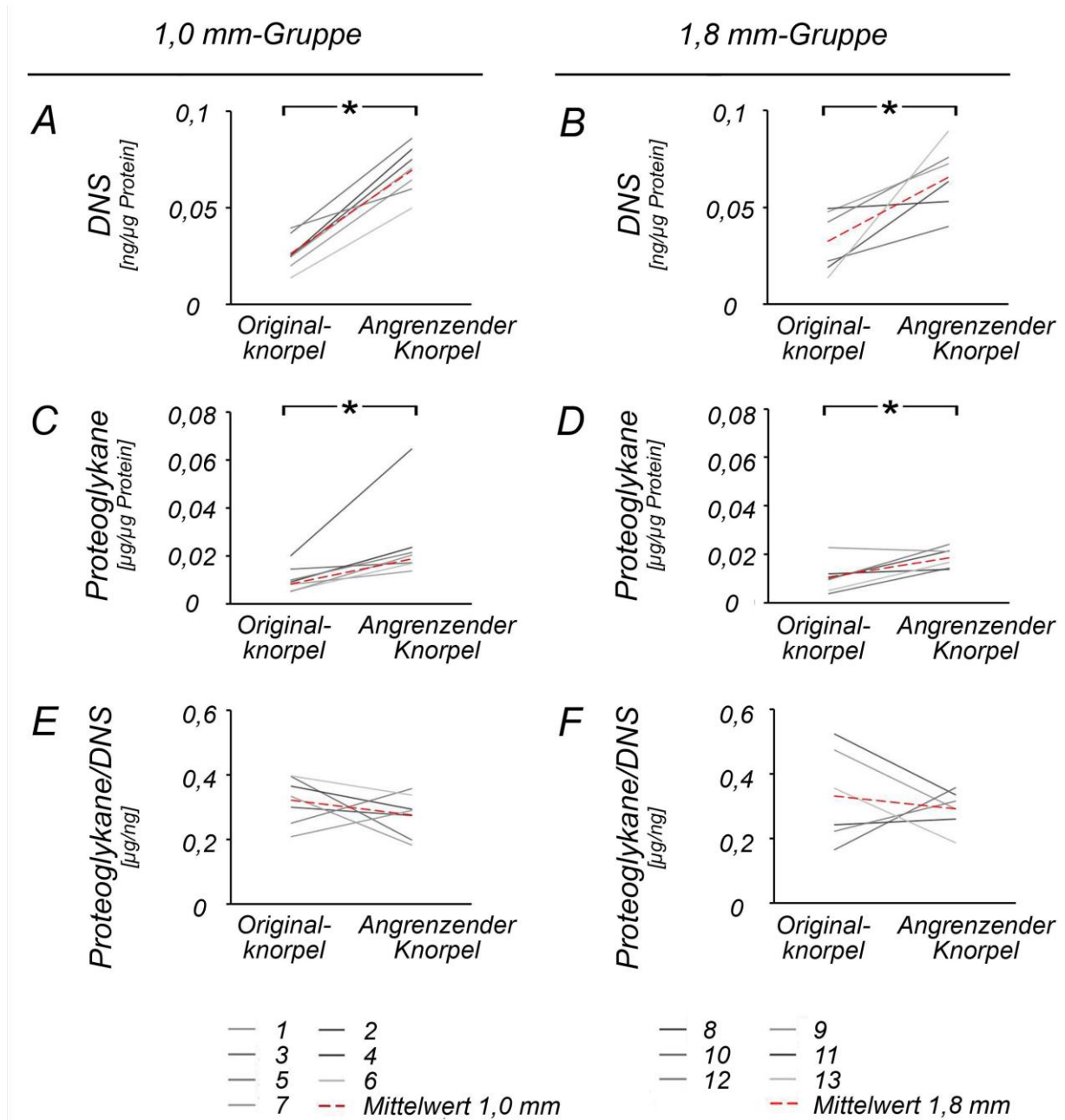


Abbildung 19: Biochemischer Vergleich zwischen dem angrenzenden Knorpel und dem Originalknorpel (DNS, Proteoglykane). Nach Pridie-Bohrung stieg die Zellzahl und der Proteoglykan-Gehalt im angrenzenden Knorpel signifikant an (verglichen mit dem Originalknorpel; A - D), während das Proteoglykane/DNS-Verhältnis unverändert war (E; F). Die Nummern 1 - 13 repräsentieren die einzelnen Tiere. *: $P < 0,05$

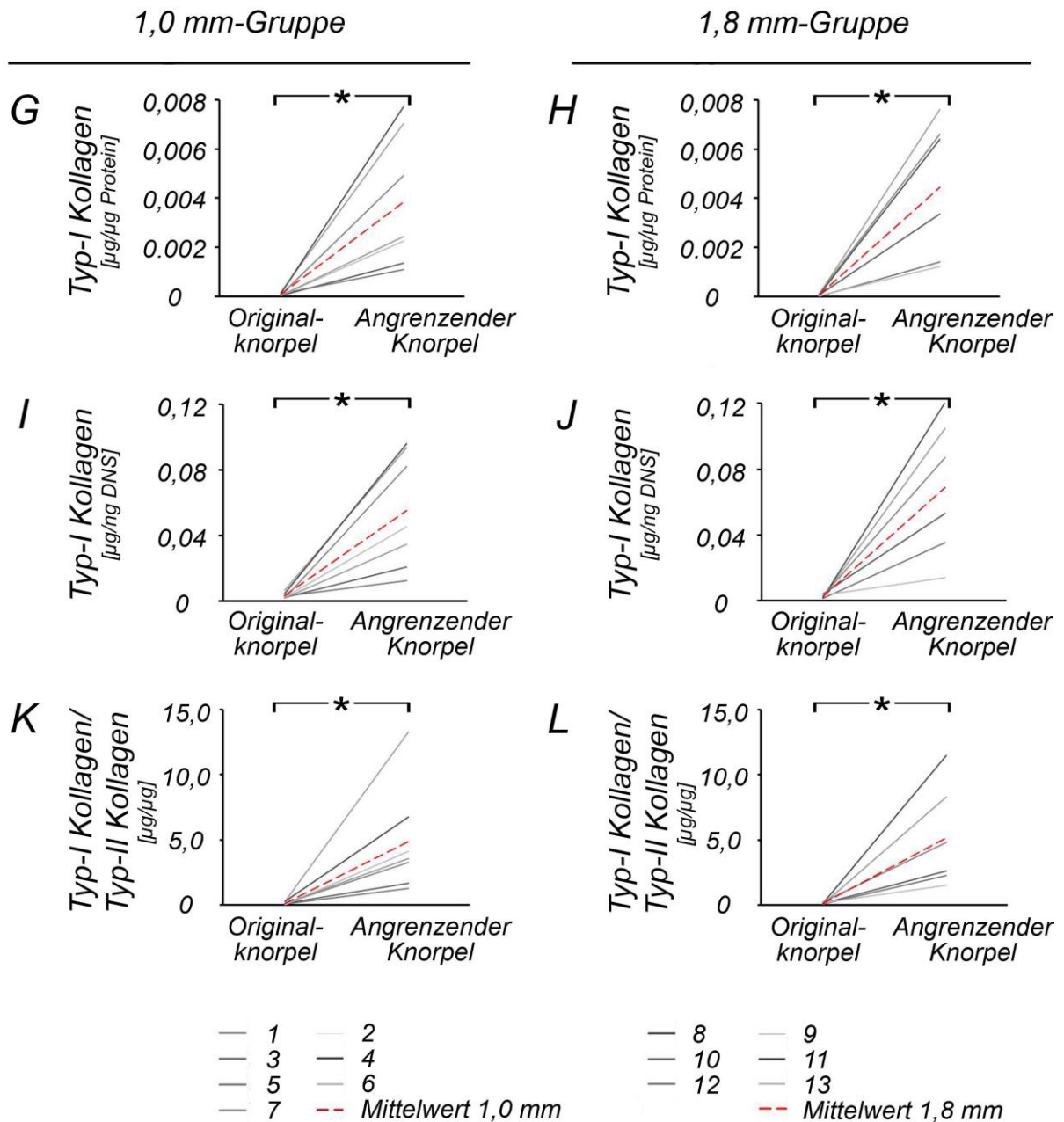


Abbildung 20: Biochemischer Vergleich zwischen dem angrenzenden Knorpel und dem Originalknorpel (Typ-I Kollagen). Nach Pridie-Bohrung war in beiden Gruppen der Typ-I-Kollagen Gehalt, Typ-I Kollagen/DNS und Typ-I Kollagen/Typ-II Kollagen im angrenzenden Knorpel signifikant höher als im Originalknorpel (G - L). Die Nummern 1 - 13 repräsentieren die einzelnen Tiere. *: $P < 0,05$

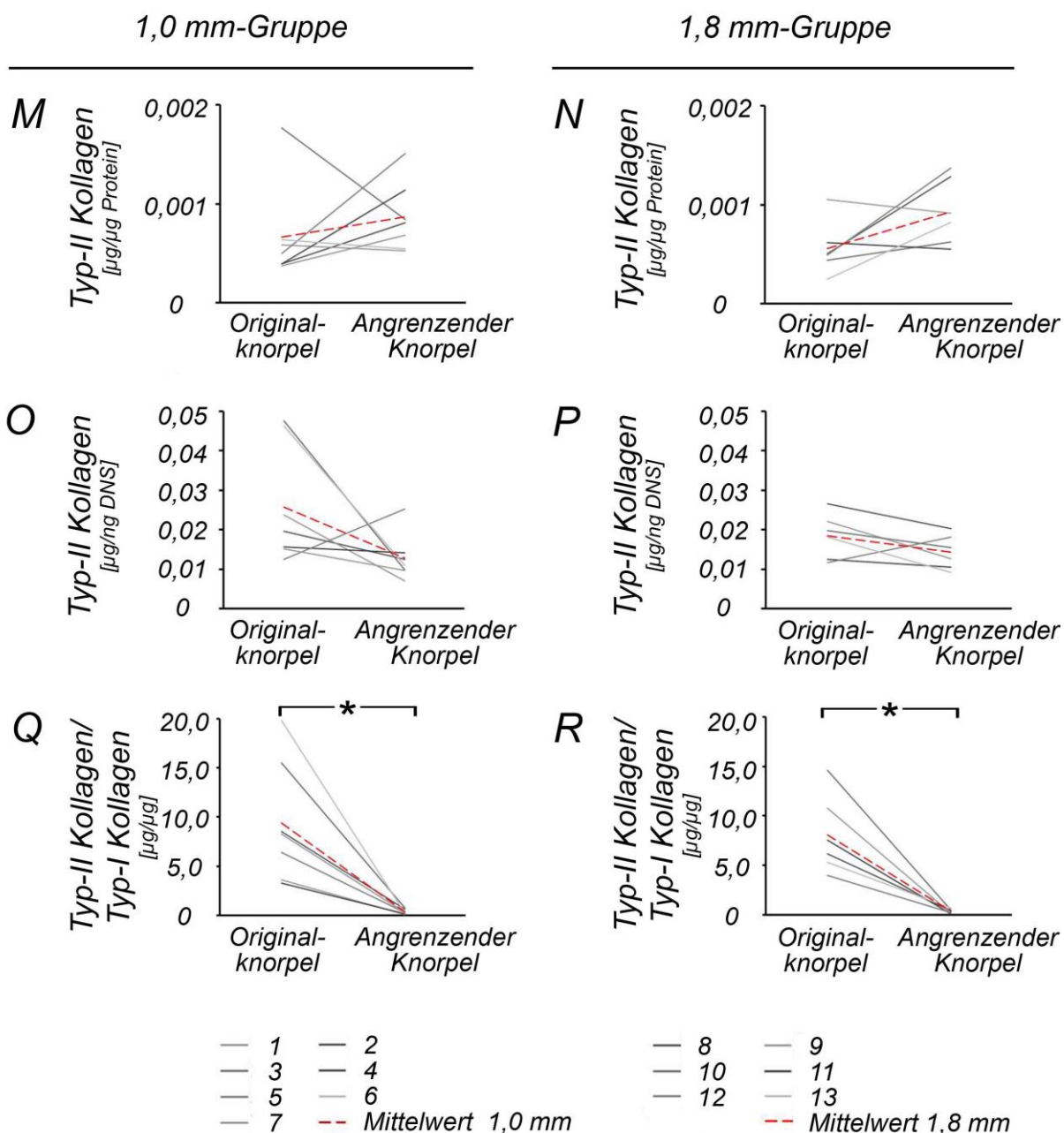


Abbildung 21: Biochemischer Vergleich zwischen dem angrenzenden Knorpel und dem Originalknorpel (Typ-II Kollagen). Nach Pridie-Bohrung war der Typ-II-Kollagen Gehalt sowie Typ-II Kollagen/DNS im benachbarten Knorpel ähnlich wie im Originalknorpel (M - P). Typ-II Kollagen/Typ-I Kollagen war im angrenzenden Knorpel beider Gruppen signifikant reduziert (Q, R). Die Nummern 1 - 13 repräsentieren die einzelnen Tiere. *: $P < 0,05$

H.2 Reparatur des subchondralen Knochens

H.2.1 Mikro-CT

H.2.1.1. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten

Subchondrale Knochenzysten waren bei keinem Tier nachweisbar. Intraläsionale Osteophyten fanden sich bei insgesamt 3/13 Tieren (23,1%). In der 1,0 mm-Gruppe zeigten sich bei 1/7 Schafen (14,3 %) drei intraläsionale Osteophyten (Abbildung 22), in der 1,8 mm-Gruppe bei 2/6 Tieren (33,3 %; Tabelle 21).

Tabelle 21: Anzahl der subchondralen Knochenzysten und intraläsionalen Osteophyten.

