Aus dem

Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung Universität des Saarlandes Direktor: Prof. Dr. med. H. Madry

# Die subchondrale Anbohrung verbessert unabhängig von Bohrlochdichte Gelenkknorpelreparatur und subchondrale Veränderungen gegenüber dem Defektdebridement

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Jan Niklas Stachel geboren am: 07.06.1988 in Mainz

Tag der Promotion: 03.03.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger Berichterstatter: Prof. Dr. Henning Madry Prof. Dr. Matthias W. Laschke Prof. Dr. Anita Ignatius Widmung

Für Julia, meine Eltern und meinen Bruder.

# Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisI		
AbbildungsverzeichnisV		
Tabellenv	verzeichnisVI	
Abkürzu	ngsverzeichnisVII	
1 Zusa	mmenfassung1	
2 Abstr	ract2	
3 Einle	itung3	
3.1	Problematik	
3.2	Biologische Grundlagen der osteochondralen Einheit	
3.2.1	Hyaliner Gelenkknorpel	
3.2.2	Subchondraler Knochen	
3.2.3	Osteochondrale Einheit	
3.3	Grundlagen der Kniegelenksanatomie	
3.4	Systematik von Gelenkknorpeldefekten	
3.5	Operative Therapiestrategien fokaler chondraler Defekte	
3.5.1	Übersicht13	
3.5.2	Defektdebridement	
3.5.3	Markraumeröffnende Verfahren15	
3.5.3	3.1 Subchondrale Anbohrung16	
3.5.3	3.2 Mikrofrakturierung16	
3.5.3	3.3 Abrasionsarthroplastik17	
3.5.4	Autologe Chondrozytentransplantation	
3.5.5	Osteochondrale Transplantation	
3.6	Osteochondrale Reparatur nach Markraumeröffnung	
3.6.1	Biologie der osteochondralen Reparatur	
3.6.2	Subchondrale Sekundärveränderungen nach Markraumeröffnung	
3.7	Konzept der vorliegenden Arbeit	
4 Frage	estellungen23	
5 Mate	rial24	
5.1	Chemikalien	
5.2	Puffer und Lösungen	
5.3	Antikörper	
5.4	Enzyme	

5.5	Geräte und Laborprodukte	27
5.6	Weitere Verbauchsmaterialien	28
5.7	Operationsinstrumente und -materialien	28
5.8	Computerprogramme	28
5.9	Versuchstiere	29
6 Meth	oden	30
6.1	Studiendesign	30
6.2	Großtiermodell	31
6.3	Operative Eingriffe	32
6.3.1	Präoperative Vorbereitungen und Narkose	33
6.3.2	Operatives Vorgehen	33
6.3.3	Postoperative Behandlung	34
6.4	Probenaufbereitung	35
6.5	Übersicht der angewandten Methoden	36
6.6	Makroskopische Begutachtung von Knorpelreparatur und angrenzendem Knorpel	37
6.6.1	Bewertungssystem nach Goebel et al.	37
6.6.2	Ausmessung degenerativer Veränderungen im angrenzenden Gelenkknorpel	38
6.7	Biochemische Analysen	39
6.7.1	Vorbereitung	39
6.7.2	Bestimmung des DNS-Gehaltes (Hoechst 33258-Test)	39
6.7.3	Bestimmung des Proteingehaltes (BCA-Test)	40
6.7.4	Bestimmung des Proteoglykangehaltes (DMMB-Test)	41
6.8	Radiologische Beurteilung des subchondralen Knochens	42
6.8.1	Mikro-CT-Bildgebung	42
6.8.2	Bildrekonstruktion	42
6.8.3	Volumes of interest (VOIs)	42
6.8.4	Analysen der Knochenmikrostruktur	44
6.8.5	Analysen von Osteophyten und subchondralen Zysten	44
6.9	Histologische Beurteilung der osteochondralen Reparatur	45
6.9.1	Entkalkung	45
6.9.2	Entwässerung und Einbettung	45
6.9.3	Anfertigung histologischer Schnitte	46
6.9.4	Histologische Färbungen	46
6.9.4	4.1 Allgemeines Vorgehen	46
6.9.4	4.2 Safranin Orange/Echtgrün-Färbung	46
6.9.4	4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	47
6.9.4	4.4 Immunhistochemische Färbung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen	47
6.9.5	Bewertungssysteme	48

6.9	9.5.1 Bewertung des osteochondralen Reparaturgewebes	48
6.9	9.5.2 Bewertung degenerativer Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpe	els50
6.9	9.5.3 Bewertung der Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Expression im Reparaturgewe	be51
6.10	Statistische Analysen	
7 Erg	gebnisse	53
7.1	Analysen der Knorpelreparatur	53
7.1.1	Makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes	53
7.1.2	2 Histologische Bewertung des Reparaturgewebes	
7.1	1.2.1 Histologische Bewertung nach Sellers <i>et al.</i>	54
7.1	1.2.2 Histologische Bewertung nach Wakitani <i>et al.</i>	57
7.1.3	3 Immunhistochemische Bewertung der Knorpelreparatur	
7.1.4	Biochemische Analysen der Knorpelreparatur	59
7.2	Analysen des angrenzenden Gelenkknorpels	61
7.2.1	Makroskopische Ausmessung degenerativer Veränderungen	61
7.2.2	2 Histologische Bewertung degenerativer Veränderungen nach Little <i>et al.</i>	61
7.2.3	Biochemische Analysen des angrenzenden Gelenkknorpels	
7.3	Radiologische Analysen des subchondralen Knochens	63
7.3.1	Mikrostrukturelle Analysen des subchondralen Knochens	63
7.3	3.1.1 Subchondrale Knochenplatte	63
7.3	3.1.2 Subartikuläre Spongiosa	64
7.3.2	2 Analysen intraläsionaler Osteophyten und subchondraler Knochenzysten	67
8 Disl	kussion	69
8.1	Hauptsächliche Ergebnisse der Studie	69
8.2	Kontext der Studienergebnisse zu vorbestehender Literatur	
8.2.1	l Gelenkknorpelreparatur	70
8.2.2	2 Veränderungen des subchondralen Knochens	73
8.2	2.2.1 Relevanz von Veränderungen des subchondralen Knochens	73
8.2	2.2.2 Störungen der Knochenmikroarchitektur	75
8.2	2.2.3 Subchondrale Sekundärveränderungen	79
8.2.3	Einfluss der Bohrlochdichte auf die osteochondrale Reparatur	
8.3	Limitationen und Stärken der Arbeit	89
8.4	Schlussfolgerungen	
8.4.1	l Zusammenfassung	
8.4.2	2 Klinische Relevanz und Ausblick	91
9 Lite	eraturverzeichnis	94
10 Pub	olikationen	120
10.1	Publikationen	

10.1.1	1 Orginalarbeiten	
10.1.2	2 Übersichtsarbeiten	
10.2	Vorträge	
10.3	Posterpräsentationen	
11 Dank	ksagung	122
12 Lebe	enslauf	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Aufbau der osteochondralen Einheit	6
Abbildung 2: Darstellung der Kniegelenksanatomie am humanen Präparat	10
Abbildung 3: Übersicht zur Einteilung von Knorpeldefekten	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Defektdebridements	14
Abbildung 5: Übersicht subchondraler Sekundärveränderungen	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Studiendesigns	31
Abbildung 7: Übersicht operatives Vorgehen	32
Abbildung 8: Übersicht angewandter Methoden	36
Abbildung 9: Flächenausmessung degenerativer Veränderungen	38
Abbildung 10: Darstellung der zweidimensionalen ROIs	43
Abbildung 11: Übersicht makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes.	53
Abbildung 12: Übersicht histologische Bewertung des Reparaturgewebes	55
Abbildung 13: Übersicht immunhistochemische Bewertung des Reparaturgewebes	59
Abbildung 14: Übersicht makroskopische Ausmessung degenerativer Veränderungen	61
Abbildung 15: Übersicht Mikro-CT-Analysen intraläsionaler Osteophyten	68

Alle Abbildungen dieser Arbeit wurden selbstständig erstellt oder anhand von Vorlagen angezeigter, größtenteils eigener Veröffentlichungen adaptiert. Die verwendeten intra- und postoperativen Bilder entstammen dem Bilderfundus des Zentrums für Experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien. 24
Tabelle 2: Puffer und Lösungen. 25
Tabelle 3: Antikörper. 26
Tabelle 4: Geräte und Produkte
Tabelle 5: Computerprogramme. 28
Tabelle 6: Makroskopisches Bewertungssystem nach Goebel et al. [97]. 37
Tabelle 7: Schema der Standardreihe des DNS-Gehaltes. 40
Tabelle 8: Schema der Standardreihe der BSA-Konzentration. 40
Tabelle 9: Schema der Standardreihe der Chondroitin-6-Sulfat-Konzentration.    41
Tabelle 10: Histologisches Bewertungssystem nach Sellers et al. [280]. 48
Tabelle 11: Histologisches Bewertungssystem nach Wakitani et al. [312]
Tabelle 12: Histologisches Bewertungssystem nach Little et al. [169]. 51
Tabelle 13: Bewertungssystem der Typ-I-/Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität [240]
Tabelle 14: Ergebnisse makroskopischer Bewertung der Knorpelreparatur
Tabelle 15: Ergebnisse histologischer Bewertung des Reparaturgewebes nach Sellers et al. [280] 56
Tabelle 16: Ergebnisse histologischer Bewertung der Knorpelreparatur nach Wakitani et al. [312]57
Tabelle 17: Ergebnisse der Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität im Reparaturgewebe 58
Tabelle 18: Ergebnisse biochemischer Analysen der Knorpelreparatur. 60
Tabelle 19: Ergebnisse histologischer Bewertung degenerativer Veränderungen im angrenzenden
Gelenkknorpel
Tabelle 20: Ergebnisse biochemischer Analysen des angrenzenden Gelenkknorpels
Tabelle 21: Ergebnisse mikrostruktureller Analysen der subchondralen Knochenplatte
Tabelle 22: Ergebnisse mikrostruktureller Analysen der subartikulären Spongiosa
Tabelle 23: Ergebnisse quantitativer Analysen intraläsionaler Osteophyten mittels Mikro-CT

Alle Tabellen wurden eigenständig erstellt. Die Tabellen des Ergebnisteils sind adaptiert an die eigene Veröffentlichung der vorliegenden Forschungsergebnisse [296].

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
3D	dreidimensional
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (avidin-biotin-peroxidase-complex)
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
aqua bidest	aqua bidestillata
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
bit	Binärziffer (binary digit)
BMD	Knochenmineraldichte (bone mineral density)
BSA	bovines Serumalbumin (bovine serum albumin)
BS/BV	Knochenoberfläche/-volumen (bone surface/volume)
BS/TV	Knochenoberflächendichte (bone surface density)
BV/TV	Knochenvolumenanteil (bone volume fraction)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
СТ	Computertomographie
Ct.Th	Dicke der subchondralen Knochenplatte (cortical thickness)
DA	Grad der Anisotropie (degree of anisotropy)
DAB	3'3 Diaminobenzidin
DGOU	Deutsche Gesellschaft fur Orthopädie und Unfallchirurgie
DMMB	Dimethylmethylenblau (dimethylmethylene blue)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	auf Englisch
et al.	et alii/et aliae
etc.	et cetera
FD	Fraktale Dimension (fractal dimension)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
ICRS	International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society
IgG	Immunglobulin G
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
1	Liter

М	Mol
mA	Milliampere
max.	Maximum
mg	Milligramm
min	Minute(n)
min.	Minimum
ml	Milliliter
mM	Millimol
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
PBE	phosphatgepuffertes EDTA (phosphat buffered EDTA)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
ROI	Region von Interesse (region of interest)
S	Sekunde
SA	Standardabweichung
Safranin O	Safranin Orange
SKA	subchondrale Knochenplatte angrenzend
SKD	subchondrale Knochenplatte der Defektregion
SKN	subchondrale Knochenplatte normal
SMI	Struktur-Model-Index (structure model index)
SSA	subartikuläre Spongiosa angrenzend
SSD	subartikuläre Spongiosa der Defektregion
SSN	subartikuläre Spongiosa normal
Tb.N	Trabekelanzahl (trabecular number)
Tb.Pf	trabekulärer Knochenanordnungsfaktor (trabecular pattern factor)
Tb.Sp	Trabekelabstand (trabecular separation)
Tb.Th	Trabekeldicke (trabecular thickness)
TNE	Tris-HCl-NaCl-EDTA
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
USP	United States Pharmacopeia
v.a.	vor allem
VOI	Volumen von Interesse (volume of interest)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

### 1 Zusammenfassung

**Fragestellung.** Die subchondrale Anbohrung ist ein etabliertes markraumeröffnendes Verfahren zur Behandlung kleinflächiger symptomatischer Gelenkknorpeldefekte. Es ist jedoch unklar, ob die subchondrale Anbohrung einem alleinigen Defektdebridement überlegen ist und ob die Dichte der angelegten Bohrlöcher die induzierte Reparatur beeinflusst.

**Methoden.** Rechteckige, vollschichtige Knorpeldefekte (4 x 8 mm) wurden in der lateralen Trochleafacette ausgewachsener Schafe (n = 16) erzeugt. Alle Defekte (n = 21) erhielten ein Debridement. Die Defekte der Kontrollgruppe (n = 7) wurden anschließend nicht weiter behandelt, die restlichen Defekte erhielten entweder 2 oder 6 (jeweils n = 7) subchondrale Bohrlöchern (Durchmesser: 1 mm; Tiefe: 10 mm). Die osteochondrale Reparatur wurde 6 Monate postoperativ mittels standardisierter (semi-) quantitativer makroskopischer, histologischer, immunhistochemischer, biochemischer Verfahren und durch Mikro-Computertomographie untersucht.

**Ergebnisse.** Verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement verbesserte die subchondrale Anbohrung unabhängig von der Bohrlochanzahl die histologische Gesamtqualität der induzierten Knorpelreparatur (P = 0,025) und den makroskopischen Zustand des angrenzenden Gelenkknorpels ( $P \le 0,032$ ). Eine Anbohrung mit 6 Bohrlöchern erhöhte den Typ-II-Kollagen-Gehalt im Reparaturgewebe verglichen mit der Kontrollgruppe (P = 0,038). Die Knochenmineraldichte zeigte sich nach Defektdebridement in der subchondralen Knochenplatte ( $P \le 0,015$ ) und subartikulären Spongiosa ( $P \le 0,041$ ) signifikant vermindert verglichen mit beiden Behandlungsgruppen. Überdies war die Querschnittsfläche der intraläsionalen Osteophyten nach Debridement signifikant größer als nach subchondraler Anbohrung ( $P \le 0,034$ ). Es bestanden keine weiteren signifikanten Unterschiede in der osteochondralen Reparatur zwischen einer Anbohrung mit 2 oder 6 Bohrlöchern.

Schlussfolgerung. Die subchondrale Anbohrung verbessert unabhängig der verwendeten Bohrlochdichte die Knorpelreparatur von kleinflächigen, vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement im Schafmodell 6 Monate postoperativ. Zudem steigert die subchondrale Anbohrung die Mineraldichte des subchondralen Knochens und verringert die Ausbildung von intraläsionalen Osteophyten verglichen mit einem Defektdebridement.

#### 2 Abstract

**Introduction.** Subchondral drilling is an established marrow stimulation technique for small symptomatic cartilage defects, but whether subchondral drilling is superior to sole defect debridement and if the drill hole density affects repair remains unclear.

**Methods.** Rectangular full-thickness chondral defects (4 x 8 mm) were created in the lateral trochlea of adult sheep (n = 16). All defects (n = 21) were debrided. Control defects were left without further treatment (n = 7), all other defects were treated with either 2 or 6 (n = 7 each) subchondral drill holes (diameter: 1 mm; depth: 10 mm). Osteochondral repair was assessed at 6 months postoperatively by standardized (semi-) quantitative macroscopic, histological, immunohistochemical, biochemical analyses and micro-computed tomography.

**Results.** Compared with defect debridement alone, histological overall cartilaginous repair tissue quality (p = .025) and the macroscopic aspect of the adjacent cartilage ( $p \le .032$ ) were improved independent of drill hole density. Drilling with 6 holes increased type 2 collagen content in the repair tissue compared with controls (p = .038). After debridement, bone mineral density was significantly decreased in the subchondral bone plate ( $p \le .015$ ) and the subarticular spongiosa ( $p \le .041$ ) compared with both treatment groups. Debridement also significantly increased intralesional osteophyte sectional area compared with drilling ( $p \le .034$ ). No other differences in osteochondral repair existed between subchondral drilling with 2 or 6 drill holes.

**Conclusions.** Subchondral drilling independent of drill hole density significantly improves cartilage repair compared with sole defect debridement of small full-thickness cartilage defects in sheep after 6 months. Subchondral drilling also increases bone mineral density of subchondral bone compartment and simultaneously reduces the formation of intralesional osteophytes compared with debridement.

#### Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Stachel N, Orth P, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiarini M, Madry H (2022) Subchondral Drilling Independent of Drill Hole Number Improves Articular Cartilage Repair and Reduces Subchondral Bone Alterations Compared With Debridement in Adult Sheep. Am J Sports Med 50(10):2669–2679

Diese Publikation diente als Vorlage für Zusammenfassung und Abstract.

#### 3 Einleitung

#### 3.1 Problematik

Gelenkknorpelschäden sind häufig und werden beispielsweise in 60-63% aller Kniegelenksarthroskopien identifiziert [10, 62, 118, 315]. Ihre Therapie stellt weiterhin ein bedeutendes Problem in der orthopädischen Chirurgie dar [31, 319]. Hyaliner Gelenkknorpel überzieht die Gleitflächen von Synovialgelenken und ist einer der Garanten einer physiologischen Gelenkfunktion [42]. Dieser kann durch ein Trauma, im Rahmen der Arthrose und von Erkrankungen des subchondralen Knochens wie der Osteochondrosis dissecans oder Osteonekrosen Schaden nehmen [177, 247, 253]. Eine kritische Ausdehnung erreichend, resultieren Knorpelschäden in Schmerzen, Gelenkreizzuständen und Bewegungseinschränkungen [178, 181, 272]. Zudem verfügen teil- und vollschichtige chondrale Defekte über ein nur sehr eingeschränktes Reparaturpotential [45, 247], da sie im Vergleich zu osteochondralen Läsionen über keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem sowie den Markraum des subchondralen Knochens verfügen [130, 132, 178]. Der Zugang zu pluripotenten mesenchymalen Stammzellen fehlt daher zumeist. Demzufolge bildet sich in chondralen Defekten lediglich ein im Vergleich zum gesunden hyalinen Gelenkknorpel minderwertiges fibröses Reparaturgewebe, welches den Defekt meist nur unvollständig ausfüllt [130, 132, 234]. Unbehandelt können Knorpeldefekte daher weiter voranschreiten, zu einer Schädigung des gesunden benachbarten Knorpelgewebes führen und durch Störung der Gelenkhomöostase in einer Arthrose des betroffenen Gelenkes enden [41, 42, 99, 139, 144, 165, 181, 200, 216, 272, 276].

Das Therapiekonzept markraumeröffnender Verfahren besteht darin, Verbindungskanäle zwischen Knorpeldefekt und dem darunterliegenden Knochenmarkraum durch fokale Perforationen oder eine lokale Abrasion der subchondralen Knochenplatte zu schaffen [140, 260, 289, 295, 297]. Hierdurch wird ein Einwandern mesenchymaler Stammzellen in die Defektregion ermöglicht [53, 284]. Eine im Vergleich zum natürlichen Heilungsverlauf und auch gegenüber einem alleinigen Defektdebridement strukturell und biomechanisch verbesserte Knorpelreparatur wird hierdurch induziert [50, 53, 80, 81, 183, 284]. Markraumeröffnende Verfahren zählen zur Standardtherapie symptomatischer kleinflächiger (< 2 cm<sup>2</sup>), teil-/ und vollschichtiger chondraler Defekte [50, 209, 222, 244, 298, 302] und werden seit mehr als 6 Jahrzehnten angewandt [140, 260, 289, 295, 298].

Interessanterweise sind für markraumeröffnende Verfahren Versagensraten von 11-27 % innerhalb der ersten 5 Jahre und von 6-32 % 10 Jahre postoperativ beschrieben [244, 295]. Ursächlich hierfür sind

u.a. die faserknorpelige Qualität des Reparaturknorpels mit inkompletter Defektfüllung und unzureichender Integration [68, 89, 244, 281]. Insbesondere mit Hilfe präklinischer Untersuchungen konnten diese Techniken in den letzten Jahren weiter verbessert werden [295]. Bezogen auf die subchondrale Anbohrung wurde der Effekt verschiedener Einflussgrößen wie Bohrlochdurchmesser [68], Anbohrtiefe [50], vorbereitendes Defektdebridement [50, 66, 82, 87], Defektlokalisation [51, 239], kühlende Spüllösungen während des Bohrvorganges [13, 48], Bohrinstrumentendesign [48] und supportive Biomaterialien [88, 95, 107] sowie supplementäre Therapieverfahren [281, 306] untersucht [89, 295, 296]. Der Einfluss der Bohrlochanzahl auf die osteochondrale Reparatur wurde hierbei jedoch bisher noch nicht erforscht. Überdies wird weiterhin kontrovers diskutiert, ob eine fokale Perforation der subchondralen Knochenplatte zusätzlich zum Defektdebridement überhaupt notwendig ist [22, 172], da das alleinige Defektdebridement bisweilen ebenfalls einen limitierten Zugang zum Blutsystem subchondraler Sinusoide zu schaffen vermag [66, 296].

#### 3.2 Biologische Grundlagen der osteochondralen Einheit

#### 3.2.1 Hyaliner Gelenkknorpel

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein bradytrophes Gewebe mesenchymalen Ursprungs. Dieser ist avaskulär, anerval und alymphatisch [34]. Aufgrund seines besonderen dreidimensionalen (3D-) Aufbaus und seiner Zusammensetzung besitzt er einzigartige biomechanische Eigenschaften und erfüllt wichtige Aufgaben der physiologischen Gelenkfunktion. Er hat eine Pufferfunktion und reduziert die biomechanische Belastung, die auf unsere Gelenke einwirkt. Überdies ermöglicht er das Gleiten der Gelenkflächen mit möglichst wenig Reibung und Widerstand [34].

Der hyaline Gelenkknorpel setzt sich zusammen aus zellulären Bestandteilen und der diese umgebenden extrazellulären Matrix. Die spezifischen Zellen des Knorpelgewebes sind Chondrozyten, welche im ausgereiften Gelenkknorpel lediglich 10% des Gesamtgewichts ausmachen [40]. Die metabolische und Zellteilungs-Aktivität sowie die Anzahl der Knorpelzellen ist altersabhängig und verringert sich deutlich nach Abschluss der Wachstumsphase im adulten Gelenkknorpel [43]. Die Chondrozyten selbst bilden die extrazelluläre Matrix. Die genaue Zusammensetzung der extrazellulären Matrix variiert interindividuell, aber auch innerhalb eines Individuums, und ist abhängig von Gelenklokalisation, biomechanischer Beanspruchung und Alter [27, 63]. Sie ist reich an Proteoglykanen (~10%) und Kollagen-Fasern (~15%) (v.a. Typ-II-, aber auch Typ-V-,VI-,IX-,X-,XI- und XIV-Kollagen) und einer Reihe anderer Makromoleküle, die v.a. der Netzwerk-Stabilisierung dienen [34, 59]. Hierzu zählen das *Cartilage* 

Oligomeric Matrix Protein (COMP), Fibronektin, das Link-Protein sowie Tenascin [133, 217]. Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist jedoch Wasser mit einem Anteil von 70 bis 80% des Knorpel-Gesamtgewichtes [59]. Für die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels besonders wichtig sind die Proteoglykane und Typ-II-Kollagenfasern der extrazellulären Matrix [26]. Das für den hyalinen Gelenkknorpel charakteristische Proteoglykan ist Aggrekan [113]. Andere wichtige Proteoglykane sind Decorin, Biglykan und Fibromodulin [59]. Proteoglykane sind Protein-Polysaccharid-Komplexe [108]. Diese bestehen sich aus einem Kernprotein, das mit aus Disacchariden aufgebauten Molekülen - den Glykosaminoglykane - verbunden ist [108]. Die häufigsten Glykosaminoglykane sind Keratan-Sulfat und Chondroitin-Sulfat [108]. Untereinheiten der Proteoglykane sind über Verbindungsproteine mit Hyaluronsäure verknüpft [255]. Dieser Verbindungskomplex aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure ist hydrophil und bindet das im Gelenkknorpel enthaltene Wasser [255]. Ein Teil des Wassers liegt ungebunden vor und dient der Gelenkschmierung und Nutrition der Knorpelzellen über den Weg der Diffusion [61]. Typ-II-Kollagen ist ein für den hyalinen Gelenkknorpel charakteristisches Kollagen und besitzt einen Anteil von ca. 95% am Gesamtgewicht von Kollagen im hyalinen Gelenkknorpel [34]. Seine komplexe Struktur verleiht den Typ-II-Kollagen-Fasern eine große Zug- und Reißfestigkeit [34]. Es bildet ein dichtes Flechtwerk, umschließt das am Verbindungskomplex aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure gebundene Wasser und steuert dessen Ausdehnung und Flussrichtung [34]. Bei Druckbelastung auf den Gelenkknorpel strömt das Wasser nur langsam aus dem Flechtwerk heraus und schützt die soliden Bestandteile des Gelenkknorpels [34]. Diese komplexe dreidimensionale Struktur der extrazellulären Matrix ermöglicht eine Reduktion des auf ein Gelenk einwirkenden Körpergewichtes um ein Vielfaches und verleiht dem Knorpel zwei seiner charakteristischen Eigenschaften: Widerstandsfähigkeit gegenüber Druck- und Scherbelastung sowie gleichzeitig hohe Elastizität [34].

Die extrazelluläre Matrix kann in verschiedene, konzentrisch angeordnete Regionen unterteilt werden [27, 256]. Ein Chondrozyt liegt eingebettet in einer basophilen, perizellulären Matrix [256, 257]. Diese wird auch Knorpelhof genannt [256, 257]. Die Matrix ist reich an Proteoglykanen und enthält u.a. das für diese Schicht spezifische Typ-VI-Kollagen, welches direkt mit den Oberflächenrezeptoren der Knorpelzellen interagiert und hierüber eine Zellverankerung sowie Signalübertragungen zwischen Matrix und Zelle ermöglicht [27, 61]. Chondrozyten organisieren sich in Funktionseinheiten, den sogenannten Chondronen [256, 257]. Ein Chondron besteht aus einem Chondrozyt oder einem Zusammenschluss mehrerer Chondrozyten und wird von einer perizellulären Kapsel umschlossen [256, 257]. Chondrone sind wiederum von der territorialen Matrix umgeben [256, 257]. Die hierin enthaltenen Kollagenfasern bilden ein korbähnliches Geflecht, welches dem mechanischen Schutz der Chondrozyten dient [27, 211]. Zwischen der territorialen Matrix genannt [256, 257]. Diese enthält ebenfalls Proteoglykane und verschiedene Kollagenfaser-Typen, welche in dieser Region die größte Dichte und Dicke aufweisen [61, 161, 257].

#### Einleitung



Abbildung 1: Histologischer Aufbau der osteochondralen Einheit. Histologischer Schnitt eines Schafpräparates (Safranin O/Echtgrün-Färbung, 40x Vergrößerung).

Der im menschlichen Kniegelenk ca. 1-3 mm dicke hyaline Gelenkknorpel ist strukturell in vier Zonen gegliedert (Abbildung 1) [177, 227]. Jede dieser Zonen besitzt eine charakteristische Zellmorphologie und -zusammensetzung sowie charakteristische Typ-II-Kollagenfasern. Apikal liegt die zellfreie Lamina splendens [27]. Sie dient als mechanische Barriere und unterstützt ein reibungsfreies Gleiten der Knorpeloberflächen [27]. Hieran schließt sich die tangentiale Zone. Diese macht ca. 10-20% der gesamten Knorpeldicke aus [34, 293]. Sie enthält abgeflachte Chondrozyten in hoher Dichte, welche u.a. Lubricin produzieren [59]. Lubricin ist ein Protein, welches als Gelenkschmiermittel dient und eine reibungsfreie Gleitfähigkeit der Knorpeloberflächen aufrechterhält [59]. Die Kollagenfasern verlaufen in dieser Zone tangential zur Knorpeloberfläche. Die nach kaudal folgende transitionale Zone mit willkürlichem Kollagenfaserverlauf (schräg und tangential) stellt ca. 40-60% der Knorpelgesamtdicke dar und enthält rundliche Chondrozyten. Hier sind die Zellen am wenigsten dicht angeordnet [34, 59]. Die tiefe basale Zone mit vertikalem Kollagenfaserverlauf macht ca. 30% der Knorpelgesamtdicke aus [59]. Die Knorpelzellen sind in dieser Zone in Säulen angeordnet, welche wie die Kollagenfasern senkrecht zur Knorpeloberfläche ausgerichtet sind [34, 59]. Den vier Knorpelzonen schließt sich die kalzifizierte Knorpelschicht an [59, 226]. Diese besteht aus hypertrophen Chondrozyten sowie vorwiegend Typ-X-Kollagen [177, 226], hat einen hohen Mineralsalzgehalt und liegt dem subchondralen Knochen

unmittelbar auf [234]. Zwischen der tiefen Zone und dem kalzifizierten Knorpel befindet sich eine histologisch nachweisbare Grenzlinie (engl. *tidemark*) [177]. Dieser wird zusammen mit dem kalzifizierten Knorpel eine entscheidende Rolle in der Übertragung von Druck- und Scherkräften vom Knorpel auf den darunterliegenden subchondralen Knochen zugeschrieben [177]. Die Grenzlinie stellt eine 3D-Schicht mit dreischichtigem Aufbau dar [173, 174, 177]. Durch die Grenzlinie treten Typ-II-Kollagenfasern von der basalen Zone in den kalzifizierten Knorpel hinein [177, 226]. Sie bewirken eine mechanisch feste Verbindung zwischen diesen beiden Schichten.

#### 3.2.2 Subchondraler Knochen

Direkt unterhalb der kalzifizierten Knorpelschicht liegt der subchondrale Knochen (Abbildung 1) [177, 226]. Die sogenannte Zementlinie (*cement line*) trennt beide Schichten voneinander [177, 226]. Subchondraler Knochen und kalzifizierte Knorpelschicht sind dreidimensional miteinander verbunden [134, 177, 225, 226]. Der wellenförmige Verlauf dieser Verbindungszone ermöglicht eine suffiziente Übersetzung von Scherkräften in Zug- und Druckbelastungen [98, 226].