Gruppe	Subchondrale Knochenzysten	Intraläsionale Osteophyten (Lokalisation im Defekt)
1,0 mm	0	1/7 Tieren: je 3 Osteophyten (2 x peripher; 1 x zentral)
1,8 mm	0	2/6 Tieren: je 1 Osteophyt (2 x peripher)

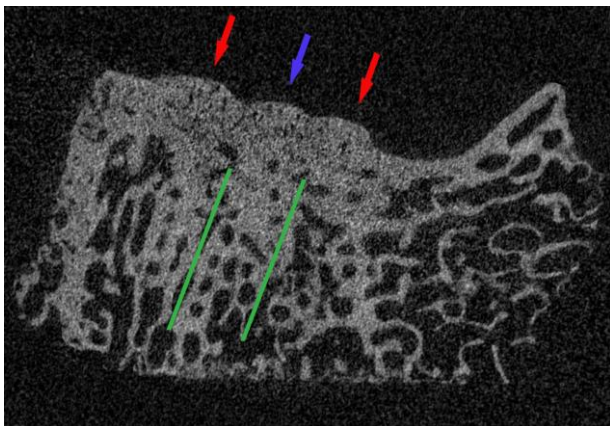


Abbildung 22: Veranschaulichung dreier intraläsionaler Osteophyten im Mikro-CT. Die Abbildung zeigt zwei periphere intraläsionale Osteophyten (rote Pfeile) und einen zentralen Osteophyt (blauer Pfeil). Die Bohrkanäle sind mit neuem Knochen durchbaut (grüne Linie).

H.2.1.2. Ergebnisse der Mikro-CT Parameter

Die subchondralen Knochenplatte sowie die subartikuläre Spongiosa wurden in jeweils drei VOIs unterteilt (G.5.3).

H.2.1.2.1 Die subchondrale Knochenplatte

Die subchondrale Knochenplatte der 1,0 mm-Gruppe wies ein signifikant höheres Knochenvolumen (BV/TV) auf als die der 1,8 mm-Gruppe. Auch die Knochenoberflächendichte (BS/TV) war in der 1,0 mm-Gruppe signifikant höher als in der 1,8 mm-Gruppe. Zudem führten 1,0 mm-Bohrlöcher zu einer signifikant dünneren

Knochenplatte als 1,8 mm-Bohrungen (1,0 mm-Gruppe: 2-fach breitere Knochenplatte im Defekt als angrenzend; 1,8 mm-Gruppe: 3-fach breiter; Abbildung 24; Tabelle 22).

Im Vergleich zum angrenzenden Knorpel wies die subchondrale Knochenplatte beider Gruppen im Defektareal eine signifikant höhere Knochenoberfläche/Volumen (BS/BV) sowie eine signifikant höhere kortikale Dicke (Ct.Th) auf (Tabelle 23). In der 1,8 mm Gruppe war die Knochenmineraldichte signifikant erniedrigt.

H.2.1.2.2 Die subartikuläre Spongiosa

In der 1,0 mm-Gruppe besaß die subartikuläre Spongiosa des Defekts ein signifikant höheres Knochenvolumen (BV/TV). Sie wies signifikant mehr (Tb.N) und dünnere Trabekel (Tb.Th) auf als die der 1,8 mm-Gruppe (Tabelle 22).

Im Vergleich zwischen Defektareal und angrenzenden VOIs waren die Knochenoberflächendichte (BS/TV) sowie die Konnektivität (Tb.Pf) ausschließlich in der 1,0 mm-Gruppe signifikant gesteigert, während Trabekeldicke und -anzahl den physiologischen Parametern entsprach (Abbildung 24; Tabelle 22). Die Spongiosa der 1,8 mm-Gruppe zeigte eine signifikant veränderte Knochenmineraldichte (BMD; gesundes Schaf-Femur: 730-1050 mg CaHA/cm³ ¹⁶⁰; Abbildung 23), Knochenvolumen (BV/TV), Trabekeldicke und -anzahl (Tb.Th; Tb.N; Abbildung 24; Tabelle 23).

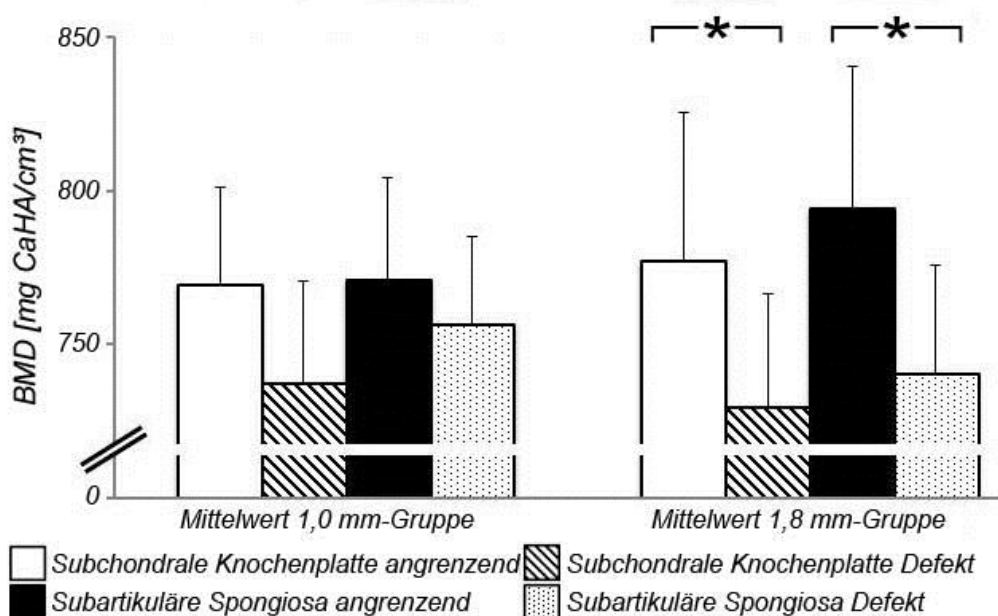


Abbildung 23: Knochenmineraldichte (BMD). Während die Knochenmineraldichte des Defektareal verglichen mit dem angrenzenden subchondralen Knochen der 1,8 mm-Gruppe im gesamten subchondralen Knochen signifikant reduziert war ($P \leq 0,036$), ließen sich in der 1,0 mm-Gruppe keine Signifikanzen nachweisen ($P > 0,05$).

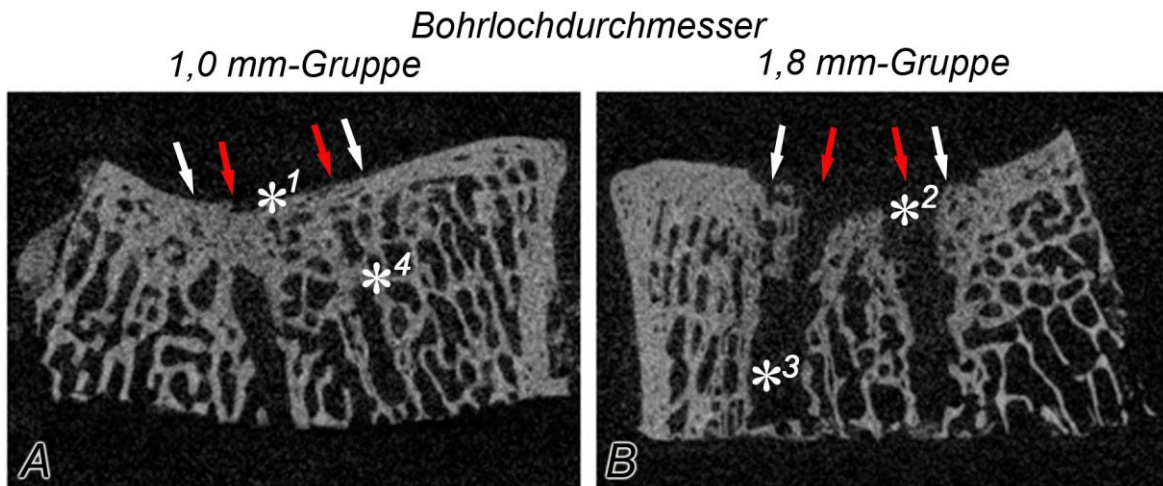


Abbildung 24: Mikro-CT Abbildungen des subchondralen Knochens. Die subchondrale Knochenplatte der 1,0 mm-Gruppe (A) war durchgängig und verlief im Niveau mit der angrenzenden subchondralen Knochenplatte (*1), wohingegen die 1,8 mm-Bohrungen (B) apikal offen waren (*2). In der 1,8 mm-Gruppe waren beide Bohrkanäle deutlich identifizierbar, sie waren doppelt so breit (*3) wie der physiologische Trabekelabstand, wohingegen die 1,0 mm-Gruppe neu gebildeten Knochen zeigte (*4). Die Bilder wurden anhand des Knochenmineraldichte-Mittelwertes im Defektareal der jeweiligen Gruppe gewählt. Roter Pfeil: Bohrkanal; weißer Pfeil: Defektgrenze.

H.2.1.3. Mikro-CT des angrenzenden Knochens

Der Vergleich zwischen den angrenzenden VOIs der 1,0 mm-Gruppe mit denen der 1,8 mm-Gruppe zeigte keine Signifikanzen.

H.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I-Kollagen

Die Immunreaktivität des subchondralen Knochens für Typ-I-Kollagen zeigte keinen statistischen Unterschied zwischen der 1,0 mm- ($2,71 \pm 0,76$) und 1,8 mm- ($2,83 \pm 0,75$) Gruppe ($P = 0,836$). Der subchondrale Knochen hatte in beiden Gruppen eine ähnliche Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen wie der angrenzende subchondrale Knochen (Abbildung 14 E, F).

Tabelle 22: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa.

Bohrlochdurchmesser-VOIs; Mittelwert ± Standardabweichung													
Parameter Einheit	Subchondrale Knochenplatte						Subartikuläre Spongiosa						
	1,0 mm		1,8 mm	P	1,0 mm		1,8 mm	P	1,0 mm		1,8 mm	P	
	Defekt		Angrenzend		Defekt		Angrenzend						
BMD	mg/cm ³	737,45 ± 33,21	729,76 ± 36,56	0,701	769,21 ± 32,08	777,36 ± 47,88	0,621	756,25 ± 29,11	740,20 ± 35,86	0,401	771,10 ± 33,06	794,21 ± 45,95	0,163
BV/TV	%	44,26 ± 9,54	29,50 ± 10,95	0,028	69,56 ± 7,39	69,77 ± 7,27	0,960	38,22 ± 5,64	28,93 ± 7,22	0,031	37,04 ± 1,86	40,03 ± 5,69	0,303
BS/BV	mm ⁻¹	55,54 ± 15,05	59,93 ± 18,59	0,653	35,14 ± 10,60	32,59 ± 8,53	0,640	44,88 ± 10,48	52,29 ± 16,83	0,320	40,59 ± 6,80	36,59 ± 6,85	0,354
BS/TV	mm ⁻¹	23,49 ± 3,32	16,34 ± 4,40	<0,001	23,28 ± 4,61	21,99 ± 4,50	0,622	16,91 ± 3,23	14,71 ± 2,98	0,229	14,81 ± 2,42	14,76 ± 3,65	0,979
Tb.Pf	mm ⁻¹	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		-61,45 ± 7,18	-57,09 ± 10,68	0,399	-52,61 ± 9,66	-50,00 ± 19,39	0,678
SMI	-/-	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		-24,61 ± 20,74	-36,32 ± 23,81	0,370	-18,68 ± 13,85	-14,63 ± 10,67	0,409
Tb.Th	mm	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		0,37 ± 0,07	0,59 ± 0,11	0,002	0,37 ± 0,09	0,35 ± 0,09	0,577
Ct.Th	mm	0,24 ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,002	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,967	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.	
Tb.N	mm ⁻¹	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		2,59 ± 0,47	1,65 ± 0,30	0,001	2,33 ± 0,78	2,33 ± 0,78	0,727
Tb.Sp	mm	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		0,88 ± 0,19	1,85 ± 0,34	0,549	0,97 ± 0,09	0,82 ± 0,16	0,248
DA	-/-	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,09	0,229	0,43 ± 0,15	0,40 ± 0,10	0,564
FD	-/-	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.		2,41 ± 0,16	2,30 ± 0,20	0,295	2,40 ± 0,10	2,43 ± 0,07	0,438

Tabelle 23: Vergleich der Miko-CT Ergebnisse zwischen dem Defektareal und dem angrenzenden subchondralen Knochen.

Parameter Einheit		P			
		1,0 mm		1,8 mm	
		Subchondrale Knochenplatte angrenzend	Subartikuläre Spongiosa angrenzend	Subchondrale Knochenplatte angrenzend	Subartikuläre Spongiosa angrenzend
		<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>
		Subchondrale Knochenplatte Defekt	Subartikuläre Spongiosa Defekt	Subchondrale Knochenplatte Defekt	Subartikuläre Spongiosa Defekt
BMD	mg/cm ³	0,059	0,311	0,036	0,017
BV/TV	%	0,883	0,619	0,051	0,029
BS/BV	mm ⁻¹	0,008	0,041	0,009	0,009
BS/TV	mm ⁻¹	0,578	0,020	0,952	0,963
Tb.Pf	mm ⁻¹	n.e.	0,031	n.e.	0,333
SMI	-/-	n.e.	0,511	n.e.	0,077
Tb.Th	mm	n.e.	0,866	n.e.	0,001
Ct.Th	mm	<0,001	n.e.	0,002	n.e.
Tb.N	mm ⁻¹	n.e.	0,985	n.e.	<0,001
Tb.Sp	mm	n.e.	0,478	n.e.	0,098
DA	-/-	n.e.	0,078	n.e.	0,969
FD	-/-	n.e.	0,976	n.e.	0,156

H.3 Korrelationen

H.3.1 Korrelation innerhalb des osteochondralen Defektareals

Jede Gruppe wurde auf 44 Korrelationen getestet (Tabelle 24). Die Zellzahl korrelierte mit dem histologischen Gesamtpunktwert im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*²³¹ und dem Proteoglykan-Gehalt. Der Proteoglykan-Gehalt korrelierte mit Sellers *et al.*²³¹ „Zellmorphologie“ und „Matrixanfärbbarkeit“. Es korrelierten Typ-II-Kollagen und Proteoglykan-Gehalt. In beiden Gruppen bestand eine Abhängigkeit zwischen der makroskopischen „Oberfläche“ mit der histologischen „Oberfläche“ sowie mit dem histologischen Gesamtpunktwert. Die makroskopisch und histologisch evaluierte „Füllung“ zeigten Abhängigkeit, ebenso der makroskopische und histologische Gesamtpunktwert.

Tabelle 24: Korrelationen innerhalb des Defektareals.

Korrelationsparameter		1,0 mm-Gruppe		1,8 mm-Gruppe	
Parameter 1	Parameter 2	Spearman	P	Spearman	P
Mikro-CT	Histologie/ Biochemie				
VOI - Parameter					
Subchondrale Knochenplatte Defekt:	Sellers - Summe	0,107	0,819	0,542	0,266
	Wakitani - Summe	-0,234	0,613	0,371	0,468
Knochenmineraldichte (BMD)	Typ-I-Kollagen	0,143	0,760	-0,657*	0,156
	Typ-II-Kollagen	0,679*	0,094	-0,314	0,544
Subchondrale Knochenplatte Defekt:	Sellers - Summe	-0,536	0,215	0,600*	0,208
	Wakitani - Summe	-0,577*	0,175	0,314	0,544
Knochenvolumen (BV/TV)	Typ-I-Kollagen	-0,250	0,589	-0,714*	0,111
	Typ-II-Kollagen	-0,607*	0,148	-0,371	0,468
Subartikuläre Spongiosa Defekt:	Sellers - Summe	-0,286	0,535	0,371	0,468
	Wakitani - Summe	-0,739*	0,058	0,086	0,872
Knochenmineraldichte (BMD)	Typ-I-Kollagen	0,571*	0,180	-0,771*	0,072
	Typ-II-Kollagen	0,071	0,879	0,257	0,623
Subartikuläre Spongiosa Defekt:	Sellers - Summe	-0,214	0,645	0,657*	0,156
	Wakitani - Summe	-0,198	0,670	0,486	0,329
Knochenvolumen (BV/TV)	Typ-I-Kollagen	-0,464	0,294	-0,771*	0,072
	Typ-II-Kollagen	0,071	0,879	-0,257	0,623
Biochemie des Reparaturgewebes		Histologie/ Biochemie			
Zellzahl	Sellers - Zellmorphologie	0,607*	0,148	-0,152	0,774
	Wakitani - Zellmorphologie	0,324	0,478	-0,319	0,538
	Sellers - Summe	0,750*	0,052	-0,371	0,468
	Wakitani - Summe	0,505	0,248	-0,429	0,397
	Proteoglykane	0,964*	<0,001	0,829*	0,042
Proteoglykane	Sellers - Matrixfärbung	0,703*	0,078	-0,131	0,805
	Wakitani - Matrixfärbung	0,847*	0,016	-0,131	0,805

	Sellers - Zellmorphologie	0,571*	0,180	-0,516	0,295
	Wakitani - Zellmorphologie	0,108	0,818	-0,870*	0,024
	Sellers - Summe	0,714*	0,071	-0,486	0,329
	Wakitani - Summe	0,414	0,355	-0,429	0,397
	Typ-II-Kollagen	1,000*	<0,001	0,942*	0,005
Typ-I-Kollagen	Sellers - Subchondraler Knochen	0,491	0,263	-0,143	0,787
	Sellers - Summe	-0,143	0,760	-0,086	0,872
	Wakitani - Summe	-0,450	0,310	-0,143	0,787
Typ-II-Kollagen	Sellers - Subchondraler Knochen	0,236	0,610	0,029	0,957
	Sellers - Summe	0,714*	0,071	-0,429	0,397
	Wakitani - Summe	0,414	0,355	-0,486	0,329
Makroskopie		Histologie			
Oberfläche	Sellers - Oberflächenarchitektur	0,809*	0,028	0,647*	0,165
	Wakitani - Oberfläche	0,809*	0,028	0,823*	0,044
	Sellers - Summe	0,668*	0,101	0,845*	0,034
	Wakitani - Summe	0,809*	0,028	0,778*	0,069
Füllung	Sellers - Füllung	0,802*	0,030	-0,309	0,552
	Wakitani - Knorpeldicke	0,802*	0,030	-0,575	0,233
Integration	Sellers - Integration	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Wakitani - Integration	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Summe	Sellers - Summe	0,234	0,613	0,841*	0,036
	Wakitani - Summe	0,382	0,398	0,435	0,389

Interpretation des Korrelationskoeffizienten: Tabelle 14; *: starke bis sehr starke Korrelation; fett gedruckt: $P < 0,05$.

H.3.2 Korrelation des angrenzenden Knorpels

In beiden Gruppen korrelierte im angrenzenden Knorpel der Typ-II-Kollagen-Anteil signifikant mit dem Proteoglykan-Gehalt (Tabelle 25). In der 1,0 mm-Gruppe waren „Zelldichte“ nach Little *et al.*¹³⁷ und Proteoglykan-Gehalt voneinander abhängig.

Tabelle 25: Korrelationen innerhalb des angrenzenden Knorpels.

Korrelationsparameter		1,0 mm-Gruppe		1,8 mm-Gruppe	
Parameter 1	Parameter 2	Spearman	<i>P</i>	Spearman	<i>P</i>
Histologische Evaluation nach Little <i>et al.</i> ¹³⁷	Biochemie				
	(Benachbarter Knorpel)				
Zelldichte	Zellzahl	-0,334	0,465	0,086	0,872
	Proteoglykane	0,741*	0,057	-0,143	0,787
Safranin-O Färbung	Proteoglykane	0,180	0,699	0,706*	0,117
Summe	Zellzahl	-0,429	0,337	0,543	0,266
	Proteoglykane	-0,036	0,939	0,543	0,266
Biochemie	Biochemie				
(Benachbarter Knorpel)	(Benachbarter Knorpel)				
Typ-II-Kollagen	Proteoglykane	0,742*	0,056	0,937*	0,006

Interpretation des Korrelationskoeffizienten: Tabelle 14; *: starke bis sehr starke Korrelation; fett gedruckt: $P < 0,05$.

I. Diskussion

Zusammenfassend zeigten die Daten dieser Studie, dass 1,0 mm Bohrlochdurchmesser (entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand) Bohrungen von 1,8 mm (nicht physiologischer Trabekelabstand) überlegen sind. Erstens wies das Knorpel-Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe sechs Monate postoperativ histologisch eine signifikant bessere Matrixanfärbbarkeit und Zellmorphologie sowie eine bessere Gesamtbewertung der Knorpelreparatur auf. Dies ging einher mit einer erhöhten Immunreaktivität für Typ-II Kollagen und erniedrigten Reaktivität für Typ-I Kollagen sowie einer gesteigerten Zellaktivierung und einer verbesserten biochemischen Zusammensetzung der Knorpelmatrix (höherer DNS-, Proteoglykan- und Typ-II-Kollagen-Gehalt). Zweitens war nach subchondraler Anbohrung mit dem 1,0 mm-Bohrer die Rekonstitution des subchondralen Knochens weiter fortgeschritten. Entsprechend dem physiologischen Normalzustand war hierbei insbesondere die subchondralen Knochenplatte dünner und die Spongiosa bestand aus zahlreicheren, schmäleren und verzweigteren Trabekeln.

I.1 Reparatur des Gelenkknorpels

I.1.1 Histologische Evaluation des Reparaturgewebes

Bohrlöcher entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand führten zu einer qualitativ höherwertigen Knorpelreparatur, gekennzeichnet durch eine signifikant bessere histologische Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie sowie Gesamtpunktwert im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*²³¹. Die Defektfüllung dünnerer Bohrkanäle war 2,4-mal höher als in der 1,8 mm-Gruppe ($P > 0,05$). Im Gegensatz dazu resultierten 1,8 mm-Bohrungen in einem faserknorpeligen Reparaturgewebe, dessen Matrix kaum anfärbbar war.

Interessanterweise stellten Marchand *et al.*¹⁵² im Kaninchenmodell keinen Einfluss des Bohrlochdurchmessers auf die Knorpelreparatur fest. Sie verglichen 0,5 mm proximale Bohrlochdurchmesser mit 0,9 mm distalen Bohrungen innerhalb eines Defekts. Demnach könnte es zu einer Durchmischung der Zellen innerhalb des Defektareals gekommen sein, sodass kein signifikanter Unterschied nachweisbar war. Möglicherweise waren die Ergebnisse auch aufgrund des differierenden Reparaturmusters des Kaninchenmodells, der unterschiedlichen Bohrloch-Lokalisationen (proximale *versus* distale Trochlea ossis femoris)

und der daraus resultierenden differierenden Eigenschaften des Gelenkknorpels^{7,8,136,200} beeinflusst.

Dies geht auch mit einer Arbeit von Kok *et al.*¹²⁶ einher; sie wiesen im Ziegenmodell nach 4 Monaten keinen signifikanten Unterschied zwischen 0,45 mm und 1,1 mm Bohrlochdurchmessern (2,0 – 4,0 mm Tiefe) in osteochondralen Defekten des Talus nach. Allerdings unterscheidet sich das mechanische Belastungsmuster des Talus von dem des Kniegelenkes^{49,133}. Zudem haben osteochondrale Defekte abweichende Reparaturkapazitäten als die hier untersuchten chondralen Defekte^{39,226}. Darüber hinaus waren die Bohrlochdurchmesser entweder dünner und gleich groß wie der physiologische Trabekelabstand des Ziegentalus ($1,2 \pm 0,45$ mm²⁵⁷), sodass ein kleinerer Durchmesser möglicherweise zu ähnlichen Resultaten führt wie physiologische Bohrlöcher.

Min *et al.*¹⁶⁶ zeigte im Kaninchenmodell (Trochleagrube; direkt postoperativ), dass eine größere Fläche der Markraumeröffnung - entweder eine große subchondrale Markraumeröffnung oder mehrere kleine Mikrofrakturierungen - mit einer erhöhten Anzahl mesenchymaler Stammzellen im Blutgerinnsel einhergeht. Allerdings war keine Aussage über ein Langzeitergebnis möglich.

Etlliche Studien zeigten einen Riss in der Integrationszone nach markraumeröffnenden Verfahren¹⁷⁰. Die Chondrozyten des direkt an die Integrationszone angrenzenden Knorpels beteiligen sich nicht an der Defektfüllung, sie sterben im Laufe der Zeit ab²³². Dies beobachteten auch wir in beiden Gruppen. Der Bohrlochdurchmesser hatte keinen Einfluss auf die Integrationszone.

I.1.2 Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Im Reparaturgewebe beider Gruppen waren die Zellzahl und der Proteoglykan- (nur in der 1,0 mm-Gruppe signifikant), Typ-I- (signifikant) sowie Typ-II-Kollagen-Gehalt ($P > 0,05$) im Vergleich zum Originalknorpel erhöht. Dies kann als Zeichen einer stimulierten Zellaktivierung während des Reparaturprozesses gedeutet werden: als biologische Reaktion auf die Knorpelverletzung stieg die Zellzahl an (Proliferation), die Produktion von Proteoglykanen sowie Typ-II-Kollagen verdeutlichen den Versuch, eine neue Knorpelmatrix auszubilden.

Das Niveau dieser Zellaktivierung war in der 1,0 mm-Gruppe höher. Die Zellzahl und die Proteoglykan-Synthese war ausschließlich in dieser Gruppe signifikant gesteigert und der Typ-II-Kollagen-Gehalt im Reparaturgewebe war 2,4-fach höher als in der 1,8 mm-Gruppe ($P > 0,05$). Dies ging einher mit einem balancierten Proteoglykan/DNS Verhältnis der 1,0 mm-

Gruppe, das Reparaturgewebe erreichte das Gleichgewicht zwischen Proteoglykanen und DNS eines gesunden Knorpels, da Proteoglykan-produzierende Chondrozyten vorhanden waren. In der 1,8 mm-Gruppe war dieses Verhältnis im Reparaturknorpel erniedrigt im Vergleich zum Originalknorpel. Vermutlich waren die Defekte zu groß, um den Knorpel vollständig wiederherzustellen (hohe Zellzahl, herabgesetzte Matrixanfärbbarkeit).

I.1.3 Typ-II-Kollagen-Gehalt des Reparaturgewebes

Im gesunden Knorpelgewebe dominiert Typ-II-Kollagen (90-95% des Gesamtkollagens^{20,38,194,210}). Hinsichtlich des Typ-II-Kollagen/DNS-Verhältnisses wurde weder in der 1,0 mm-, noch 1,8 mm-Gruppe das Niveau des Originalknorpels erreicht. Möglicherweise braucht dieser spezielle Signalweg längere Zeit, um diese Stufe zu erreichen. Dennoch bestand das Reparaturgewebe dünner Bohrlöcher aus doppelt so viel Typ-II-Kollagen (biochemisch ermittelt) und zeigte eine signifikant höherer Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen (immunhistochemisch ermittelt) verglichen mit der 1,8 mm-Gruppe. Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen ist an die einwirkenden Druck-, Zug- und Scherkräfte angepasst¹⁰⁴ und verleiht dem Gelenkknorpel seine Form³⁸. Dies unterstützt die These, dass sich das Reparaturgewebe dünnerer Bohrungen besser an mechanische Belastungen anpassen kann, möglicherweise einhergehend mit verlängerter Beständigkeit. Typ-II-Kollagenfibrillen bilden eine Art Netzwerk, in welches die Chondrozyten eingelagert sind. Demnach könnten sie eine Voraussetzung für die gesteigerte Synthese von Matrixkomponenten sein^{38,92,193}. Entsprechend fanden wir eine signifikante Korrelation zwischen Typ-II-Kollagen- und Proteoglykan-Gehalt in beiden Gruppen. Dies lässt sich in Einklang bringen mit der Korrelation zwischen dem Typ-II-Kollagen-Gehalt und dem Gesamtpunktwert im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*²³¹ ($P > 0,05$; korreliert nur in der 1,0 mm-Gruppe).