Der subchondrale Knochen setzt sich zusammen aus subchondraler Knochenplatte und subartikulärer Spongiosa (Abbildung 1) [177]. Der Knochen enthält vorwiegend Typ-I-Kollagen [226]. Die subchondrale Knochenplatte besteht ähnlich der Knochenkortikalis aus dichtem Lamellenknochen [177, 226]. Sie setzt sich aus mehreren ca. 0,2-0,4 mm dicken Platten zusammen, welche schmale 0,4-0,6 mm weite Hohlräume honigwabenartig umschließen [177, 226, 287]. Die subchondrale Knochenplatte ist durch-setzt von kleinen Kanälen und Hohlräumen [177]. Sie trennt die kalzifizierte Knorpelschicht vom Knochenmarkraum der subartikulären Spongiosa [67, 177, 226]. Letztgenannte besteht aus einem Trabekel-netzwerk, welches aus der subchondralen Knochenplatte entspringt [182, 226]. Die Knochentrabekel sind vorwiegend rechtwinklig zur Gelenkoberfläche ausgerichtet und durch dünnere, tangential ausgerichtete Trabekel querverbunden [177]. Zwischen den Knochentrabekeln liegen relativ weite Hohl-räume, welche den Knochenmarkraum bilden [226]. Dieser enthält Fettzellen, Endothelzellen, aber auch mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen sowie Blutgefäße [226]. Die Festigkeit der subartikulären Spongiosa korreliert mit ihrer Trabekeldichte [112, 226]. Fingerartige, enge, gefäßführende Knochenkanäle treten aus der subartikulären Spongiosa in die subchondrale Knochenplatte ein [177, 226] und reichen bis in die kalzifizierte Knorpelschicht hinein [103, 177, 226].

Hinsichtlich ihrer Anatomie und Beschaffenheit erscheint die subchondrale Knochenregion variabel [134, 177, 226]. Dichte, Dicke, biochemische Zusammensetzung und mechanische Eigenschaften des subchondralen Knochens sowie Beschaffenheit und Dichte des Gefäßnetzes und der Knochenkanäle

variieren abhängig von Gelenktyp, Lokalisation innerhalb des Gelenkes, von den auf sie wirkenden Belastungen, vom Alter und von genetischen Einflüssen [9, 44, 55, 67, 134, 163, 177, 201, 203, 226]. Der subchondrale Knochen befindet sich weiterhin in einem ständigen Anpassungs- und Remodellierungs-Prozess [55, 177, 226]. So weist der subchondralen Knochen beispielsweise in Zonen größerer Belastung eine höhere Dichte, Dicke und Gefäßversorgung als in mechanisch unbelasteten Regionen auf [177].

#### 3.2.3 Osteochondrale Einheit

Einerseits scheinen Gelenkknorpel sowie subchondraler Knochen hinsichtlich ihrer biomechanischen und physiologischen Abläufe getrennt und unabhängig zu funktionieren [182, 226], allerdings bilden diese Gewebe physiologisch und pathophysiologisch betrachtet eine gemeinsame Funktionseinheit [100, 226]. Diese funktionelle Einheit setzt sich aus nicht kalzifiziertem Gelenkknorpel, kalzifiziertem Knorpel, subchondraler Knochenplatte und subartikulärer Spongiosa zusammen (Abbildung 1) [177, 226] und ist anatomische Grundlage für eine gesunde Gelenkhomöostase [122, 271].

Der subchondrale Knochen besitzt eine höhere Steifigkeit und Festigkeit als der Gelenkknorpel [54, 170, 177]. Daher fungiert er vorwiegend als Formgeber für die Gelenkkontur. Der Gelenkknorpel erfüllt u.a. die Funktion eines Lastträgers und -verteilers [135, 165, 177, 226, 262, 265]. Die Schicht des kalzifizierten Knorpels dient als Pufferzone, um Druckspitzen zwischen Gelenkknorpel und steiferem subchondralen Knochen zu minimieren [177, 226] und reguliert den Diffusionsaustausch zwischen beiden Schichten [225, 226]. In ihrer Einheit ermöglichen sie eine harmonische Druck- und Lastverlagerung im Rahmen von Gelenkbelastung und -bewegung [75, 98, 226]. Hierbei absorbiert die subchondrale Knochenschicht den Großteil der Gelenkbelastung (ca. 30%), die Gelenkknorpelschicht lediglich ca. 1-3 % [177, 226, 261, 265].

Die subchondrale Knochenschicht nimmt eine Schlüsselrolle im Metabolismus des Gelenkknorpels ein [182, 226]. Über das arterielle und venöse Gefäßsystem der subchondralen Knochenplatte bestehen Verbindungen zwischen dem blutreichen subchondralen Knochenmark und dem eigentlich avaskulären Gelenkknorpel [55, 165, 177, 191, 226, 232]. Gefäßkanäle treten aus der subchondralen Knochenplatte in die kalzifizierte Knorpelschicht bis an die Grenzlinie heran und ermöglichen eine Versorgung der tiefen Gelenkknorpelschichten mit Nährstoffen [7, 124, 165, 177, 225, 226, 232, 251]. Überdies enthält die subchondrale Knochenschicht eine hohe Dichte an Nervenendigungen, welche bis in die kalzifizierte Knorpelschicht hineinreichen [177]. Die Blutflussrate in der subchondralen Knochenplatte ist ca. 3-10fach höher im Vergleich zur subartikulären Spongiosa [232]. Hierdurch wird eine ausreichende

Nährstoffversorgung des Gelenkknorpels gewährleistet [135, 232]. Auch findet ein Transport von Signalmolekülen auf diesem Wege zwischen den einzelnen Schichten statt [75, 226]. Ohne derartige Verbindungskanäle würde der Gelenkknorpel ausschließlich per Diffusion über die Synovia mit Nährstoffen versorgt [177].

Ein Verständnis der komplexen Physiologie, Anatomie und Biomechanik der osteochondralen Einheit ist von herausragender Bedeutung für die Diagnostik, Therapie und Prävention von osteochondralen Pathologien und rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus [42, 165, 182, 295]. Pathologien des subchondralen Knochens führen u.a. durch mechanische Überbeanspruchung sowie durch inflammatorische Prozesse zu Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels, und umgekehrt [98, 162, 165, 177, 182, 226, 271]. So kann die Integrität der osteochondralen Einheit beispielsweise durch Gelenkpathologien wie Arthrose, Osteonekrosen, Osteochondrosis dissecans und traumatische Gelenkknorpelschäden gestört sein [42, 165, 177, 182, 226, 271]. Im Kontext der Therapie chondraler und osteochondraler Pathologien scheint eine möglichst physiologische Rekonstitution der osteochondralen Einheit u.a. für den Langzeiterfolg dieser Verfahren unabdingbar [49, 100, 115, 165, 226, 265, 271]. So muss hierbei nicht nur ein Reparaturgewebe induziert werden, welches die biomechanischen Eigenschaften des gesunden hyalinen Gelenkknorpels nachbildet, sondern auch eine möglichst physiologische Integration zum subchondralen Knochen sowie Homöostase der osteochondralen Einheit hergestellt werden [165]. Eine gestörte osteochondrale Einheit, z.B. durch Entwicklung von subchondralen Sekundärveränderungen wie Zysten, Osteophyten oder eine flächige Verdickung der subchondralen Knochenplatte, resultiert wiederum zumeist in einer minderwertigen Knorpelreparatur [263]. Die Weiterentwicklung bestehender Operationstechniken oder die Entwicklung von Biomaterialien soll die osteochondrale Reparatur weiter verbessern und ist Gegenstand der aktuellen Forschung [36, 90, 221, 222, 244, 295].

#### 3.3 Grundlagen der Kniegelenksanatomie

Das Kniegelenk ist eine Drehscharniergelenk. In diesem artikulieren drei Knochen miteinander (Abbildung 2). Distaler Oberschenkelknochen (Femur) und proximaler Schienbeinknochen (Tibia) bilden über die mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen der medialen und lateralen Femurkondylen sowie der korrespondierenden Kondylen des Tibiaplateaus das Femorotibialgelenk. Die Kniescheibe (Patella) sowie die Gleitrinne des distalen Femurs (*Trochlea femoris*) artikulieren als Patellofemoralgelenk. Beide Gelenke sind von einer gemeinsamen Gelenkkapsel umschlossen und werden durch verschiedene Bänder, Sehnen sowie Innen- und Außenmeniskus statisch und dynamisch stabilisiert. Die Patella ist als Hypomochlion in den Kniegelenksstreckapparat aus *Musculus quadriceps femoris* und Patellasehne integriert. Sie dient der Verlängerung des Hebelarmes des Knie-Streckapparates und vergrößert dessen Drehmoment. Die Rückfläche der Patella, welche durch mediale und laterale Patellafacette sowie zentralen Patellafirst gebildet wird, ist von Gelenkknorpel überzogen und gleitet im Zuge der Kniegelenksbeugung und -streckung zentriert in der kongruent rinnenartig geformten, ebenfalls knorpelig überzogenen Trochlea. Die Gelenkflächen der Trochlea setzen sich entsprechend aus einer medialen und lateralen Gelenkfacette und dem zentralen Gelenkfirst zusammen.



#### Abbildung 2: Darstellung der Kniegelenksanatomie am humanen Präparat.

(A) Ansicht von vorne mit Eröffnung der Gelenkkapsel und nach kaudal geklappter Patella. Schwarz gefüllter Kreis: Trochlea femoris mit Facies patellaris femoris; blauer Stern: laterale Femurkondyle; roter Stern: mediale Femurkondyle; blaue Pfeilspitze: zeigt auf die laterale Tibiakondyle; rote Pfeilspitze: zeigt auf die mediale Tibiakondyle.
 (B) Ansicht von lateral. (C) Transversalschnitt und tangentiale Röntgenbildgebung des Femoropatellargelenks. Vorlage der Abbildung: Prometheus LernAtlas [279].

#### 3.4 Systematik von Gelenkknorpeldefekten

Knorpeldefekte können fokal, umschrieben oder multifokal, disseminiert - wie im Rahmen der Arthrose - im Gelenk auftreten [234]. Knorpeldefekte werden hinsichtlich ihrer Tiefenausdehnung in chondrale und osteochondrale Knorpeldefekte unterteilt (Abbildung 3). Chondrale Knorpeldefekte reichen maximal bis an den subchondralen Knochen heran, eröffnen diesen jedoch nicht [234, 238]. Chondrale Knorpeldefekte werden nochmals in teilschichtige und vollschichtige Defekte unterteilt [234]. Osteochondrale Knorpeldefekte wiederum erstrecken sich bis in den subchondralen Knochen [234, 238]. Sie sind meist traumatisch bedingt, können jedoch auch im Rahmen einer Osteonekrose oder der Osteochondrosis dissecans entstehen [234]. Knorpelschäden werden mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) sowie im Rahmen einer Arthroskopie diagnostiziert und entsprechend klassifiziert. Gängige Klassifikationssysteme für die Beschreibung der Tiefenausdehnung von Knorpeldefekten sind die Klassifikation der *International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society* (ICRS) [32], nach Noyes und Stabler [223] oder nach Outerbridge [249].



Abbildung 3: Übersicht zur Einteilung von Knorpeldefekten.

(A) Teilschichtiger chondraler Defekt. (B) Vollschichtiger chondraler Defekt bis zur subchondralen Knochenschicht. (C) Osteochondraler Defekt bis in den subchondralen Knochen hinein. *Hellblau*: hyaliner Gelenkknorpel; *dunkel-blau*: kalzifizierter Knorpel; *gelb*: subchondraler Knochen; *violette Linie*: *Grenzlinie*. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [295].

Ist der hyaline Knorpel im Erwachsenenalter einmal beschädigt, besitzt er keine Fähigkeit zur Spontanregeneration [34]. Ein Ersatz durch vollwertigen hyalinen Gelenkknorpel - im Sinne einer Knorpelregeneration - ist nicht möglich [45, 234]. Beeinflusst von Tiefenausdehnung und Lokalisation des Knorpeldefekts findet lediglich eine Knorpelreparatur statt. Dadurch bildet sich bestenfalls ein dem normalen hyalinen Knorpel ähnliches Ersatzgewebes [234], welches jedoch nicht vollumfänglich die komplexe Mikroarchitektur und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels nachbildet [45]. Chondralen Knorpeldefekten fehlt der Zugang zum subchondralen Knochenmark und zum Gefäßsystem. Sie werden von Synoviozyten der Gelenkschleimhaut spärlich besiedelt [130, 132, 177, 284]. Theoretisch haben auch Fettgewebsstammzellen aus dem Hoffa-Fettkörper [234] sowie - durch intraartikuläre Einblutungen im Rahmen traumatischer Defekte - Zellen des Blutsystems [143] Anteil an den induzierten Reparaturprozessen. Es bildet sich hierdurch ausschließlich ein faserartiges Gewebe minderwertiger Qualität, welches den Defekt in der Regel nur unvollständig ausfüllt und mit dem angrenzenden gesunden Gelenkknorpel insuffizient verbunden ist [41, 139, 186, 234, 301]. Die angrenzenden gesunden Knorpelzellen wandern in der Regel nicht in die Defektregion ein und unterliegen meist einem Apoptoseprozess [148, 177, 304]. Das entstandene Reparaturgewebe hält den mechanischen Beanspruchungen nicht stand und degeneriert oftmals bereits nach Wochen bis Monaten [234]. Größere Defekte können sich dann in den angrenzenden Knorpel ausdehnen [56, 132] und im weiteren Verlauf in einer Arthrose münden [41, 42, 71].

Osteochondrale Defekte besitzen wiederum Zugang zum Knochenmark und Gefäßsystem des subchondralen Knochens. Hierüber bildet sich ein Blutgerinnsel im Defektbett, welches u.a. pluripotente Stammzellen enthält [85, 139, 284]. Unter dem Einfluss von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren differenzieren diese in Chondrozyten und Osteoblasten [234]. Im Zuge der nun ablaufenden Osteogenese und Chondrogenese wird im Defekt ein osteochondraler Reparaturvorgang angestoßen [60, 234]. Die induzierte Reparatur scheint zwar der Reparatur von chondralen Defekten überlegen, jedoch entsteht auch in osteochondralen Defekten lediglich ein strukturell und funktionell minderwertiges, faserknorpelartiges Reparaturgewebe, welches den Defekt in der Regel ebenfalls nur unvollständig ausfüllt und meist insuffizient mit dem angrenzenden gesunden Gelenkknorpel integriert ist [79, 85, 139, 177, 234, 284]. Der subchondrale Knochen sowie die osteochondrale Einheit bauen sich mit veränderter Struktur auf [134, 232]. Hierbei werden u.a. flächige Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte, eine gestörte Mikrostruktur des subchondralen Knochens sowie ein unvollständiger Wiederaufbau der Grenzlinie beobachtet [134, 177, 234, 237]. Nach einigen Monaten zeigt sich bereits eine beginnende Degeneration des Reparaturgewebes, welche über die folgenden Jahre fortschreitet [139] und zu einer Arthrose des betroffenen Gelenkes führen kann [71]. Kleinere osteochondrale Defekte weisen hierbei eine bessere Reparatur auf als große und tiefe Defekte [177], bei welchen auch der subchondrale Knochendefekt nicht vollständig wiederaufgebaut werden kann [139, 177].

#### 3.5 Operative Therapiestrategien fokaler chondraler Defekte

#### 3.5.1 Übersicht

Symptomatische, vollschichtige, fokale Gelenkknorpeldefekte ohne Zeichen einer höhergradigen Arthrose im restlichen Gelenk stellen die typische Indikation zu knorpelregenerativen Eingriffen dar [222]. Ziele einer operativen Behandlung sind die Erzeugung eines Ersatzgewebes, welches dem natürlichen Knorpelreparaturgewebe überlegen und dem angrenzenden, gesunden Gelenkknorpel biomechanisch gleichwertig ist, den Knorpeldefekt vollständig ausfüllt sowie stabil mit dem angrenzenden Gelenkknorpel und subchondralen Knochen verbunden ist. Die durchgeführte Therapie sollte in einer Verbesserung von Gelenkfunktion und -kongruenz, einer Schmerzreduktion sowie der Prävention arthrotischer Schädigungen benachbarter Knorpelareale resultieren [178, 181, 220]. Für eine entsprechende Indikationsstellung müssen folgende Voraussetzungen vorliegen bzw. geschaffen werden: 1. Es soll keine fortgeschrittene Arthrose des betroffenen Gelenkes (Kellgren und Lawrence Grad III oder IV [147]) vorliegen. 2. Der Knorpel der korrespondierenden Gelenkfläche soll nicht höhergradig geschädigt sein ( $\leq$  ICRS Grad II [32]). 3. Eine möglichst physiologische Beinachse soll vorliegen (maximale Achsabweichung von 5° Varus/Valgus [14, 136]). 4. Das Gelenk soll ligamentär stabil geführt sein. [36, 175, 222]

Ein praktikabler und in den meisten Therapieempfehlungen angewandter Parameter für die Verfahrensauswahl ist die Defektgröße [222, 316]. Andere wichtige Einflussfaktoren sind Patientenalter, -anspruch, Defektlokalisation, Knorpelstatus des restlichen Gelenkes, Begleitpathologien und Beinachse [222, 316]. Aufgrund der in den letzten Jahren gerade bezüglich des Kniegelenks verbesserten Studienlage, konnten durch die Arbeitsgemeinschaft "Klinische Geweberegeneration" der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU) klinische Empfehlungen hinsichtlich der Auswahl knorpelrekonstruktiver Operationsverfahren ausgesprochen werden [222]. Es ist zu betonen, dass sich diese von der Behandlung osteochondraler Knorpeldefekte unterscheiden; in letztgenanntem Fall muss die subchondrale Pathologie mitadressiert werden [222]. Ein besonderes Augenmerk wird im Folgenden auf die Knorpeltherapie am Kniegelenk gelegt.

#### 3.5.2 Defektdebridement

Das vorbereitende Defektdebridement vor knorpelchirurgischen Eingriffen (Abbildung 4) ist streng abzugrenzen von einem (heute nicht mehr leitliniengerechtem) Gelenkdebridement im Rahmen der symptomatischen Arthrosebehandlung, im Zuge dessen früher instabile Knorpelfragmente,

#### Einleitung

Meniskusauffaserungen, freie Gelenkkörper und synoviale Verwachsungen im Sinne einer Knorpelglättung mit Hilfe einer Fräse oder der Diathermie arthroskopisch entfernt wurden [184, 196, 294]. Auch ist das vorbereitende Defektdebridement nicht zu verwechseln mit dem oberflächlichen Debridement von teilschichtigen Knorpeldefekten, wobei ausschließlich instabile Knorpelfragmente beseitigt werden ohne ein Debridement in die Tiefe vorzunehmen [303, 314].





В



Dargestellt ist das Defektdebridement mit vollständiger Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht und Schaffung stabiler Defektränder am Schafmodell. (A) Safranin O-gefärbter histologischer Schnitt eines debridierten Gelenkknorpeldefekts. *Pfeilspitzen*: Defektränder nach Debridement; Maßstab: 2 mm. (B) Makroskopisches Bild eines debridierten Gelenkknorpeldefektes. *Gestrichelte schwarze Linie*: Begrenzung des debridierten Gelenkknorpeldefekts; Maßstab: 4 mm. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [295].

Ein Defektdebridement im eigentlichen Sinne wird routinemäßig vor Eröffnung des Markraums oder sonstiger Knorpeltherapie durchgeführt. Es umfasst zwingend die Entfernung instabiler und unterminierter Knorpelfragmente im Bereich des zu behandelnden Knorpeldefektes zur Schaffung stabiler Randwälle zum angrenzenden gesunden Gelenkknorpel sowie eine flächige Freilegung der Oberfläche der subchondralen Knochenplatte am Defektgrund unter Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht [82, 183, 300] (Abbildung 4). Auch sollten Defektränder mit stabilen Randwällen und vitalem Knorpelgewebe geschaffen werden als Voraussetzung für eine suffiziente Integration des Reparaturgewebes zum angrenzenden Gelenkknorpel [304]. Beschädigte, avitale Knorpelfragmente können im Rahmen der Knorpelreparatur nicht resorbiert werden und verhindern eine stabile Integration [304]. Die präparierten Defektränder sollten rechtwinklig zum subchondralen Knochen verlaufen [111]. Ein stumpfes und zu aggressives Debridement wiederum verstärkt die Apoptose von Chondrozyten im angrenzenden Knorpelgewebe [131, 304] und kann die Integration des Reparaturgewebes verschlechtern [171, 304]. Das Defektdebridement wird mit Hilfe von Küretten, motorisierten Fräsen oder eines Skalpells durchgeführt [82, 304]. Das verwendete Instrument sollte in diesem Zusammenhang einerseits den angrenzenden gesunden Gelenkknorpel und subchondralen Knochen schonen [6, 82, 131, 304], andererseits eine ausreichende Tiefe des Defektdebridements gewährleisten [66].

#### 3.5.3 Markraumeröffnende Verfahren

Der Begriff der markraumeröffnenden Verfahren fasst die Techniken der Mikrofrakturierung [297], der fokalen Abrasion [140] sowie der subchondralen Anbohrung [260, 289] zusammen. Diese sind weiterhin die Standardmethoden zur Behandlung von kleinflächigen, vollschichtigen chondralen Läsionen (≤ 2 cm<sup>2</sup>) [8, 206, 209, 222, 298, 302]. Ergänzt um in den Defekt eingebrachte, resorbierbare Matrizes besteht für diese (im deutschsprachigen Raum dann als "Matrix-augmentierte markraumeröffnende Verfahren" bezeichnete Methoden) sogar im Grenzbereich zur autologen Knorpelzelltransplantation eine relative Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft "Klinische Geweberegeneration" der DGOU bis zu einer Defektgröße von 4,5 cm<sup>2</sup> [146, 221, 222, 295].

Mit Hilfe von speziellen Ahlen (Mikrofrakturierung) [297], Kugelfräsen (fokale Abrasion) [140] sowie Kirschnerdrähten oder chirurgischen Bohrern (subchondrale Anbohrung) [260, 289] wird eine Verbindung des mittels Debridements vorbereiteten Knorpeldefektes mit dem subchondralen Markraum geschaffen [295]. Hierdurch entsteht ein Blutgerinnsel aus Knochenmarkinhalten im Knorpeldefekt, welches unter anderem mesenchymale Stammzellen sowie Wachstumsfaktoren enthält [238, 284, 295]. Im Rahmen der nachfolgend induzierten Chondrogenese entsteht ein faserknorpeliges Reparaturgewebe, welches den Defekt teil- bis vollständig ausfüllt [48, 50, 68, 95, 107, 159, 168, 198, 208, 235, 239, 243, 284, 295, 297, 298]. Die hierdurch induzierte osteochondrale Reparatur zeigt sich dem natürlichen Heilungsverlauf und auch einem alleinigen Defektdebridement überlegen [50, 53, 80, 81, 95, 107, 168, 243, 295]. Markraumeröffnenden Verfahren finden im klinischen Alltag aufgrund ihrer einfachen Handhabung, Kosteneffektivität und geringen Invasivität weiterhin verbreitet Anwendung in der Therapie vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte [209, 212, 273, 281, 295, 300, 319]. Diese Techniken sind breit verfügbar und können ohne größeren Vorbereitungsaufwand eingesetzt werden. Dies ist insofern vorteilhaft, als dass Knorpeldefekte oftmals als Zufallsbefund im Rahmen einer Arthroskopie diagnostiziert werden [77, 150, 185] und eine entsprechende Therapie gegebenenfalls kurzfristig indiziert werden muss. Im Bereich des Kniegelenks werden vorwiegend die Techniken der subchondralen Anbohrung und Mikrofrakturierung verwendet [158, 159, 281, 295, 298]. Es zeigen sich befriedigende kurz- und mittelfristige Ergebnisse [24, 154, 156, 209, 244, 299]. Jedoch wird 1,5 [160], 3 [275] und 5 Jahre [308] postoperativ eine voranschreitende Abnutzung des entstandenen Reparaturgewebes [177, 205, 276, 298] beobachtet [159, 244, 273, 295]. Im Langzeitverlauf können Funktionsverbesserung und Schmerzlinderung weiter abnehmen [24, 244], auch wenn bis 15 Jahre nach Operation immer noch zufriedenstellende Ergebnisse dokumentiert sind [244].

#### 3.5.3.1 Subchondrale Anbohrung

Die subchondrale Anbohrung wurde erstmals von Ian Scott Smilie 1957 zur Therapie der Osteochondrosis dissecans beschrieben [289, 295]. Kenneth Pridie veröffentlichte 1959 diese Technik zur Therapie degenerativer Knorpelläsionen [260, 295]. Der subchondrale Knochenmarksraum wird durch rechtwinklig zur debridierten Defektoberfläche angelegte Bohrkanäle mit Hilfe von chirurgischen Bohrern oder Kirschner-Drähten eröffnet [48, 89, 260, 289, 295]. Der Bohrvorgang sollte zur Vermeidung von Hitzenekrosen und zur besseren Beseitigung von Bohrmehl unter kontinuierlicher, kühlender Spülung erfolgen [48, 89, 295]. Eine Mindesteindringtiefe von 3-4 mm ist im klinischen Kontext zur sicheren und vollständigen Eröffnung der gegebenenfalls durch Sklerose verdichteten subchondralen Knochenplatte empfohlen [50, 123, 295].

#### 3.5.3.2 Mikrofrakturierung

Die Mikrofrakturierung zur Behandlung vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte wurde von John Richard Steadman in den 1980er Jahren entwickelt [297]. Erstmals wurden die klinischen Ergebnisse der Methode 1997 veröffentlicht [297]. Mit Hilfe unterschiedlich stark abgewinkelter Ahlen werden Mikrofrakturlöcher mit einer Tiefe von 2-4 mm in der subchondralen Knochenplatte erzeugt [300]. Steadman propagierte eine verbesserte Integration des entstehenden Reparaturgewebes zum subchondralen Knochen durch Anrauung der Knochenoberfläche sowie eine Vermeidung möglicher Hitzenekrosen im angrenzenden subchondralen Knochen [300]. Da die Technik der Mikrofrakturierung als Weiterentwicklung der bestehenden markraumeröffnenden Verfahren galt und gut unter arthroskopischer Sicht anwendbar ist, erfreute sich dieses Verfahren in den letzten Jahrzehnten großer Beliebtheit in der klinischen Anwendung [195, 295].

#### 3.5.3.3 Abrasionsarthroplastik

Die fokale Abrasion ist eine lokale Anwendung der Technik der Abrasionsarthroplastik, welche durch Lanny Leo Johnson in den späten 1970er Jahren zur Therapie von arthrotischen Knorpeldefekte entwickelt wurde [22]. Klinische Ergebnisse wurden erstmals 1987 veröffentlicht [22, 140, 142, 295]. Im Rahmen der Abrasion wird die subchondrale Knochenplatte des Defektgrundes mit Hilfe einer Kugelfräse flächig bis zu einer Tiefe von ca. 1-1,5 mm ausgedünnt [155]. Es erfolgt ein oberflächliches Abtragen abgestorbener Osteone mit Eröffnung des Gefäßnetzes der subchondralen Knochenplatte [143]. Johnson empfahl, noch bestehende Knorpelinseln im Defektbett zur Unterstützung der angestoßenen Knorpelreparatur zu belassen [143]. Dieses Verfahren ist strikt abzugrenzen von der 1979 beschriebenen Spongiosation nach Ficat, im Rahmen welcher die subchondrale Knochenplatte unter Freilegung der subartikulären Spongiosa bis zu einer Tiefe von 2-3 mm entfernt wird [73]. Bei der Abrasionsarthroplastik sollte jedoch eine Eröffnung der subartikulären Spongiosa vermieden werden, da diese zu einer verschlechterten osteochondralen Reparatur führt [140, 143]. Die Technik der fokalen Abrasion wird heutzutage vorwiegend zur Behandlung isolierter, kleiner, chronisch degenerativer Knorpeldefekte mit begleitender Verdickung und Sklerose der angrenzenden subchondralen Knochenplatte verwendet [273, 300].

#### 3.5.4 Autologe Chondrozytentransplantation

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) wird seit 1987 klinisch zur Behandlung von vollschichtigen Knorpeldefekten im Kniegelenk angewandt. Klinische Ergebnisse wurden erstmals 1994 von Lars Peterson und Matts Brittberg veröffentlicht [33, 219]. Die Methode wurde in den letzten Jahrzehnten stetig weiterentwickelt, sodass mittlerweile verschiedene Generationen der Technik existieren [188, 219]. Es handelt sich um ein zweizeitiges Vorgehen. Im Rahmen der ersten Operation werden zunächst arthroskopisch osteochondrale Zylinder aus weniger belasteten, gesunden Gelenkbereichen entnommen [36, 175]. In spezialisierten Laboren werden die Knorpelzellen anschließend enzymatisch isoliert und kultiviert [36, 175]. In einer Zweitoperation (3-6 Wochen später) werden die Zellen in den zuvor präparierten Knorpeldefekt eingebracht [36, 175]. In der Orginaltechnik (erste Generation der autologen Chondrozytentransplantation) wurde der Knorpeldefekt mit einem an den angrenzenden, gesunden Gelenkknorpel angenähten Periostlappen überdeckt und die kultivierten Zellen in Form einer Suspension hierunter injiziert [175]. Weiterentwicklungen umfassen die Verwendung von Biomaterialien (v.a. Typ-I/III-Kollagenmembranen) zur Abdeckung des Defektes (zweite Generation) sowie das Einbetten der kultivierten Knorpelzellen in 3D-Biomaterialien (membran- oder hydrogelbasiert) vor Implantation in den Defekt (dritte Generation, Matrix-gekoppelte autologe Chondrozytentransplantation) (MACT)) [8, 36, 70, 127, 228]. Neueste Entwicklung auf dem Gebiet der autologen Chondrozytentransplantation ist das Konzept eines trägermaterialfreien 3D-Systems (Sphäroidaltechnik), wobei sich die kultivierten Knorpelzellen zu hochdichten Zellhaufen (Sphäroide) zusammenlagern und in ihrer selbsterzeugten extrazellulären Matrix eingebettet sind [8, 36, 74]. Anschließend können die autologen Zellen im Trägermaterial eingebettet teilweise sogar arthroskopisch in den Knorpeldefekt transplantiert werden [36, 202]. Die ACT soll verglichen mit den markraumeröffnenden Verfahren zu einer strukturell verbesserten Knorpelreparatur führen [30, 33, 248, 319] mit zufriedenstellenden klinischen Langzeitergebnissen [119, 206]. In der Behandlung von mittel- bis großflächigen chondralen Defekten (2-10 cm<sup>2</sup>) scheinen sie insbesondere bei jüngeren, aktiven Patienten (< 50 Jahre) den markraumeröffnenden Verfahren überlegen zu sein [1, 19, 35, 36, 156, 219, 222, 319].

#### 3.5.5 Osteochondrale Transplantation

Die autologe osteochondrale Transplantation (OCT) hat in der Therapie rein chondraler Knorpeldefekte in den letzten Jahren an Bedeutung verloren [222]. Angewandt wird sie bei kleinflächigen ( $\leq$  1-1,5 cm<sup>2</sup>), vorwiegend osteochondralen Defekten [222]. Bereits 1964 berichtete Heinz Wagner von der autologen osteochondralen Transplantation zur Behandlung der Osteochondrosis dissecans [312]. Die Technik wurde in den 1990er Jahren weiterentwickelt [25, 110, 192] und kann durch die Entwicklung des *Osteochondral Autograft Transfer System* (OATS) auch arthroskopisch durchgeführt werden [278]. Hierbei werden osteochondrale Zylinder aus einer gesunden Gelenkregion außerhalb der Hauptbelastungszone entnommen und in der sogenannten *press-fit*-Technik in den vorbereiteten Defekt knöchern eingepasst [109]. Die Technik der Mosaikplastik [109, 110] mit Einbringen mehrerer kleiner Knorpel-Knochen-Zylinder zur Therapie größerer Knorpeldefekte wird aktuell aufgrund der Problematik am *Interface* der einzelnen Zylinder, einer kritischen Vitalität des zentralen Zylinders sowie der bestehenden Entnahmemorbidität nicht mehr empfohlen [14, 222]. Zur Therapie größerer osteochondraler Defekt können prinzipiell osteochondrale *Allografts* verwendet werden [46], welche jedoch aufgrund der Rechtslage in Deutschland aktuell nicht zur Verfügung stehen [222].

#### 3.6 Osteochondrale Reparatur nach Markraumeröffnung

#### 3.6.1 Biologie der osteochondralen Reparatur

Die Grundzüge der durch ein markraumeröffnendes Verfahren angestoßenen Reparaturprozesse vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte wurden in Tierstudien detailliert beschrieben und sind gut verstanden [183, 198, 204, 207, 284]. Eine Schlüsselrolle nehmen hierbei pluripotente mesenchymale Stammzellen aus dem subchondralen Knochenmark ein, welche sich unter anderem zu Chondrozyten und Osteozyten - wichtige Zellreihen der osteochondralen Einheit - differenzieren können [50, 53, 183, 198]. Zunächst füllt sich der präparierte Gelenkknorpeldefekt in den ersten Stunden durch die angelegten Verbindungskanäle mit flüssigen Knochenmarkinhalten [183, 284]. Ähnlich der normalen Wundheilung wird durch Kontakt einwandernder Thrombozyten mit freiliegendem Kollagen an der Defektbasis eine Gerinnungskaskade aktiviert [183]. Durch Polymerisation von Fibrin und Zelladhäsion bildet sich ein Blutkoagel, das den Defekt ausfüllt [183]. Im Laufe der ersten Tage wird dieses Blutkoagel unter anderem durch das Wirken von neutrophilen Granulozyten und Monozyten umgebaut und ein 3D-Grundgerüst aus arkardenartig aufgespannten Kollagenfasersträngen entsteht [183, 284]. Dieses bietet einerseits ein optimales Milieu für die weiteren Reparaturprozesse und schützt andererseits den freiliegenden subchondralen Knochen vor mechanischer Schädigung [183]. Durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Botenstoffen wandern über die folgenden Wochen immer mehr Stammzellen, perivaskuläre Zellen und Gefäße in den Defekt ein [183, 284]. Im Rahmen der Chondrogenese und Osteogenese proliferieren die pluripotenten Stammzellen und durchlaufen einen Differenzierungsprozess [183, 284]. Die entstehenden Chondrozyten beginnen mit der Produktion knorpelspezifischer Matrix und ein gelenkknorpelartiges Reparaturgewebe entsteht in den ersten Wochen, welches den Defekt in der Regel vollständig ausfüllt [198, 207, 284]. Dieses wird jedoch im Verlauf zunehmend faserknorpelartig umgebaut [207, 284] und beginnt bereits nach einigen Wochen zu degenerieren [284]. Die angestoßenen Reparaturprozesse führen zur Bildung eines biomechanisch und strukturell minderwertigen, fibrokartilaginären Reparaturgewebes [96, 137, 140, 183, 204, 238, 244, 260, 263, 281, 292, 295, 298]. Durch Sekretion von Angiogenesefaktoren wird überdies eine Gefäßeinwanderung in den Defekt stimuliert [183]. Hierdurch wird die Reparatur des eröffneten subchondralen Knochens durch Knochenumbauprozesse wie Resorption und enchondrale sowie intramembranöse Ossifikation eingeleitet [183, 198, 263, 284]. Die angelegten Knochenkanäle verschließen sich hierbei aus der Tiefe hin zur Oberfläche [198]. Diese Prozesse resultieren zumeist in einer nur unvollständigen und gestörten Rekonstruktion der Knochenmikrostruktur sowie der osteochondralen Grenzzone [48, 49, 68, 235, 238, 243, 263, 295]. Hiervon sind sowohl die subchondrale Knochenplatte als auch die subartikuläre Spongiosa betroffen [235]. Begleitende mikroarchitektonische Veränderungen sind typischerweise eine Verminderung des Mineralsalzgehaltes, des relativen Knochenvolumens sowie der Trabekeldicke [157, 235]. Des Weiteren wird oftmals die Entstehung subchondraler Sekundärveränderungen induziert [86, 87, 91, 235, 238, 263, 295]. Die Grenzzone der osteochondralen Einheit bildet hierdurch meist eine irregulär geformte Oberfläche aus und ist in ihrer Funktion gestört [263]. Diese subchondralen Veränderungen werden im folgenden Unterkapitel beschrieben.

#### 3.6.2 Subchondrale Sekundärveränderungen nach Markraumeröffnung

Subchondrale Sekundärveränderungen wie intraläsionale Osteophyten, eine flächige Verlagerung bzw. Verdickung der subchondralen Knochenplatte und subchondrale Zysten (Abbildung 5) treten sowohl in präklinischer als auch klinischer Anwendung bereits wenige Wochen nach Operation auf [238]. Sie zeigen sich im weiteren Verlauf - 6 bis 12 Monate postoperativ - weiter zunehmend [210] und werden in bis zu 75% der behandelten Defekte beobachtet [37, 48, 49, 57, 58, 68, 82, 86, 91, 105, 153, 160, 205, 208, 210, 235, 243, 274, 275, 295, 298]. Ein intraläsionaler Osteophyt ist definiert als fokal innerhalb der Knorpeldefektregion über die Begrenzung der subchondralen Knochenplatte (Zementlinie) hinauswachsender Knochen, welcher sich gelenkwärts in das Gelenkknorpel- oder Reparaturgewebe hinein projiziert oder auch freiliegen kann [238]. Dieser kann zentral im Defekt oder peripher an den Defekträndern lokalisiert sein und ist abzugrenzen von einer flächigen Verlagerung bzw. Verdickung der subchondralen Knochenplatte [177]. Genannte knöcherne Überwucherungen entstehen durch metaplastische, enchondrale Ossifikationsprozesse in den tiefen Regionen des Knorpelgewebes und oberflächlichen Schichten des subchondralen Knochens sowie durch überschießende intramembranöse Ossifikation im Rahmen des Wiederaufbaus der subchondralen Knochenschicht nach Eröffnung [232, 284]. Subchondrale Knochenzysten wiederum sind teils mit Flüssigkeit sowie gemischt osteochondral und fibrösem Gewebe gefüllte, nicht epithelial ausgekleidete Hohlräume innerhalb des subchondralen Knochens [16, 91, 167]. Sie entwickeln sich durch Einwirkung hydraulischer Kräfte auf den freiliegenden subchondralen Knochen [91] und in Folge von lokalen Inflammationsprozessen [82, 269]. Ursächlich für die beschriebenen Vorgänge sind verschiedene Faktoren [177, 182, 232]. Einerseits werden durch mechanische Reize der chirurgischen Instrumente auf den subchondralen Knochen und durch die Eröffnung des subchondralen Knochens selbst Inflammations- und Umbauprozesse induziert [48, 49, 76, 91, 230, 232]. Hierbei scheint bereits das vorbereitende Defektdebridement abhängig seiner Tiefe relevante Impulse zu setzen [50, 87, 210]. Überdies bietet das im Vergleich zum hyalinen Gelenkknorpel strukturell minderwertige Reparaturgewebe dem subchondralen Knochen nur einen begrenzten Schutz vor Druck- und Scherbelastungen [76, 232, 238, 263, 295]. Durch die resultierenden mechanischen Reize werden ebenfalls pathologische Signalkaskaden und Prozesse aktiviert [76].





Schematische Darstellung von Mikro-CT-Bildern subchondraler Sekundärveränderungen am Schafmodell. (A) Intraläsionale Osteophyten. (B) Verlagerung bzw. Verdickung der subchondralen Knochenplatte. (C) Subchondrale Knochenzyste. *Weiße Sterne*: subchondrale Sekundärveränderungen; *Pfeilspitzen*: Knorpeldefektgrenzen; *gestrichelte rote Linien*: Verlauf der Oberfläche einer normalen subchondralen Knochenplatte. Maßstab: 2 mm. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [295].

Subchondrale Sekundärveränderungen stören die Integrität der osteochondralen Einheit [238, 263, 295]. Der Nährstoffaustausch zwischen subchondralem Knochen und Knorpelgewebe ist durch die veränderte Dichte des subchondralen Knochens und veränderte Druckverhältnisse in den blutführenden Knochenkanäle gestört [165]. Veränderungen der Rigidität und Festigkeit des subchondralen Knochens [262, 263, 267, 271] wiederum beeinträchtigen die Absorption und Umverteilung von Druck- und Scherbelastungen in den betroffenen osteochondralen Regionen [114, 166, 226, 263, 271, 305]. Im Speziellen dünnen Osteophyten und flächige Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte das hierüberliegende Knorpelreparaturgewebe aus [199, 210, 238, 263, 282, 284, 295], wodurch sich dessen Widerstandsfähigkeit vermindert [3, 129, 263]. Diese Prozesse leisten einer zunehmenden Degeneration des Knorpelreparaturgewebes sowie des angrenzenden Gelenkknorpels Vorschub [165, 263, 264, 266, 268, 295]. Ähnliche Vorgänge sind auch im Rahmen der Arthrose zu beobachten [165, 182, 226, 262, 267]. Den Sekundärveränderungen des subchondralen Knochens wird daher eine gewichtige prognostische Rolle für den Langzeitverlauf nach markraumeröffnenden Verfahren zugesprochen [58, 86, 91, 177, 183, 205, 210, 232, 238, 263, 298].

#### 3.7 Konzept der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Einfluss der Bohrlochdichte auf die osteochondrale Reparatur von kleinen, vollschichtigen Knorpeldefekten in den Kniegelenken ausgewachsener Schafe. Hierfür erzeugten wir standardisierte Knorpeldefekte in der lateralen Trochlea, welche alle bis zur subchondralen Knochenplatte debridiert wurden mit vollständiger Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht, ohne diese jedoch zu verletzen [68, 243]. Die debridierten Knorpeldefekte wurden ohne Therapie als Kontrollgruppe verwendet oder zusätzlich in den beiden Therapiegruppen mit 2 oder 6 subchondralen Bohrlöchern behandelt. Die osteochondrale Reparatur wurde *ex vivo* mittels erprobter [68, 86, 87, 97, 233, 235, 236, 243, 245] (semi-) quantitativer makroskopischer, histologischer, immunhistochemischer, biochemischer und Mikro-Computertomographie (CT)-Verfahren im Detail untersucht.

Die Einflüsse verschiedener technischer Variablen markraumeröffnender Verfahren wurden in der Vergangenheit in präklinischen Studien beleuchtet [48, 50, 66, 68, 82, 243, 245, 295]. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten die Anwendung im klinischen Alltag verbessern [222, 295]. Die Bedeutung der Bohrlochdichte sowie der genaue Effekt eines alleinigen Defektdebridements für die osteochondrale Reparatur von Knorpeldefekten wurden hierbei bisher jedoch noch nicht untersucht. Andererseits wird diskutiert, ob eine Eröffnung des subchondralen Knochens nach erfolgtem Defektdebridement überhaupt notwendig ist [22, 111, 143, 172, 303]. Daher bewerteten wir zusätzlich die Wirkung der subchondralen Anbohrung *per se* im Vergleich zu einem alleinigen Defektdebridement.

Unsere Untersuchungen führten wir am Großtiermodell Schaf durch. Das Schafmodell hat sich in der präklinischen Knorpelforschung am Kniegelenk aufgrund der anatomischen und biologischen Ähnlichkeiten zum menschlichen Kniegelenk hinsichtlich der Übertragbarkeit in den klinischen Kontext als günstig erwiesen [64, 68, 95, 180, 227, 235, 243, 245]. Um den Einfluss anderer Faktoren, welche den osteochondralen Reparaturprozess beeinflussen können, zu minimieren, wurden alle weiteren technischen Variablen neben der Bohrlochdichte konstant gehalten (Instrumente, Bohrlochtiefe, Bohrlochdurchmesser, Defektgröße, -lokalisation und -tiefe etc.). Als Nachbeobachtungszeitpunkt wurden, basierend auf vorgehenden Großtierstudien [68, 235, 241, 243], sechs Monate gewählt. Dies bildet im klinischen Kontext einen mittelfristigen postoperativen Verlauf zufriedenstellend ab. In der vorliegenden Studie verglichen wir drei Gruppen miteinander (2 Bohrlöcher; 6 Bohrlöcher; Debridement). Hierfür wählten wir ein gemischt uni-/bilaterales Studiendesign, um die Anzahl der zu operierenden Schafe zu reduzieren [241].

# 4 Fragestellungen

In einer Großtierstudie überprüften wir folgende Hypothesen:

- Die subchondrale Anbohrung mit höherer Bohrlochdichte verbessert die osteochondrale Reparatur von kleinen, vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten gegenüber einer Behandlung mit niedrigerer Bohrlochdichte.
- Die subchondrale Anbohrung führt *per se* zu einer verbesserten Reparatur von kleinen,
  vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement.
- Die subchondrale Anbohrung führt zu einer höhergradigeren Schwächung des subchondralen Knochens als das alleinige Defektdebridement.

# 5 Material

#### 5.1 Chemikalien

Die Chemikalien für die Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden im Allgemeinen von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen spezieller Chemikalien waren:

Chemikalie	Hersteller
ABC-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Ameisensäure	Uniklinikum des Saarlandes, Apotheke
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BSA	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Caprofen	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Dimethylmethylenblau	Serva (Darmstadt, Deutschland)
Echtgrün (FCF)	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (100 %)	Uniklinikum des Saarlandes, Apotheke
Fenpipramid/Levomethadon (0,25 %)	MSD (Unterschleißheim, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin nach Weigert	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isofluran (1,5 %)	Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
Paraffin-Granulat "Roti Plast"	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Albrecht (Aulendorf, Deutschland)
Propofol (1 % und 2 %)	AstraZeneca (Wedel, Deutschland)
Ringer-Lactat-Lösung	Baxter (Deerfield, IL, USA)
Roti Histokitt II	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 1: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Safranin O	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Standard-DNS-Lösung (10µg/ml; Kalbsthymus)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
T61	MSD (Rahway, NJ, USA)
Tusche, schwarz	Pelikan (Hannover, Deutschland)
Xylazin (1 %)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Xylol	Fischar (Saabrücken, Deutschland)

# 5.2 Puffer und Lösungen

Die aufgeführten Lösungen wurden mit aqua bidest angesetzt.

Tabelle 2: Puffer	<sup>.</sup> und Lösungen.
-------------------	----------------------------

Puffer/Lösung	Inhaltsstoff	Konzentration/Menge/Volumen
Blockierungspuffer	BSA PBS	6 ml 200 ml
DAB-Lösung	H₂0 Puffer (pH 5,5) DAB-Reagenz Wasserstoffperoxid	5 ml 2 Tropfen 4 Tropfen 2 Tropfen
DMMB-Färbelösung (pH 3,5)	1,9-Dimethylmethylenblau Natriumhydroxid (1 M) Ethanol (95 %) Ameisensäure (90 %) H <sub>2</sub> O	16 mg 25,6 ml 5 ml 3 ml <i>ad</i> 1000 ml
DMMB-Lösung A	D-Cystein-Hydrochlorid- Monohydrat PBE	0,05 g 30 ml
DMMB-Lösung B	Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz DMMB-Lösung A	0,053 g 1 ml
DMMB-Lösung C	Lösung A DMMB-Lösung B	24,95 ml 0,05 ml
Echtgrün-Lösung	Echtgrün H₂O	200 mg <i>ad</i> 1000 ml
Entkalkungslösung	Natrium-Citrat Ameisensäure (90 %) H₂O	100 g 250 ml <i>ad</i> 750 ml
Eosin-Lösung	Eosin G H₂O	10 g <i>ad</i> 2000 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	Kaliumdihydrogenphosphat Dinatriumhydrogenphosphat Formalin-Stammlösung (37 %) H <sub>2</sub> O	9,07 g 11,86 g 140 ml <i>ad</i> 1000 ml
Material

Puffer/Lösung	Inhaltsstoff	Konzentration/Menge/Volumen
Hämatoxylin-Lösung nach Harris	Hämatoxylin Ethanol (100 %) Natrium-lodat Aluminiumkaliumsulfat H <sub>2</sub> O	10 g 120 ml 10 g 200 g <i>ad</i> 2000 ml
HCI (Salzsäure)-Lösung	HCI (40 %) H <sub>2</sub> O	5,4 ml <i>ad</i> 200 ml
Papain-Lösung	Papain PBS	5mg <i>ad</i> 40 ml
PBE	Dinatriumhydrogenphosphat EDTA H₂O	7,1 g 1,86 g <i>ad</i> 500 ml
PBS	Kaliumchlorid (pH 7,2) Kaliumhydrogenphosphat Natriumchlorid	2,7 mM 1,7 mM 136 mM
Safranin Orange-Lösung	Safranin O H <sub>2</sub> O	1 g <i>ad</i> 1000 ml
TNE-Puffer	Natriumchlorid EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat Tris-Hydrochlorid (pH 7,4)	5,8 g (100 mM) 372 mg (1 mM) 1322 mg (10 mM)
Trypsin-Lösung (0,5 %)	Trypsin (2,5 %) H₂O	1 ml 200 ml
Wasserstoffperoxid- Lösung (0,3 %)	Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O	0,6 ml 200 ml

# 5.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die immunhistochemischen Färbungen verwendet:

Tabelle 3: Antikörper.

Primärer Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Sekundärer Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)

## 5.4 Enzyme

Vor biochemischer Analyse wurden die entnommenen Knorpelproben mit Hilfe von Papain (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verdaut. Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) fand im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen Anwendung.

## 5.5 Geräte und Laborprodukte

Zusätzlich zu allgemeinen Laborgeräten fanden folgende Gerätschaften und Produkte Anwendung:

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Canon Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (Mikroskop)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74°C Platinum 550	Angelantonie Industrie (Massa, Italien)
GENios Microplate Reader	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37°C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlplatte EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Magnetrührer RH Basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikro-CT (Skyscan 1172)	Bruker (Billerica, MA, USA)
Mikro-CT Röntgenröhre	Hamamatsu (Hamamatsu, Japan)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatte 96-well-Format transparent	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
OptiPlate-96 Schwarz	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Paraffinausgießstation EG 1140-H	Leica (Nussloch, Deutschland)
Plattenabdeckung	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Plattenschüttler LabNet Orbit LS	Labnet (Woodbridge, NJ USA)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Tischzentrifuge Qualitron Mikrozentrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Vortex Reagenzglasmischer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Waage EW-600-sM	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 37°C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank 62°C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasserbad HI 1210	Leica (Nussloch, Deutschland)

Tabelle 4: Geräte und Produkte.

## 5.6 Weitere Verbauchsmaterialien

Glasbehälter und Plastikmaterialien stammten von den Firmen Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland), Parafilm von der Firma Fisher (Schwerte, Deutschland). Für die Paraffin-Einbettung verwendeten wir Ausgießformen aus Metall sowie Kunststoff-Einbettkassetten der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland). Zur Anfertigung histologischer Schnitte bezogen wir Objektträger (SuperFrost; SuperFrost/Plus) und Deckgläser von der Firma R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland). Hersteller der Mikrotommesser (Typ 819) war die Firma Leica (Nussloch, Deutschland).

## 5.7 Operationsinstrumente und -materialien

Nadeln, Nahtmaterial, Spritzen und Kanülen wurden von der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) bezogen. Das verwendete chirurgische Instrumentarium stammte größtenteils von den Firmen A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz), Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland) und Megro (Wesel, Deutschland). Zur Anwendung kamen darüber hinaus maßgefertigte Stanzen zur Erzeugung standardisierter Knorpeldefekte und chirurgische, gewinkelte Küretten mit eckiger Spitze (jeweils Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) sowie Kirschner-Drähte mit Trokar und Gewinde mit einem Durchmesser von 1 mm (CL-Medical, Merchweiler, Deutschland), welche mit Hilfe einer elektrischen Bohrmaschine (MBQ 700; De Soutter Medical Limited, Nohfelden, Deutschland) angetrieben wurden.

## 5.8 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden im Zuge unserer Analysen eingesetzt:

Programm	Verwendung	Hersteller/Entwickler
Adobe Photoshop CS2	Abbildungen, Illustrationen	Adobe Inc. (St. José, CA, USA)
analySIS 5.0	Analysen digitaler Bilder	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
cellSens Standard	Analysen digitaler Bilder	Olympus (Hamburg, Deutschland)
GraphPad PRISM 8	Datenvisualisierung	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
Microsoft Excel 2016	Tabellen, Diagramme	Microsoft (Redmond, WA, USA)

Tabelle 5: Computerprogramme.

Programm	Verwendung	Hersteller/Entwickler
Skyscan CT-Analyzer	Analysen der Mikro-CT-Daten	Bruker (Billerica, MA, USA)
Skyscan CT-Vol	3D-Rekonstruktion der Mikro- CT-Bilder	Bruker (Billerica, MA, USA)
Skyscan DataViewer	Betrachten der Mikro-CT- Bilder	Bruker (Billerica, MA, USA)
Skyscan NRecon	Rekonstruktion der Mikro-CT- Bilder	Bruker (Billerica, MA, USA)
SPSS Statistik 26	Statistische Analysen	IBM (Armonk, NY, USA)

## 5.9 Versuchstiere

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Versuchstiere (17 ausgewachsene, weibliche Merinoschafe) bezogen wir vom Landesschafzuchtverband Sachsen-Anhalt e.v. (Halle, Deutschland).

## 6 Methoden

## 6.1 Studiendesign

Die Stichprobengröße der vorliegenden Tierstudie wurde orientiert an den Poweranalysen vergleichbarer Studien [68, 235, 241, 243] berechnet. Hierfür wurde ein Zweistichproben-t-Test verwendet. Für das gemischt unilaterale/bilaterale Studiendesign der vorliegenden Arbeit wählten wir eine Stichprobengröße von 8 Kniegelenken für die Therapiegruppen und 7 Kniegelenken für die Kontrollgruppe (23 Kniegelenke; 17 Schafe) (Abbildung 6). Ein Schaf musste aufgrund einer schweren Kniegelenksinfektion von der Studie ausgeschlossen werden. Die restlichen Tiere konnten in die weiteren Analysen eingeschlossen werden (21 Kniegelenke; 16 Schafe). In diesen 16 Schafen wurden insgesamt 21 vollschichtige, rechtwinklige Gelenkknorpeldefekte (Defektfläche:  $4 \times 8 \text{ mm} = 32 \text{ mm}^2$ ) zentral in der lateralen Trochleafacette (1 Defekt pro Kniegelenk) erzeugt (Abbildung 7). Alle Defekte wurden unter vollständiger Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht und Schonung des subchondralen Knochens debridiert (n = 21). Standardisierte subchondrale Bohrlöcher (Durchmesser: 1 mm; Tiefe: 10 mm) wurden in 14 von 21 Defekten angelegt. Hierbei wurde entweder eine hohe Bohrlochdichte (6 Bohrlöcher; n = 7) oder eine niedrige Bohrlochdichte (2 Bohrlöcher; n = 7) verwendet. Die restlichen Defekte (n = 7) wurden nach Defektdebridement nicht behandelt und erhielten als Kontrollgruppe keine subchondrale Anbohrung (Abbildung 7). Die Verteilung der Gruppen erfolgte randomisiert. In den Therapiegruppen wurden 10 Knorpeldefekte bilateral erzeugt (n = 10 Defekte in 5 Schafen) und auf einer Seite mit 6 Bohrlöchern (n = 5) sowie auf der Gegenseite mit 2 Bohrlöchern (n = 5) behandelt. Die Seite der Behandlungsgruppen wechselte hierbei jeweils alternierend zwischen rechts und links. Die restlichen 4 Defekte der Behandlungsgruppen sowie alle Defekte der Kontrollgruppe (n = 7) wurden einseitig in unterschiedlichen Tieren angelegt (n = 11 Defekte in 11 Schafen). Die kontralateralen Seiten erhielten hierbei Knorpeldefekte im Rahmen einer nicht publizierten Studie unter Verwendung vergleichbarer chirurgischer Verfahren (gleicher operativer Zugang; vergleichbare Größe, Geometrie, Tiefe, Lokalisation der Defekte; Verwendung markraumeröffnender Verfahren) (Abbildung 6). Folglich wurden alle Schafe bilateral operiert und belasteten beide Kniegelenke unmittelbar nach Operation voll. Klinisch zeigten sich postoperativ keine Unterschiede hinsichtlich Schmerzen oder individueller Gelenkbelastung zwischen den einzelnen Tieren. Nach einer Beobachtungszeit von 6 Monaten wurden die Tiere artgerecht euthanasiert und die osteochondrale Reparatur ex vivo verblindet durch zwei unabhängige Untersucher (Prof. Dr. med. Patrick Orth, Niklas Stachel) bewertet. Die Knorpelreparatur wurde hierbei mit Hilfe etablierter semiquantitativer makroskopischer [97, 197], histologischer [280, 313], immunhistochemischer [240] sowie biochemischer [151, 214, 290] Verfahren analysiert. Der subchondrale Knochen wurde histologisch [280] und mittels Mikro-CT [86, 210, 235] beurteilt.



Abbildung 6: Schematische Darstellung des Studiendesigns.

## 6.2 Großtiermodell

Die tierexperimentellen Versuche wurden nach Genehmigung der saarländischen Tierschutzkommission (gemäß §8 des Tierschutzgesetztes; Versuchsnummer 20/2011) in Übereinstimmung mit dem nationalen Recht für Tierschutz sowie nach gültigen NIH-Richtlinien des *National Institute of Health* (Bethesda, MD, USA) für die Achtung und den Schutz von Versuchstieren (NIH Publication 85-23; Rev 1985) durchgeführt [215]. Für unsere Versuche verwendeten wir gesunde, weibliche Merinoschafe (n = 17; Durchschnittsalter ( $\pm$  Standardabweichung; SA): 34  $\pm$  8 Monate; durchschnittliches Körpergewicht ( $\pm$  SA): 77,1  $\pm$  4,4 kg). Wir bezogen die Versuchstiere vom Landesschafzuchtverband Sachsen-Anhalt e.v. (Halle, Deutschland). Die Schafe wurden artgerecht in ausreichend großen Ställen mit Auslauf gehalten und regelmäßig tierärztlich begutachtet. Sie erhielten uneingeschränkten Zugang zu sauberem Trinkwasser - welches mehrfach am Tag gewechselt wurde - und wurden gemäß einer standardisierten Diät gefüttert.

## 6.3 Operative Eingriffe



#### Abbildung 7: Übersicht operatives Vorgehen.

(A) Nach sterilem Abwaschen und Abdecken erfolgte die Darstellung der *Trochlea femoris* über einen etablierten Miniarthrotomie-Zugang [231]. Im Anschluss an die knorpelchirurgischen Eingriffe wurden Kapsel, Subkutangewebe und Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Ein aluminiumhaltiger Sprühverband wurde angelegt. (B,C) Mit Hilfe einer maßgefertigten Stanze wurden alle Knorpeldefekte (4 x 8 mm; 32 mm<sup>2</sup>) zentral in der lateralen Trochleafacette erzeugt und mittels einer rechtwinkligen, gewinkelten Kürette unter vollständiger Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht debridiert. Nachfolgend wurden in den beiden Therapiegruppen standardisierte, subchondrale Bohrlöcher (Durchmesser: 1 mm; Tiefe: 10 mm) senkrecht zur Gelenkoberfläche mit Kirschner-Drähten angelegt. *Hellblau*: hyaliner Gelenkknorpel; *dunkelblau*: kalzifizierter Knorpel; *gelb*: subchondraler Knochen; *violette Linie*: Grenzlinie. (D) Die behandelten Defekte erhielten entweder 6 oder 2 Bohrlöcher in standardisierter Anordnung. Die Kontrolldefekte wurden nach Defektdebridement unbehandelt belassen. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [296].

#### 6.3.1 Präoperative Vorbereitungen und Narkose

Nach einer zwölfstündigen Nahrungskarenz wurden die Versuchstiere mit 1 % Xylazin (Bayer, Leverkusen, Deutschland) intramuskulär sediert (0,05 mg/kg Körpergewicht). Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 20 ml Propofol (2%; AstraZeneca, Wedel, Deutschland) intravenös. Anschließend wurden die Tiere endotracheal intubiert. Die Narkose wurde aufrechterhalten mit 1,5 % Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) *per inhalationem* und intravenöser Gabe von 1 % Propofol (6-20 mg/kg Körpergewicht) über einen Infusomat. Die Narkose und anästhesiologische Betreuung erfolgten durch Herrn Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland).

#### 6.3.2 Operatives Vorgehen

Alle Operationen wurden durch Prof. Dr. med. Henning Madry unter Assistenz von Prof. Dr. med. Patrick Orth und Niklas Stachel am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert. Hiernach erfolgte die standardisierte Rasur des Operationsgebietes, das mehrfache sterile Abwaschen mit Braunol-Lösung (Braun, Melsungen, Germany) sowie das sterile Abdecken des zu operierenden Kniegelenks (Abbildung 7 A). Es wurde ein etablierter Miniarthrotomie-Zugang gewählt [231] (Abbildung 7 A). Anhand der anatomischen Landmarken wurde unter Längszug des Beines und Extension des Kniegelenkes durch den Assistenten ein Hautschnitt über 4-5 cm Länge von 1 cm medial des unteren Patellapols bis 1 cm proximal der Tuberositas tibiae durchgeführt. Die subkutane Präparation erfolgte mit dem Elektrokauter unter simultaner Blutstillung bis auf Faszienniveau zur Darstellung der medialen Begrenzung der Patellasehne. Die Gelenkkapsel wurde mittels Elektrothermie eröffnet. Der Musculus vastus medialis obliquus sowie das Retinaculum patellae mediale wurden durch den minimalinvasiven Zugang geschont. Der Hoffa-Fettkörper wurde mit einem Langenbeck-Haken geschützt. Die Patella wurde nicht luxiert, sondern mit einem kleinen Hohmann-Haken angehoben und zur Darstellung der Trochlea femoris proximalisiert (Abbildung 7 A). Mit maßgefertigten Stanzen wurden nun standardisierte rechtwinklige, vollschichtige Gelenkknorpeldefekte (n = 21; Defektfläche: 4 x 8 mm = 32 mm<sup>2</sup>) zentral in der lateralen Facette der *Trochlea femoris* präpariert (Abbildung 7 B). Der Knorpel wurde mit einem Skalpell entfernt und das Defektbett unter vollständiger Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht und penibler Schonung des subchondralen Knochens mit Hilfe einer gewinkelten Kürette mit eckiger Spitze (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) debridiert (Abbildung 7 B und C). Nach Defektdebridement wurde keine Blutung im Bereich der freigelegten subchondralen Knochenplatte beobachtet. Mit Hilfe von Kirschner-Drähten mit Trokar und Gewinde (Durchmesser: 1 mm), angetrieben durch eine elektrische Bohrmaschine (MBQ 700; De Soutter Medical Limited, Nohfelden, Deutschland), wurden in den Therapiegruppen (14 von 21 Defekte) entweder 2 (n = 7) oder 6 (n = 7) subchondrale Bohrlöcher rechtwinklig zur Knochenoberfläche angelegt (Abbildung 7 D). Zur Standardisierung der Bohrlochtiefe von 10 mm wurde eine metallische Bohrhülse mit integriertem Bohr-Stopp genutzt. Die subchondrale Anbohrung erfolgte unter kontinuierlicher Spülung mit gekühlter Ringer-Lactat-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA) um eine Hitzeentwicklung zur vermeiden und Bohrmehl zu entfernen. Auf einen Mindestabstand von 1,5 mm zwischen den Bohrlöchern wurde geachtet, um ein Ineinanderbrechen der Bohrlöcher zu vermeiden. Die Größenverhältnisse der Kniegelenke von Schaf und Mensch beachtend [227, 246], entspricht dies dem klinisch empfohlenen Abstand von 3-4 mm zwischen Mikrofrakturlöchern [208]. Die Anlage der subchondralen Bohrlöcher erfolgte standardisiert (6 Bohrlöcher in 2 Reihen; 2 Bohrlöcher im Defektzentrum in 1 Reihe) (Abbildung 7 D). Nach Anbohrung konnte aus allen Bohrlöchern ein Blutaustritt beobachtet werden. Die restlichen Defekte (7 von 21 Defekten) wurden nicht angebohrt und dienten als Kontrollen (Abbildung 7 D). Nach ausgiebiger Gelenkspülung mit Ringer-Lactat-Lösung erfolgte ein dichter Kapselverschluss mit geflochtenem Fadenmaterial der Stärke 3 USP (United States Pharmacopeia) bei bluttrockenem Situs. Nachfolgend wurde der schichtweise Wundverschluss mit Subkutannähten und Einzelknopfnähten der Haut mit Vicryl-Fäden der Stärke 2 USP durchgeführt. Ein aluminiumhaltiger Sprühverband wurde angelegt (Abbildung 7 A).