I.1.4 Typ-I-Kollagen-Gehalt des Reparaturgewebes

Typ-I-Kollagen ist ein charakteristischer Marker für fibrösen Reparaturknorpel¹⁹⁴. Beide Gruppen zeigten einen signifikanten Anstieg des biochemisch ermittelten Typ-I-Kollagen-Gehalts im Reparaturgewebe im Vergleich zum Originalknorpel. Dies verdeutlicht, dass das Reparaturgewebe stets einen fibrocartilaginären Anteil aufwies; gesunder Gelenkknorpel konnte somit nicht regeneriert werden. Möglicherweise überdauert auch der Prozess der Kollagen-Synthese den Zeitraum von sechs Monaten und war somit in unserem Tiermodell noch nicht abschließend beurteilbar¹⁹⁵. Eine weitere Möglichkeit ist, dass aufgrund der

erhöhten mechanischen Belastung (unmittelbar postoperative Vollbelastung) bereits degenerative Veränderungen auftraten, die den Anstieg des Typ-I-Kollagens erklären. Dennoch zeigte das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe keine Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen; die Reaktivität war signifikant geringer als in der 1,8 mm-Gruppe und auch Typ-I-Kollagen/Typ-II-Kollagen des Reparaturgewebes war ausschließlich in der 1,0 mm-Gruppe nicht signifikant angestiegen. Demnach ist der Anteil an fibrösem Reparaturknorpel in der 1,0 mm-Gruppe bedeutend niedriger.

I.1.5 Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Knorpels

Knorpeldefekte beeinflussen auch den umliegenden Knorpel. Beide Bohrlochgruppen führten zu degenerativen Veränderungen in den dem Defekt benachbarten Knorpelregionen. Neben einem signifikanten Anstieg des Typ-I-Kollagens (im Vergleich zum Originalknorpel), waren auch die Proteoglykan-Synthese und die Zellzahl im angrenzenden Knorpel signifikant erhöht. Letzteres stellt möglicherweise einen Kompensationsmechanismus des Knorpels dar, Degenerationen entgegenzuwirken, es ist aber auch als ein Zeichen der Früharthrose zu werten¹⁴⁶.

I.2 Rekonstitution des subchondralen Knochens

I.2.1 Histologische Evaluation des subchondralen Knochens

Die Wiederherstellung eines mechanisch belastbaren und dennoch elastisch-verformbaren subchondralen Knochens unterstützt die Knorpelreparatur^{56,110,148}. Der subchondrale Knochen fängt ca. 30% der Belastung ab, der Knorpel dagegen nur 1-3%^{30,104}. Ist der subchondrale Knochen unzureichend wiederhergestellt, steigt die mechanische Belastung auf den Knorpel an. Dadurch wird die Knorpelreparatur negativ beeinflusst, das Knorpelreparaturgewebe degeneriert und auch der umliegende Knorpel wird zunehmend geschädigt^{141,217}. Unsere Daten zeigten, dass dünnere Bohrkanäle zur signifikant besseren Rekonstitution des subchondralen Knochens führten (1,0 mm: >75% des subchondralen Knochens repariert; 1,8 mm: <75%). Theoretisch war der neu gebildete subchondrale Knochen in der 1,0 mm-Gruppe eher in der Lage den Knorpel-Reparaturprozess zu unterstützen, wohingegen die Knorpelreparatur in der 1,8 mm-Gruppe bedingt durch eine insuffiziente knöcherne Grundlage erschwert war.

I.2.2 Intraläsionale Osteophyten und subchondrale Knochenzysten

Nach markraumeröffnenden Verfahren wurden Veränderungen der osteochondralen Einheit beschrieben. Es kam zu einer vermehrten subchondralen Knochenbildung mit Ausdünnung des darüber liegenden Reparaturknorpels sowie zur Bildung intraläsionaler Osteophyten^{50,69,85,169,196}. Die Entwicklung von intraläsionalen Osteophyten nach markraumeröffnenden Verfahren fand man häufiger in Menschen als in Schafen; beschrieben sind 54-70% nach Mikrofrakturierung⁵⁰ oder 8-25% nach ACT^{50,262}. In der vorliegenden Arbeit bildeten sich bei 23% der Trochlea-Defekte intraläsionale Osteophyten. Bei gleichem Versuchsaufbau fanden sich an der medialen Femurkondyle intraläsionale Osteophyten in 26% der angebohrten Defekte¹⁹⁸. Interessanterweise befanden sich die intraläsionalen Osteophyten stets am Bohrloch-Rand und saßen nicht als eine „Kappe“ auf dem Bohrkanal. Demnach bildeten sie sich wahrscheinlich nicht auf Basis eingewanderter Knochenmarkszellen, sondern nahmen ihren Ursprung von der umgebenden subchondralen Knochenplatte.

Es ist beschrieben, dass bei Schafen in 50% der osteochondralen Defekte Knochenzysten auftreten²²⁸, wohingegen die Inzidenz bei Patienten geringer ist^{169,262}. Mögliche Ursachen sind die unterschiedliche Spezies, eine aggressivere Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit im Schaf, die unterschiedliche Dicke der subchondralen Knochenplatte, das Vorhandensein von mikroarchitektonischen Verletzungen der subchondralen Knochenplatte⁴² oder Unterschiede in der postoperativen Belastung zwischen Schaf und Patient^{22,110,198}. Die Ätiopathogenese dieser subchondralen Knochenzysten ist nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise entstehen sie durch das Eintreten von Synovialflüssigkeit durch Haarrisse oder lokale Defekte in den subchondralen Knochen. Aufgrund des konsekutiv erhöhten intraossären Flüssigkeitsdrucks wird der Knochen resorbiert und Knochenzysten entstehen^{10,104,158,184,185,258-260}. Eine weitere Erklärung ist, dass Zysten wegen mechanischer Instabilität entstehen und sich vergrößern. Sie stellen eine Form von Arthrose-induzierter Osteonekrose¹⁵⁸ mit anschließender Bildung von fibrotischem, avaskulärem Knochenmark dar^{225,253}. Infolge stressinduzierter Knochenresorption breiten sie sich in arthrotischen Gelenken aus¹⁵⁸. Während in der vorliegenden Arbeit an der Trochlea keine Knochenzysten vorhanden waren, wurde in einer vorangegangenen Arbeit an der medialen Femurkondyle bei 63% der Schafe Zysten dokumentiert¹⁹⁸. Ein Erklärungsansatz für diese Diskrepanz ist die unterschiedliche mechanische Belastung der Trochlea und der medialen Femurkondyle²⁰⁰.

I.2.3 Veränderungen des subchondralen Knochens nach subchondraler Anbohrung

Markraumeröffnende Verfahren führen zu einem Umbau der Mikroarchitektur des subchondralen Knochens. Dennoch evaluierten nur wenige klinische Studien diesen Einfluss markraumeröffnender Verfahren^{50,94,167,169,198,262}. Bei einer gesunden osteochondralen Einheit erscheint die subchondrale Knochenplatte im Mikro-CT als homogene, dichte subchondrale Linie. Die Begrenzung zum darüber liegenden Knorpel ist scharf. Im Vergleich dazu ist die Grenze zwischen der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa ungenauer definiert¹⁶². Die Spongiosa ist durch verzweigte Knochen trabekel mit dazwischen liegenden Hohlräumen gezeichnet.

Unter Anwendung des hochauflösenden Mikro-CTs lässt sich Knochen sehr exakt bildlich darstellen^{65,153}. Es ermöglicht eine objektive dreidimensionale Messung der Mikroarchitektur in einer mikroskopischen Skala²²³ anhand von standardisierten Parametern²⁰⁸, korreliert mit der konventionellen zweidimensionalen Histomorphometrie¹² und bestimmt präzise strukturelle Veränderungen der osteochondralen Einheit^{84,96,181}. Zudem stellt es Sklerosierungen, intraläsionale Osteophyten und subchondrale Knochenzysten dar¹⁶². Markraumeröffnende Verfahren verändern und schwächen die gesamte osteochondrale Einheit über einen langandauernden postoperativen Zeitraum. In der Vergangenheit blieb dies oft unberücksichtigt^{43,152,153,161,196,197}.

Chen *et al.*^{43,45} wies im Kaninchenmodell 3 Monate postoperativ nach, dass tiefere Bohrlöcher (6 mm *versus* 2 mm) die Qualität und Quantität des Knorpelreparaturgewebes erhöhen, da sie einen größeren Zugang zum Markraum schaffen und den Knochenumbau stärker anregen. Allerdings stellte Kok *et al.*¹²⁶ im Ziegenmodell (osteochondrale Defekte im Talus) nach 4 Monaten keinen signifikanten Unterschied zwischen 2 mm bzw. 4 mm Bohrlochtiefe fest.

Orth *et al.*¹⁹⁸ zeigten kürzlich, dass Pridie-Bohrungen im Schafmodell mit einem 1,0 mm-Bohrlochdurchmesser an der medialen Femurkondyle erhebliche Veränderungen in nahezu allen Parametern der knöchernen Mikroarchitektur induzierten. Innerhalb der subchondralen Knochenplatte waren die Knochenoberflächendichte (BS/TV) und kortikale Dicke (Ct.Th) reduziert, wohingegen in der Spongiosa die Trabekel dünner waren (Tb.Th) und der Trabekelabstand (Tb.Sp) zunahm und deren Konnektivität anstieg (reduzierter Tb.Pf). Im gesamten subchondralen Knochen kam es nach Pridie-Bohrungen zu einem Rückgang der Knochenmineraldichte (BMD) und des Knochenvolumens (BV/TV). Auch in der

vorliegenden Arbeit stellen wir eine signifikant veränderte Mikroarchitektur des subchondralen Knochens nach Pridie-Bohrung fest: in beiden Gruppen war die Oberflächenbeschaffenheit (BS/BV) im gesamten subchondralen Knochen signifikant erhöht, zudem wies die subchondrale Knochenplatte eine signifikant erhöhte kortikale Dicke (Ct.Th) auf. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit früheren Berichten unserer Arbeitsgruppe¹⁹⁸.

1.2.4 Veränderungen der subchondralen Knochenplatte

Etliche Studien haben gezeigt, dass die wiederhergestellte subchondrale Knochenplatte nach markraumeröffnenden Verfahren dicker und steifer ist als im benachbarten Knochen, während das knorpelige Reparaturgewebe dünner erscheint: das Verhältnis zwischen Knorpel und Knochen innerhalb der osteochondralen Einheit verschiebt sich zu Gunsten des subchondralen Knochens, doch das Gesamtvolumen wird aufrechterhalten^{148,152,195,196,217}. Es kommt zu einer Elastizitätsreduktion der subchondralen Knochenlamelle⁴², denn eine breitere, steifere Knochenplatte verändert die biomechanischen Eigenschaften der osteochondralen Einheit. Scher- und Stoßkräfte, die im Bereich lasttragender Areale wirken, können nicht mehr ausreichend abgefangen werden^{42,67,219}. Die osteochondrale Einheit ist somit anfälliger für mechanische Belastungen^{11,148}.

Auch wir beobachteten dieses Phänomen, jedoch stärker ausgeprägt in der 1,8 mm-Gruppe. Die subchondrale Knochenplatte war bei beiden Bohrlochgrößen deutlich verbreitert, wobei 1,8 mm-Bohrungen eine signifikant dickere Knochenplatte induzierten als dünnere Bohrungen: in der 1,8 mm-Gruppe zeigte sich eine 3-fach breitere Knochenplatte im Defektareal im Vergleich zur angrenzenden subchondralen Knochenplatte, wohingegen die 1,0 mm-Bohrungen eine 2-fache Verbreiterung dieser induzierten. Zudem war die Knochenmineraldichte (BMD) des Defektareals ausschließlich in der 1,8 mm-Gruppe signifikant erniedrigt (im Vergleich zum benachbarten Knochen). Durch das Auftreten von subchondralen Bohrungen wird die subchondrale Versteifung gefördert^{167,219}. Die signifikant breitere Knochenplatte der 1,8 mm-Gruppe führte somit möglicherweise zu einem steiferen⁴² Knochen, welcher für mechanische Belastungen anfälliger sein könnte^{11,42,67,148,219}. Dies stützt die Hypothese, dass sich eine erschwerte Reparatur des subchondralen Knochens negativ auf den Knorpelreparaturprozess auswirken könnte^{110,148,167,217}.

I.2.5 Veränderungen der subartikulären Spongiosa

Die subartikuläre Spongiosa der 1,0 mm-Gruppe war gekennzeichnet durch eine physiologische Knochenmineraldichte (BMD), ein normales Knochenvolumen (BV/TV) mit zahlreichen dünnen verzweigten Trabekeln. In der 1,8 mm-Bohrlochgruppe bestand die Mikroarchitektur der Spongiosa aus wenigen breiten Trabekeln, die Konnektivität, die Knochenmineraldichte sowie das Knochenvolumen waren reduziert. Demnach erschien das spongiöse Netzwerk der 1,0 mm-Gruppe dynamischer und elastischer.

In der 1,0 mm-Gruppe entsprach die Trabekeldicke (Tb.Th) im Defektareal die der angrenzenden Spongiosa ($0,37 \pm 0,07$ mm *versus* $0,37 \pm 0,09$ mm). Dünnere Bohrkanäle resultierten in einer natürlichen Trabekeldicke. Im Gegensatz dazu waren die Trabekel der 1,8 mm-Gruppe signifikant dicker. Ihr Durchmesser war nahezu doppelt so breit wie im gesunden Knochen ($0,59 \pm 0,11$ mm *versus* $0,35 \pm 0,09$ mm).