### 6.3.3 Postoperative Behandlung

Eine postoperative Antibiose mit Penicillin/Streptomycin (12/7 mg/kg Körpergewicht; Albrecht, Aulendorf, Deutschland) wurde intramuskulär verabreicht. Die postoperative Analgesie erfolgte täglich über 2 Wochen mit 3 ml 0,25% Fenpipramid/Levomethadon (MSD, Unterschleißheim, Deutschland) intramuskulär sowie Caprofen (1,4 mg/kg Körpergewicht; Zoetis, Delémont, Schweiz) subkutan. Die Schmerzmedikation wurde an den Bedarf angepasst. Engmaschige klinische Kontrollen wurden im Rahmen täglicher Visiten durch den Operateur nach einem standardisierten Protokoll über 14 Tage nach Operation durchgeführt. Hierbei wurde u.a. auf Anzeichen von Schmerzen, lokalen und systemischen Entzündungen, Wundkomplikationen und Fehlbelastungen der operierten Extremitäten geachtet. Eine direkte, uneingeschränkte postoperative Vollbelastung der operierten Gelenke war möglich. Ein Tier musste aufgrund einer schweren Gelenkinfektion frühzeitig artgerecht euthanasiert werden. Die restlichen Tiere wurden nach 14 Tagen in gutem Allgemeinzustand ohne Hinweis auf eine postoperative Komplikation in den Haltungsbetrieb transportiert. Hier wurden die Tiere wechselnd im Stall und auf der Weide ohne weitere Komplikationen gehalten. Regelmäßige Visiten erfolgten durch Operateur und Schäfer. Die Gesamtstandzeit betrug 6 Monate. Am Ende der Beobachtungsdauer erfolgte die leitlinienbasierte, artgerechte Euthanasie nach einer Narkoseeinleitung durch eine Überdosis von T61 (MSD, Rahway, NJ, USA).

## 6.4 Probenaufbereitung

Wir explantierten die Kniegelenke nach Euthanasie im Ganzen und befreiten diese vom Weichteilmantel. Die makroskopische Begutachtung ergab keinen Hinweis auf Infektions- und Entzündungszeichen. Eine hochauflösende, digitale Fotodokumentation (Canon Powershot A480 mit Makrolinse; 10 Megapixel; Neu-Isenburg, Deutschland) aller Defekte sowie des angrenzenden Gelenkknorpels wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt [97]. Das Reparaturgewebe der proximalen Defekthälften (4 x 4 mm) sowie der Gelenkknorpel auf einer Strecke von 3 mm direkt angrenzend an den proximalen Defektrand (4 x 3 mm) wurden mit Hilfe eines Skalpells unter Schonung des subchondralen Knochens entnommen und bei einer Temperatur von -80°C auf Trockeneis bis zur biochemischen Analyse gelagert. Anschließend wurden die osteochondralen Proben der *Trochlea femoris* inklusive Defektregion und mindestens 8 mm angrenzendem Gewebe zurechtgeschnitten, in verwechslungsfrei gekennzeichnete Behälter überführt und in gepufferter Formalin (4%) -Lösung über 24 h fixiert. Hiernach spülten wir die Proben unter gefiltertem Leitungswasser und lagerten diese anschließend in Ethanol (70%) bis zu den weiteren analytischen Aufbereitungen.



## 6.5 Übersicht der angewandten Methoden

Abbildung 8: Übersicht angewandter Methoden.

Nach Euthanasie und Probenaufbereitung wurden die osteochondrale Reparatur sowie angrenzender Gelenkknorpel und subchondraler Knochen mit Hilfe etablierter makroskopischer, biochemischer, radiologischer, histologischer und immunhistochemischer Methoden analysiert. *Schwarz gestrichelte Linie*: Begrenzung Ausschnitte; *rot gestrichelte Linie*: Begrenzung Defektregion; *rot eingefärbte Fläche*: 2,5 mm um distale Defekthälfte angrenzender Gelenkknorpel; *grün eingefärbte Fläche*: Gelenkknorpel auf Strecke von 3 mm direkt angrenzend an den proximalen Defektrand (4 x 3mm); *gelb eingefärbte Fläche*: Gelenkknorpel proximale Defekthälfte; *braun eingefärbte Fläche*: mittels Mikro-CT analysierter subchondraler Knochen der Defektregion, unmittelbar medial angrenzend sowie mit einem Abstand von 3,5 mm medial angrenzend an die Defektregion; *violett eingefärbte Fläche*: histologisch und immunhistochemisch beurteilte distale Defekthälfte sowie 3 mm medial und lateral angrenzender Gelenkknorpel.

## 6.6 Makroskopische Begutachtung von Knorpelreparatur und angrenzendem Knorpel

## 6.6.1 Bewertungssystem nach Goebel et al.

Tabelle 6: Makroskopisches Bewertungssystem nach Goebel et al. [97].

Kategorie	Parameter	Punkte
1. <i>Farbe</i> des	Hyalin oder weiß	0
Reparaturgewebes	Vorwiegend weiß (> 50%)	1
	Vorwiegend transparent (> 50%)	2
	Transparent	3
	Kein Reparaturgewebe vorhanden	4
2. Sichtbare Blutgefäße	Keine sichtbaren Blutgefäße	0
im Reparaturgewebe	< 25% des Reparaturgewebes	1
	25-50% des Reparaturgewebes	2
	50-75% des Reparaturgewebes	3
	75 % des Reparaturgewebes	4
3. Oberflächenbeschaf-	Glatt, homogen	0
<i>fenheit</i> des	Glatt, inhomogen	1
Reparaturgewebes	Fibrillationen	2
	Inkompletter Reparaturknorpel	3
	Kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung	Im Niveau	0
im Vergleich zum	> 50% der Defekttiefe ausgefüllt oder hervorstehend	1
angrenzenden Knorper	< 50% der Defekttiefe ausgefüllt	2
	0% der Defekttiefe ausgefüllt	3
	Beschädigung des subchondralen Knochens	4
5. Degeneration des	Normal	0
angrenzenden Knorpels	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

Das Knorpelreparaturgewebe sowie der angrenzende Gelenkknorpel wurden mit Hilfe des semiquantitativen Bewertungssystems nach Goebel *et al.* [97] anhand der standardisiert fotodokumentierten Defektregionen (n = 21) makroskopisch bewertet (max. 20 Punkte: keine Knorpelreparatur; min. 0 Punkte: normaler hyaliner Gelenkknorpel) (Tabelle 6). Die Untersuchungen wurden verblindet durch zwei unabhängige Untersucher (Prof. Dr. med. Patrick Orth, Niklas Stachel) durchgeführt. Die jeweiligen Mittelwerte der Bewertungspunkte wurden für die statistischen Analysen verwendet.

## 6.6.2 Ausmessung degenerativer Veränderungen im angrenzenden Gelenkknorpel





(A) Defektregion (4 x 8 mm; 32 mm<sup>2</sup>) mit Reparaturgewebe und angrenzender Gelenkknorpel vor Tuschefärbung. (B) Einfärbung degenerativer Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels mittels India-Ink-Tuschefärbung [197]. (C) Vergrößerter Ausschnitt der distalen Defekthälfte sowie des angrenzenden Gelenkknorpels mit Markierung der gefärbten arthrotischen Läsionen. *Rot eingefärbte Fläche*: Defektregion; *dunkelviolette Linie*: Begrenzung der ROI im angrenzenden Gelenkknorpel 2,5 mm um die distale Defekthälfte (42,5 mm<sup>2</sup>); *grün eingefärbte Flächen*: manuell ausgemessenen Flächen tuschegefärbter, arthrotischer Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels innerhalb der ROI.

Zur makroskopischen Ausmessung degenerativer Veränderungen des distal an die Defekte angrenzenden Gelenkknorpels wurden India-Ink-Färbungen angefertigt [197]. Die Trochleaproben wurden hierzu aus der Ethanol-Lösung genommen, mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend mit Tusche gefärbt. Die Tusche wurde mit einem Pinsel (Pelikan, Hannover, Deutschland) aufgetragen und überschüssige Farbreste mit einem Papiertuch vorsichtig entfernt. Verschleißbedingte Veränderungen der Knorpeloberfläche wie Rauheiten oder Fissuren färben sich mit der Tusche und werden hierdurch visualisiert. Die tuschegefärbten Proben wurden unter standardisierten Bedingungen fotografiert (Canon Powershot A480 mit Makrolinse; 10 Megapixel; Neu-Isenburg, Deutschland) (Abbildung 9). Die Flächen der angefärbten degenerativen Veränderungen der Knorpeloberfläche des angrenzenden Gelenkknorpels wurden manuell anhand der digitalisierten Fotodokumentation ausgemessen (analySIS 5.0; Olympus Soft Imaging System, Münster, Deutschland). Hierzu wurden in einer definierten Fläche (Region von Interesse; engl. *region of interest*; ROI) 2,5 mm um die distalen Defekthälften (42,5 mm<sup>2</sup>) die mit Tusche eingefärbten Veränderungen deliniert und deren Gesamtflächenausdehnung berechnet (Abbildung 9).

## 6.7 Biochemische Analysen

#### 6.7.1 Vorbereitung

Die zur biochemischen Analyse entnommenen und bei -80°C gelagerten Proben des Knorpelreparaturgewebes sowie des direkt angrenzenden Gelenkknorpels wurden zur weiteren Bearbeitung zunächst in einer mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; engl. *phosphate buffered saline*) verdünnten Papain-Lösung (0,5 mg/ml) über Nacht bei 60-64°C zur Proben-Verdauung inkubiert.

### 6.7.2 Bestimmung des DNS-Gehaltes (Hoechst 33258-Test)

Wir bestimmten den Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Gehalt der Proben mittels Fluorometrie und verwendeten hierfür den Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258 (Bisbenzimid; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) [151]. Dieser interkaliert mit DNS und färbt diese an. Zunächst wurde eine Standardreihe des DNS-Gehaltes (A-F) mit jeweils 100 µl Standardlösung pro Mikrotiterplatte (schwarz; 96-*well*-Format) angelegt (Tabelle 7). In die restlichen Vertiefungen der 96-*well*-Platte pipettierten wir nun jeweils 10 µl der Papain-verdauten Proben und fügten 90 µl TNE (Tris-HCI-NaCI-EDTA)-Puffer hinzu. Im nächsten Schritt wurde der mit TNE-Pufferlösung verdünnte Hoechst 33258-Farbstoff streng lichtgeschützt hinzugefügt (100 µl pro Probe). Die Fluoreszenz-Anregung des Farbstoffes erfolgte mit einer Wellenlänge von 365 nm. Die Intensität der Emission wurde für die Wellenlänge 458 nm detektiert. Für die Untersuchungen verwendeten wir einen GENios-Spektrofluorometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland). Anhand der DNS-Standardreihe konnten wir eine Kalibrierungsgerade ermitteln und hiermit den DNS-Gehalt jeder Probe berechnen.

Standard	Standard-DNS-Lösung	TNE-Puffer	DNS-Gehalt
А	Ο μΙ	100 µl	0 ng
В	5 µl	95 µl	50 ng
С	10 µl	90 µl	100 ng
D	20 µl	80 µl	200 ng
Е	50 µl	50 µl	500 ng
F	90 µl	10 µl	900 ng

Tabelle 7: Schema der Standardreihe des DNS-Gehaltes.

### 6.7.3 Bestimmung des Proteingehaltes (BCA-Test)

Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte ebenfalls fluorometrisch mit Hilfe der Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*; BCA), welche mit an Peptidbindungen gekoppelten Kupferionen einen blau-violetten Farbstoffkomplex bildet und Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm emittiert [290]. Zunächst wurde eine Standardreihe der BSA (bovines Serumalbumin)-Konzentration (A-I) pro Mikrotiterplatte (transparent; 96-*well*-Format) angelegt (25 µl Standardlösung pro Vertiefung) (Tabelle 8). Nun pipettierten wir 5 µl der Papain-verdauten Probenlösungen in die restlichen Vertiefungen der Mikrotiterplatten und fügten anschließend 200 µl des BCA-Arbeitsreagenz hinzu. Die 96-*well*-Platten wurden nach 30 Sekunden auf einem Plattenschüttler für 30 Minuten in einem Wärmeschrank (37°C) inkubiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Mit dem GENios-Spektrofluorometer wurde nun die Intensität der Emission für eine Wellenlänge von 530 nm gemessen und anhand der mit Hilfe der Standardreihe ermittelten Kalibrierungsgerade die Proteinkonzentration jeder Probe berechnet.

Standard	H <sub>2</sub> O	BSA-Lösung	BSA-Konzentration
A	0 µl	75 µl Stammlösung	2000 µg/ml
В	31,3 µl	93,8 µl Stammlösung	1500 µg/ml
С	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
н	100,0 µl	25 µl von G	25 µg/ml
I	100,0 µl	Ο μΙ	0 µg/ml

 Tabelle 8: Schema der Standardreihe der BSA-Konzentration.

Stammlösung: 2 mg BSA/ml.

## 6.7.4 Bestimmung des Proteoglykangehaltes (DMMB-Test)

Zur fluorometrischen Bestimmung des Proteoglykangehaltes der Proben wurde eine gepufferte Dimethylmethylenblau-Lösung (DMMB-Lösung) verwendet [214]. Zur Herstellung der DMMB-Lösung fügten wir 16 mg DMMB zu 5 ml 95% igem Ethanol. Anschließend wurden 3 ml Ameisensäure sowie 25,6 ml einmolares (1 M) Natriumhydroxid hinzugegeben und die Lösung bis auf 1 l Gesamtvolumen mit zweifach destilliertem Wasser (aqua bidest) aufgefüllt (pH-Wert: 3,5). Wir legten zunächst eine Standardreihe der Chondroitin-6-Sulfat-Konzentration (A-F) mit 40 µl Standardlösung (hergestellt aus Lösungen A-C) pro Vertiefung auf den Mikrotiterplatten (transparent; 96-well-Format) an (Tabelle 9) und fügten jeweils 250 µl DMMB-Lösung hinzu. Chondroitin-6-Sulfat - ein tierisches Proteoglykan, welches wichtiger Bestandteil von Knorpel, Knochen und Bindegewebe ist - wurde zur Herstellung der Standardlösung verwendet. Die 3 Lösungen A, B und C stellten wir wie folgt her: 1. Lösung A mit 0,05 g D-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat und 30 ml PBE (engl. phosphate-buffered EDTA). 2. Lösung B mit 0,05 Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz und 1 ml Lösung A. 3. Lösung C mit 24,95 ml Lösung A und 0,05 ml Lösung B. Im nächsten Schritt wurden 10 µl der Papain-verdauten Probenlösungen in die restlichen Vertiefungen der 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert und 30 µl Lösung A sowie 250 µl DMMB-Lösung hinzugefügt. Mit Hilfe des GENios Spektrofluorometers detektierten wir die Intensität der Emission für eine Wellenlänge von 530 nm. Mit Hilfe der Standardreihe ermittelten wir eine Kalibrierungsgerade und berechneten hiermit die Proteoglykankonzentration der einzelnen Proben.

Standard	Herstellung des Standards	C6S-Konzentration
А	40 µl Lösung C	100 µg/ml
В	32 μl Lösung C + 8 μl Lösung A	80 µg/ml
С	24 μl Lösung C + 16 μl Lösung A	60 µg/ml
D	16 μl Lösung C + 24 μl Lösung A	40 µg/ml
Е	8 μl Lösung C + 32 μ l Lösung A	20 µg/ml
F	40 µl Lösung A	0 µg/ml

Tabelle 9: Schema der Standardreihe der Chondroitin-6-Sulfat-Konzentration.

C6S: Chondroitin-6-Sulfat.

## 6.8 Radiologische Beurteilung des subchondralen Knochens

#### 6.8.1 Mikro-CT-Bildgebung

Die Trochleaproben wurden zur Schnittbildgebung in einem röntgendurchlässigen, speziell zugerichteten Zentrifugenröhrchen platziert und mit handelsüblichen Plastik-Strohhalmen fixiert. Die Röhrchen wurden mit 70% igem Ethanol luftfrei befüllt und mit Parafilm verschlossen. Die Bildgebungen aller 21 Schaftrochleas wurden mit einem Mikro-Computertomograph (Skyscan 1172; Bruker, Billerica, MA, USA) nach standardisiertem Protokoll durchgeführt. Der Computertomograph ist mit einer Mikrofokus-Röntgenröhre (Spotgröße < 5 µm; Hamamatsu, Japan), einem Rotationstisch sowie einem beweglichen 11 Megapixel Röntgendetektor (12-bit digitale CCD-Kamera) ausgestattet. Eine detaillierte Untersuchung des subchondralen Knochens mit einem maximalen Auflösungsvermögen von bis zu 0,8 µm ist hierdurch möglich. Ein 0,5 mm Aluminium/Kupfer-Filter wurde verwendet, um Aufhärtungsartefakte zu reduzieren. Gemäß eines standardisierten Untersuchungsprotokolls (Röhrenspannung: 70 kV; Stromstärke: 140 µA; mittlere Auflösung: 13 µm) wurden pro Trochleaprobe (n = 21) 900-1200 16-bit Röntgenbilder angefertigt. Die Bilder wurden jeweils mit einer Belichtungszeit von 1770 ms und in 0,4°-Schritten aufgenommen. Die Parameter *frame averaging, random movement* und *ring artifact correction* wurden auf 3, 15 und 7 (jeweils keine Einheit) festgesetzt. Alle Einstellungen orientierten sich an etablierten Untersuchungsprotokollen vergleichbarer Studien [68, 235, 243].

#### 6.8.2 Bildrekonstruktion

Für die CT-Bildrekonstruktion (Skyscan NRecon) wurde ein modifizierter Algorithmus nach Feldkamp *et al.* [72] verwendet. Die rekonstruierten Mikro-CT-Bilder wurden anschließend in eine exakt koronare Schnitteben der Defektregion rotiert (Skyscan Data Viewer).

### 6.8.3 Volumes of interest (VOIs)

Die Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte und subartikulären Spongiosa unterhalb der Defektregion (Defektregionen), direkt medial angrenzend (angrenzende Regionen) sowie mit 3,5 mm Abstand zur Defektregion (Normalregionen) wurden getrennt voneinander beurteilt. Hierfür wurden in den einzelnen koronaren 2D-Schnittbildern der entsprechenden Proben (n = 21) definierte ROIs

### Methoden

eingezeichnet, welche im Mikro-CT-Bilddatensatz zu VOIs (Volumen von Interesse; engl. *volumes of interest*) zusammengefügt wurden (Skyscan CTAnalyzer). Pro Defektregion (n = 21) wurden sechs VOIs (Gesamtzahl = 126) mit folgender Definition eingezeichnet: subchondrale Knochenplatte der Defektregion (SKD), subartikuläre Spongiosa der Defektregion (SSD), direkt medial an die Defektregion angrenzende subchondrale Knochenplatte (SKA) und subartikuläre Spongiosa (SSA) sowie mit einem Abstand von 3,5 mm medial angrenzende, als Normalkontrollen definierte subchondrale Knochenplatte (SKN) und subartikuläre Spongiosa (SSN) (Abbildung 10). Zur übersichtlicheren Darstellung der Daten wurden die VOIs SKA, SSA, SKN und SSN aller drei Gruppen jeweils zusammengefasst. Die Tiefe der eingezeichneten VOIs betrug maximal 10 mm. Die Breite der VOIs wurde auf 3,5 mm begrenzt, um ein Überlappen der einzelnen VOIs zu vermeiden.



#### Abbildung 10: Darstellung der zweidimensionalen ROIs.

Definierte ROIs wurden in koronaren Mikro-CT-Schnittbildern eingezeichnet und im Bilddatensatz zu dreidimensionalen VOIs zusammengefügt. Subchondrale Knochenplatte und subartikuläre Spongiosa wurden getrennt voneinander analysiert. Pro Defektregion wurden die folgenden 6 ROIs eingezeichnet: Subchondrale Knochenplatte Defekt (SKD) und Subartikuläre Spongiosa Defekt (SSD) jeweils unterhalb der Defektregion; Subchondrale Knochenplatte Angrenzend (SKA) und Subartikuläre Spongiosa Angrenzend (SSA) jeweils direkt medial angrenzend an die Defektregion; Subchondrale Knochenplatte Normal (SKN) und Subartikuläre Spongiosa Normal (SSN) jeweils als Normalkontrolle mit einem Abstand von 3,5 mm medial angrenzend an die Defektregion. Tiefe (max. 10 mm) und Breite (max. 3,5 mm) der ROIs wurden begrenzt.

## 6.8.4 Analysen der Knochenmikrostruktur

Die Knochenmikrostruktur wurde innerhalb der definierte VOIs analysiert (Programm: Skyscan CTAnalyzer). Hierfür erfolgte eine Datensegmentierung in binäre Bilder mit Graustufen-Schwellenwerten von 89 und 255. Wie Vorstudien zeigen konnten, bilden diese Werte Knochen bestmöglich ab [68, 235, 243]. Die folgenden 3D-Parameter wurden für die einzelnen VOIs bestimmt: Knochenmineraldichte (engl. bone mineral density; BMD), Knochenvolumenanteil (engl. bone volume fraction; BV/TV), Knochenoberfläche/Knochenvolumen-Verhältnis (engl. bone surface/volume ratio; BS/BV), Knochenoberflächendichte (engl. bone surface density; BS/TV). Die kortikale Dicke (engl. cortical thickness; Ct.Th) wurde ausschließlich für die subchondrale Knochenplatte ausgemessen, während Trabekeldicke (engl. trabecular thickness; Tb.Th), Trabekelabstand (engl. trabecular separation; Tb.Sp), Trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (engl. trabecular pattern factor; Tb.Pf), Trabekelanzahl (engl. trabecular number; Tb.N), Struktur-Model-Index (engl. structure model index; SMI), Grad der Anisotropie (engl. degree of anisotropy; DA) und Fraktale Dimension (engl. fractal dimension; FD) lediglich für die subartikuläre Spongiosa ermittelt wurden. Zwei in 70% igem Ethanol gelagerte Calciumhydroxyapatit (CaHA)-Phantome mit bekannter Knochenmineraldichte von 250 und 750 mg CaHA/cm<sup>3</sup> dienten der Kalibrierung vor Bestimmung der Knochenmineraldichte der einzelnen VOIs anhand ermittelter Grauwerte (Abschwächungskoeffizienten). Alle Analyse-Einstellungen wurden anhand etablierter Studienprotokolle vorgenommen [68, 235, 243].

### 6.8.5 Analysen von Osteophyten und subchondralen Zysten

Alle geometrischen Formen knöcherner Anbauten oberhalb der Zementlinie wurden als intraläsionale Osteophyten betrachtet [86]. Eine Differenzierung zwischen Osteophyten und einer flächigen Verlagerung bzw. Verdickung der subchondralen Knochenplatte erfolgte entsprechend nicht. Maximale Höhe, maximaler Basisdurchmesser, maximaler longitudinaler Durchmesser, maximale longitudinale Querschnittsfläche und 3D-Volumen der einzelnen Osteophyten wurden berechnet (Skyscan CTAnalyzer) und deren Lokalisation (zentral: zwischen Bohrlöchern; peripher: zwischen Bohrloch und Defektrand) beschrieben. Das Ausmaß des osteophytären Überwuchses wurde mit Hilfe eines adaptierten magnetresonanztomographischen Bewertungssystems nach Mithoefer *et al.* [210] beschrieben und hierbei in Relation zur Dicke des angrenzenden Gelenkknorpels gesetzt (Grad 0: keine knöcherne Überwucherung; Grad 1: maximale Osteophytenhöhe 1-33% der angrenzenden Knorpeldicke; Grad 2: maximale Osteophytenhöhe 34-66% der angrenzenden Knorpeldicke; Grad 3: maximale Osteophytenhöhe  $\geq 67\%$  der angrenzenden Knorpeldicke). Die Dicke des Gelenkknorpels wurde innerhalb von 3 mm medial und lateral angrenzend an die Defektregionen auf Safranin Orange/Echtgrün-gefärbten histologischen Schnitten vermessen (n =  $2 \times 21$ ). Der Mittelwert der Messungen wurde als Referenzwert verwendet.

Zur Analyse von subchondralen Knochenzysten wurde ein adaptierter Algorithmus in Anlehnung an Gao *et al.* [86] und Orth *et al.* [235] gebraucht. Der Mindestdurchmesser einer Zyste wurde wie vorbeschrieben auf den dreifachen Durchmesser der angelegten subchondralen Bohrlöcher (3 mm) festgelegt, um diese gegenüber residuellen oder durch Resorption erweiterten Bohrlöchern abzugrenzen. Subchondrale Zysten wurden überdies von lokalen Resorptionsprozessen der subchondralen Knochenplatte unterschieden und mussten definitionsgemäß bis in die subartikuläre Spongiosa hineinreichen.

## 6.9 Histologische Beurteilung der osteochondralen Reparatur

#### 6.9.1 Entkalkung

Nach erfolgter Mikro-CT-Bildgebung wurden die osteochondralen Blöcke in eine Entkalkungslösung überführt. Die Entkalkungslösung wurde wöchentlich gewechselt. Die Proben wurden über zwei Monate entkalkt. Mit einer 22G (Gauge)-Kanüle wurde der Entkalkungsgrad geprüft. Bei zufriedenstellender Entkalkung wurden die Blöcke mit einem Skalpell auf die Defektregion sowie die angrenzende osteochondrale Einheit zurechtgeschnitten.

### 6.9.2 Entwässerung und Einbettung

Zunächst wurden die Proben in gefiltertem Leitungswasser ausgiebig gewaschen (2 x 1 h und 1 x ü.N. (über Nacht)). Hierauf folgten der Entwässerungsprozess in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1 x 1 h in Ethanol 70%; 2 x 1 h in Ethanol 95%; 1 x 1 h, ü.N. und 1 x 1 h in Ethanol 100%), die Lagerung in Xylol über 2 x 1 h und anschließend in flüssigem Paraffin (62°C; 1 x 1 h und ü.N.). Anschließend wurden die osteochondralen Blöcke für den Einbettungsprozess jeweils auf einer Ausgießform aus Stahlblech positioniert. Die Ausrichtung der Proben erfolgte standardisiert zur Anfertigung exakt koronarer histologischer Schnitte der Defektregion. Das distale Defektende zeigte jeweils zum Boden der Ausgießform. Nach Probenpositionierung wurden Einbettkassetten aus Kunststoff aufgebracht. Die Einbettung in flüssigem Paraffin wurde mit einer Einbettmaschine durchgeführt (EG 1140-C; Leica, Neissloch, Deutschland). Die Paraffinaushärtung erfolgte über Nacht auf einer Kälteplatte.

## 6.9.3 Anfertigung histologischer Schnitte

Nach Paraffinaushärtung fertigten wir 3  $\mu$ m dicke, koronare histologische Schnitte der distalen osteochondralen Defekthälften aller Proben (n = 21) mit einem Rotationsmikrotom (RM 2135; Leica, Neissloch, Deutschland; Mikrotommesser: Leica Typ 819; Neigungswinkel: 6-7°) an. Die Schnitte wurden zunächst in ein 24°C warmes Wasserbad überführt (HI 1210; Leica, Neissloch, Deutschland) und anschließend auf Albumin-beschichtete Objektträger (SuperFrost; R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten wir spezielle Objektträger (SuperFrost/Plus; R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland). Die Schnitte trockneten auf einer Wärmeplatte (42°C; 20 min) und härteten im Wärmeschrank aus (62°C; ü.N.).

#### 6.9.4 Histologische Färbungen

#### 6.9.4.1 Allgemeines Vorgehen

Die Entparaffinierung und Hydrierung erfolgten in Xylol (2 x 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 2,5 min in 100% Ethanol; 2 x 2,5 min in 95% Ethanol; 1 x 2,5 min in 80% Ethanol). Für die histologischen Standardfärbungen verwendeten wir einen 200 ml fassenden Glasbehälter. Pro Färbedurchgang positionierten wir maximal 10 Schnitte in einer entsprechenden Haltevorrichtung. Unser Vorgehen orientierte sich an etablierten Färbeprotokollen [149, 164, 277]. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Schnitte jeweils in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1 x 2,5 min in 80% Ethanol; 2 x 2,5 min in 95% Ethanol; 2 x 5 min in 100% Ethanol) und in Xylol (2 x 2,5 min) entwässert. Anschließend erfolgte die Eindeckung mit Deckgläsern (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) mit Hilfe eines Einschlussmittels (Roti Histokitt; Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die eingedeckten Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 6.9.4.2 Safranin Orange/Echtgrün-Färbung

Der Farbstoff Safranin Orange (Safranin O) färbt Glykosaminoglykane orange-rot [270], während *Fast-Green* FCF und Hämatoxylin gemeinsam Zytoplasma und Kollagenfasern grün sowie Zellkerne violettschwarz darstellen [149, 277]. Die Färbung erfolgte gemäß eines modifizierten Protokolls nach John Alan Kiernan [149]. Zunächst wurden die histologischen Schnitte für 10 Minuten in Hämatoxylin-Lösung nach Weigert gefärbt, anschließend mit gefiltertem Leitungswasser gewaschen. In den nächsten Schritten wurden die Proben in Echtgrün-Lösung (0,02 %) für 4 Minuten, folgend dreimal kurz in Essigsäure (1%) sowie 10-12 Minuten in Safranin O-Lösung (1%) eingetaucht.

#### 6.9.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin färbt saure Strukturen, welche insbesondere in den Zellkernen enthalten sind (u.a. DNS, raues endoplasmatisches Retikulum), blau [125, 277]. Eosin stellt basische Strukturen - wie beispielsweise im Zellplasma enthaltene Proteine oder Kollagenfasern - rot dar [125]. Die Färbung orientierte sich an etablierten Färbeprotokollen [149, 277]. Die Schnitte wurden für 10 Minuten in Hämatoxylin-Lösung nach Harris gefärbt. Hiernach wurden die Proben unter gefiltertem Leitungswasser abgespült, für 3 Sekunden in Salzsäure (HCl)-Lösung differenziert und in erwärmtem, gefiltertem Leitungswasser (60°C) für 4 Minuten gebläut. Ein erneuter Färbedurchgang in Hämatoxylin-Lösung nach Harris (2,5 min) mit nachfolgender Spülung unter gefiltertem Leitungswasser und Anfärbung in Eosin-Lösung über 1,5 Minuten folgten.

## 6.9.4.4 Immunhistochemische Färbung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen

Wir verwendeten zur Darstellung der Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Expression die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (engl. avidin-biotin-peroxidase-complex; ABC) [126]. Hierzu nutzten wir primäre monoklonale anti-Typ-I- sowie anti-Typ-II-IgG (Immunglobulin G)-Antikörper (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland) und biotinylierte goat-anti-mouse-IgG-Antikörper (Vector, Burlingame, CA, USA). Die entparaffinierten und hydrierten Proben wurden in gefiltertem Leitungswasser gewaschen (2 x 1 min), anschließend in Wasserstoffperoxid-Lösung (0,3%) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals mit Leitungswasser gespült (2 x 1 min). Eine Andauung mit Trypsin-Lösung (0,5%) bei 37°C (10 min) und Spülung mit PBS-Lösung (2 x 1 min) folgten. Die Proben wurden für 30 Minuten in einem Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Antikörper wurden jeweils steril mit dem Blockierungspuffer verdünnt (Typ-I-Antikörper: 1:90; Typ-II-Antikörper: 1:45). Die histologischen Schnitte wurden mit einem Fettstift (PAP Pen Liquid Blocker; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) umrandet, in einer Nasskammer mit 200 µl des entsprechenden, verdünnten Antikörpers (anti-Typ-I- oder anti-Typ-II-IgG-Antikörper) bedeckt und nachfolgend bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Die Objektträger wurden nun mit PBS-Lösung gewaschen (2 x 5 min). Der sekundäre biotinylierte goat-anti-mouse-IgG-Antikörper (Vector, Burlingame, CA, USA) wurde mit PBS-Lösung verdünnt (1:200). Die Objektträger wurden nun mit 200 µl des verdünnten sekundären Antikörpers bedeckt und in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert (1 h). Hierauf folgten die Spülung mit PBS-Lösung (3 x 5 min) und eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur nach Aufbringen des ABC-Reagenz auf die Schnitte. Die Proben wurden anschließend in PBS-Lösung gewaschen (3 x 5 min), die DAB (Diaminobenzidin)-Lösung wurde aufgebracht und die Proben bei Raumtemperatur für 7 Minuten inkubiert. Abschließend spülten wir die Schnitte mit PBS-Lösung (3 x 5 min) und Leitungswasser (1 min).

### 6.9.5 Bewertungssysteme

Alle Analysen wurden verblindet durch zwei unabhängige Untersucher (Prof. Dr. med. Patrick Orth, Niklas Stachel) mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX45, Hamburg, Deutschland) bei 20- und 40facher Vergrößerung durchgeführt.

#### 6.9.5.1 Bewertung des osteochondralen Reparaturgewebes

Anhand von 8-10 Safranin O/Echtgrün- und Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten pro Defektregion (insgesamt 176 histologische Schnitte) wurde die osteochondrale Reparatur mit Hilfe des semiquantitativen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* [280] (max. 31 Punkte: kein Reparaturgewebe; min. 0 Punkte: physiologische osteochondrale Regeneration) (Tabelle 10) sowie nach Wakitani *et al.* [313] (max. 14 Punkte: kein Reparaturgewebe; min. 0 Punkte: physiologische osteochondrale Regeneration) (Tabelle 11) bewertet.

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung	91-100%	0
(in Relation zum	76-90% oder 111-125%	1
angrenzenden	51-75%	2
gesunden Knorpel)	26-50%	3
	< 25%	4
2. Integration des	Normale Kontinuität	0
Reparaturgewebes	Verminderte Zellularität	1
mit dem umliegenden	Spalte auf einer Seite	2
Knorpel	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbung mit	Normal	0
Safranin O/Echtgrün	Leicht vermindert	1
	Mittelstark vermindert	2
	Stark vermindert	3
	Keine Anfärbung	4

Tabelle 10: Histologisches Bewertungssystem nach Sellers et al. [280].

Methoden
----------

Kategorie	Parameter	Punkte
4. Zellmorphologie	Normal	0
	Vorwiegend runde Zellen mit Chondrozyten-	
	morphologie:	
	75% der Zellen angeordnet in Säulen in der	0
	basalen Zone	
	25- 75% der Zellen angeordnet in Säulen in der	1
	basalen Zone	
	< 25% der Zellen angeordnet in Säulen in der	2
	basalen Zone (desorganisiert)	
	50% runde Zellen mit Chondrozyten-	
	morphologie:	
	75% der Zellen angeordnet in Säulen in der	2
	basalen Zone	
	25-75% der Zellen angeordnet in Säulen in der	3
	basalen Zone	
	< 25% der Zellen angeordnet in Säulen in der	4
	basalen Zone (desorganisiert)	
	Vorwiegend spindelförmige, fibroblastenartige	5
	Zellen	
5. Defektarchitektur ohne	Normal	0
Berücksichtigung der	1-3 kleine Defekte/Lücken	1
Defektränder	1-3 große Defekte/Lücken	2
	> 3 große Defekte/Lücken	3
	Risse/Spalten	4
6. Oberflächenarchitektur	Normal	0
(Fibrillation = Auffaserung	Leichte Fibrillationen	1
der Oberfläche)	Mittelstarke Fibrillationen	2
	Starke Fibrillationen	3
7. Neubildung des	Falls der neugebildete Knochen unterhalb der	
subchondralen Knochens	tidemark liegt <sup>a</sup> :	
unterhalb des Defektes	90-100%	0
	75-89%	1
	50-74%	2
	25-49%	3
	< 25%	4
	Falls der neugebildete Knochen oberhalb der	
	tidemark liegt <sup>b</sup> :	
	90-100%	0
	75-89%	1
	50-74%	2
	25-49%	3
	< 25%	4
8. Formation der tidemark	Vollständig	0
	75-89%	1
	50-74%	2
	25-49%	3
	< 25%	4

<sup>a</sup> Prozentualer Anteil der wiederhergestellten subchondralen Knochenschicht im Vergleich zur ursprünglichen Situation. <sup>b</sup> Gemittelter prozentualer Anteil an der Gesamtdicke des Reparaturknorpels.

Tabelle 11: Histologisches Bewertungssys	stem nach Wakitani et al. [313].
--	----------------------------------

Kategorie	Punkte
1. Zellmorphologie	
Hyaliner Knorpel	0
Vorwiegend hyaliner Knorpel	1
Vorwiegend Faserknorpel	2
Vorwiegend Nicht-Knorpelgewebe	3
Nicht-Knorpelgewebe	4
2. Matrixanfärbung	
Normal (verglichen mit dem angrenzenden, gesunden Knorpel)	0
Leicht vermindert	1
Deutlich vermindert	2
Keine Anfärbung	3
3. Oberflächenbeschaffenheit (Anteil glatter Oberfläche an der gesamten Defektoberfläche)	
Glatt (> 3/4)	0
Moderat (> 1/2 - 3/4)	1
Irregulär (1/4 – 1/2)	2
Massiv irregulär (< 1/4)	3
4. Knorpeldicke im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	
> 2/3	0
1/3 – 2/3	1
< 1/3	2
5. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden Knorpel	
Beidseitig integriert	0
Auf einer Seite integriert	1
Auf keiner Seite integriert	2

## 6.9.5.2 Bewertung degenerativer Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels

Degenerative Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels beurteilten wir histologisch innerhalb von 3 mm lateral und medial der Defektränder mittels eines semiquantitativen Bewertungssystems nach Little *et al.* [169] (max. 25 Punkte: schwere Degeneration; min. 0 Punkte: normaler hyaliner Gelenkknorpel) (Tabelle 12). Pro Defekt wurden 3 Safranin O/Echtgrün-gefärbte Schnitte bewertet (insgesamt 63 histologische Schnitte). Tabelle 12: Histologisches Bewertungssystem nach Little et al. [169].

Kategorie	Punkte
1. Struktur (Bewertung des schlechtesten Areals)	
Normal	0
Leichte Oberflächen-Irregularitäten (Oberfläche kaum beeinträchtigt)	1
Moderate Oberflächen-Irregularitäten (Oberfläche aufgeraut)	2
Schwere Oberflächen-Irregularitäten (Risse, Fissuren, Fibrillationen bis < 10 % Tiefe)	3
Fissuren bis zur Transitionalzone (1/3 Tiefe)	4
Fissuren bis zur radialen Zone (2/3 Tiefe)	5
Fissuren bis zur kalzifizierten Zone (gesamte Tiefe)	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 zum subchondralen Knochen	10
2. Chondrozytendichte (Bewertung des gesamten Areals)	
Normal	0
Erhöht oder leicht erniedrigt	1
Moderat erniedrigt	2
Massiv erniedrigt	3
Keine Zellen	4
3. Zellklone (Bewertung des gesamten Areals)	
Normal	0
Einzelne Zelldubletten	1
Zahlreiche Zelldubletten	2
Zelldubletten und -tripletten	3
Mehrere Zellnester oder keine Zellen	4
4. Safranin O-Färbung (Bewertung des schlechtesten Areals)	
Normal	0
Abgeschwächte Färbung bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	1
Abgeschwächte Färbung bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	2
Abgeschwächte Färbung bis zur kalzifizierten Zone (gesamte Tiefe)	3
Keine Färbung	4
5. Tidemark/kalzifizierter Knorpel/subchondraler Knochen (Bewertung des	
schlechtesten Areals)	
Intakte subchondrale Knochenplatte und eine tidemark	0
Intakte subchondrale Knochenplatte und doppelte tidemark	1
Blutgefäße penetrieren die subchondrale Knochenplatte bis zum kalzifizierten Knorpel	2
Blutgefäße penetrieren die tidemark	3

## 6.9.5.3 Bewertung der Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Expression im Reparaturgewebe

Typ-I- und Typ-II-Kollagengehalt im Knorpelreparaturgewebe wurden jeweils anhand von 2 entsprechend immunhistochemisch angefärbter Schnitte aus dem Zentrum der distalen Defekthälfte beurteilt (jeweils 42 Schnitte). Typ-I- und Typ-II-Kollagen stellen sich in der jeweiligen immunhistochemischen Färbung braun dar. Die Farbintensität ist hierbei proportional zur Typ-I- und Typ-II-KollagenExpression im Gewebe. Die Bewertung des Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Gehaltes erfolgte jeweils anhand eines semiquantitativen Bewertungssystems [240] (Tabelle 13). Die Immunreaktivität von Typ-I-Kollagen im Knorpelreparaturgewebe wurde mit derjenigen des angrenzenden subchondralen Knochens verglichen. Der subchondrale Knochen hat einen hohen Typ-I-Kollagen-Gehalt, färbt sich daher intensiv braun und dient in der Bewertung als Positivkontrolle. Die Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität des Knorpelreparaturgewebes wiederum verglichen wir mit der des angrenzenden hyalinen Gelenkknorpels, welcher in diesem Fall als Positivkontrolle fungierte.

Tabelle 13: Bewertungssystem der Typ-I-/Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität [240].

Immunreaktivität	Punkte
Keine Immunreaktion	0
Signifikant reduzierte Immunreaktion	1
Moderat reduzierte Immunreaktion	2
Gleiche Immunreaktion	3
Ausgeprägtere Immunreaktion	4

Intensität der Immunreaktivität/Braunfärbung im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle (Typ-I-Kollagen: subchondraler Knochen; Typ-II-Kollagen: angrenzender Knorpel).

## 6.10 Statistische Analysen

Die Normalverteilung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft. Die Untersuchungen ergaben, dass alle Daten nicht normalverteilt waren. Daher wurde der Kruskal-Wallis-Test als Hypothesen-Test zur Datenanalyse, um alle drei Gruppen hinsichtlich der einzelnen Parameter miteinander zu vergleichen. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden die individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen für die jeweiligen Parameter analysiert. Hinsichtlich der Inzidenzen intraläsionaler Osteophyten und subchondraler Zysten wurden die einzelnen Gruppen unter Anwendung des Chi-Quadrat-Tests gegenübergestellt. Die Datenanalysen wurden mit Unterstützung von David Zurakowski (PhD; Boston Children 's Hospital, MA, USA) durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS Statistik 26 (IBM, Armonk, NY, USA) eingesetzt. Ein *P*-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle Daten werden im Folgenden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SA) dargestellt.

## 7 Ergebnisse

## 7.1 Analysen der Knorpelreparatur

## 7.1.1 Makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes

Die makroskopische Analyse der Knorpelreparatur erfolgte mit Hilfe des Bewertungssystems nach Goebel *et al.* [97] (Tabelle 6). Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 14 und Abbildung 11 dargestellt. Der Gesamtpunktwert des Reparaturgewebes nach alleinigem Defektdebridement zeigte sich diskret erhöht (MW ± SA Gesamtpunktwert:  $7,46 \pm 5,73$ ) im Vergleich zu beiden Behandlungsgruppen (6 Bohrlöcher:  $5,04 \pm 2,45$ ; 2 Bohrlöcher:  $4,96 \pm 1,98$ ). Das Reparaturgewebe in der Kontrollgruppe kennzeichnete sich tendenziell durch eine transparentere Farbe (Farbe:  $1,50 \pm 1,85$ ), oberflächliche Fibrillationen (Oberfläche:  $2,21 \pm 1,50$ ) und eine geringere Defektfüllung (Defektfüllung:  $1,46 \pm 1,40$ ), während beide Behandlungsgruppen ein weißlicheres Reparaturgewebe (Farbe 6 Bohrlöcher:  $0,57 \pm 0,61$ ; 2 Bohrlöcher:  $0,64 \pm 0,48$ ) aufwiesen, das den Defekt vollständiger ausfüllte (Defektfüllung 6 Bohrlöcher:  $0,64 \pm 0,24$ ; 2 Bohrlöcher:  $0,75 \pm 0,32$ ). Es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen allen drei Gruppen hinsichtlich der einzelnen individuellen Parameter ( $P \ge 0,518$ ) sowie der Gesamtpunktwerte (P = 0,768).



#### Abbildung 11: Übersicht makroskopische Bewertung des Reparaturgewebes.

Repräsentative, makroskopische Bilder der Gelenkknorpelreparatur sowie des angrenzenden Gelenkknorpels. *Schwarze Ecken*: Begrenzungen der Defektregion. Maßstab: 4 mm. Die mittleren Gesamtpunkwerte mit Standardabweichung sind als Boxplot dargestellt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [296].

	Defektbehandlung nach Debridement			P Wert	
Parameter	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Gesamt	Spezifisch
Farbe Reparaturgewebe	0,57 ± 0,61	$0,64 \pm 0,48$	1,50 ± 1,85	0,843	NB
Sichtbare Blutgefäße	0,71 ± 0,81	$0,50 \pm 0,50$	$0,39 \pm 0,64$	0,672	NB
Beschaffenheit Oberfläche	1,71 ± 0,74	1,46 ± 0,82	2,21 ± 1,50	0,591	NB
Defektfüllung	0,64 ± 0,24	$0,75 \pm 0,32$	1,46 ± 1,40	0,518	NB
Degeneration angrenzender Knorpel	1,39 ± 0,61	1,61 ± 0,76	1,89 ± 1,14	0,632	NB
Gesamtpunktwert	5,04 ± 2,45	4,96 ± 1,98	7,46 ± 5,73	0,768	NB

Tabelle 14: Ergebnisse makroskopischer Bewertung der Knorpelreparatur.

Bewertungssystem nach Goebel *et al.* [97]: 20 = kein Reparaturgewebe; 0 = normaler hyaliner Gelenkknorpel. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. NB, nicht berechnet.

### 7.1.2 Histologische Bewertung des Reparaturgewebes

Anhand Safranin O/Echtgrün- und Hämatoxylin-Eosin-gefärbter histologischer Schnitte wurde die osteochondrale Reparatur mit Hilfe der etablierten histologischen Bewertungssysteme [236] nach Sellers *et al.* [280] (Tabelle 10) und Wakitani *et al.* [313] (Tabelle 11) semiquantitativ durch 2 unabhängige Untersucher verblindet beurteilt.

### 7.1.2.1 Histologische Bewertung nach Sellers et al.

Die Ergebnisse der Bewertung sind in Tabelle 15 und Abbildung 12 dargestellt. Die histologischen Analysen mit Hilfe des Bewertungssystems nach Sellers *et al.* [280] (Tabelle 10) zeigten einen signifikant verbesserten Gesamtpunktwert der osteochondralen Reparatur nach Defektbehandlung mit 6 Bohrlöchern (17,67 ± 3,75; P = 0,009) sowie 2 Bohrlöchern (17,48 ± 4,09; P = 0,033) verglichen mit einem alleinigen Debridement (19,33 ± 4,62). Beide Anbohrungsgruppen induzierten ein Reparaturgewebe, welches den Defekt suffizienter ausfüllte (Defektfüllung 6 Bohrlöcher: 1,27 ± 1,37; P = 0,032; 2 Bohrlöcher: 1,37 ± 1,31; P = 0,043) sowie eine verbesserte Defektarchitektur mit weniger ausgedehnten Lücken innerhalb des Reparaturgewebes (Defektarchitektur 6 Bohrlöcher: 2,18 ± 1,58; P = 0,028; 2 Bohrlöcher: 2,24 ± 1,77; P = 0,036) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Defektfüllung: 2,04 ± 1,58; Defektarchitektur: 2,84 ± 1,48).

### Ergebnisse



Abbildung 12: Übersicht histologische Bewertung des Reparaturgewebes.

Dargestellt sind repräsentative histologische Schnitte der osteochondrale Reparatur aller 3 Gruppen. Die Bewertung der osteochondralen Reparatur erfolgte anhand der Bewertungssysteme nach Sellers *et al.* [280] und Wakitani *et al.* [313]. (A) Übersicht der Defektregionen mit angrenzendem Gelenkknorpel und subchondralem Knochen (Safranin O/Echtgrün-Färbung). Maßstab: 2 mm. (B) Ausschnitte der lateralen Defektregionen mit Integrationszonen zum angrenzenden Gelenkknorpel und subchondralen Knochen. Maßstab: 1 mm. (C) Ausschnitte der medialen Defektregionen mit Integrationszonen zum angrenzenden Gelenkknorpel und subchondralen Knochen. Maßstab: 1 mm. (A-C) Gestrichelte Linie: Normaler Verlauf der intakten Knorpeloberfläche; große Pfeilspitzen: Defektgrenzen; *kleine Pfeilspitzen*: Integrationszonen zum angrenzenden Gelenkknorpel; *Pfeile*: Integrationszonen zum subchondralen Knochen; *schwarzer Kreis*: Resorption subchondrale Knochenplatte. (D,E) Ausschnitte des Reparaturgewebes mit Darstellung der Defektarchitektur (**D**) und Oberflächenbeschaffenheit (**E**) (Hämatoxylin-Eosin-Färbung). *Pfeile*: Oberfläche Knorpelreparaturgewebe; Pfeilspitzen: Übergang zum subchondralen Knochen; Stern: (**D**) Riss in der Defektreparatur, (**E**) Fibrillationen der Knorpeloberfläche. Maßstab: 0,8 mm. Die Gesamtpunktwerte sowie exemplarische Individualparameter des histologischen Bewertungssystems nach Sellers *et al.* sind jeweils als Box-Plot dargestellt. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung; <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung; <sup>c</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* 2 Bohrlöcher. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [296].

Interessanterweise resultierten beide Behandlungsgruppen in einer stark verminderten bis fehlenden Matrixanfärbung (Matrixanfärbung 6 Bohrlöcher: 3,37 ± 0,77; 2 Bohrlöcher: 3,42 ± 0,69), welche sich verglichen mit der Kontrollgruppe verschlechtert zeigte (Matrixanfärbung: 2,86 ± 1,08; 6 Bohrlöcher: P = 0,012; 2 Bohrlöcher: P = 0,006). Eine Defektbehandlung mit 2 Bohrlöchern wiederum mündete in einem Knorpelreparaturgewebe mit lediglich mäßigen Fibrillationen der Oberfläche (Oberflächenarchitektur: 1,92 ± 1,06), während nach Behandlung mit 6 Bohrlöchern (Oberflächenarchitektur: 2,54 ± 0,84) sowie einem alleinigem Defektdebridement (Oberflächenarchitektur: 2,80 ± 0,50) signifikant stärker ausgeprägte Fibrillationen der Oberfläche zu erkennen waren (P < 0,001). Hinsichtlich aller weiteren individuellen Bewertungsparameter bestanden keine signifikanten Unterschiede in der induzierten osteochondralen Reparatur zwischen beiden Behandlungsgruppen ( $P \ge 0,774$ ).

	Defektbehandlung nach Debridement			<i>P</i> Wert	
Parameter	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Gesamt	Spezifisch
Defektfüllung	1,27 ± 1,37	1,37 ± 1,31	2,04 ± 1,58	0,048	0,032 <sup><i>a</i></sup> ; 0,043 <sup><i>b</i></sup>
Integration	1,67 ± 0,70	$2,03 \pm 0,72$	$2,00 \pm 0,74$	0,009	NS
Matrixanfärbung	3,37 ± 0,77	$3,42 \pm 0,69$	2,86 ± 1,08	0,010	0,012 <sup>a</sup> ; 0,006 <sup>b</sup>
Zellmorphologie	2,63 ± 1,11	2,53 ± 1,04	2,80 ± 1,24	0,536	NB
Defektarchitektur	2,19 ± 1,58	2,24 ± 1,77	2,84 ± 1,48	0,048	0,028 <sup>a</sup> ; 0,036 <sup>b</sup>
Oberflächenarchitektur	2,54 ± 0,84	1,92 ± 1,06	$2,80 \pm 0,50$	<0,001	<0,001 <sup>bc</sup>
Subchondraler Knochen	$0,00 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,27$	$0,00 \pm 0,00$	0,010	NS
tidemark	$4,00 \pm 0,00$	$4,00 \pm 0,00$	$4,00 \pm 0,00$	1,000	NB
Gesamtpunktwert	17,67 ± 3,75	17,48 ± 4,09	19,33 ± 4,62	0,025	0,009 <sup>a</sup> ; 0,033 <sup>b</sup>

Tabelle 15: Ergebnisse histologischer Bewertung des Reparaturgewebes nach Sellers et al. [280].

Bewertungssystem nach Sellers *et al.* [280]: 31 = kein Reparaturgewebe; 0 = osteochondrale Regeneration. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. NB, nicht berechnet. NS, nicht signifikant. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>c</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* 2 Bohrlöcher.

#### 7.1.2.2 Histologische Bewertung nach Wakitani et al.

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der Analysen der Knorpelreparatur anhand des semiquantitativen Bewertungssystems nach Wakitani et al. [313] (Tabelle 11). Diese wiesen ebenfalls eine verbesserte Gesamtreparatur in beiden Behandlungsgruppen (Gesamtpunktwert 6 Bohrlöcher: 7,44  $\pm$  2,49; P = 0.015; 2 Bohrlöcher: 7,34  $\pm$  1,90; P = 0,020) verglichen mit der Kontrollgruppe nach (Gesamtpunktwert: 8,54 ± 2,72). Hierbei verbesserte eine Defektbehandlung mit 6 oder 2 Bohrlöchern die Dicke (Knorpeldicke 6 Bohrlöcher:  $0,41 \pm 0,75$ ; P = 0,001; 2 Bohrlöcher:  $0,48 \pm 0,76$ ; P = 0,002) sowie Oberflächenbeschaffenheit (Oberflächenbeschaffenheit 6 Bohrlöcher:  $1,92 \pm 1,05$ ; P = 0,038; 2 Bohrlöcher:  $1,21 \pm 1,07$ ; P < 0,001) des induzierten Knorpelreparaturgewebes verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement (Knorpeldicke:  $0.78 \pm 0.84$ ; Oberflächenbeschaffenheit:  $2.46 \pm 0.79$ ). Zwar induzierte die Defektbehandlung mit 2 Bohrlöchern auch im Vergleich zu einer Behandlung mit 6 Bohrlöchern ein Reparaturgewebe mit glatterer Oberfläche (P < 0,001), jedoch zeigte die extrazelluläre Matrix des Reparaturgewebes eine nur schwache bis nicht vorhandene Anfärbung mit Safranin O/Echtgrün (Matrixanfärbung:  $2,53 \pm 0,50$ ), welche gegenüber der Kontrollgruppe (Matrixanfärbung:  $2,12 \pm 0,72$ ) signifikant vermindert war (P = 0,006). Den Einfluss der Bohrlochdichte betrachtend, konnten wir keine weiteren signifikanten Unterschiede hinsichtlich aller weiteren individuellen Parameter ( $P \ge 0.514$ ) sowie des Gesamtpunktwertes (P = 0,857) beobachten.

	Defektbehandlung nach Debridement			P Wert	
Parameter	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Gesamt	Spezifisch
Zellmorphologie	2,08 ± 0,27	2,21 ± 0,41	$2,32 \pm 0,74$	0,119	NB
Matrixanfärbung	2,38 ± 0,77	2,53 ± 0,50	$2,12 \pm 0,72$	0,031	0,006 <sup>b</sup>
Beschaffenheit Oberfläche	1,92 ± 1,05	1,21 ± 1,07	2,46 ± 0,79	<0,001	<0,001 <sup>bc</sup> ; 0,038 <sup>a</sup>
Knorpeldicke	0,41 ± 0,75	0,48 ± 0,76	0,78 ± 0,84	<0,001	<0,001 <sup>a</sup> ; 0,002 <sup>b</sup>
Integration	$0,65 \pm 0,70$	$0,90 \pm 0,65$	0,86 ± 0,81	0,089	NB
Gesamtpunktwert	7,44 ± 2,49	7,34 ± 1,90	8,54 ± 2,72	0,025	0,015²; 0,020 <sup>b</sup>

Tabelle 16: Ergebnisse histologischer Bewertung der Knorpelreparatur nach Wakitani et al. [313].

Bewertungssystem nach Wakitani *et al.* [313]: 14 = kein Reparaturgewebe; 0 = chondrale Regeneration. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. NB, nicht berechnet. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>c</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* 2 Bohrlöcher.

Die histologische Bewertung nach Sellers *et al.* und Wakitani *et al.* zusammenfassend resultierte eine Defektbehandlung unabhängig der Bohrlochdichte in einem faserknorpelartigem Reparaturgewebe mit Anteilen chondrozytenartiger Zellen (ca. 50 %), welches den Defekt suffizient im Mittel mehr als 76 % ausfüllte, jedoch eine reduzierte Matrixanfärbung mit Safranin O/Echtgrün - ein indirektes Maß für den Glykosaminoglykan-, Kollagen- und Zellgehalt - sowie eine nur teilständige Integration zum angrenzenden Gelenkknorpel aufwies. Die Defektreparatur zeigte sich gegenüber einem alleinigen Defektdebridement insgesamt und speziell hinsichtlich der Defektfüllung und Architektur des Reparaturgewebes verbessert. Hinsichtlich der Bohrlochdichte konnte bis auf eine verbesserte Oberflächenbeschaffenheit nach Behandlung mit 2 Bohrlöchern gegenüber 6 Bohrlöchern kein signifikanter Einfluss auf die osteochondrale Reparatur nachgewiesen werden (Abbildung 12).

### 7.1.3 Immunhistochemische Bewertung der Knorpelreparatur

Den Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Gehalt im Knorpelreparaturgewebe bewerteten wir semiquantitativ anhand immunhistochemisch gefärbter histologischer Schnitte (Tabelle 13) [240]. Die Intensität der Braunfärbung ist hierbei proportional zur Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Expression. Die Ergebnisse der Bewertungen sind in Tabelle 17 und Abbildung 13 dargestellt. Eine Defektbehandlung mit 6 Bohrlöchern steigerte den Typ-II-Kollagen-Gehalt im Knorpelreparaturgewebe signifikant im Vergleich zu unbehandelten Defekten (6 Bohrlöcher:  $3,71 \pm 0,49$ ; keine Anbohrung:  $2,20 \pm 1,48$ ; P = 0,038). Es bestanden keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Typ-II-Kollagen-Expression ( $P \ge 0,103$ ). Die Typ-I-Kollagen-Immunreaktivität zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich zwischen den einzelnen Gruppen (6 Bohrlöcher:  $1,86 \pm 0,69$ ; 2 Bohrlöcher:  $1,86 \pm 0,69$ ; keine Anbohrung:  $1,60 \pm 0,55$ ;  $P \ge 0,664$ ).

	Defektb	P Wert		
Parameter	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Spezifisch
Typ-I-Kollagen	1,86 ± 0,69	1,86 ± 0,69	1,60 ± 0,55	NS
Typ-II-Kollagen	$3,71 \pm 0,49$	2,71 ± 1,11	2,20 ± 1,48	0,038ª

Die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen wurde semiquantitativ mit der des angrenzenden subchondralen Knochens verglichen [240]: 0 = keine Immunreaktivität; 4 = Immunreaktivität stärker als im angrenzenden subchondralen Knochen. Die Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen wurde mit der des angrenzenden Gelenkknorpels verglichen [240]: 0 = keine Immunreaktivität; 4 = Immunreaktivität stärker als im angrenzenden Gelenkknorpel. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. NS, nicht signifikant. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher versus keine Anbohrung.

#### Ergebnisse



Abbildung 13: Übersicht immunhistochemische Bewertung des Reparaturgewebes. Dargestellt sind repräsentative immunhistochemisch gefärbte Schnitte der Defektregionen aller 3 Gruppen. (A) Immunhistochemische Färbung für Typ-I-Kollagen. Die Intensität der Immunreaktivität (Braunfärbung) des Reparaturgewebes wurde semiquantitativ mit der des subchondralen Knochens (Positivkontrolle) verglichen [240]. (B) Immunhistochemische Färbung für Typ-II-Kollagen. Die Intensität der Immunreaktivität (Braunfärbung) des Reparaturgewebes wurde semiquantitativ mit der des angrenzenden Gelenkknorpels (Positivkontrolle) verglichen [240]. *Große Pfeilspitzen*: Defektgrenzen; *kleine Pfeilspitzen*: Integrationszonen zum angrenzenden Gelenkknorpel; *Pfeile*: Integrationszonen zum subchondralen Knochen. Maßstab: 2 mm. Die Gesamtpunktwerte der Immunreaktivität für Typ-I- und Typ-II-Kollagen sind jeweils als Box-Plot dargestellt. <sup>a</sup> *P* < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [296].

### 7.1.4 Biochemische Analysen der Knorpelreparatur

DNS- [151], Protein- [290] und Proteoglykangehalte [214] des Knorpelreparaturgewebes sowie des an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpels wurden fluorometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 18 dargestellt. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allen 3 Gruppen hinsichtlich DNS-Gehalt (DNS/Gesamtprotein;  $P \ge 0,073$ ), Proteoglykan-Gehalt (Proteoglykan/Gesamtprotein;  $P \ge 0,297$ ) und Proteoglykan/DNS-Verhältnis ( $P \ge 0,295$ ) im Knorpelreparaturgewebe sowie angrenzenden Gelenkknorpel. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Reparaturgewebe der 3 Gruppen sowie dem angrenzenden Gelenkknorpel gefunden werden ( $P \ge 0,375$ ). Das Reparaturgewebe nach Anbohrung zeigte sich allerdings in beiden Behandlungsgruppen tendenziell zellärmer (DNS/Gesamtprotein (ng/mg) 6 Bohrlöcher: 1804,34 ± 1002,02; 2 Bohrlöcher: 1850,26 ± 1459,49), jedoch mit höherem Proteoglykangehalt (Proteoglykan/Gesamtprotein ( $\mu$ g/ng) 6 Bohrlöcher: 78,76 ± 42,01; 2 Bohrlöcher: 84,62 ± 35,07) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (DNS/Gesamtprotein (ng/mg): 3461,09 ± 2686,41; Proteoglykan/Gesamtprotein ( $\mu$ g/ng): 58,70 ± 28,39) sowie dem angrenzenden Gelenkknorpel (DNS/Gesamtprotein (ng/mg):

2112,96 ± 1287,38; Proteoglykan/Gesamtprotein ( $\mu$ g/ng): 68,30 ± 21,74). Das Proteoglykan/DNS-Verhältnis erschien interessanterweise in beiden Behandlungsgruppen physiologischer (Proteoglykan/DNS ( $\mu$ g/ng) 6 Bohrlöcher: 0,06 ± 0,05; 2 Bohrlöcher: 0,05 ± 0,02; keine Anbohrung: 0,03 ± 0,02) und dem angrenzenden Gelenkknorpel ähnlicher (Proteoglykan/DNS ( $\mu$ g/ng): 0,05 ± 0,03).