Chen *et al.*⁴⁶ beschrieben nach Mikrofrakturierung Verdichtungen der subartikulären Spongiosa am Rande der Mikrofraktur-Löcher. Bei der Mikrofrakturierung wird das penetrierte Knochengewebe nicht nach apikal in den Gelenkspalt befördert, sondern zur Seite verdrängt. Im Mikro-CT kann sich dies als erhöhte Trabekeldicke darstellen. Diese Verdichtungen der subartikulären Spongiosa wurden bei Verwendung eines Spiralbohrers, der das Knochenmehl durch die wendelförmigen Spannuten nach außen befördert¹⁹⁶, nicht nachgewiesen. Da in der vorliegenden Arbeit ein dickerer Draht (1,8 mm) potentiell mehr Knochengewebe verdrängte als ein dünner Draht (1,0 mm), könnte dies eine mögliche Rolle bei der signifikant gesteigerten Trabekeldicke der 1,8 mm-Gruppe spielen.

Die Trabekelanzahl (Tb.N) dünner Bohrlocher entsprach der eines gesunden Knochens ($2,59 \pm 0,47$ mm⁻¹ *versus* $2,33 \pm 0,78$ mm⁻¹). 1,8 mm-Bohrungen führten zu einer signifikanten Reduktion der Trabekelanzahl ($1,65 \pm 0,30$ mm⁻¹ *versus* $2,33 \pm 0,78$ mm⁻¹).

Bohrlöcher entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand führten darüber hinaus auch zu einer erhöhten Konnektivität (signifikant erniedrigter Tb.Pf). Die Konnektivität verdeutlicht die Kompaktheit eines Netzwerkes: je höher die Konnektivität, umso mehr Verbindungen liegen im Trabekelnetz vor und desto stärker ist der Knochenumbau²³⁹. Der Knochen verändert sich dynamisch, er knüpft Verzweigungen, um sich an neue mechanische Situationen anzupassen. Es wird vermutet, dass sich ein gesteigerter Knochenumsatz positiv auf die Knorpelreparatur auswirkt^{43,110,148}. Die Steigerung der Konnektivität nach 1,0 mm-Anbohrungen könnte demzufolge den Versuch des Knochens abbilden, die perforierte Spongiosa zu stabilisieren¹⁹⁸.

Interessanterweise war der Trabekelabstand (Tb.Sp) der 1,8 mm-Gruppe im Defekt ($1,85 \pm 0,34$ mm) etwa so groß wie dessen Bohrl Lochdurchmesser. Sechs 1,8 mm-Bohrungen (jeweils $2,5$ mm²) penetrierten 48% des Defektareals ($32,0$ mm²), wohingegen 1,0 mm-Bohrlöcher (jeweils $0,8$ mm²) lediglich 15% eröffneten. Dies verdeutlicht, dass 1,8 mm-Bohrungen einen größeren knöchernen Schaden verrichteten und die Mikroarchitektur stärker schwächten als 1,0 mm Bohrungen. Die entstandenen Läsionen erscheinen zu groß um überbrückt zu werden. Ein gesunder Knochen stabilisiert den Reparaturprozess^{110,148} und bildet eine wichtige Basis für die Knorpelreparatur^{196,217}. Somit waren in der 1,8 mm-Gruppe die Knochen- sowie die Knorpelreparatur erschwert^{110,148}. Im Vergleich dazu fügten sich 1,0 mm-Bohrungen besser in die Struktur des Knochens ein und auch der Trabekelabstand entsprach dem eines gesunden Knochens (1,0 mm-Gruppe: im Defekt: $0,88 \pm 0,19$ mm; angrenzend: $0,97 \pm 0,09$ mm; Abbildung 25).

Zusammenfassend wies die Mikro-CT-Analyse nach, dass Bohrkanäle entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand (*versus* 1,8 mm-Anbohrungen) zu einer signifikant besseren Wiederherstellung des subchondralen Knochens führten. Zum Einen war die Rekonstitution der subchondralen Knochenplatte verbessert, zum Andern ähnelte die subartikuläre Spongiosa mehr dem angrenzenden intakten subchondralen Knochen. Folglich lässt sich aus den Daten des Mikro-CTs als auch der histologischen Evaluation eine ähnliche Interpretation ableiten: je größer (und weniger physiologisch) die Bohrungen sind, desto schwieriger scheint die Wiederherstellung eines normalen subchondralen Knochengewebes.

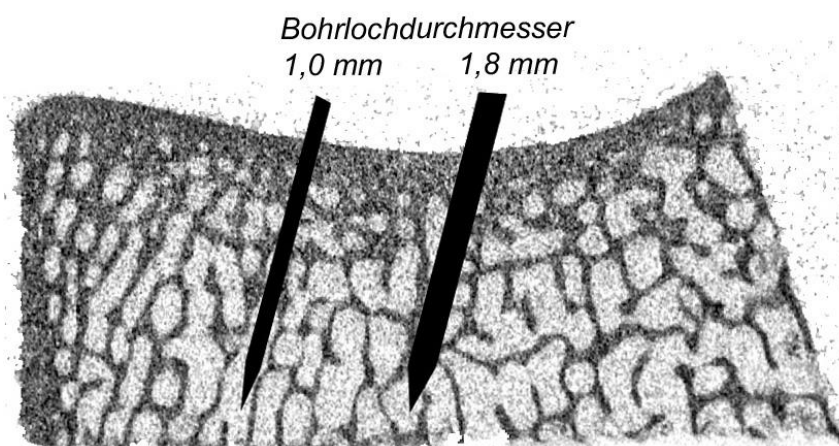


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Bohrlochdurchmesser im Mikro-CT Bild. Bohrlöcher, die dem physiologischen Trabekelabstand entsprechen (links; 1,0 mm), fügten sich besser in die Struktur der Spongiosa ein, während große Bohrungen (rechts; 1,8 mm) die Mikroarchitektur des Knochens eher zerstören.

I.3 Korrelationen

I.3.1 Korrelationen innerhalb des osteochondralen Defektareals

Die Oberfläche des Gelenkknorpels hat wichtige Funktionen. Sie stellt eine mechanische Barriere zwischen der Synovialflüssigkeit und dem Knorpel dar und fängt Scherkräfte ab^{194,210,237}. Ist die Oberfläche beschädigt, können auch tiefere Regionen des Gelenkknorpels beeinträchtigt werden. Auffaserungen der oberflächlichen Schicht verdeutlichen degenerative Veränderungen, auch das Gelenkgleiten ist aufgrund der rauen Oberfläche eingeschränkt. Knorpeldefekte wurden durch die makroskopische Evaluation nach Goebel *et al.*⁸² erfasst. In beiden Gruppen wurde eine erhöhte Chondrozyten-Anzahl mit einer gesteigerten zellulären Proteoglykan-Synthese in Zusammenhang gebracht^{38,92,193}. Dies wurde zudem durch eine intensivere histologische Safranin-O Anfärbung der Knorpelmatrix verdeutlicht (1,0 mm-Gruppe). Die hydrophilen Proteoglykane sorgen im gesunden Knorpel für einen Wassergehalt von ca. 70%^{92,210} und garantieren so die Elastizität des Knorpels^{104,194}. Da in der Gruppe der dünneren Bohrlöcher ein höherer Proteoglykan-Anteil des Knorpelreparaturgewebes vorlag, war dieses Gewebe theoretisch elastischer als jenes der 1,8 mm-Gruppe. Elastisches Gewebe kann mechanische Belastungen besser absorbieren¹⁸³. Das Reparaturgewebe dickerer Bohrkanäle könnte aufgrund einer potenziell verminderten Elastizität weniger widerstandsfähig und möglicherweise kürzer haltbar sein als das der 1,0 mm-Gruppe^{211,249}.

I.3.2 Korrelationen innerhalb des angrenzenden Knorpels

Im angrenzenden Knorpel der 1,0 mm-Bohrlochgruppe wurde ein Zusammenhang zwischen dem Proteoglykan-Gehalt und der Chondrozytendichte ($P = 0,057$), sowie zwischen Proteoglykane/DNS und der Matrixanfärbbarkeit (signifikant) nachgewiesen. Infolgedessen wurde die These bestärkt, dass viele Chondrozyten-ähnliche Zellen den Proteoglykan-Gehalt und dadurch die Matrixanfärbbarkeit steigern. Weiterhin korrelierte im angrenzenden Knorpel Typ-II-Kollagen mit dem Proteoglykan-Anteil (in beiden Gruppen signifikant). Dies unterstrich die Annahme, dass ein dichteres Netzwerk aus Typ-II-Kollagenfibrillen die chondrozytäre Synthese von Matrixbestandteilen unterstützt.

I.4 Limitierungen des gewählten Modells

Die Schlussfolgerungen unseres präklinischen Großtiermodells sind limitiert. Es erlaubt nur bedingt eine Aussage über die klinische Situation beim Patienten^{123,124,200}.

Wir wählten das Schafmodell, da es wichtige Eigenschaften des humanen Knies widerspiegelt (relative Größe der artikulierenden Knochen, bikondyläres distales Femur, Beinachse, Bänder und Menisci^{156,199,200}). Auch die Gelenkoberfläche ist dem menschlichen Kniegelenk ähnlicher als bei Kleintieren²³⁶. Das menschliche Knie misst eine durchschnittliche Knorpeldicke von 2,2-2,5 mm, das Schafsknie 0,4-0,5 mm^{4,71,204}. Die Trochlea des Schafes ist durchschnittlich halb so breit wie die humane Trochlea²⁰⁴. Die Trochlea bietet den Vorteil, dass sie im Vergleich zur Kondyle flach ist. Dadurch ist eine einheitliche Defektbeurteilung leichter zu realisieren¹⁹⁹. Die standardisierten Knorpeldefekte (4 x 8 mm; 32 mm²) wurden entsprechend der Trochlea-Breite angepasst. Sie simulierten einen kleinen vollschichtigen Knorpeldefekt des Patienten und erlaubten das Setzen mehrerer Bohrlöcher (n = 6 pro Defekt). Die Tatsache, dass der subchondrale Knochen des Schafes sehr steif und dick ist und dadurch eine erhöhte Gefahr einer Knochenfraktur besteht, wurde berücksichtigt^{167,219}. Allerdings ist das Schaf ein Vierfüßler (unterschiedliches Stand- und Gangbild^{200,222}) und die Ergebnisse nach markraumeröffnenden Verfahren der Trochlea und der medialen Femurkondyle scheinen Spezies-abhängig zu sein (bei Patienten sind die Ergebnisse nach markraumeröffnenden Verfahren der medialen Femurkondyle besser als die der Trochlea, im Schafmodell ist es entgegengesetzt)^{44,132,200}.

Zudem entlasten Patienten nach markraumeröffnenden Verfahren die operierte Extremität normalerweise für ca. sechs Wochen, um den Knorpelreparaturprozess sowie die Rekonstitution des subchondralen Knochens zu unterstützen. In Tiermodellen lassen sich eine sofortige postoperative Vollbelastung und ein uneingeschränkter Bewegungsumfang des betroffenen Gelenks oft nicht vermeiden. Demnach ist die Läsion im Tiermodell stärkeren biomechanischen Belastungen ausgesetzt als sie im klinischen Alltag auftreten¹⁹⁸.

Auch ein qualitativ hochwertiges Reparaturgewebe garantiert kein klinisch ideales Ergebnis^{118,270}. Dennoch legen Studien nahe, dass ein minderwertiges Reparaturgewebe meist auch in klinisch schlechten Ergebnissen resultiert^{169,263}. Da in der vorliegenden Arbeit dickere Bohrlöcher zu einer makroskopisch, histologisch, biochemisch, immunhistochemisch und radiologisch minderwertigen Reparatur der osteochondralen Einheit führten, erscheint es schlüssig, dass 1,8 mm-Anbohrungen auch zu einem klinisch unbefriedigenderem Ergebnis führen könnten als 1,0 mm-Bohrlöcher.

I.5 Translationale Aspekte

In der vorliegenden Arbeit wählten wir eine Knorpeldefektgröße von 4 x 8 mm (32 mm²) im Großtiermodell. Die humane Trochlea und Femurkondyle sind durchschnittlich etwa doppelt so breit wie bei einem Schaf²⁰⁴. Die durchschnittliche Defektgröße in Patienten beträgt 21 mm²⁹⁷ und die kritische Defektgröße 400 mm²²³⁸. Letztere entspricht im Schafmodell umgerechnet 165 mm² (Verhältnis Schaf/Patient der Trochlea-Breite x Verhältnis Schaf/Patient der Trochlea-Länge [stellvertretend Patella-Breite] 0,49 x 0,84 = 0,41; 0,41 x 400 mm² [kritische Defektgröße in Patienten] = 165 mm²)²⁰⁴. Demnach sind die Läsionen in Patienten vergleichbar klein. Interessanterweise ähnelt sich der physiologische Trabekelabstand beim Schaf und beim Patienten: der humane Trabekelabstand (Tb.Sp) des Femurs oder der Tibia misst $0,75 \pm 0,15$ mm^{59,109,134,230}; an der Schaf-Trochlea: $0,90 \pm 0,08$ mm⁵⁸ (ermittelt anhand des Mikro-CTs). Unsere Daten zeigten, dass der physiologische Trabekelabstand ein gutes Maß für die Wahl des optimalen Bohrlochdurchmessers darstellen könnte. Aufgrund der Tatsache, dass sich der Trabekelabstand in beiden Spezies gleicht, können unsere Resultate bezüglich des Bohrlochdurchmessers auf den Patienten übertragen werden. Folglich wären Bohrlöcher mit einem Durchmesser von 1,0 mm auch bei Patienten empfehlenswert.