			· ·	•		
		Defektbehandlung nach Debridement				P Wert
Parameter	Einheit	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Angrenzender Gelenkknorpel	Spezifisch
DNS/ Gesamtprotein	ng/mg	1804,34 ± 1002,02	1850,26 ± 1459,49	3461,09 ± 2686,41	2112,96 ± 1287,38	NS
Proteoglykan/ Gesamtprotein	µg/ng	78,76 ± 42,01	84,62 ± 35,07	58,70 ± 28,39	68,30 ± 21,74	NS
Proteoglykan/ DNS	µg/ng	0,06 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,03	NS

Tabelle 18: Ergebnisse biochemischer Analysen der Knorpelreparatur.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Mittelwerte ± Standardabweichungen aller Messergebnisse der angrenzenden Gelenkknorpelregionen sind zusammengefasst als "Angrenzender Gelenkknorpel" angegeben. NS, nicht signifikant.

## 7.2 Analysen des angrenzenden Gelenkknorpels

### 7.2.1 Makroskopische Ausmessung degenerativer Veränderungen

Nach India-Ink-Tuschefärbung [197] wurden die angefärbten Flächen degenerativer Veränderungen des an die distale Defekthälfte angrenzenden Gelenkknorpels eingezeichnet und ausgemessen. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen. Die Behandlung mit 6 und 2 Bohrlöchern verringerte die Flächen makroskopisch sichtbarer arthrotischer Veränderungen im angrenzenden Gelenkknorpel signifikant (Fläche (mm<sup>2</sup>) 6 Bohrlöcher: 2,98 ± 0,85; P = 0,032; 2 Bohrlöcher: 2,44 ± 1,47; P = 0,016) im Vergleich zu einem alleinigen Defektdebridement (Fläche (mm<sup>2</sup>): 5,88 ± 2,04). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen beiden Behandlungsgruppen (P = 0,421).



Abbildung 14: Übersicht makroskopische Ausmessung degenerativer Veränderungen.

Darstellung repräsentativer makroskopischer Bilder nach Tuschefärbung. *Rot eingefärbte Fläche*: distale Defektregion; *gestrichelte Linie*: Begrenzung der *region of interest* (ROI) im angrenzenden Gelenkknorpel 2,5 mm um die distalen Defekthälften (42,5 mm<sup>2</sup>). Die Flächen der angefärbten arthrotischen Veränderungen wurden innerhalb der ROI manuell ausgemessen. Die Ergebnisse sind jeweils als Box-Plot dargestellt. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung; <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung.

## 7.2.2 Histologische Bewertung degenerativer Veränderungen nach Little et al.

Der medial und lateral angrenzende Gelenkknorpel wurde mit Hilfe des semiquantitativen Bewertungssystems nach Little *et al.* [169] (Tabelle 12) hinsichtlich arthrotischer Veränderungen beurteilt. Tabelle 19 fasst die Ergebnisse der Analysen zusammen. Zwischen den einzelnen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtpunktwertes histologisch nachweisbarer degenerativer Veränderungen im angrenzenden Gelenkknorpel (6 Bohrlöcher: 8,67 ± 1,68; 2 Bohrlöcher: 8,76 ± 3,11; keine Anbohrung: 8,33 ± 2,29; P = 0,743). Eine Behandlung mit 6 Bohrlöchern induzierte signifikant
mehr Zellkonglomerate aus 2-3 Zellen im angrenzenden Gelenkknorpel (Zellklone: 2,81 ± 0,68) im Vergleich zu einer Behandlung mit 2 Bohrlöchern (Zellklone: 2,33 ± 0,80; P = 0,023) und zu einem alleinigen Defektdebridement (Zellklone: 1,86 ± 0,86; P = 0,001). Hinsichtlich aller weiteren individuellen Bewertungsparameter bestand kein signifikanter Unterschied zwischen allen 3 Gruppen ( $P \ge 0,074$ ). Tendenziell wies die angrenzende Gelenkknorpeloberfläche nach einer Behandlung mit 6 Bohrlöchern (Struktur: 1,33 ± 1,35) zwar weniger Irregularitäten auf als nach einer Behandlung mit 2 Bohrlöchern (Struktur: 2,00 ± 2,35; P = 0,074) und nach alleinigem Defektdebridement (Struktur: 2,33 ± 1,23; P = 0,074), jedoch zeigte sich ein vergleichsweise ausgeprägteres Einwandern von Blutgefäßen im Bereich des osteochondralen Übergangs (*tidemark* 6 Bohrlöcher: 2,43 ± 0,68; 2 Bohrlöcher: 1,95 ± 0,67; keine Anbohrung: 2,07 ± 0,96;  $P \ge 0,114$ ).

 Tabelle 19: Ergebnisse histologischer Bewertung degenerativer Veränderungen im angrenzenden Gelenkknorpel.

	Defektbe	ehandlung nach D	P Wert		
Parameter	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Gesamt	Spezifisch
Struktur	1,33 ± 1,35	2,00 ± 2,35	2,33 ± 1,23	0,074	NB
Chondrozytendichte	$1,00 \pm 0,00$	1,05 ± 0,38	$1,00 \pm 0,00$	0,744	NB
Zellklone	2,81 ± 0,68	2,33 ± 0,80	1,86 ± 0,86	0,002	0,001 <sup>a</sup> ; 0,023 <sup>b</sup>
Safranin O-Färbung	1,10 ± 0,30	1,43 ± 0,75	1,20 ± 0,41	0,241	NB
tidemark	$2,43 \pm 0,68$	1,95 ± 0,67	$2,07 \pm 0,96$	0,114	NB
Gesamtpunktwert	8,67 ± 1,68	8,76 ± 3,11	8,33 ± 2,29	0,743	NB

Bewertungssystem nach Little *et al.*: 25 = schwere Degeneration; 0 = normaler hyaliner Gelenkknorpel. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. NB, nicht bestimmt. <sup>*a*</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>*b*</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* 2 Bohrlöcher.

#### 7.2.3 Biochemische Analysen des angrenzenden Gelenkknorpels

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tabelle 20 dargestellt. Tendenziell zeigte sich in der Behandlungsgruppe mit 6 Bohrlöchern der höchste DNS-Gehalt (DNS/Gesamtprotein (ng/mg) 6 Bohrlöcher: 2515,75 ± 1986,85; 2 Bohrlöcher: 1984,54 ± 1012,29; keine Anbohrung: 1838,58 ± 505,78) sowie Proteoglykangehalt (Proteoglykan/Gesamtprotein ( $\mu$ g/ng) 6 Bohrlöcher: 77,91 ± 34,21; 2 Bohrlöcher: 68,00 ± 11,20; keine Anbohrung: 60,35 ± 15,14). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (DNS/Gesamtprotein:  $P \ge 0,620$ ; Proteoglykan/Gesamtprotein:  $P \ge 0,295$ ). Auch das Proteoglykan/DNS-Verhältnis im angrenzenden Gelenkknorpel wies keine signifikanten Unterschiede zwischen allen 3 Gruppen auf (Proteoglykan/DNS ( $\mu$ g/ng) 6 Bohrlöcher: 0,05 ± 0,04; 2 Bohrlöcher: 0,05 ± 0,04; keine Anbohrung: 0,04 ± 0,02;  $P \ge 0,604$ ).

		Defektbehandlung nach Debridement			P Wert
Parameter	Einheit	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Spezifisch
DNS/ Gesamtprotein	ng/mg	2515,75 ± 1986,85	1984,54 ± 1012,29	1838,58 ± 505,78	NS
Proteoglykan/ Gesamtprotein	µg/ng	77,91 ± 34,21	68,00 ± 11,20	60,35 ± 15,14	NS
Proteoglykan/ DNS	µg/ng	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,04 ± 0,02	NS

Tabelle 20: Ergebnisse biochemischer Analysen des angrenzenden Gelenkknorpels.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. NS, nicht signifikant.

## 7.3 Radiologische Analysen des subchondralen Knochens

#### 7.3.1 Mikrostrukturelle Analysen des subchondralen Knochens

Der subchondrale Knochen wurde radiologisch mittels Mikro-CT analysiert. Die einzelnen mikrostrukturellen Parameter wurden in definierten VOIs bestimmt. Hierbei wurden die subchondrale Knochenplatte (VOIs: SKD, SKA, SKN) und subartikuläre Spongiosa (VOIs: SSD, SSA, SSN) getrennt voneinander beurteilt (Abbildung 10).

#### 7.3.1.1 Subchondrale Knochenplatte

Die mikrostrukturellen Parameter der subchondrale Knochenplatte der Defektregion (SKD), der angrenzenden subchondrale Knochenplatte (SKA) und der normalen subchondralen Knochenplatte mit einem Abstand von 3,5 mm medial angrenzend an die Defektregion (SKN) wurden radiologisch analysiert (Abbildung 10). Die Ergebnisse der Analysen werden in Tabelle 21 aufgeführt. In der subchondralen Knochenplatte der Defektregion zeigte sich nach alleinigem Defektdebridement eine signifikant reduzierte Knochenmineraldichte (BMD (mg/cm<sup>3</sup>): 704,84 ± 14,79) im Vergleich zu beiden Behandlungsgruppen (BMD (mg/cm<sup>3</sup>) 6 Bohrlöcher: 767,31 ± 46,20; P = 0,009; 2 Bohrlöcher: 785,49 ± 57,64; P =0,015). Knochenvolumenanteil (BV/TV (%) 6 Bohrlöcher: 19,02 ± 18,56; 2 Bohrlöcher: 19,34 ± 15,05; keine Anbohrung: 23,37 ± 16,49), Knochenoberflächendichte (BS/TV (1/mm) 6 Bohrlöcher: 8,98 ± 7,79; 2 Bohrlöcher: 10,28 ± 8,82; keine Anbohrung: 11,22 ± 8,43) sowie kortikale Dicke (Ct.Th (mm) 6 Bohrlöcher: 0,14 ± 0,09; 2 Bohrlöcher: 0,16 ± 0,12; keine Anbohrung: 0,18 ± 0,13) dieser Region waren verglichen mit den Normalkontrollen signifikant verringert (BV/TV (%) Normalkontrollen: 68,97; *P* 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher/keine Anbohrung = 0,002/0,002/0,002; BS/TV (1/mm) Normalkontrollen: 28,00; *P* 6 Bohrlöcher/2Bohrlöcher/keine Anbohrung = 0,002/0,015/0,002; Ct.Th (mm) Normalkontrollen: 0,33; *P* 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher/keine Anbohrung = <0,001/0,007/0,007). Hinsichtlich der weiteren mikrostrukturellen Parameter der subchondralen Knochenplatte bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen bezogen auf die Defektregion, den angrenzenden subchondralen Knochen sowie gegenüber den Normalkontrollen (*P*  $\ge$  0,699). Zusammenfassend zeigte sich in allen 3 Gruppen eine geschwächte Mikrostruktur der subchondralen Knochenplatte direkt unterhalb der Defektregion mit signifikant reduzierter kortikaler Dicke (Ct.Th), Kochenoberflächendichte (BS/TV) sowie signifikant reduziertem Knochenvolumen (BV/TV). Jedoch resultierte eine Behandlung mit 6 und 2 Bohrlöchern in einer signifikant verbesserten Knochenmineraldichte (BMD) dieser Region verglichen mit einem alleinigen Debridement.

	Defektbehandlung nach Debridement					P Wert
Parameter, Einheit	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	SKA	SKN	Spezifisch
BMD,	767,31	785,49	704,84	766,47	766,96	0,009 <sup>a</sup> ; 0,015 <sup>b</sup>
mg/cm <sup>3</sup>	± 46,20	± 57,64	± 14,79	± 118,80	± 97,12	
BV/TV,	19,02	19,34	23,37	63,40	68,97	0,002 <sup>cde</sup>
%	± 18,56	± 15,05	± 16,49	± 12,64	± 11,56	
BS/BV,	58,91	52,59	74,82	47,69	42,11	NS
1/mm	± 25,62	± 8,00	± 65,34	± 12,60	± 10,93	
BS/TV,	8,98	10,28	11,22	28,79	28,00	0,002 <sup>ce</sup> ; 0,015 <sup>d</sup>
1/mm	± 7,79	± 8,82	± 8,43	± 2,40	± 2,42	
Ct.Th,	0,14	0,16	0,18	0,35	0,33	<0,001 <sup><i>c</i></sup> ; 0,007 <sup><i>d</i>e</sup>
mm	± 0,09	± 0,12	± 0,13	± 0,06	± 0,07	

 Tabelle 21: Ergebnisse mikrostruktureller Analysen der subchondralen Knochenplatte.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Mittelwerte ± Standardabweichungen der angrenzenden VOIs aller Gruppen werden zusammengefasst als SKA ("Subchondrale Knochenplatte Angrenzend") angegeben. Die Mittelwerte ± Standardabweichungen der normalen VOIs aller Gruppen werden zusammengefasst als SKN ("Subchondrale Knochenplatte Normal"; Normalkontrollen) angegeben. NS, nicht signifikant. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>c</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* Normalkontrollen. <sup>d</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* Normalkontrollen. <sup>e</sup> P < 0,05 für keine Anbohrung *versus* Normalkontrollen.

#### 7.3.1.2 Subartikuläre Spongiosa

Die subartikuläre Spongiosa wurde mikrostrukturell direkt unterhalb der Defektregion (SSD), direkt angrenzend (SSA) sowie angrenzend mit einem Abstand von 3,5 mm medial der Defektregion als Normalkontrolle (SSN) analysiert (Abbildung 10). Tabelle 22 zeigt die Untersuchungsergebnisse. Auch in der subartikulären Spongiosa der Defektregion induzierte das alleinige Defektdebridement eine signifikant reduzierte Knochenmineraldichte (BMD (mg/cm<sup>3</sup>): 753,52  $\pm$  13,74) verglichen mit beiden

Behandlungsgruppen (BMD (mg/cm<sup>3</sup>) 6 Bohrlöcher: 799,07  $\pm$  36,38; P = 0,026; 2 Bohrlöcher: 805,93  $\pm 44,93$ ; P = 0,041) sowie den Normalkontrollen (BMD (mg/cm<sup>3</sup>): 822,84  $\pm 84,22$ ; P = 0,023). Auch die fractal dimension - ein Maß für die Oberflächenkomplexität des Knochens - war in der Defektregion nach Debridement (FD:  $2,12 \pm 0,18$ ) gegenüber einer Behandlung mit 6 Bohrlöchern (FD:  $2,37 \pm 0,05$ ; P = 0,002) und 2 Bohrlöchern (FD: 2,36 ± 0,07; P = 0,006) sowie den Normalkontrollen (FD: 2,33 ± 0,04; P = 0,001) signifikant reduziert, während die Dicke der Knochentrabekel gegenüber beiden Behandlungsgruppen erhöht war (Tb.Th (mm) keine Anbohrung:  $0.12 \pm 0.00$ ; 6 Bohrlöcher:  $0.10 \pm 0.02$ ; 2 Bohrlöcher:  $0.09 \pm 0.02$ ; P 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher = 0.048/0.006). Das Knochenoberflächen/Knochenvolumen-Verhältnis - ein Maß für die freie Oberfläche des Knochens, an der Knochenumbau stattfinden kann - war nach alleinigem Defektdebridement am niedrigsten (BS/BV (1/mm) keine Anbohrung:  $29,65 \pm 1,33$ ; 6 Bohrlöcher:  $39,28 \pm 10,62$ ; 2 Bohrlöcher:  $42,45 \pm 12,39$ ; Normalkontrollen: 32,10 $\pm$  9,82), wobei sich der Unterschied gegenüber der Behandlungsgruppe mit 2 Bohrlöchern als signifikant erwies (P = 0.026). Alle 3 Gruppen zeigten eine signifikante Reduktion des Anisotropiegrades (Grad der Komplexität der Knochenmikrostruktur; DA 6 Bohrlöcher:  $0.33 \pm 0.04$ ; 2 Bohrlöcher:  $0.33 \pm 0.04$ ; keine Anbohrung:  $0,31 \pm 0,10$ ) gegenüber den Normalkontrollen auf (DA Normalkontrollen:  $2,33 \pm$ 0,04; P 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher/keine Anbohrung jeweils < 0,001). Eine Behandlung mit 6 Bohrlöchern oder 2 Bohrlöchern erhöhte des Weiteren den Anteil der Knochenoberfläche am Gesamtvolumen der VOI in der subartikulären Spongiosa der Defektregion (Knochenoberflächendichte; BS/TV (1/mm) 6 Bohrlöcher: 8,79 ± 1,87; 2 Bohrlöcher: 9,25 ± 1,47) gegenüber unbehandelten Defekten (BS/TV (1/mm): 7,37 ± 1,48), der direkt angrenzenden subartikulären Spongiosa (BS/TV (1/mm): 7,53 ± 0,84) sowie den Normalkontrollen (BS/TV (1/mm): 7,95  $\pm$  0,79), wobei lediglich der Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe mit 2 Bohrlöchern und den Normalkontrollen signifikant war (P = 0.041). Auch der structure model index - ein Indikator für die Trabekelstruktur - war nach einer Behandlung mit 2 Bohrlöchern gegenüber den Normalkontrollen signifikant erhöht (SMI 2 Bohrlöcher:  $0.25 \pm 1.04$ ; Normalkontrollen:  $-0,22 \pm 0,73$ ; P = 0,024). Hinsichtlich der weiteren individuellen Parameter bestand kein signifikanter Unterschied in der subartikulären Spongiosa der Defektregion zwischen allen 3 Gruppen sowie im Vergleich zur direkt angrenzenden subartikulären Spongiosa sowie den Normalkontrollen (P  $\geq 0.310$ ). Zusammenfassend resultierte die subchondrale Anbohrung unabhängig der Bohrlochdichte im Vergleich zu einem alleinigen Defektdebridement in einer verbesserten Wiederherstellung der subartikulären Spongiosa direkt unterhalb der Defektregion angezeigt durch eine signifikant erhöhte Knochenmineraldichte und signifikant physiologischere fractal dimension. Dies scheint aus einem gesteigerten Knochenauf- und -umbau zu resultieren, welcher sich durch ein erhöhtes Knochenoberflächen/Knochenvolumen-Verhältnis (BS/BV), eine tendenziell höhere Knochenoberflächendichte (BS/TV) sowie das Vorliegen von signifikant dünneren Knochentrabekeln (Tb.Th) in höherer Anzahl (Tb.N 6 Bohrlöcher: 2,45  $\pm$  0,58; 2 Bohrlöcher: 2,57  $\pm$  0,54; keine Anbohrung: 2,12  $\pm$  0,44;  $P \ge$  0,482) kennzeichnet.

In der direkt angrenzenden subartikulären Spongiosa war der Grad der Anisotropie in allen 3 Gruppen im Vergleich zu den Normalkontrollen erniedrigt (DA SSA:  $1,50 \pm 0,17$ ; Normalkontrollen:  $1,94 \pm 0,33$ ; *P* 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher/keine Anbohrung= 0,003/0,037/0,004). Ein alleiniges Defektdebridement reduzierte die *fractal dimension* in der direkt angrenzenden subartikulären Spongiosa (FD SSA keine Anbohrung:  $2,14 \pm 0,25$ ) im Vergleich zu den Normalkontrollen (FD Normalkontrollen:  $2,33 \pm 0,04$ ; *P* = 0,048) sowie im Vergleich zur direkt angrenzenden subartikulären Spongiosa nach Behandlung mit 2 Bohrlöchern (FD SSA 2 Bohrlöcher:  $2,32 \pm 0,03$ ; *P* = 0,036). Hinsichtlich aller weiteren Einzelparameter bestanden keine signifikanten Unterschiede in der direkt angrenzenden subartikulären Spongiosa zwischen allen 3 Gruppen sowie im Vergleich zu den Normalkontrollen (*P* ≥ 0,078).

	Defektbehandlung nach Debridement					P Wert
Parameter, Einheit	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	SSA	SSN	Spezifisch
BMD	799,07 ± 36,38	805,93 ± 44,93	753,52 ± 13,74	811,20 ± 85,99	822,84 ± 84,22	0,026 <sup>a</sup> ; 0,041 <sup>b</sup> ; 0,023 <sup>e</sup>
BV/TV,	23,78	23,36	24,97	22,49	26,93	NS
%	± 8,31	± 7,37	± 5,60	± 5,42	± 8,27	
BS/BV,	39,28	42,45	29,65	35,40	32,10	0,026 <sup>b</sup>
1/mm	± 10,62	± 12,39	± 1,33	± 9,34	± 9,82	
BS/TV,	8,79	9,25	7,37	7,53	7,95	0,041 <sup><i>d</i></sup>
1/mm	± 1,87	± 1,47	± 1,48	± 0,84	± 0,79	
Tb.Pf,	-8,23	-7,55	-7,69	-5,64	-7,86	NS
1/mm	± 5,62	± 10,02	± 2,04	± 3,08	± 3,35	
SMI	0,22 ± 0,79	0,25 ± 1,04	0,10 ± 0,15	0,50 ± 0,78	-0,22 ± 0,73	0,024 <sup><i>d</i></sup>
Tb.Th,	0,10	0,09	0,12	0,10	0,11	0,048 <sup>a</sup> ; 0,006 <sup>b</sup>
mm	± 0,02	± 0,02	± 0,00	± 0,02	± 0,03	
Tb.N,	2,45	2,57	2,12	2,14	2,39	NS
1/mm	± 0,58	± 0,54	± 0,44	± 0,25	± 0,30	
Tb.Sp,	0,42	0,38	0,42	0,43	0,41	NS
mm	± 0,10	± 0,05	± 0,07	± 0,06	± 0,06	
DA	0,33	0,33	0,31	1,50	1,94	<0,001 <sup>cde</sup> ; 0,003 <sup>f</sup> ;
	± 0,04	± 0,04	± 0,10	± 0,17	± 0,33	0,037 <sup>g</sup> ; 0,004 <sup>h</sup>
FD	2,37	2,36	2,12	2,28	2,33	0,002 <sup>a</sup> ; 0,006 <sup>b</sup> ;
	± 0,05	± 0,07	± 0,18	± 0,13	± 0,04	0,001 <sup>e</sup> ; 0,048 <sup>h</sup> ; 0,036 <sup>i</sup>

Tabelle 22: Ergebnisse mikrostruktureller Analysen der subartikulären Spongiosa.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Mittelwerte ± Standardabweichungen der angrenzenden VOIs aller Gruppen werden zusammengefasst als SSA ("Subartikuläre Spongiosa Angrenzend") angegeben. Die Mittelwerte ± Standardabweichungen der normalen VOIs aller Gruppen werden zusammengefasst als SSN ("Subartikuläre Spongiosa Normal"; Normalkontrollen) angegeben. NS, nicht signifikant. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. <sup>c</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* Normalkontrollen. <sup>d</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* Normalkontrollen. <sup>e</sup> P < 0,05 für keine Anbohrung *versus* Normalkontrollen. <sup>f</sup> P < 0,05 SSA 6 Bohrlöcher *versus* Normalkontrollen. <sup>g</sup> P < 0,05 SSA 2 Bohrlöcher *versus* Normalkontrollen. <sup>h</sup> P < 0,05 SSA keine Anbohrung *versus* Normalkontrollen. <sup>i</sup> P < 0,05 SSA 2 Bohrlöcher *versus* SSA keine Anbohrung.

## 7.3.2 Analysen intraläsionaler Osteophyten und subchondraler Knochenzysten

Intraläsionale Osteophyten und subchondrale Knochenzysten wurden anhand etablierter Algorithmen mittels Mikro-CT detektiert [86, 235]. In allen 3 Gruppen waren lokale Resorptionsprozesse der subchondralen Knochenplatte und in den beiden Behandlungsgruppen residuelle Bohrkanäle regelmäßig zu finden. Die Kriterien subchondraler Knochenzysten nach Gao *et al.* [86] wurden jedoch in keinem Fall erfüllt. Es wurden folglich in keiner der 3 Gruppen subchondrale Knochenzysten beobachtet. Intraläsionale Osteophyten waren in allen 3 Gruppen zu finden (Gesamtanzahl/Inzidenz 6 Bohrlöcher: 7/66,7 %; 2 Bohrlöcher: 4/50 %; keine Anbohrung: 3/50 %). Diese wurden detailliert radiologisch vermessen. Die Untersuchungsergebnisse werden in Tabelle 23 sowie Abbildung 15 gezeigt.

	Defektbe	P Wert		
Parameter, Einheit	6 Bohrlöcher	2 Bohrlöcher	Ø Anbohrung	Spezifisch
Anzahl gesamt	7	4	3	NB
Inzidenz, %	66,7	50,0	50,0	NS
Anzahl pro Defekt	1,17 ± 1,17	0,67 ± 0,82	$0,50 \pm 0,55$	NS
Maximale longitudinale Querschnittsfläche, mm <sup>2</sup>	0,18 ± 0,14	0,37 ± 0,27	2,55 ± 2,63	0,016 <sup>a</sup> ; 0,034 <sup>b</sup>
Gesamtvolumen, mm <sup>3</sup>	0,18 ± 0,25	0,57 ± 0,89	7,64 ± 10,95	NS
Maximale Höhe, mm	$0,23 \pm 0,09$	0,27 ± 0,06	$0,65 \pm 0,55$	NS
Maximaler Basisdurchmesser, mm	1,06 ± 0,80	1,81 ± 1,67	5,31 ± 1,20	0,017 <sup>a</sup>
Maximaler longitudinaler Durchmesser, mm	1,29 ± 1,56	1,64 ± 1,43	4,41 ± 0,90	0,030 <sup>a</sup>
Grad der Überwucherung	0,89 ± 0,60	0,86 ± 0,90	1,17 ± 1,33	NS
Anzahl mit Lokalisation peripher/zentral im Defekt	4/3	3/1	0/3	NB

Tabelle 23: Ergebnisse quantitativer Analysen intraläsionaler Osteophyten mittels Mikro-CT.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Der Grad der Überwucherung wurde mit Hilfe des modifizierten Bewertungssystem nach Mithoefer *et al.* [210] bestimmt: Grad 0: keine knöcherne Überwucherung; Grad 1: maximale Osteophytenhöhe 1-33% der angrenzenden Knorpeldicke; Grad 2: maximale Osteophytenhöhe 34-66% der angrenzenden Knorpeldicke; Grad 3: maximale Osteophytenhöhe  $\geq 67\%$  der angrenzenden Knorpeldicke. NB, nicht bestimmt. NS, nicht signifikant. <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung.

Hinsichtlich Inzidenzen (P = 0,472) und Anzahl von Osteophyten pro Defekt ( $P \ge 0,295$ ) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Osteophyten in der Kontrollgruppe traten vorwiegend zentral im Defekt auf, während die Osteophyten der Behandlungsgruppen vornehmlich um die angelegten Bohrlöcher sowohl zentral als auch peripher im Defekt nachzuweisen waren. Die intraläsionalen Osteophyten der Kontrollgruppe stellten sich im Vergleich zu beiden Behandlungsgruppen größer mit signifikant erhöhter maximaler longitudinaler Querschnittsfläche dar (keine Anbohrung: 2,55 ± 2,63 mm<sup>2</sup>; 6 Bohrlöcher: 0,18 ± 0,37 mm<sup>2</sup>; 2 Bohrlöcher: 0,37 ± 0,27 mm<sup>2</sup>; *P* 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher = 0,016/0,034).

Darüber hinaus waren das Gesamtvolumen der Osteophyten nach Defektdebridement ~40fach gegenüber einer Behandlung mit 6 Bohrlöchern (P = 0,067) und ~15fach gegenüber einer Behandlung mit 2 Bohrlöchern (P = 0,114) sowie die maximale Osteophytenhöhe ~2fach (P = 0,067) bzw. ~1,5fach (P = 0,114)) erhöht. Der maximale Basisdurchmesser (keine Anbohrung:  $5,31 \pm 1,20$  mm; 6 Bohrlöcher:  $1,06 \pm 0,80$  mm; 2 Bohrlöcher:  $1,81 \pm 1,67$  mm; P 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher:  $1,29 \pm 1,56$  mm; 2 Bohrlöcher:  $1,64 \pm 1,42$  mm; P 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher = 0,017/0,114) sowie longitudinale Durchmesser (keine Anbohrung:  $4,41 \pm 0,90$  mm; 6 Bohrlöcher:  $1,29 \pm 1,56$  mm; 2 Bohrlöcher:  $1,64 \pm 1,42$  mm; P 6 Bohrlöcher/2 Bohrlöcher = 0,030/0,114) waren ebenfalls nach Defektdebridement gesteigert. Zwischen beiden Behandlungsgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede ( $P \ge 0,164$ ). Tendenziell war nach Behandlung mit 6 Bohrlöcher:  $1,17 \pm 1,17$ ; 2 Bohrlöcher:  $0,67 \pm 0,82$ ; P = 0,432), jedoch stellten sich die Osteophyten u.a. hinsichtlich ihrer maximalen longitudinalen Querschnittsfläche (6 Bohrlöcher:  $0,18 \pm 0,14$  mm<sup>2</sup>; 2 Bohrlöcher:  $0,57 \pm 0,89$  mm<sup>3</sup>; P = 0,315) tendenziell kleiner dar. Hinsichtlich des Grades der Überwucherung nach Mithoefer *et al.* [210] konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen allen 3 Gruppen gefunden werden ( $P \ge 0,804$ ).



Abbildung 15: Übersicht Mikro-CT-Analysen intraläsionaler Osteophyten.

Dargestellt sind repräsentative Mikro-CT Bilder intraläsionaler Osteophyten (markiert mit weißen Sternen) aller 3 Gruppen. Ein alleiniges Defektdebridement (keine Anbohrung) induzierte Osteophyten mit einer im Vergleich zu beiden Behandlungsgruppen signifikant größeren maximalen longitudinalen Querschnittsfläche. Eingefügt sind jeweils Übersichtsbilder der Defektregionen mit Darstellung der Osteophytenlokalisation. *Weiße Pfeilspitzen*: Defektgrenzen; *weiße Pfeile*: residuelle Bohrlöcher; *gestrichelte weiße Linie*: Verlauf der Oberfläche einer normalen subchondralen Knochenplatte; *gestrichelte rote Linie*: maximale longitudinale Ausdehnung der Osteophyten. Die Flächen zwischen den gestrichelten roten und weißen Linien stellen die maximalen longitudinalen Querschnittsflächen der Osteophyten dar. Maßstab: 1 mm (Übersichtsbilder: 3 mm). <sup>a</sup> P < 0,05 für 6 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung; <sup>b</sup> P < 0,05 für 2 Bohrlöcher *versus* keine Anbohrung. Vorlage der Abbildung: Stachel *et al.* [296].

## 8 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit im translationalen Schafmodell war einerseits den Einfluss der Bohrlochdichte auf die osteochondrale Reparatur kleinflächiger, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte 6 Monate postoperativ zu analysieren. Andererseits untersuchten wir, ob die subchondrale Anbohrung *per se* einem alleinigen Defektdebridement in der induzierten osteochondralen Reparatur überlegen ist. Hierfür erzeugten wir standardisierte Knorpeldefekte in der lateralen Trochlea, welche alle bis zur subchondralen Knochenplatte debridiert wurden. Die debridierten Knorpeldefekte wurden ohne Therapie als Kontrollgruppe belassen oder in den beiden Therapiegruppen mit 2 oder 6 subchondralen Bohrlöchern behandelt. Die osteochondrale Reparatur wurde 6 Monate nach Operation mittels standardisierter (semi-) quantitativer histologischer, immunhistochemischer, biochemischer und Mikro-CT-Verfahren beurteilt. Die maßgeblichen Ergebnisse dieser Arbeit sind, dass die subchondrale Anbohrung unabhängig der verwendeten Bohrlochdichte die Knorpelreparatur verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement im Schafmodell 6 Monate postoperativ signifikant verbessert. Die subchondrale Anbohrung steigert zudem signifikant die Mineraldichte des subchondralen Knochens unterhalb der Knorpeldefekte und verringert signifikant die Ausbildung von intraläsionalen Osteophyten verglichen mit einem Defektdebridement.

## 8.1 Hauptsächliche Ergebnisse der Studie

Die gegenwärtigen Studienergebnisse erweitern unser Verständnis über den Effekt der subchondralen Anbohrung auf die osteochondrale Reparatur von kleinen, vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten um zwei bedeutsame Sachverhalte. Die erste wesentliche Erkenntnis ist, dass eine Anbohrung unabhängig der verwendeten Bohrlochdichte die induzierte Gelenkknorpelreparatur im Vergleich zu einem alleinigen Defektdebridement signifikant verbessert sowie den angrenzenden Gelenkknorpel suffizienter vor arthrotischen Veränderungen schützt. Interessanterweise steigert hierbei ausschließlich eine Anbohrung mit höherer Bohrlochdichte den Typ-II-Kollagen-Gehalt - Kennzeichen des hyalinen Knorpels - im Reparaturgewebe verglichen mit einem Defektdebridement. Die zweite bemerkenswerte Erkenntnis ist der signifikant ungünstige Effekt eines alleinigen Defektdebridements auf die Mikrostruktur des subchondralen Knochens in der Defektregion sowie die Entwicklung von intraläsionalen Osteophyten. Hierbei zeigte sich die Knochenmineraldichte sowohl in der subchondralen Knochenplatte als auch in der subartikulären Spongiosa unterhalb der debridierten Defekte signifikant verringert im Vergleich zu beiden Anbohrungsgruppen sowie dem angrenzenden, gesunden subchondralen Knochen. Des Weiteren beobachteten wir eine Vergrößerung der Querschnittsfläche induzierter intraläsionaler Osteophyten - ein Richtwert der Osteophytengröße - nach Defektdebridement verglichen mit einer Defektbehandlung mit 2 und 6 Bohrlöchern.

## 8.2 Kontext der Studienergebnisse zu vorbestehender Literatur

## 8.2.1 Gelenkknorpelreparatur

Die Mobilisierung mesenchymaler Stammzellen aus dem subchondralen Knochenmark durch subchondrale Anbohrung steigert die Knorpelreparatur verglichen mit dem natürlichen Heilungsverlauf von isolierten Gelenkknorpeldefekten [50, 53]. Die vorliegenden Studienergebnisse belegen, dass eine subchondrale Anbohrung von debridierten Knorpeldefekten die Gelenkknorpelreparatur auch gegenüber einem alleinigen Debridement strukturell verbessert. Dies kann unter anderem der vermehrten Defektfüllung sowie höherwertigen Architektur des induzierten Reparaturgewebes zugeschrieben werden. Beides scheint die Beständigkeit des Knorpelreparaturgewebes zu erhöhen. Zudem wird der an den Defekt angrenzende, gesunde Gelenkknorpel durch die überlegene Knorpelreparatur suffizienter vor mechanischer Beanspruchung geschützt. Dies spiegelt sich in den reduzierten Flächen perifokaler Arthrose wider. Der gesteigerte Typ-II-Kollagen-Gehalt im Reparaturgewebe nach subchondraler Anbohrung mit einer hohen Bohrlochdichte verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement ist ein weiteres Indiz einer höherwertigen Gelenkknorpelreparatur [285] und scheint seinen Ursprung am ehesten in der durch Anbohrung verbesserten Mobilisierung und Aktivierung mesenchymaler Stammzellen zu haben [80, 183, 284].

Auch das alleinige Debridement von Knorpeldefekten scheint bereits eine Knorpelreparatur zu induzieren [87]. Die Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht im Rahmen des Debridements kann zu einer oberflächlichen Eröffnung der subchondralen Knochenplatte sowie kleiner Gefäß- und Knochenkanäle, welche durch die subchondrale Knochenplatte in den kalzifizierten Knorpel übertreten, führen [29, 177, 309]. Hierdurch erhält der Knorpeldefekt ebenfalls Zugang zu mesenchymalen Stammzellen sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen (u.a. *insulin-like growth factor I* (IGF-I), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *basic fibroblast growth factor 2* (FGF-2), Interleukin 6 (IL-6), *stem cell factor* (SCF), *transforming growth factor beta* (TGF-β) etc. [183]) des subchondralen Knochenmarks über die eröffneten Sinusoide [29, 177]. Als weitere Quelle einer möglichen Knorpelreparatur wird der postoperativ durch Verletzungen der Gelenkinnenhaut oder des Hoffa-Fettkörpers im Zuge des operativen Zuganges und chirurgischer Manipulationen entstehende Hämarthros vermutet [29, 143]. Folglich adhäriert ein Blutkoagel, welcher Stammzellen und Wachstumsfaktoren enthält, im Defektbereich [29, 141, 143]. Das fokale Debridement mit Entfernung von instabilen Knorpelfragmenten und Präparation stabiler Randwällen hin zum gesunden, benachbarten Gelenkknorpel [128] scheint im kurz- und mittelfristigen Verlauf klinisch und funktionell daher auch zufriedenstellende Ergebnisse in der Therapie von fokalen Gelenkknorpeldefekten zu liefern [4, 5, 128, 200, 303, 314]. Diese Methode wird im klinischen Alltag zumeist in der Therapie von symptomatischen, teilschichtigen - bei Patienten mit niedrigerem funktionellen Anspruch aber auch vollschichtigen - Gelenkknorpeldefekten verwendet [102, 195, 303]. Manche Autoren propagieren ein Debridement sogar als Erstlinientherapie für kleine, fokale Gelenkknorpeldefekte (Defektfläche  $< 2 \text{ cm}^2$ ) bei Leistungssportlern während einer laufenden Saison [19, 205, 229, 250, 303]. Als Vorteile werden eine verkürzte Rehabilitationszeit im Vergleich zu anderen knorpelchirurgischen Eingriffen sowie ein im Vergleich zu markraumeröffnenden Verfahren scheinbar weniger negativer Einfluss auf die Resultate einer evtl. im Verlauf folgenden ACT aufgeführt. Messner et al. dokumentierten beispielsweise in einer klinischen Studie, dass ein alleiniges Debridement fokaler Kniegelenk-Knorpeldefekte in einer Kohorte junger Sportler im Langzeitverlauf bis 14 Jahre nach Operation größtenteils in guten klinisch-funktionellen Ergebnissen resultierte [200]. Röntgenologisch zeigten sich im Verlauf jedoch bereits Zeichen einer beginnenden Arthrose. Nach Debridement von fokalen Gelenkknorpeldefekten (Outerbridge Grad 3-4 [249]; Defektdurchmesser: ~ 1.9 cm) wiesen in einer weiteren klinischen Studie (42 Patienten; Alter: ~ 28 Jahre) 32% der behandelten Patienten nach 6 Monaten eine deutliche Symptomverbesserung auf [65]. Die in diesen Fällen ursprünglich geplante zweizeitige ACT oder osteochondrale Transplantation mussten nicht mehr durchgeführt werden. Die vielversprechenden klinischen Ergebnisse führten in den letzten Jahren dazu, dass einige Chirurgen die Notwendigkeit einer ergänzenden Markraumeröffnung durch Anbohrung oder Mikrofrakturierung zunehmend in Frage stellten [22].

Hinsichtlich der isolierten Gelenkknorpelreparatur wurde jedoch in präklinischen Studien bereits in der Vergangenheit nachgewiesen, dass die subchondrale Anbohrung von Gelenkknorpeldefekten eine faserknorpelartige Reparatur induziert [48, 50, 68, 95, 107, 168, 239], welche sich verglichen mit unbehandelten oder debridierten Defekten verbessert zeigte [95, 107, 168]. So steigerte im Rattenmodell die Anbohrung von trochleären Knorpeldefekten die faserknorpelige Reparatur hinsichtlich der histologischen Struktur und makroskopischen Oberflächenbeschaffenheit verglichen mit unbehandelten Defekten bereits 4 Wochen postoperativ (5 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 0,2 mm; Defektfläche: 3,1 mm²) [107]. Auch im Ziegenmodell (unbekannte Bohrlochdichte; Bohrlochdurchmesser: 1 mm; Defektfläche: 28,3 mm²) verbesserte die subchondrale Anbohrung den histologischen Gesamtwert der Knorpelreparatur (O'Driscoll [224] und Pineda [254]) und erhöhte die Defektfüllung verglichen mit dem Debridement von vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten (Defektlokalisation: mediale Femurkondyle) 4 Monate postoperativ [168]. Ein Jahr postoperativ wiederum induzierte die subchondrale Anbohrung von vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten in Femurkondylen von noch nicht ausgewachsenen Schafen histologisch und makroskopisch eine vollständige Defektfüllung mit faserknorpelartigem Gewebe, während das Reparaturgewebe nach alleinigem Defektdebridement von gleichartigen Gelenkknorpeldefekten in der Trochlea den Defekt mit fibrösem Gewebe nicht suffizient ausfüllte (3 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1,5 mm; Defektfläche: 28,3 mm<sup>2</sup>) [95]. Weitere Studien verglichen den Effekt der Mikrofrakturierung mit einem alleinigen Debridement. Gao et al. beobachteten interessanterweise in der Frühphase 4 Wochen nach Operation keinen signifikanten Unterschied in der Knorpelreparatur kleiner, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte in der Trochlea von Minischweinen verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement [87]. Orth et al. wiederum wiesen im Schafmodell eine verbesserte chondrale Reparatur von vollschichtigen Knorpeldefekten in medialen Femurkondylen 6 Monate nach Mikrofrakturierung im Vergleich zu einem Defektdebridement nach [243]. Auch in ausgewachsenen Pferden belegten Frisbie et al. eine verbesserte Knorpelreparatur nach Mikrofrakturierung verglichen mit einem alleinigen Debridement von vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten (Defektlokalisation: mediale Femurkondyle) [80, 81]. Die Mikrofrakturierung induzierte 4 und 12 Monate nach Operation ein Reparaturgewebe mit signifikant besserer Defektfüllung und einem höherem Typ-II-Kollagen-Gehalt [80]. Zu den vorangegangenen präklinischen Studienergebnissen ist folgendes einschränkend zu erwähnen. In einer Studie wurden keine Informationen zur Tiefe des Defektdebridements angegeben [107]. Somit kann nicht sicher zwischen bis auf den subchondralen Knochen debridierten oder teilschichtigen Defekten differenziert werden, was jedoch einen potenziellen Einfluss auf die entstehende Knorpelreparatur hat [82]. Giordano et al. [95] wiederum verglichen erstens unterschiedliche Defektregionen (Femurkondyle versus Trochlea). Die Gelenkknorpelreparatur zeigt sich allerdings abhängig von der Defektlokalisation [51, 52, 239]. Zweitens wurden heranwachsende Tiere mit noch offenen Wachstumsfugen operiert. Hierbei wurde eine hohe Bohrlochtiefe von 20 mm gewählt, um die Wachstumsfugen zu perforieren. Dies kann verglichen mit einer Anbohrung bei adulten Schafen zu einer gesteigerten Rekrutierung von Stammzellen und Wachstumsfaktoren und somit veränderten Knorpelreparatur führen [50].

Die gegenwärtigen Studienergebnisse bestätigen einerseits, dass ein alleiniges Debridement von fokalen, kleinflächigen, vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten einer ergänzenden Markraumeröffnung mittels subchondraler Anbohrung hinsichtlich der induzierten Knorpelreparatur unterlegen ist. Zusätzlich wurde erstmals aufgezeigt, dass der angrenzende Gelenkknorpel durch die verbesserte Reparatur nach Anbohrung suffizienter vor Degeneration geschützt ist. Diese Erkenntnisse unterstreichen den Stellenwert der Markraumeröffnung mittels subchondraler Anbohrung in der Behandlung kleiner, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte gegenüber dem alleinigen Defektdebridement.

## 8.2.2 Veränderungen des subchondralen Knochens

Die Freilegung und Eröffnung des subchondralen Knochens im Rahmen der chirurgischen Markraumeröffnung stößt eine osteochondrale Reparatur an, welche ähnlich der natürlichen Reparatur von osteochondralen Defekten abläuft [232]. Diese Reparaturprozesse verlaufen in geometrisch, örtlich und zeitlich definierten Abschnitten [232, 237, 284]. Sie münden schlussendlich in einer geschwächten Mikroarchitektur des subchondralen Knochens sowie der osteochondralen Grenzzone unterhalb der, aber auch seitlich angrenzend an den Knorpeldefekt. Auch wird die Ausbildung von subchondralen Sekundärveränderungen wie intraläsionale Osteophyten, eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte und subchondrale Knochenzysten induziert [86, 91, 177, 182, 232, 235, 238]. Die genannten Prozesse sind u.a. abhängig von Defektgröße, -lokalisation, den verwendeten chirurgischen Techniken und Tiermodellen [232].

#### 8.2.2.1 Relevanz von Veränderungen des subchondralen Knochens

Von der Qualität der induzierten Reparatur des subchondralen Knochens hängt die Funktionalität der wiederhergestellten osteochondralen Einheit sowie hiermit auch die Gesamtqualität der induzierten osteochondralen Reparatur maßgeblich ab [49]. So beschrieben Hoemann et al. in einer Kaninchenstudie 8 Wochen nach subchondraler Anbohrung von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 24 mm<sup>2</sup>) histologisch hyalines Knorpelreparaturgewebe vorwiegend über Regionen bereits rekonstituierter subchondraler Knochenplatte, während über Bereichen unvollständigen Knochenwiederaufbaus oder gestörter Knochen-Knorpel-Integration vorwiegend fibröses Reparaturgewebe nachzuweisen war [120]. Die gleiche Arbeitsgruppe demonstrierte eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der subchondralen Remodellierung und der induzierten Knorpelreparatur (Defektfüllung, Anfärbung mit Safranin O sowie immunhistochemische Anfärbung von Typ-II-Kollagen) 3 Monate nach subchondraler Anbohrung und Mikrofrakturierung von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 16 mm<sup>2</sup>) im Kaninchenmodell [49]. Andere präklinische Studien beobachteten wiederum keinen direkten Zusammenhang zwischen der Reparatur des Gelenkknorpels sowie des subchondralen Knochens im mittelfristigen Verlauf [16, 68, 182, 226, 235, 237, 238, 242]. Dies kann hierdurch begründet sein, dass die Reparaturprozesse von Gelenkknorpel und subchondralem Knochen zeitlich versetzt zueinander ablaufen [237]. Störungen der subchondralen Mikroarchitektur sowie Sekundärveränderungen des subchondralen Knochens beeinflussen jedoch vermutlich vorwiegend die langfristigen Resultate der Knorpelreparatur negativ [58, 86, 91, 177, 183, 205, 210, 232, 238, 263, 298]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einerseits eine ausgedehntere Schwächung des subchondralen Knochens nach alleinigem Defektdebridement im Vergleich zur subchondralen Anbohrung - dargestellt u.a. durch eine signifikant niedrigere Knochenmineraldichte der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa. Diese geht entgegen anderer präklinischer Beobachtungen [16, 68, 182, 226, 235, 237, 238, 242] bereits im mittelfristigen Verlauf mit einer signifikant schlechteren Knorpelreparatur einher mit u.a. reduzierter Defektfüllung und minderwertiger Defektarchitektur. Die vorliegenden Daten unterstreichen somit die enge Verknüpfung der Reparaturprozesse des subchondralen Knochens und des Knorpelgewebes [232, 237, 284] sowie die Bedeutung einer gestörten subchondralen Mikroarchitektur für die Qualität der induzierten osteochondralen Reparatur [49].

Intraläsionale Osteophyten sowie eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte dünnen den hierüberliegende Reparaturknorpel aus [199, 210, 232, 237, 238, 282, 284]. Zudem erhöht sich die Steifigkeit des subchondralen Knochens [262, 263, 267, 271], während sich die Elastizität des Reparaturgewebes und dessen Fähigkeit Druck umzuverteilen und abzudämpfen vermindern [114, 166, 226, 238, 263, 271, 305]. Auch scheint der Nährstoffaustausch zwischen subchondralem Knochen und Knorpelgewebe durch die veränderte Dichte des subchondralen Knochens und die dadurch steigenden Druckverhältnisse in den blutführenden Knochenkanäle gestört zu sein [165]. Vor allem großvolumige intraläsionale Osteophyten sowie Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte scheinen eine zunehmende Degeneration von Reparaturgewebe und subchondralem Knochen durch u.a. erhöhte Druck- und Scherbelastungen sowie eine gestörte Biophysiologie der osteochondralen Einheit zu verursachen [166, 226, 238, 263, 271]. Offenbar kann hierbei bereits eine Verlagerung um wenige Millimeter die Widerstandsfähigkeit des Reparaturgewebes gegenüber Belastungsspitzen entscheidend beeinträchtigen [210, 238, 282]. Ein ansteigendes Volumen der in den Defekt ragenden knöchernen Überwucherungen dünnt das Knorpelreparaturgewebes jedoch zunehmend aus und schwächt dessen biomechanische Eigenschaften sowie Widerstandsfähigkeit ausgeprägter [210]. Ein entscheidender Einfluss auf die langfristige Beständigkeit der induzierten Knorpelreparatur sowie die klinischen Langzeit-Ergebnisse werden folglich vermutet [12, 78, 208–210, 238]. Präklinische und klinische Langzeit-Daten sind zum aktuellen Zeitpunkt jedoch noch spärlich [238]. So konnte in klinischen Studien bislang 12 Monate [286] und 22 Monate [210] nach Mikrofrakturierung zwar kein signifikanter Einfluss von diesen subchondralen Sekundärveränderungen auf die klinisch-funktionellen Resultate der Knorpelreparatur beschrieben werden, jedoch schienen diese in klinischer Anwendung die Versagensrate der Markraumeröffnung [210] sowie auch nachfolgender, revisions-knorpelchirurgischer Eingriffe [205] zu erhöhen. In der gegenwärtigen Studie beobachteten wir flächigere und größere intraläsionale Osteophyten nach alleinigem Defektdebridement verglichen mit einer subchondralen Anbohrung mit 2 oder 6 Bohrlöchern bereits im mittelfristigen postoperativen Verlauf. Diese resultierten wie auch in Vorstudien postuliert in einer ausgeprägteren Ausdünnung und Degeneration der induzierten Knorpelreparatur [166, 210, 226, 238, 263, 271]. Zugleich minderten die flächenmäßig signifikant vergrößerten Osteophyten die Qualität der induzierten osteochondralen Reparatur im vorliegenden Modell. Dies belegen u.a. die gesteigerten degenerativen Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels nach Defektdebridement.

Zusammenfassend stellten sich eine signifikante Schwächung der subchondralen Mikroarchitektur sowie signifikant vergrößerte, flächige Osteophyten nach alleinigem Defektdebridement verglichen mit einer subchondralen Anbohrung unabhängig der Bohrlochdichte dar. Die subchondralen Veränderungen korrelierten bemerkenswerterweise bereits im mittelfristigen Verlauf 6 Monate nach Operation mit einer signifikant schlechteren Knorpelreparatur sowie ausgedehnteren Degenerationen des angrenzenden Gelenkknorpels. Dies erweitert unser Verständnis über den mittelfristigen Einfluss subchondraler Veränderungen auf die Knorpelreparatur [16, 49, 68, 120, 182, 226, 235, 237, 238, 242]. Eine Zunahme dieser Wirkung im Langzeitverlauf lässt sich vermuten [12, 78, 208–210, 238].

#### 8.2.2.2 Störungen der Knochenmikroarchitektur

In den ersten Wochen nach Eröffnung der subchondralen Knochenplatte durch Anbohrung oder Mikrofrakturierung ist der Knochenumbau durch eine Osteoklastenaktivierung - initialer Mediator der induzierten osteochondralen Reparatur - zunächst hin zu Knochenresorptionsprozessen verschoben [47-49, 87, 94]. Diese Vorgänge starten im Kleintiermodell Kaninchen bereits 2 Wochen nach Operation [47]. Im nichthumanen Primatenmodell dauern die Resorptionsprozesse mindestens 6 Wochen nach Operation an, während die stufenweise Rekonstitution des subchondralen Knochens mittels intramembranöser und enchondraler Ossifikation zwischen der 6 bis 12 Wochen startet [94]. Chevrier et al. [53] untersuchten 1 bis 59 Tage nach subchondraler Anbohrung (4 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 0,9 mm; Bohrtiefe: 4 mm) vollschichtiger trochleärer Knorpeldefekte (Defektfläche: 15,7 mm<sup>2</sup>) im Kaninchenmodell die sequentiellen osteochondralen Reparaturprozesse. Ähnlich der Reparatur kleiner osteochondraler Defekte [284] beobachteten sie einen Wiederaufbau der subartikulären Spongiosa durch intramembranöse Ossifikation mit Expression von Typ-I-Kollagen in den tieferen Regionen der Bohrlöcher. In den oberflächlichen Regionen der subchondralen Knochenschicht waren Prozesse enchondraler Ossifikation mit Formation von Knorpelgewebe und Expression von vorwiegend Typ-II-Kollagen zu erkennen. Dieses chondrale Gewebe wurde im weiteren Verlauf schrittweise in Knochen umgewandelt. Die subchondrale Knochenplatte baute sich hierdurch kallusartig und lediglich porös auf. Vergleichbare Abläufe wurden auch in anderen Kleintierstudie nachgewiesen [120-122, 198, 207, 284]. Im Kaninchenmodell verschlossen sich die angelegten Bohrlöcher auf diese Weise mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,5 mm pro Woche von der Tiefe ausgehend zur Oberfläche hin [122]. Marchand et al. [187] dokumentierten im Kaninchenmodell einen Tag nach Anbohrung zunächst eine deutliche Reduktion des Knochenvolumens (BV/TV) in der subchondralen Knochenplatte sowie subartikulären Spongiosa. In den anschließenden 6,5 Monaten formierte sich der subchondrale Knochen stufenweise, jedoch lediglich unvollständig. Knochenvolumen (BV/TV) und Knochenmineraldichte (BMD) zeigten sich im Vergleich zum gesunden subchondralen Knochen weiterhin signifikant vermindert. Im Bereich der subchondralen Knochenplatte waren diese Veränderungen am stärksten ausgeprägt. Die subchondrale Knochenplatte war im Vergleich zur gesunden, dicht gepackten subchondralen Knochenplatte deutlich poröser und die kalzifizierte Knorpelschicht sowie Grenzlinie waren dünner sowie nur unvollständig ausgebildet. In einer weiteren Arbeit stellten Chen et al. zwar eine partielle Rekonstitution des eröffneten subchondralen Knochens sowohl 3 Monate nach Anbohrung (4 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 0,9 mm; Bohrtiefe: 2 oder 6 mm) als auch nach Mikrofrakturierung (4 Mikrofrakturierungen; Ahlendurchmesser: 1 mm) gleichartiger Defekte mit normwertigen Knochenvolumenwerten fest, jedoch war der subchondrale Knochen v.a. in der Umgebung der erzeugten Markraumeröffnung weiterhin geschwächt [49]. Insgesamt erschien die subchondrale Knochenmikrostruktur weniger organisiert und isotroper mit einem feineren und verzweigteren Trabekelnetzwerk (erhöhte Konnektivität der Knochentrabekel). Verglichen mit Normalkontrollen steigerte die subchondrale Anbohrung das Verhältnis zwischen Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV). Orth et al. untersuchten den Einfluss der subchondralen Anbohrung (6 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1 mm) von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 32 mm<sup>2</sup>) auf den subchondralen Knochen sechs Monate postoperativ [235]. Knochenmineraldichte und Knochenvolumenanteil (BV/TV) waren sowohl innerhalb der subchondralen Knochenplatte als auch subartikulären Spongiosa verglichen mit dem angrenzenden subchondralen Knochen vermindert, während das Verhältnis zwischen Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV), wie auch von Chen et al. beobachtet [49], gesteigert war. In der subchondralen Knochenplatte war zudem die Dicke der Kortikalis vermindert. Eine Reduktion der Knochentrabekeldicke war in der subartikulären Spongiosa zu erkennen, während deren Konnektivität (Tb.Pf) und Abstand (Tb.Sp) erhöht waren. Die Knochenmikrostruktur erschien 6 Monate postoperativ somit noch nicht wiederhergestellt und weiterhin geschwächt. Die subchondrale Anbohrung (6 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1 mm oder 1,8 mm; Bohrtiefe: 10 mm) vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektfläche: 32 mm<sup>2</sup>) in medialen Femurkondylen von Schafen wiederum steigerte 6 Monate nach Operation ebenfalls das Verhältnis zwischen Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV) in der subchondralen Knochenplatte sowie interessanterweise die kortikale Dicke (Ct.Th) verglichen mit dem angrenzenden subchondralen Knochen [68]. Eine Anbohrung mit einem größeren Durchmesser verringerte zusätzlich die Knochenmineraldichte und vergrößerte die kortikale Dicke ausgeprägter. In der subartikulären Spongiosa erhöhte die Anbohrung mit kleinerem Durchmesser das Verhältnis zwischen Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV) und verringerte den trabekulären Knochen-Anordnungsfaktor (Tb.Pf), was einer gesteigerten Verzweigung des Trabekelnetzwerkes im Rahmen der ablaufenden Remodellierungsprozesse entspricht. Eine Anbohrung mit größerem Durchmesser wiederum reduzierte das Knochenvolumen (BV/TV), die Knochenmineraldichte, die Anzahl der Knochentrabekel (Tb.N) und steigerte BS/BV sowie die Trabekeldicke (Tb.Th) im Vergleich zum angrenzenden Knochen in dieser Schicht. Elmholt et

#### Diskussion

*al.* [69] wiesen in Minischweinen 6 Monate nach subchondraler Anbohrung (4 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1 mm; Bohrtiefe: 4 mm) von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 28,3 mm<sup>2</sup>) im Vergleich zum angrenzenden subchondralen Knochen überraschenderweise lediglich eine erhöhte Vernetzungsdichte auf. Knochenvolumen, Mineraldichte und Trabekelparameter zeigten sich jedoch nicht verändert.

Zusammenfassend stellen sich sowohl im Klein- als auch Großtiermodell bis 6 Monate nach Markraumeröffnung subchondrale Knochenplatte und subartikuläre Spongiosa in ihrer Mikrostruktur weiterhin geschwächt dar. Dies spiegelt sich in einer häufig zu beobachtenden reduzierten Knochenmineraldichte sowie einem verringerten Knochenvolumen wieder [68, 187, 235, 243]. Ähnliche Veränderungen liegen auch im Rahmen der Osteoporose [288] und Arthrose [38, 39, 190, 291, 317] vor [238]. Der oftmals dokumentierte erhöhte Knochenoberflächenanteil pro Knochenvolumen (BS/BV) [49, 68, 235] sowie das Vorhandensein von eher dünnen Knochentrabekeln mit gesteigerter Vernetzung [69, 235] sind Hinweise auf bis 6 Monate postoperativ weiterhin ablaufende Umbauprozesse im subchondralen Knochen nach Markraumeröffnung. Die Heterogenität der Studienmodelle erschwert jedoch einen direkten Vergleich der bisherigen Ergebnisse untereinander. Die Daten der aktuellen Arbeit belegen ebenfalls einen nur unvollständigen Aufbau der subchondralen Knochenplatte nach subchondraler Anbohrung, was sich in einer Reduktion des Knochenvolumens (BV/TV), der Kortikalisdicke (Ct.Th) sowie der Knochenoberflächendichte (BS/TV) - einem Maß für den Anteil der Knochenoberfläche am Gesamtvolumen des aufgebauten Gewebes - widerspiegelte. Auf Ebene der subartikulären Spongiosa war ein verringerter Grad der Anisotropie (DA) zu beobachten, was für eine niedrigere Komplexität der aufgebauten Knochenmikrostruktur spricht. Die Knochenmineraldichte des rekonstituierten Knochens erscheint ähnlich der Ergebnisse von Eldracher et al. [68] jedoch bei Verwendung eines niedrigen Bohrlochdurchmessers von 1 mm zufriedenstellend aufgebaut.

Die vorliegende Studie weist zudem bemerkenswerterweise eine ausgeprägtere Schwächung sowohl der subchondralen Knochenplatte (verminderte kortikale Dicke, BV/TV und BS/TV), als auch der subartikulären Spongiosa (verminderte BMD, DA, FD) nach alleinigem Defektdebridement auf. Ähnliche Veränderungen wurden in debridierten Defekten gleicher Größe in den Femurkondylen von Schafen bisher nur in der subchondralen Knochenplatte (verringerte Knochenmineraldichte und BV/TV) beobachtet [243]. Im Ziegenmodell induzierte ein isoliertes Defektdebridement bis zur kalzifizierten Knorpelschicht (Defektregion: mediale Femurkondyle; Defektfläche: 28,3 mm<sup>2</sup>) sechs Monate postoperativ histologisch ebenfalls eine deutliche Minderung des Knochenvolumens mit polarisationsmikroskopisch geschwächtem Kollagennetzwerk sowie Trabekelsystem bis 1,8 mm unterhalb der Knorpeldefekte [309]. Histologisch waren interessanterweise Knochenresorptionsprozesse durch Osteoklastenaktivierung sowie Knochenremodellierungsvorgänge durch enchondrale Ossifikation in dieser subchondralen Region zu erkennen. Zwischen subchondraler Knochenplatte und subartikulärer Spongiosa wurde hierbei nicht differenziert. Auch untersuchten Vasara et al. nicht die tieferen Schichten des subchondralen Knochens. Den kurzfristigen Einfluss eines Defektdebridements auf den subchondralen Knochen beleuchteten vergangene Tierstudien ebenfalls. So verglichen Fisher et al. die Umbauprozesse im subchondralen Knochen zwischen vollschichtigen und teilschichtigen Knorpeldefekten (Defektregion: Trochlea; Defektfläche: 12,6 mm<sup>2</sup>) in noch nicht ausgewachsenen Minischweinen 6 Wochen postoperativ [76]. Hierbei beobachteten sie ausschließlich in vollschichtigen Knorpeldefekten signifikante Knochenumbau- und -resorptionsprozesse mit u.a. Minderung des Knochenvolumenanteils bis 2 mm unterhalb der ursprünglichen Knochen-Knorpel-Grenze. Gao et al. wiederum wiesen in einer Minischweinstudie nach, dass das alleinige Defektdebridement von vollschichtigen Knorpeldefekten in der Trochlea mit vollständiger Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht bereits in der Frühphase 4 Wochen postoperativ zu einer signifikanten Schwächung des subchondralen Knochens führt [87]. Eine Reduktion des Knochenvolumens der subchondralen Knochenplatte (reduzierte BV/TV, BS/TV, BS/BV) sowie der subartikulären Spongiosa (reduzierte BV/TV, Tb.Th und SMI) in der Mikro-CT-Bildgebung verglichen mit dem angrenzenden, gesunden subchondralen Knochen war zu erkennen. Makroskopisch blieb die subchondrale Knochenschicht im Rahmen des Debridements nach Angaben der Autoren indessen intraoperativ intakt. Die beschriebenen Veränderungen waren in dieser Studie etwas weniger ausgeprägt, jedoch vergleichbar mit den subchondralen Veränderungen nach ergänzender Mikrofrakturierung. Knochenmineraldichte sowie kortikale Dicke zeigten sich im Gegensatz zur Mikrofrakturierung nicht signifikant verändert.