I.6 Ausblick

Markraumstimulationen stellen die Erstlinientherapie bei kleinen symptomatischen Knorpeldefekten dar, dennoch existieren keine exakten Empfehlungen bezüglich des Bohrlochdurchmessers. Üblicherweise werden dünne Instrumente eingesetzt, doch kürzlich wurde die Verwendung größerer Bohrer empfohlen, um den mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark einen möglichst großen Zugang zum Knorpeldefekt zu ermöglichen^{113,166,215,232,246}. Jedoch zeigten die Daten dieser Studie, dass 1,8 mm-Bohrungen einen größeren Schaden innerhalb des gesamten subchondralen Knochens verrichteten, während sich 1,0 mm Bohrungen – entsprechend dem physiologischen Trabekelabstandes – besser in die Mikroarchitektur des Knochens einfügten. Um Patienten mit der Indikation zur Pridie-Bohrung eine optimale operative Versorgung zu bieten, erscheint die Verwendung von dünnen Kirschner-Drähten im klinischen Alltag sinnvoll. Diese Resultate haben wichtige Konsequenz für die Markraumstimulationstechnik. Klinische Studien an Patienten müssen dieses Konzept weiter evaluieren.

J. Zusammenfassung

Dieser Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass subchondrale Bohrlochdurchmesser entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand zur verbesserten Knorpeldefektreparatur sowie Reparatur der osteochondralen Einheit im Schafmodell führen als große Bohrlöcher (1,8 mm; nicht physiologischer Trabekelabstand).

Unsere Daten zeigten, dass das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe erstens histologisch eine signifikant bessere Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Reparatur des subchondralen Knochens sowie Gesamtpunktwert erreichte als 1,8 mm-Bohrungen. Zweitens war das Reparaturgewebe der 1,0 mm-Bohrlöcher charakterisiert durch eine signifikant höhere Zellaktivität, eine signifikant höherwertige Qualität der extrazellulären Matrix sowie verbesserten biochemischen Parametern (DNS-, Proteoglykan-, Typ-II-Kollagen-Gehalt) im Vergleich zum gesunden Originalknorpel. Drittens war im Reparaturgewebe der 1,0 mm-Gruppe die Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen signifikant höher und für Typ-I-Kollagen signifikant geringer als die der 1,8 mm-Gruppe. Viertens wies die subchondralen Knochenplatte nach 1,0 mm-Bohrungen ein signifikant höheres Knochenvolumen (BV/TV) auf und dessen Breite (Ct.Th) entsprach eher dem Normwert und als die der 1,8 mm-Gruppe. Zudem zeigte die subartikuläre Spongiosa nach 1,0 mm-Bohrungen ein signifikant höheres Knochenvolumen (BV/TV) charakterisiert durch zahlreichere (Tb.N), dünnere (Tb.Th) und stärker verzweigte (Tb.Pf) Trabekel. Darüber hinaus entsprach die Knochenmineraldichte (BMD) des Defektareals der 1,0 mm-Gruppe im gesamten subchondralen Knochen der des angrenzenden Knochens, während sie in der 1,8 mm-Gruppe signifikant reduziert war.

Wir zeigten damit im Großtiermodell nach 6 Monaten, dass sich kleinere Kirschner-Draht-Bohrlöcher entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand besser in die Mikroarchitektur einfügen und so zu einer erfolgreicherer Knorpeldefektreparatur sowie vorteilhafteren Reparatur des subchondralen Knochens führen und folglich in einer besseren Reparatur der osteochondralen Einheit resultieren als übergroße Anbohrungen. Nachfolgende klinische Studien müssen diese Ergebnisse am Patienten bestätigen.

K. Literaturverzeichnis

1. Aigner T, Cook JL, Gerwin N, *et al.* Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18 Suppl 3:2-6.
2. Akizuki S, Yasukawa Y, Takizawa T. Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy*. 1997;13(1):9-17.
3. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions. *Am J Sports Med*. 2005;33(3):443-460.
4. Allen MJ, Houlton JE, Adams SB, *et al.* The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg*. 1998;27(6):596-605.
5. Altman RD. Early management of osteoarthritis. *Am J Manag Care*. 2010;16 Suppl Management:41-47.
6. Anetzberger H, Müller-Gerbl M, Scherer MA, *et al.* Veränderung der subchondralen Mineralisierung nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes beim Schaf. *Unfallchirurg*. 1994;97(12):655-660.
7. Appleyard RC, Burkhardt D, Ghosh P, *et al.* Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(1):65-77.
8. Armstrong SJ, Read RA, Price R. Topographical variation within the articular cartilage and subchondral bone of the normal ovine knee joint: a histological approach. *Osteoarthritis Cartilage*. 1995;3(1):25-33.
9. Asik M, Ciftci F, Sen C, *et al.* The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee: midterm results. *Arthroscopy*. 2008;24(11):1214-1220.
10. Aspenberg P, Van der Vis H. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res*. 1998(352):75-80.
11. Atkinson TS, Haut RC, Altiero NJ. Impact-induced fissuring of articular cartilage: an investigation of failure criteria. *J Biomech Eng*. 1998;120(2):181-187.
12. Barou O, Valentin D, Vico L, *et al.* High-resolution three-dimensional micro-computed tomography detects bone loss and changes in trabecular architecture early: comparison with DEXA and bone histomorphometry in a rat model of disuse osteoporosis. *Invest Radiol*. 2002;37(1):40-46.
13. Basad E, Ishaque B, Bachmann G, *et al.* Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):519-527.

14. Beale BS. Use of nutraceuticals and chondroprotectants in osteoarthritic dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(1):271-289.
15. Behery O, Siston RA, Harris JD, *et al.* Treatment of cartilage defects of the knee: expanding on the existing algorithm. *Clin J Sport Med.* 2014;24(1):21-30.
16. Behrens P, Bosch U, Bruns J, *et al.* Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft "Gewebereneration und Gewebeersatz" zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2004;142(5):529-539.
17. Beickert R. Mikrofrakturierung bei fokalem Knorpelschaden. *Arthroskopie.* 2005;18:186-192.
18. Bekkers JE, Inklaar M, Saris DB. Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review. *Am J Sports Med.* 2009;37 Suppl 1:148-155.
19. Berry JL, Thaeler-Oberdoerster DA, Greenwald AS. Subchondral pathways to the superior surface of the human talus. *Foot Ankle.* 1986;7(1):2-9.
20. Bora FW, Jr., Miller G. Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin.* 1987;3(3):325-336.
21. Bouwmeester PS, Kuijer R, Homminga GN, *et al.* A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery. *J Orthop Res.* 2002;20(2):267-273.
22. Brandt KD. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arthritis Rheum.* 2003;49(2):267-271.
23. Braun S, Vogt S, Imhoff AB. Stadiengerechte operative Knorpeltherapie. Aktueller Stand. *Orthopäde.* 2007;36(6):589-599.
24. Brittberg M. Failed articular cartilage repair: What to do? . In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications 2010:165-171.
25. Brittberg M. Unloading of the Repaired Cartilage Lesion. Why, When and How. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:99-105.
26. Brittberg M. Which lesions should be treated and why? In: Brittberg M, Gobbi A, Imhoff AB, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair. Clinical Guidelines.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications; 2012:3-14.
27. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(14):889-895.
28. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:58-69.
29. Brophy RH, Rodeo SA, Barnes RP, *et al.* Knee articular cartilage injuries in the National Football League: epidemiology and treatment approach by team physicians. *J Knee Surg.* 2009;22(4):331-338.

30. Brown TD, Vrahas MS. The apparent elastic modulus of the juxtarticular subchondral bone of the femoral head. *J Orthop Res.* 1984;2(1):32-38.
31. Brucker P, Agneskirchner JD, Burkart A, *et al.* Mega-OATS. Technik und Ergebnisse. *Unfallchirurg.* 2002;105(5):443-449.
32. Brunk CF, Jones KC, James TW. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem.* 1979;92(2):497-500.
33. Buck FM, Hoffmann A, Hofer B, *et al.* Chronic medial knee pain without history of prior trauma: correlation of pain at rest and during exercise using bone scintigraphy and MR imaging. *Skeletal Radiol.* 2009;38(4):339-347.
34. Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lect.* 1983;32:349-370.
35. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum.* 1998;41(8):1331-1342.
36. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.* 1998;47:487-504.
37. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47:477-486.
38. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465-480.
39. Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, *et al.* Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(10):1533-1548.
40. Bullough PG, Yawitz PS, Tafra L, *et al.* Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. *J Orthop Res.* 1985;3(1):1-16.
41. Bulstra SK, Homminga GN, Buurman WA, *et al.* The potential of adult human perichondrium to form hyalin cartilage in vitro. *J Orthop Res.* 1990;8(3):328-335.
42. Burr DB, Radin EL. Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthrosis? *Rheum Dis Clin North Am.* 2003;29(4):675-685.
43. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, *et al.* Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its relationship to articular cartilage resurfacing. *Am J Sports Med.* 2011;39(8):1731-1740.
44. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, *et al.* Bone marrow stimulation of the medial femoral condyle produces inferior cartilage and bone repair compared to the trochlea in a rabbit surgical model. *J Orthop Res.* 2013;31(11):1757-1764.
45. Chen H, Hoemann CD, Sun J, *et al.* Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. *J Orthop Res.* 2011;29(8):1178-1184.
46. Chen H, Sun J, Hoemann CD, *et al.* Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res.* 2009;27(11):1432-1438.

47. Cicuttini F, Ding C, Wluka A, *et al.* Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: a prospective study. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):2033-2039.
48. Clark JM, Huber JD. The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72(5):866-873.
49. Cole AA, Kuettner KE. Molecular basis for differences between human joints. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):19-26.
50. Cole BJ, Farr J, Winalski CS, *et al.* 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.* 2011;39(6):1170-1179.
51. Cole BJ, Pascual-Garrido C, Grumet RC. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(7):1778-1790.
52. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol.* 2002;173(3):387-394.
53. Cucchiaroni M, Madry H, Ma C, *et al.* Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther.* 2005;12(2):229-238.
54. Curl WW, Krome J, Gordon ES, *et al.* Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 1997;13(4):456-460.
55. Dai L, He Z, Zhang X, *et al.* One-step repair for cartilage defects in a rabbit model: a technique combining the perforated decalcified cortical-cancellous bone matrix scaffold with microfracture. *Am J Sports Med.* 2014;42(3):583-591.
56. Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE (Hrsg.) *Bone engineering. Em squared Inc* Toronto; 2000:1-14.
57. Dhollander AA, Huysse WC, Verdonk PC, *et al.* MRI evaluation of a new scaffold-based allogenic chondrocyte implantation for cartilage repair. *Eur J Radiol.* 2009;75(1):72-81.
58. Ding M, Cheng L, Bollen P, *et al.* Glucocorticoid induced osteopenia in cancellous bone of sheep: validation of large animal model for spine fusion and biomaterial research. *Spine.* 2010;35(4):363-370.
59. Ding M, Danielsen CC, Hvid I, *et al.* Three-dimensional microarchitecture of adolescent cancellous bone. *Bone.* 2012;51(5):953-960.
60. Duncan H, Jundt J, Riddle JM, *et al.* The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am.* 1987;69(8):1212-1220.
61. Eckstein F, Müller-Gerbl M, Putz R. Distribution of subchondral bone density and cartilage thickness in the human patella. *J Anat.* 1992;180 (Pt 3):425-433.
62. Erggelet C, Steinwachs M, Reichelt A. Die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. *Dtsch Arztebl.* 1998;95(22).

63. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 1986;883(2):173-177.
64. Farr J, Cole B, Dhawan A, *et al*. Clinical cartilage restoration: evolution and overview. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(10):2696-2705.
65. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, *et al*. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989;4(1):3-11.
66. Fischer H. *Darstellung und Anordnung der kollagenen Fibrillen in der Matrix des Gelenkknorpels* [Dissertation], Universität Freiburg i.Br.; 1988.
67. Flanigan DC, Harris JD, Brockmeier PM, *et al*. The effects of lesion size and location on subchondral bone contact in experimental knee articular cartilage defects in a bovine model. *Arthroscopy*. 2010;26(12):1655-1661.
68. Flanigan DC, Harris JD, Trinh TQ, *et al*. Prevalence of chondral defects in athletes' knees: a systematic review. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(10):1795-1801.
69. Fortier LA, Cole BJ, McIlwraith CW. Science and animal models of marrow stimulation for cartilage repair. *J Knee Surg*. 2012;25(1):3-8.
70. Frappier J, Stanish W, Brittberg M, *et al*. Economic evaluation of BST-CarGel as an adjunct to microfracture vs microfracture alone in knee cartilage surgery. *J Med Econ*. 2014:[Druckausgabe ausstehend].
71. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(3):142-146.
72. Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, *et al*. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med*. 2006;34(11):1824-1831.
73. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, *et al*. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop Relat Res*. 2003(407):215-227.
74. Fujisawa Y, Masuhara K, Shiomi S. The effect of high tibial osteotomy on osteoarthritis of the knee. An arthroscopic study of 54 knee joints. *Orthop Clin North Am*. 1979;10(3):585-608.
75. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, *et al*. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1980;62(1):79-89.
76. Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, *et al*. Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks. *Dtsch Arztebl*. 2003;38:2448-2453.
77. Gerber BE, Robinson D, Nevo Z, *et al*. Mechanical resistance of biological repair cartilage: comparative in vivo tests of different surgical repair procedures. *Int J Artif Organs*. 2002;25(11):1109-1115.
78. Gies T. Über die Heilung von Knorpelwunden. *Dtsch Z Chir*. 1882:18.

79. Gill TJ, Asnis PD, Berkson EM. The treatment of articular cartilage defects using the microfracture technique. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2006;36(10):728-738.
80. Giunta R, Lower N, Kierse R, *et al.* Die Beanspruchung des Radiokarpalgelenks. CT-Untersuchungen der subchondralen Knochendichte in vivo. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 1997;29(1):32-37.
81. Gobbi A. Age based management of small (<2cm²) cartilage lesions. In: Brittberg M, Gobbi A, Imhoff AB, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair. Clinical Guidelines.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications; 2012:15-29.
82. Goebel L, Orth P, Müller A, *et al.* Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T - comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(9):1046-1055.
83. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:230-237.
84. Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, *et al.* Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(14):2470-2490.
85. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, *et al.* The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):434-447.
86. Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, *et al.* A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy.* 2005;21(9):1066-1075.
87. Handl M, Držik M, Varga F. The Current Status of Biomechanical Evaluation of the Hyaline Cartilage. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:23-32.
88. Hangody L, Fules P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:25-32.
89. Hangody L, Kish G, Karpati Z, *et al.* Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics.* 1998;21(7):751-756.
90. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6(3):861-870.
91. Harris JD, Siston RA, Pan X, *et al.* Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(12):2220-2233.
92. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, *et al.* Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(3):423-435.

93. Heinegard D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):50-56.
94. Heir S, Aroen A, Loken S, *et al*. Cartilage repair in the rabbit knee: mosaic plasty resulted in higher degree of tissue filling but affected subchondral bone more than microfracture technique: a blinded, randomized, controlled, long-term follow-up trial in 88 knees. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(2):197-209.
95. Henderson IJ, La Valette DP. Subchondral bone overgrowth in the presence of full-thickness cartilage defects in the knee. *Knee*. 2005;12(6):435-440.
96. Hirschmann MT, Davda K, Rasch H, *et al*. Clinical value of combined single photon emission computerized tomography and conventional computer tomography (SPECT/CT) in sports medicine. *Sports Med Arthrosc*. 2011;19(2):174-181.
97. Hjelle K, Solheim E, Strand T, *et al*. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 2002;18(7):730-734.
98. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, *et al*. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(12):2671-2686.
99. Hunter W. On the structure and diseases of articulating cartilages. *Philos Trans Roy Soc*. 1743;42-B:514-521.
100. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(6):432-463.
101. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*. 1996;78(5):721-733.
102. Hurst JM, Steadman JR, O'Brien L, *et al*. Rehabilitation following microfracture for chondral injury in the knee. *Clin Sports Med*. 2010;29(2):257-265.
103. Imade S, Kumahashi N, Kuwata S, *et al*. A comparison of patient-reported outcomes and arthroscopic findings between drilling and autologous osteochondral grafting for the treatment of articular cartilage defects combined with anterior cruciate ligament injury. *Knee*. 2012; 20(5):354-359.
104. Imhof H. Arthrose (degenerative Gelenkerkrankungen). In: Axe Stäubler JF (Hrsg.). *Handbuch diagnostische Radiologie: Muskuloskelettales System 3: Systematische Skeletterkrankungen - Erkrankungen der Gelenke* Vol 1. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2005:314-356.
105. Imhoff AB, Burkart A, Ottl GM, *et al*. Der posteriore Femurkondylentransfer - Erste Erfahrungen mit einer Salvageoperation. *Orthopäde*. 1999;28(1):45-51.
106. Imhoff AB, Ottl GM, Burkart A, *et al*. Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde*. 1999;28(1):33-44.
107. Inoue H. Alterations in the collagen framework of osteoarthritic cartilage and subchondral bone. *Int Orthop*. 1981;5(1):47-52.

108. Insall JN. Intra-articular surgery for degenerative arthritis of the knee. A report of the work of the late K. H. Pridie. *J Bone Joint Surg Br.* 1967;49(2):211-228.
109. Isaksson H, Toyras J, Hakulinen M, *et al.* Structural parameters of normal and osteoporotic human trabecular bone are affected differently by microCT image resolution. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):167-177.
110. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, *et al.* Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A(1):53-64.
111. Jaiswal PK, Macmull S, Bentley G, *et al.* Does smoking influence outcome after autologous chondrocyte implantation?: A case-controlled study. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(12):1575-1578.
112. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* 1986;2(1):54-69.
113. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2001(391):306-317.
114. Jones DG, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(11):2502-2520.
115. Jubel A, Andermahr J, Schiffer G, *et al.* Transplantation of de novo scaffold-free cartilage implants into sheep knee chondral defects. *Am J Sports Med.* 2008;36(8):1555-1564.
116. Kanamiya T, Naito M, Hara M, *et al.* The influences of biomechanical factors on cartilage regeneration after high tibial osteotomy for knees with medial compartment osteoarthritis: clinical and arthroscopic observations. *Arthroscopy.* 2002;18(7):725-729.
117. Kaul G, Cucchiari M, Arntzen D, *et al.* Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 2006;8(1):100-111.
118. Kaul G, Cucchiari M, Remberger K, *et al.* Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(11):2315-2324.
119. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods – Theory and Practice:* Butterworth-Heinemann: Oxford, 1999.
120. Kim YJ, Sah RL, Doong JY, *et al.* Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem.* 1988;174(1):168-176.
121. Kiss A, Cucchiari M, Menger MD, *et al.* Enamel matrix derivative inhibits proteoglycan production and articular cartilage repair, delays the restoration of the subchondral bone and induces changes of the synovial membrane in a lapine osteochondral defect model in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014;8(1):41-49.

122. Knutsen G. Microfracture and Autologous Chondrocyte Implantation: their place in therapy. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts*. Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:135-141.
123. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, *et al.* A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(10):2105-2112.
124. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, *et al.* Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86-A(3):455-464.
125. Ko JY, Kim KI, Park S, *et al.* In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(11):3571-3581.
126. Kok AC, Tuijthof GJ, den Dunnen S, *et al.* No effect of hole geometry in microfracture for talar osteochondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471(11):3653-3662.
127. Kon E, Filardo G, Berruto M, *et al.* Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture. *Am J Sports Med*. 2011;39(12):2549-2557.
128. Kon E, Filardo G, Drobnic M, *et al.* Non-surgical management of early knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011;20(3):436-449.
129. Kon E, Gobbi A, Filardo G, *et al.* Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med*. 2009;37(1):33-41.
130. Koshino T, Wada S, Ara Y, *et al.* Regeneration of degenerated articular cartilage after high tibial valgus osteotomy for medial compartmental osteoarthritis of the knee. *Knee*. 2003;10(3):229-236.
131. Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, *et al.* Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy*. 2006;22(11):1180-1186.
132. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, *et al.* Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(11):1119-1125.
133. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(2):93-103.
134. Lai YM, Qin L, Yeung HY, *et al.* Regional differences in trabecular BMD and micro-architecture of weight-bearing bone under habitual gait loading--a pQCT and microCT study in human cadavers. *Bone*. 2005;37(2):274-282.

135. Lane LB, Villacin A, Bullough PG. The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. *J Bone Joint Surg Br.* 1977;59(3):272-278.
136. Little CB, Ghosh P, Bellenger CR. Topographic variation in biglycan and decorin synthesis by articular cartilage in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in sheep. *J Orthop Res.* 1996;14(3):433-444.
137. Little CB, Smith MM, Cake MA, *et al.* The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:80-92.
138. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(8):971-979.
139. Loeser RF. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010;26(3):371-386.
140. Longo UG, Petrillo S, Franceschetti E, *et al.* Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells Int.* 2012;2012:168385.
141. Lopa S, Madry H. Bioinspired Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2014:[Druckausgabe ausstehend].
142. Madry H. Operative und rekonstruktive Behandlung. In: Wirth CJ, Zichner L, Kohn D, (Hrsg.). *Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Band Knie.* Stuttgart: Thieme; 2005.
143. Madry H. The subchondral bone: a new frontier in articular cartilage repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):417-418.
144. Madry H. How to treat large (>4cm²) cartilage lesions in patients with different ages. In: Brittberg M, Gobbi A, Imhoff AB, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair. Clinical Guidelines.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications; 2012:89-130.
145. Madry H, Grün UW, Knutsen G. Knorpelrekonstruktion und Gelenkerhalt. *Dtsch Aerztebl.* 2011;40(108):9.
146. Madry H, Luyten FP, Facchini A. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(3):407-422.
147. Madry H, Pape D. Autologe Chondrozytentransplantation. *Orthopäde.* 2008;37(8):756-763.
148. Madry H, van Dijk CN, Müller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):419-433.
149. Madry H, Weimer A, Kohn D, *et al.* Tissue-Engineering zur Knorpelreparatur verbessert durch Gentransfer. Aktuelle Forschungsergebnisse und Literaturübersicht. *Orthopäde.* 2007;36(3):236-247.
150. Mandelbaum BR, Boyer J, Delcogliano M. Cartilage Repair Treatment Flow Charts. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:71-81.

151. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64(3):460-466.
152. Marchand C, Chen G, Tran-Khanh N, *et al.* Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):508-519.
153. Marchand C, Chen H, Buschmann MD, *et al.* Standardized three-dimensional volumes of interest with adapted surfaces for more precise subchondral bone analyses by micro-computed tomography. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(4):475-484.
154. Marlovits S, Singer P, Zeller P, *et al.* Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol.* 2006;57(1):16-23.
155. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:106-110.
156. Martini L, Fini M, Giavaresi G, *et al.* Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med.* 2001;51(4):292-299.
157. Matsunaga D, Akizuki S, Takizawa T, *et al.* Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis. *Knee.* 2007;14(6):465-471.
158. McErlain DD, Ulici V, Darling M, *et al.* An in vivo investigation of the initiation and progression of subchondral cysts in a rodent model of secondary osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):26.
159. Meachim G. Light microscopy of Indian ink preparations of fibrillated cartilage. *Ann Rheum Dis.* 1972;31(6):457-464.
160. Meller R, Neddermann A, Willbold E, *et al.* The relation between tunnel widening and bone mineral density after anterior cruciate ligament reconstruction: an experimental study in sheep. *Arthroscopy.* 2010;26(4):481-487.
161. Menche DS, Frenkel SR, Blair B, *et al.* A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy.* 1996;12(3):280-286.
162. Menetrey J, Unno-Veith F, Madry H, *et al.* Epidemiology and imaging of the subchondral bone in articular cartilage repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):463-471.
163. Miller BS, Briggs KK, Downie B, *et al.* Clinical outcomes following the microfracture procedure for chondral defects of the knee: a longitudinal data analysis. *Cartilage.* 2010;1(2):108-112.

164. Milz S. Lückenbildungen der subchondralen Mineralisierungszone des Tibiaplateaus. *Osteologie*. 1994;3:110-118.
165. Milz S, Putz R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat*. 1994;185 (Pt 1):103-110.
166. Min BH, Choi WH, Lee YS, *et al*. Effect of different bone marrow stimulation techniques (BSTs) on MSCs mobilization. *J Orthop Res*. 2013;31(11):1814-1819.
167. Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, *et al*. Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med*. 2009;37(5):902-908.
168. Mithoefer K, Hambly K, Della Villa S, *et al*. Return to sports participation after articular cartilage repair in the knee: scientific evidence. *Am J Sports Med*. 2009;37 Suppl 1:167-176.
169. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, *et al*. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med*. 2009;37(10):2053-2063.
170. Mithoefer K, Williams RJ, 3rd, Warren RF, *et al*. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(9):1911-1920.
171. Moran CJ, Pascual-Garrido C, Chubinskaya S, *et al*. Restoration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(4):336-344.
172. Moseley JB, Jr., Anderson AF, Browne JE, *et al*. Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients. *Am J Sports Med*. 2010;38(2):238-246.
173. Mouritzen U, Christgau S, Lehmann HJ, *et al*. Cartilage turnover assessed with a newly developed assay measuring collagen type II degradation products: influence of age, sex, menopause, hormone replacement therapy, and body mass index. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(4):332-336.
174. Müller-Gerbl M, Dalstra M, Ding M, *et al*. Distribution of strength and mineralization in the subchondral bone plate of human tibial heads. *J Biomech*. 1998;31 Suppl 1:123.
175. Müller-Gerbl M, Putz R, Hodapp N, *et al*. Computed tomography-osteodensitometry for assessing the density distribution of subchondral bone as a measure of long-term mechanical adaptation in individual joints. *Skeletal Radiol*. 1989;18(7):507-512.
176. Müller-Gerbl M, Putz R, Hodapp N, *et al*. Computed tomography-osteodensitometry: a method of assessing the mechanical condition of the major joints in a living subject. *Clinical Biomech*. 1990;5(4):193-198.
177. Müller-Gerbl M, Putz R, Kenn R. Demonstration of subchondral bone density patterns by three-dimensional CT osteodensitometry as a noninvasive method for in vivo assessment of individual long-term stresses in joints. *J Bone Miner Res*. 1992;7 Suppl 2:411-418.

178. Müller-Gerbl M, Schulte E, Putz R. The thickness of the calcified layer of articular cartilage: a function of the load supported? *J Anat.* 1987;154:103-111.
179. Müller B, Kohn D. Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Orthopäde.* 1999;28(1):4-10.
180. Müller G, Hanschke M. Quantitative and qualitative analyses of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue. *Connect Tissue Res.* 1996;33(4):243-248.
181. Müller R, Hahn M, Vogel M, *et al.* Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. *Bone.* 1996;18(3):215-220.
182. Murphy RT, Pennock AT, Bugbee WD. Osteochondral allograft transplantation of the knee in the pediatric and adolescent population. *Am J Sports Med.* 2014;42(3):635-640.
183. Naoum S, Martin E, Ellakwa A. Long-term fluoride exchanges at restoration surfaces and effects on surface mechanical properties. *ISRN Dent.* 2013;2013:579039.
184. Newberry WN, Garcia JJ, Mackenzie CD, *et al.* Analysis of acute mechanical insult in an animal model of post-traumatic osteoarthritis. *J Biomech Eng.* 1998;120(6):704-709.
185. Newberry WN, Mackenzie CD, Haut RC. Blunt impact causes changes in bone and cartilage in a regularly exercised animal model. *J Orthop Res.* 1998;16(3):348-354.
186. Niemeyer P, Kostler W, Salzmann GM, *et al.* Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal cartilage defects in patients age 40 years and older: A matched-pair analysis with 2-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2010;38(12):2410-2416.
187. Noble J, Alexander K. Studies of tibial subchondral bone density and its significance. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67(2):295-302.
188. Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med.* 1989;17(4):505-513.
189. O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(12):1795-1812.
190. O'Driscoll SW, Salter RB. The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(8):1248-1257.
191. Ochs BG, Müller-Horvat C, Albrecht D, *et al.* Remodeling of articular cartilage and subchondral bone after bone grafting and matrix-associated autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans of the knee. *Am J Sports Med.* 2011;39(4):764-773.
192. Odgaard A, Pedersen CM, Bentzen SM, *et al.* Density changes at the proximal tibia after medial meniscectomy. *J Orthop Res.* 1989;7(5):744-753.
193. Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res.* 2003;311(3):393-399.

194. Orth P. *Genstransfer zur Verbesserung der Knorpelreparatur* [Dissertation], Universität des Saarlandes, Campus Homburg/Saar; 2008.
195. Orth P, Cucchiarini M, Kaul G, *et al.* Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(10):1161-1169.
196. Orth P, Cucchiarini M, Kohn D, *et al.* Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair - translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater*. 2013;25:299-316.
197. Orth P, Cucchiarini M, Zurakowski D, *et al.* Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(4):614-624.
198. Orth P, Goebel L, Wolfram U, *et al.* Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sports Med*. 2012;40(4):828-836.
199. Orth P, Madry H. A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013;14:5.
200. Orth P, Meyer HL, Goebel L, *et al.* Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. *J Orthop Res*. 2013;31(11):1772-1779.
201. Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, *et al.* Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning*. 2014;7:1-17.
202. Orth P, Zurakowski D, Alini M, *et al.* Reduction of sample size requirements by bilateral versus unilateral research designs in animal models for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(11):885-891.
203. Orth P, Zurakowski D, Wincheringer D, *et al.* Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(5):329-339.
204. Osterhoff G, Löffler S, Steinke H, *et al.* Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee*. 2011;18(2):98-103.
205. Otte P. [The inability of regeneration of the articular cartilage]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 1958;90(3):299-303.
206. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:752-757.
207. Pape D, Filardo G, Kon E, *et al.* Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):448-462.
208. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, *et al.* Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610.

209. Paul J, Brucker PU, Vogt S, *et al.* OATS and Mega OATS. Why, When and How. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts*. Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:107-117.
210. Peretti GM, Mangiavini L, Deponi D. Basic Science of Articular Cartilage Repair. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts*. Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:3-11.
211. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, *et al.* Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002;30(1):2-12.
212. Peterson L, Minas T, Brittberg M, *et al.* Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:17-24.
213. Peterson L, Minas T, Brittberg M, *et al.* Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 2000(374):212-234.
214. Pridie BvK. www.swoc.co.uk/ken-pridie.html. *South West Orthopaedic Club*.
215. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. Proceedings of the British Orthopaedic Association. *J Bone Joint Surg Br.* 1959;41.
216. Pugh JW, Radin EL, Rose RM. Quantitative studies of human subchondral cancellous bone. Its relationship to the state of its overlying cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1974;56(2):313-321.
217. Qiu YS, Shahgaldi BF, Revell WJ, *et al.* Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003;11(11):810-820.
218. Radin EL, Paul IL. Does cartilage compliance reduce skeletal impact loads? The relative force-attenuating properties of articular cartilage, synovial fluid, periarticular soft tissues and bone. *Arthritis Rheum.* 1970;13(2):139-144.
219. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;213:34-40.
220. Richardson JB. Subchondral Bone: Current Concepts. In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts*. Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:53-60.
221. Rose T, Imhoff AB. Verletzungen beim Fußball. *Dtsch Aerztebl.* 2006;23:1611-1616.
222. Rudert M. Histological evaluation of osteochondral defects: consideration of animal models with emphasis on the rabbit, experimental setup, follow-up and applied methods. *Cells Tissues Organs.* 2002;171(4):229-240.
223. Ruegsegger P, Koller B, Müller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int.* 1996;58(1):24-29.

224. Safran MR, Seiber K. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2010;18(5):259-266.
225. Saini A, Saifuddin A. MRI of osteonecrosis. *Clin Radiol.* 2004;59(12):1079-1093.
226. Saris DB, Dhert WJ, Verbout AJ. Joint homeostasis. The discrepancy between old and fresh defects in cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(7):1067-1076.
227. Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg.* 2011;77(6):709-726.
228. Schlichting K, Schell H, Kleemann RU, *et al.* Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing. *Am J Sports Med.* 2008;36(12):2379-2391.
229. Schnettler R, Horas U, Meyer C. Autologe osteochondrale Transplantate. *Orthopäde.* 2008;37(8):734-742.
230. Sell CA, Masi JN, Burghardt A, *et al.* Quantification of trabecular bone structure using magnetic resonance imaging at 3 Tesla--calibration studies using microcomputed tomography as a standard of reference. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(5):355-364.
231. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(10):1452-1463.
232. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(4):532-553.
233. Shepard N, Mitchell N. The localization of proteoglycan by light and electron microscopy using safranin O. A study of epiphyseal cartilage. *J Ultrastruct Res.* 1976;54(3):451-460.
234. Shepherd DE, Seedhom BB. Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(1):27-34.
235. Sherman SL, Garrity J, Bauer K, *et al.* Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts. *J Am Acad Orthop Surg.* 2014;22(2):121-133.
236. Simon TM, Aberman HM. Cartilage regeneration and repair testing in a surrogate large animal model. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):65-79.
237. Simon TM, Jackson DW. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc.* 2006;14(3):146-154.
238. Siston RA, Geier D, Bishop JY, *et al.* The high variability in sizing knee cartilage defects. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(1):70-75.
239. *Structural parameters measured by Skyscan™ CT-analyzer software.* [computer program]. Version: Skyscan; 2008.
240. Slynarski K, Deszczynski JM. Bone marrow mesenchymal stem cells in cartilage repair. In: Brittberg M, Gobbi A, Imhoff AB, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair. Clinical Guidelines.* Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications; 2012:295-304.

241. Smillie IS. Treatment of osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Br.* 1957;39-B(2):248-260.
242. Solheim E, Oyen J, Hegna J, *et al.* Microfracture treatment of single or multiple articular cartilage defects of the knee: a 5-year median follow-up of 110 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):504-508.
243. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, *et al.* Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* 2003;19(5):477-484.
244. Steadman JR, Miller BS, Karas SG, *et al.* The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J Knee Surg.* 2003;16(2):83-86.
245. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, *et al.* Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde.* 1999;28(1):26-32.
246. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:362-369.
247. Steinmeyer J, Konttinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):168-211.
248. Steinwachs M, Kreuz PC, Guhlke-Steinwachs U, *et al.* Aktuelle Behandlung des Knorpelschadens im Patellofemoralgelenk. *Orthopäde.* 2008;37:841-847.
249. Steinwachs MR, Erggelet C, Lahm A, *et al.* Klinische und zellbiologische Aspekte der autologen Chondrozytenimplantation. *Unfallchirurg.* 1999;102(11):855-860.
250. Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. Marrow stimulation techniques. *Injury.* 2008;39 Suppl 1:26-31.
251. Steinwachs MR, Waibl B, Niemeyer P. Klinische Behandlung von Gelenkknorpelschäden mithilfe autologer Vorläuferzellen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2011;54(7):797-802.
252. Tetteh ES, Bajaj S, Ghodadra NS. Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2012;42(3):243-253.
253. Theodorou SJ, Theodorou DJ, Agnantis NJ, *et al.* Osteonecrosis of the tibial plateau: magnetic resonance imaging appearances with quantitation of lesion size and evidence of a pathogenesis of meniscal injury. *J Comput Assist Tomogr.* 2010;34(1):149-155.
254. Ulstein S, Aroen A, Rotterud JH, *et al.* Microfracture technique versus osteochondral autologous transplantation mosaicplasty in patients with articular chondral lesions of the knee: a prospective randomized trial with long-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014:[Druckausgabe ausstehend].
255. Vachon AM, Keeley FW, McIlwraith CW, *et al.* Biochemical analysis of normal articular cartilage in horses. *Am J Vet Res.* 1990;51(12):1905-1911.

256. Van Assche D, Wondrasch B, Risberg MA. Rehabilitation of Patients with Articular Cartilage Injury in the Knee (Part I) and Postoperative Rehabilitation of Patients after Cartilage Repair Procedures (Part II). In: Brittberg M, Imhoff AB, Madry H, *et al.*, (Hrsg.). *Cartilage Repair: Current Concepts*. Vol 1. Guildford: UK: DJO Publications.; 2010:173-195.
257. van Bergen CJ, Kerkhoffs GM, Ozdemir M, *et al.* Demineralized bone matrix and platelet-rich plasma do not improve healing of osteochondral defects of the talus: an experimental goat study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(11):1746-1754.
258. Van der Vis HM, Aspenberg P, Marti RK, *et al.* Fluid pressure causes bone resorption in a rabbit model of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res*. 1998(350):201-208.
259. van Dijk CN, Reilingh ML, Zengerink M, *et al.* The natural history of osteochondral lesions in the ankle. *Instr Course Lect*. 2010;59:375-386.
260. van Dijk CN, Reilingh ML, Zengerink M, *et al.* Osteochondral defects in the ankle: why painful? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(5):570-580.
261. Vanlauwe J, Saris DB, Victor J, *et al.* Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters. *Am J Sports Med*. 2011;39(12):2566-2574.
262. Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, *et al.* 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*. 2010;38(5):943-949.
263. Vavken P, Samartzis D. Effectiveness of autologous chondrocyte implantation in cartilage repair of the knee: a systematic review of controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(6):857-863.
264. Von Keudell A, Atzwanger J, Forstner R, *et al.* Radiological evaluation of cartilage after microfracture treatment: a long-term follow-up study. *Eur J Radiol*. 2012;81(7):1618-1624.
265. Wakabayashi S, Akizuki S, Takizawa T, *et al.* A comparison of the healing potential of fibrillated cartilage versus eburnated bone in osteoarthritic knees after high tibial osteotomy: An arthroscopic study with 1-year follow-up. *Arthroscopy*. 2002;18(3):272-278.
266. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579-592.
267. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*. 2007;14(3):177-182.
268. Wilson WJ, Jacobs JE. Patellar graft for severely depressed comminuted fractures of the lateral tibial condyle. *J Bone Joint Surg Am*. 1952;34-A(2):436-442.
269. Zak L, Krusche-Mandl I, Aldrian S, *et al.* Clinical and MRI evaluation of medium- to long-term results after autologous osteochondral transplantation (OCT) in the knee joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014:[Druckausgabe ausstehend].

- 270.** Zaslav K, Cole B, Brewster R, *et al.* A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med.* 2009;37(1):42-55.
- 271.** Ziegler R, Goebel L, Cucchiaroni M, *et al.* Effect of open wedge high tibial osteotomy on the lateral tibiofemoral compartment in sheep. Part II: standard and overcorrection do not cause articular cartilage degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013:[Druckausgabe ausstehend].

L. Publikationen und Vorträge

Eingereichte Publikation:

Eldracher, M., Orth, P., Cucchiarini, M., Pape, D., Madry, H. (2014) Subchondral drill holes reflecting the physiological trabecular distance improve osteochondral repair. *Am J Sports Med.*

Eingereicht am 24.02.2014

Veröffentlichte Publikation:

Orth, P., Meyer, H.L., Goebel, L., **Eldracher, M.**, Ong, M.F., Cucchiarini, M., Madry, H. (2013) Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. *Journal of Orthopaedic Research* 31:1772-1779.

Impact-Faktor: 2,976

Vorträge:

Eldracher, M., Orth, P., Pape, D., Goebel, L., Cucchiarini, M., Madry, H. Effect of subchondral drill hole size on the repair of full-thickness cartilage defects: analysis in a large animal model at 6 months.

2nd Cartilage Net Congress, Luxembourg (Luxemburg), 12/2012

Orth, P., Meyer, H.L., Goebel, L., **Eldracher, M.**, Ong, M.F., Kohn, D., Cucchiarini, M., Madry, H. Topographische Unterschiede in der Knorpelreparatur in vivo zwischen Femurkondyle und Trochlea im Schafmodell.

Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (Berlin), 99. Tagung, 10/2013

M. Danksagung

Mit der Fertigstellung der Dissertation möchte ich denjenigen danken, die mich begleitet und unterstützt haben. Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. med. H. Madry für seine wissenschaftliche Betreuung meines Promotionsverfahrens und seine motivierende Auseinandersetzung mit grundlegenden Fragen. Auch bedanke ich mich für die ausgesprochen angenehme Atmosphäre während der kritischen als auch inspirierenden Diskussionen.

Dr. med. P. Orth für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie die stets vorhandene Bereitschaft, bei anstehenden Fragen zur Seite zu stehen. Seine hilfreichen Rückmeldungen habe ich sehr geschätzt.

Prof. Dr. rer. nat. M. Cucchiarini für ihre wertvollen Ratschläge und Diskussionsbereitschaft. PD Dr. med. D. Pape für die intensive Mitarbeit bei der Durchführung der Tierexperimente. Prof. Dr. med. D. Kohn danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit. Roman Brunner danke ich für seine Mitarbeit.

Der Arbeitsgruppe des Labors der experimentellen Orthopädie, insbesondere Lars Goebel, Raphaela Ziegler und Gertrud Schmitt, für die gegenseitige Hilfsbereitschaft sowie angenehme Arbeitsatmosphäre.

Freunden für ihre Unterstützung, Aufmunterungen und entgegengebrachte Nachsicht.

Daniel Menges, der mich in den richtigen Momenten motiviert hat und immer für mich da war. Ich danke ihm auch für seine Geduld, seine Unterstützung und dafür, dass er immer an mich geglaubt hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre liebevolle, moralische als auch tatkräftige Unterstützung und ihr außerordentliches Interesse an meinem Dissertationsprojekt. Ihnen sei die vorliegende Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.