Keine der genannten Studien verglich den Effekt einer Anbohrung auf den subchondralen Knochen mit dem eines Defektdebridements ohne Eröffnung der subchondralen Knochenplatte. Die vorliegende Arbeit ergänzt die bisherigen Studienergebnisse um bedeutende Erkenntnisse. Einerseits zeigte sich die Schwächung des subchondralen Knochens im mittelfristigen Verlauf 6 Monate nach Operation nach alleinigem Defektdebridement sowohl in der subchondralen Knochenplatte, als auch in der subartikulären Spongiosa. Überdies war diese verglichen mit der subchondralen Anbohrung - unabhängig der Bohrlochdichte - sogar gesteigert (u.a. reduzierte Knochenmineraldichte). Als Zeichen eines erhöhten Knochenstoffwechsels mit Auf- und Umbau resultierte die subchondrale Anbohrung mit 2 und 6 Bohrlöchern des Weiteren in einer verminderten Dicke der Knochentrabekel verglichen mit einem Defektdebridement. Diese durch subchondrale Anbohrung induzierten Umbauprozesse reduzierten folglich die potentiell nachteiligen Veränderungen im subchondralen Knochen im Vergleich zum Defektdebridement, was sich u.a. durch eine physiologischere Knochenmineraldichte darstellte. Zu diesem mittelfristigen Untersuchungszeitpunkt befindet sich der subchondrale Knochen weiterhin in einem Remodellierungsprozess, welcher durch ergänzende subchondrale Anbohrung verbessert scheint.

#### 8.2.2.3 Subchondrale Sekundärveränderungen

Subchondrale Sekundärveränderungen wie intraläsionalen Osteophyten oder eine flächige Verlagerung bzw. Verdickung der subchondralen Knochenplatte und subchondrale Knochenzysten treten sowohl in präklinischer als auch klinischer Anwendung nach chirurgischer Markraumeröffnung regelmäßig auf [37, 48, 49, 57, 58, 68, 82, 86, 91, 105, 153, 160, 205, 208, 210, 235, 238, 243, 274, 275, 298]. So wurde eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte nach Markraumeröffnung durch subchondrale Anbohrung oder Mikrofrakturierung in Kleintierstudien in ~46% (42-50%) [11, 49, 92, 187] sowie in Großtierstudien in ~65% (0-100%) [16, 23, 64, 68, 69, 92, 152, 235, 283] nachgewiesen. In ~48% (0-100%) der behandelten Defekte wiederum wurden in Großtierstudien detektierte knöcherne Anbauten der subchondralen Knochenplatte als intraläsionale Osteophyten spezifiziert [16, 68, 86, 138, 235, 243]. Subchondrale Knochenzysten wiederum traten im Großtiermodell in ~37% (0-100%) der Defekte auf [68, 69, 80, 82, 86, 120, 138, 235, 243, 307, 320]. Im Kleintiermodell wurden subchondrale Zysten ebenfalls beobachtet, jedoch liegen keine Angabe zu ihrer Inzidenz vor [49]. Das gehäufte Auftreten subchondraler Sekundärveränderungen im Rahmen präklinischer Studien scheint durch die zumeist unmittelbare postoperative Vollbelastung des operierten Gelenkes begünstigt. Der subchondrale Knochen zeigt sich gerade in den ersten 6-12 Wochen nach Operation durch die zunächst ablaufenden Resorptionsprozesse noch sehr vulnerabel und das im Umbau befindliche Knorpelreparaturgewebe bietet diesem noch keinen ausreichenden mechanischen Schutz [91]. Daher werden im klinischen Kontext im Allgemeinen eine Entlastung der operierten Extremität mit Sohlenkontakt sowie tägliche Beübungen des operierten Gelenkes mit einer Motorschiene über 6-8 Wochen postoperativ nach Markraumeröffnung empfohlen [300]. Jedoch treten subchondrale Sekundärveränderungen dennoch auch in der klinischen Anwendung nach Markraumeröffnung auf [58, 160, 208, 210, 238, 275]. Eine Differenzierung zwischen intraläsionalen Osteophyten und einer flächigen Verlagerung der subchondralen Knochenplatte ist aufgrund der geringeren Auflösung der verwendeten Bildgebungen in klinischen Studien schwieriger [232]. Daher werden diese Veränderungen zumeist als knöcherne Überwucherungen zusammengefasst [210] und nach Markraumeröffnung in ~56% (25-100%) beobachtet [37, 58, 160, 208–210, 274, 275, 286]. Ein Großteil entsteht scheinbar zwischen 6 und 12 Monaten postoperativ [210]. Die Inzidenz sowie das Ausmaß der subchondralen Sekundärveränderungen nehmen im weiteren, langfristigen postoperativen Verlauf zu [58, 210, 274, 275]. So beschrieben Cole et al. nach Mikrofrakturierung subchondrale Zysten 3 Wochen postoperativ in keinem Fall, 6 Monate postoperativ bei 15,4%, 12 Monate nach Operation bei 38,5% sowie 24 Monate nach Operation bei 37,5% der behandelten Patienten [58]. In einer klinischen Studie dokumentierten Mithoefer et al. 22 Monate nach Mikrofrakturierung von symptomatischen Knorpelläsionen in Kniegelenken (84 Patienten; 94 Läsionen; Durchschnittalter: 46,2 Jahre) sogar in 62 % der Patienten magnetresonanztomographisch Überwucherungen der subchondralen Knochenplatte [210]. Größtenteils (63,5%) waren diese nur gering ausgeprägt (< 33% der Defekttiefe). Ein vorangehendes zu tiefes Defektdebridement mit Verletzung der subchondralen Knochenplatte und sichtbaren

#### Diskussion

Kontaktblutungen stellte sich als signifikanter Risikofaktor für das Auftreten dieser Veränderungen heraus. Bemerkenswerterweise hatten Durchmesser und Anzahl der Mikrofrakturen keinen signifikanten Einfluss auf deren Entwicklung [210]. Shive *et al.* wiederum wiesen 12 Monate nach Mikrofrakturierung von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Femurkondyle) in allen Fällen Überwucherungen der subchondralen Knochenplatte nach, jedoch waren diese zu 80% ebenfalls nur gering ( $\leq$ 10% des Defektvolumens) und meist punktuell (56% der Fälle) entwickelt [286].

Der kurz- bis mittelfristige Verlauf der osteochondralen Reparatur nach Markraumeröffnung ist vornehmlich im Kleintiermodell detailliert beschrieben. Insgesamt zeigt sich in präklinischen Studien eine große Variabilität im Auftreten subchondraler Sekundärveränderungen. Zeitpunkt und Ausprägung scheinen hierbei u.a. abhängig vom gewählten Tiermodell, der Defektlokalisation sowie -größe [232]. So entwickelt sich eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte beispielsweise im Kleintiermodell zwar frühzeitiger, jedoch ist diese im Großtiermodell ausgeprägter [182]. Aroen et al. [11] erkannten histologisch nach subchondraler Anbohrung (4 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 0,6 mm; Bohrtiefe: 3 mm) von vollschichtigen Knorpeldefekten in der Patella von Kaninchen bereits 2 Wochen nach Operation eine signifikante Verlagerung der subchondralen Knochenplatte verglichen mit unbehandelten Defekten. Chen et al. [49] indessen beobachteten 3 Monate nach subchondraler Anbohrung sowie Mikrofrakturierung von vollschichtigen Knorpeldefekten in der Trochlea von Kaninchen eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte in 38-50% der Fälle und beschrieben ebenfalls subchondrale Knochenzysten sowie residuelle Mikrofrakturlöcher und Bohrkanäle mittels Mikro-CT. Im gleichen Tiermodell stellte sich sogar die subchondrale Knochenplatte angrenzend an mittels subchondraler Anbohrung (8 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 0,5 oder 0,9 mm; Bohrtiefe 3,5 mm; Zusatz: Thrombin) behandelte, vollschichtige trochleäre Knorpeldefekte verglichen mit gesunden Kontrollen 6,5 Monate nach Operation im Mikro-CT verdickt dar [187]. Eine mögliche Ursache hierfür könnten degenerative Prozesse durch eine vermehrte mechanische Belastung des angrenzenden Knorpels und des subchondralen Knochens im Zuge einer insuffizienten Defektreparatur sein. Orth et al. wiesen im Kaninchenmodell nach, dass die Reparaturprozesse des subchondralen Knochens in retropatellaren osteochondralen Defekten zeitlich und geometrisch klar definiert ablaufen [237]. In diesem Modell war der subchondrale Knochen 6 Monate nach Defekterzeugung bis auf seine ursprüngliche Höhe rekonstituiert. Im weiteren Verlauf bis 12 Monate nach Defekterzeugung verlagerte sich die subchondrale Knochenschicht jedoch zunehmend flächig in das Knorpelreparaturgewebe hinein, welches hierdurch ausgedünnt wurde und Zeichen der Degradation zeigte. Ähnliche Prozesse beobachteten Qiu et al. im Rahmen der Reparatur von osteochondralen Defekten in den Femurkondylen von Kaninchen bereits 4 Monate nach Defekterzeugung [263]. Die hierbei beschriebenen flächigen Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte stellten sich bis 8 Monate nach Operation konstant dar. Eine Ausdünnung des Knorpelreparaturgewebes konnte zu diesem Zeitpunkt zwar ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch keine Degeneration. Während Orth et al. im Großtiermodell Schaf 6 Monate nach subchondraler Anbohrung (6 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1 mm; Bohrtiefe: 10 mm) vollschichtiger Knorpeldefekte im Bereich medialer Femurkondylen lokale, intraläsionale Osteophyten in 26% der Defekte, jedoch keine flächige Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte dokumentierten [235], wurden im vergleichbaren Versuchsmodell [68] in der lateralen Trochlea intraläsionale Osteophyten mit ähnlicher Inzidenz (23%), flächige Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte jedoch in 71% (Bohrlochdurchmesser: 1 mm) bis 100% (Bohrlochdurchmesser: 1,8 mm) der behandelten Defekte mittels Mikro-CT ausgemacht. Angaben zum Ausmaß der genannten Veränderungen wurden hierbei jedoch nicht gemacht. Subchondrale Knochenzysten andererseits wurden in 63% der behandelten Defekte in der medialen Femurkondyle [235], bemerkenswerterweise dagegen in 0% der Defekte in der lateralen Trochlea [68] beschrieben. Eine Mikrofrakturierung (6 Mikrofrakturierungen; Ahlendurchmesser: 1 oder 1,2 mm; Mikrofrakturtiefe: 4 mm) im gleichen Defektmodell induzierte in medialen Femurkondylen in 50-75% der Defekte lokale, intraläsionale Osteophyten sowie in 38-50% subchondrale Knochenzysten [243]. Flächige Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte wurden nicht beobachtet. Die Detektion der subchondralen Pathologien erfolgte in diesen Schafstudien jeweils mittels Mikro-CT [68, 235, 243]. Auch in den Kiefergelenk-Kondylen von Schafen erfassten Ishimaru et al. 3 Monate nach Anbohrung (Bohrlochdurchmesser: 1 mm; Bohrtiefe: 10 mm) von vollschichtigen Knorpeldefekten nativradiologisch und histologisch intraläsionale Osteophyten (100%) sowie subchondrale Knochenzysten (20-40%) [138]. Im Pferdemodell (Karpalknochen) detektierten Shamis et al. histologisch eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte nach subchondraler Anbohrung (5 oder 11 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1 mm; Bohrtiefe: 10 mm) mit Ausdünnung des hierüberliegenden Knorpelreparaturgewebes in 50 % der Defekte bereits 5 Monate nach Operation [283]. Frisbie et al. [80, 82] beschrieben im gleichen Tiermodell nativradiologisch und magnetresonanztomographisch nach Mikrofrakturierung von vollschichtigen Knorpeldefekten medialer Femurkondylen (Defektfläche: 100 mm²) 12 Monate nach Operation subchondrale Knochenzysten unterhalb von 20-42% der behandelten Defekte. Bemerkenswerterweise waren diese 4 Monate nach Operation noch nicht abzugrenzen. Kleine, intraläsionale Osteophyten zeigten sich 12 Monate postoperativ dagegen in nahezu allen Gelenken [82]. Im Großtiermodell Minischwein wiederum war 3 Monate [23] sowie 6,5 Monate [92, 152] nach Mikrofrakturierung (5 Mikrofrakturierungen; Ahlendurchmesser: 1 mm; Mikrofrakturtiefe: 3 mm) von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 19,6 mm<sup>2</sup>) regelmäßig histologisch eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte zu erkennen, welche im Mittel 20-25% des Knorpelreparaturgewebes ausfüllte und bereits 6 Wochen nach Operation beginnend nachzuweisen war [92, 152]. Auch nach subchondraler Anbohrung (4 Bohrlöcher; Bohrlochdurchmesser: 1 mm; Bohrtiefe: 4 mm) vollschichtiger Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 28,3 mm<sup>2</sup>) wurden im Minischweinmodell eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte in 75% [69] und lokale, intraläsionale Osteophyten in 17% [116] der Defekte mittels Mikro-CT beschrieben. Lokale Resorptionen der subchondralen Knochenplatte traten regelmäßig auf [69, 116], während subchondralen Knochenzysten lediglich in 8% der Defekt zu sehen waren [69].

Zusammenfassend treten subchondraler Sekundärveränderungen im präklinischen Kontext regelmäßig nach Markraumeröffnung auf. Die bisherigen Studien weisen jedoch eine hohe Heterogenität hinsichtlich der gewählten Defektmodelle, der verwendeten chirurgischen Instrumentarien, Tiermodelle sowie Nachweismethoden (u.a. Nativröntgen, Histologie, Mikro-CT) auf. Eine vergleichende Auswertung der Daten hinsichtlich bestehender Einflussfaktoren wie Defektlokalisation, Instrumentenvariablen oder Tiermodell ist aus diesen Gründen nicht verlässlich möglich. Ein wesentlicher Einfluss lässt sich jedoch vermuten. In der vorliegenden Arbeit nutzten wir daher bewusst etablierte Klassifikationen der subchondralen Veränderungen [86] sowie reproduzierbare, klinisch übertragbare und detaillierte Messmethoden [86, 210]. Hinsichtlich der Defektmodelle orientierten wir uns an vorangegangenen Studien [235, 243, 245], um einen Vergleich standardisierter zu ermöglichen. In der aktuellen Studie wurden intraläsionalen Osteophyten bzw. knöcherne Anbauten in 50-67%, subchondrale Knochenzysten jedoch in 0% der angebohrten Defekte nachgewiesen. Ein signifikanter Einfluss der Bohrlochdichte zeigte sich hierbei nicht. Diese Beobachtungen decken sich mit den Daten von Eldracher et al. [68] mit gleichem Defektmodell und identischer subchondraler Anbohrung mit 6 Bohrlöchern (intraläsionale Osteophyten: 23%; flächige Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte: 71%; Zysten: 0%). Orth et al. [235] wiederum konnten interessanterweise nach gleichartiger Anbohrung in den medialen Femurkondylen von Schafen ebenfalls 6 Monate postoperativ knöcherne Überwucherungen der subchondralen Knochenplatte seltener nachweisen (intraläsionale Osteophyten: 26%; flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte: 0%). Subchondrale Knochenzysten andererseits traten gehäuft auf (63%). Die Gegenüberstellung der aktuellen Beobachtungen und der Daten dieser vergleichbaren Studienmodelle liefert uns neue Erkenntnisse zum Einfluss der Defektlokalisation auf die Entwicklung von subchondralen Sekundärveränderungen. Hierbei scheinen knöcherne Überwucherungen (intraläsionale Osteophyten, Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte) im Schafmodell gehäuft im Bereich der Trochlea aufzutreten, während subchondrale Knochenzysten vermehrt im Bereich medialer Femurkondylen beobachtet werden. Auch im klinischen Kontext wurde ein vermehrtes Auftreten von Überwucherungen der subchondralen Knochenplatte in lateralen Femurkondylen beschrieben [117]. Diese Lokalisation entspricht im Schafmodell hinsichtlich der osteochondralen Reparatureigenschaften wiederum der Trochlea [239]. Eine Abhängigkeit der osteochondralen Reparaturprozesse wurde zudem auch in anderen präklinischen Studien registriert [51, 239].

Bemerkenswerterweise wurden intraläsionale Osteophyten bzw. knöcherne Anbauten in der vorliegenden Arbeit auch nach alleinigem Defektdebridement in 50% der Defekte nachgewiesen. Überdies induzierte das Defektdebridement signifikant größere, flächige Osteophyten, während nach subchondraler Anbohrung mit 2 oder 6 Bohrlöchern kleinere, solitäre osteophytäre Anbauten zu dokumentieren waren, welche in der Regel in Bezug zu den angelegten Bohrkanälen standen. Es lässt sich daher vermuten, dass die durch subchondrale Anbohrung erzeugte, histologisch höherwertige Knorpelreparatur den subchondralen Knochen suffizienter vor mechanischer Belastung schützte. Die flächigen Osteophyten nach Debridement resultierten indessen scheinbar in einer verstärkten Degeneration des ausgedünnten Knorpelreparaturgewebes sowie des angrenzenden Gelenkknorpels.

Vorangegangene, präklinische Studien beschrieben ebenfalls subchondrale Sekundärveränderungen nach Defektdebridment. So wurde in Minischweinen 3 Monate [23] und 6,5 Monate [152] nach Debridement vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 19,6 mm²) mit einer Kürette histologisch regelmäßig eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte nachgewiesen. Diese zeigte sich in dieser Studie jedoch geringer ausgeprägt als nach zusätzlicher Mikrofrakturierung. Ähnliche Beobachtungen machten Vasara et al. [309] 6 Monate nach Debridement vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: mediale Femurkondyle; Defektfläche: 28,3 mm<sup>2</sup>) mit einer Kürette in Ziegen. Auch im Schafmodell dokumentierten Orth et al. 6 Monate nach Debridement vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: mediale Femurkondyle; Defektfläche: 32 mm<sup>2</sup>) subchondrale Knochenzysten (13%) sowie intraläsionalen Osteophyten (25%) mittels Mikro-CT [243]. In den genannten Studien betonten die Autoren jeweils explizit, dass die subchondrale Knochenplatte im Rahmen des Debridements geschont wurde. Da die Tiefe des Defektdebridements jedoch unabhängig des verwendeten Instrumentes nur schwer kontrollierbar ist [121, 122], ist eine unbeabsichtigte Verletzung und Eröffnung der subchondralen Knochenplatte nicht auszuschließen. Dies wird als Hauptimpuls der nachfolgenden enchondralen Ossifikationsprozesse mit Ausbildung von Osteophyten und Verlagerungen der subchondralen Knochenplatte sowie der Entstehung lokalisierter, subchondraler Zysten über Verbindungskanäle zum subchondralen Knochen vermutet. Eine weitere mögliche Ursache ist die veränderte mechanische Belastung des subchondralen Knochens nach Defekterzeugung und insuffizienter Knorpelreparatur [187]. Interessanterweise wurden subchondrale Sekundärveränderungen in 30-60% der Fälle ebenfalls nach autologer Chondrozytentransplantation dokumentiert [15, 37, 91, 117, 165, 193, 205, 218, 274, 275, 310]. Auch hier erfolgt eine vorbereitende Defektpräparation mittels Debridements der kalzifizierten Knorpelschicht. Dieses kann gleichermaßen zu einer oberflächlichen Abrasion der subchondralen Knochenplatte mit konsekutiver Eröffnung von kleinen Gefäß- und Knochenkanälen führen und genannte Prozesse anstoßen [66, 76, 101]. Um eine Integration des durch Knorpeltherapie induzierten Reparaturgewebes zum subchondralen Knochen zu gewährleisten sowie eine suffiziente Versorgung des Ersatzgewebes mit u.a. Nährstoffen und Wachstumsfaktoren aus dem subchondralen Knochen zu fördern, muss jedoch im Rahmen des Defektdebridements die kalzifizierte Knorpelschicht vollständig entfernt werden [12, 17, 28, 81, 82, 121, 210]. Die subchondrale Knochenplatte sollte dabei allerdings unberührt bleiben [21, 50, 210]. Ein zu tiefes Debridement bis in den subchondralen Knochen hinein kann intraläsionale Osteophyten und eine flächige Verlagerung der subchondralen Knochenplatte sowie Resoprtionsprozesse im subchondralen Knochen mit Ausbildung von subchondralen Knochenzysten induzieren [50, 81, 82, 121, 210]. Das Defektdebridement ist daher unbedingt von der Abrasionsarthroplastik nach Johnson [140, 142] abzugrenzen [295]. Ein zu oberflächliches Debridement mit Verbleib von kalzifiziertem Knorpelgewebe am Defektgrund wiederum verhindert - u.a. durch die darin enthaltenen, negativ geladenen Glykosaminoglykane - eine suffiziente Integration des Reparaturgewebes zur subchondralen Knochenplatte hin [47, 81, 82, 120, 121, 283]. Da ausschließlich optisch und haptisch gesteuert [82], ist die Tiefenausdehnung des Debridements der kalzifizierten Knorpelschicht schwierig zu dosieren und variiert interindividuell zwischen Chirurgen - u.a. abhängig vom chirurgischen Ausbildungsgrad - beträchtlich [318].

Das regelmäßige Auftreten signifikant größerer intraläsionaler Osteophyten sowie die signifikante Schwächung der subchondralen Mikrostruktur nach alleinigem Defektdebridement in der aktuellen Studie betont den Einfluss der Defektvorbereitung auf die Entwicklung subchondraler Veränderungen und damit auf die langfristige Prognose der Knorpelreparatur. Zukünftige Studien sollten hier u.a. die genaue Steuerung der Debridement-Tiefe und deren Einfluss auf den subchondralen Knochen beleuchten. Weiterhin demonstrieren die Daten der vorliegenden Arbeit erstmals eine Reduktion der Fläche induzierter Osteophyten durch eine ergänzende subchondrale Anbohrung gegenüber dem alleinigen Defektdebridement, welche unabhängig der Bohrlochdichte ist. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der subchondralen Anbohrung in der Therapie kleinflächiger, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte.

## 8.2.3 Einfluss der Bohrlochdichte auf die osteochondrale Reparatur

Wir beobachteten in der vorliegenden Arbeit eine verbesserte osteochondrale Reparatur nach subchondraler Anbohrung verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement unabhängig der verwendeten Bohrlochdichte. Eine hohe Dichte von 6 Bohrlöchern mit einer niedrigen Dichte von 2 Bohrlöchern vergleichend, zeigten sich lediglich unwesentliche Unterschiede. So induzierte ausschließlich eine Anbohrung mit 6 Bohrlöchern einen höheren Typ-II-Kollagen-Gehalt im Knorpelreparaturgewebe verglichen mit einem Defektdebridement. Gegenüber einer Anbohrung mit niedriger Dichte war diese Erhöhung jedoch nicht signifikant. Nach Anbohrung mit 2 Bohrlöchern wiederum war eine Verbesserung der Oberflächenstruktur des erzeugten Reparaturgewebes im Vergleich zu einer Anbohrung mit 6 Bohrlöchern nachzuweisen. Insgesamt hat sich jedoch kein signifikanter Einfluss der Bohrlochdichte auf die generierte osteochondrale Reparatur herausgestellt.

Um den Einfluss der Bohrlochdichte auf die osteochondrale Reparatur von Knorpeldefekten isoliert zu betrachten, wurden alle weiteren Variablen (Bohrlochdurchmesser, -tiefe, Defektgröße, -tiefe, Defektdebridement, Instrumentarium etc.) konstant gehalten [50, 68, 82, 231, 239]. Die subchondrale Anbohrung der debridierten Defekte wurde mit einer hohen Bohrlochdichte von 6 Bohrlöchern oder einer niedrigen Bohrlochdichte von 2 Bohrlöchern durchgeführt. Eine Anbohrung mit 6 Bohrlöchern (Fläche pro Bohrloch: 0,79 mm<sup>2</sup>; Gesamtfläche Anbohrung: 4,71 mm<sup>2</sup>) perforiert dabei ~15% der debridierten Defektfläche (32 mm<sup>2</sup>) und spiegelt daher eine hohe Bohrlochdichte suffizient wider. Mit einer höheren Bohrlochdichte wäre wiederum der empfohlene minimale Abstand zwischen den angelegten Bohrlöchern von ~1,5 mm nicht zu gewährleisten gewesen. Dies hätte jedoch in einem Ineinanderbrechen der Bohrlöcher resultieren können. Die proportionalen Unterschiede der bikondylären Weite des distalen Femurs und der trochleären Weite zwischen Mensch und Schaf beachtend (Größenfaktor Mensch:Schaf ~2:1) [227, 246], bildet der somit erreichte Abstand von ~1,5 mm im Schafmodell den klinisch empfohlenen Abstand von ~3 mm zwischen Mikrofrakturlöchern zufriedenstellend ab [208]. Die Verwendung von 8 Bohrlöchern hätte beispielsweise lediglich einen minimalen Abstand von maximal 1 mm, die Verwendung von 10 Bohrlöchern einen Abstand von maximal 0,6 mm zwischen den angelegten Bohrlöchern ermöglicht. In beiden Fällen wäre dieser somit zu niedrig und der mögliche negative Effekt auf den subchondralen Knochen wäre unvorhersehbar gewesen. Mit 2 Bohrlöchern (Gesamtfläche Anbohrung: 1,57 mm<sup>2</sup>) werden andererseits ~5% der debridierten Defektfläche eröffnet. Dies repräsentiert eine niedrige Bohrlochdichte geeignet. Die Verwendung von 1 Bohrloch (Gesamtfläche Anbohrung: 0,78 mm<sup>2</sup>), welches lediglich ~2,5% der Defektfläche eröffnet, wäre hingegen nicht ausreichend und bezogen auf die Defektfläche das Volumen des hierdurch induzierten Blutkoagels und dessen Stabilität vermutlich zu klein gewesen. Eine gerade Anzahl von 2 Bohrlöchern wurde zudem verwendet, um eine standardisierte Verteilung der Bohrlöcher für alle Defekt in dieser Behandlungsgruppe zu gewährleisten (eine longitudinale Reihe von zwei Bohrlöchern zentral im Defekt).

Eine höhere Anzahl von Bohrlöchern scheint das Einwandern mesenchymaler Stammzellen in den Knorpeldefekt zu verbessern [204]. In Kniegelenken noch nicht ausgewachsener Kaninchen beobachteten Min et al. beispielsweise eine höhere Anzahl mesenchymaler Stammzellen im Defekt nach Anlage von 3 oder 5 Mikrofrakturen verglichen mit 1 Mikrofraktur pro trochleären Defekt (Defektfläche 19,6 mm<sup>2</sup>) [204]. In der aktuellen Arbeit wurden durch Anlage von 6 Bohrlöchern mit einem Bohrlochdurchmesser von 1 mm und einer Tiefe von 10 mm (Volumen pro Bohrloch: 8 mm<sup>3</sup>; Gesamtvolumen Anbohrung: 48 mm<sup>3</sup>) 15 % des subchondralen Knochenvolumens unterhalb der Defektregion (320 mm<sup>3</sup>) eröffnet, durch 2 Bohrlöcher (Gesamtvolumen Anbohrung: 16 mm<sup>3</sup>) ausschließlich 5% des Knochenvolumens. Hierdurch sollte folglich das Reparaturpotenzial nach Anbohrung mit 6 Bohrlöchern verbessert sein [284]. Allerdings werden der subchondrale Knochen sowie die osteochondrale Einheit bei Verwendung einer hohen Bohrlochdichte ausgeprägter geschwächt. Dies kann den mittel- und langfristigen Verlauf der osteochondralen Reparatur ebenfalls maßgeblich beeinflussen [48, 49, 86, 238]. In der vorliegenden Studie schienen sich zum mittelfristigen Zeitpunkt 6 Monate nach Operation durch Verwendung einer hohen Bohrlochdichte die potenzielle Verbesserung der Gelenkknorpelreparatur einerseits sowie die ausgedehntere Schädigung des subchondralen Knochens andererseits auszugleichen. Eine Überlegenheit der induzierten osteochondralen Reparatur gegenüber einer niedrigen Bohrlochdichte konnte in der gegenwärtigen Studie nicht beobachtet werden.

Präklinische Studien beleuchteten insbesondere in den letzten 15 Jahren die verschiedenen technischen Variablen der Markraumeröffnung [295], um deren therapeutischen Effekt weiter zu optimieren. So bieten etwa Perforationen, welche tief in den subchondralen Knochen hinabreichen, einen gesteigerten Zugang zu Markrauminhalten wie mesenchymalen Stammzellen [284]. Chen *et al.* stellten eine verbesserte osteochondrale Reparatur vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 16 mm<sup>2</sup>) im Kleintiermodell Kaninchen 3 Monate nach subchondraler Anbohrung (Bohrlochdurchmesser: 0,9 mm) bis 6 mm Tiefe verglichen mit einer Anbohrung bis 3 mm Tiefe fest [49, 50]. Spezielle, sehr dünne Nanofrakturahlen (Nanofracture®; Arthrosurface, MA, USA; Ahlendurchmesser: 1 mm) ermöglichen eine Eindringtiefe bis 9 mm [21] und verbesserten die osteochondrale Reparatur von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: mediale Femurkondyle; Defektfläche: 50,3 mm<sup>2</sup>) 12 Monate postoperativ im Großtiermodell Schaf verglichen mit einer Standard-Mikrofrakturerung [320, 321]. Die Standard-Mikrofrakturahlen gewährleisten eine vergleichsweise begrenzte Eindringtiefe bis ca. 4 mm [123], welche u.a. abhängig von der Geometrie der Ahlenspitze, vom Impuls und von der Frequenz der Hammerschläge sowie der subchondralen Knochendichte ist [295].

Hinsichtlich des Instrumentendurchmessers wiesen Min et al. im Kleintiermodell Kaninchen (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 19,6 mm<sup>2</sup>) nach, dass bei Verwendung von Mikrofrakturahlen mit größerem Durchmesser (1,8 mm) im Vergleich zu Ahlen mit einem kleineren Durchmesser (0,8 mm) eine um den Faktor 5,7 signifikant gesteigerte Menge mesenchymaler Stammzellen aus dem Markraum mobilisiert wird [204]. Andere Studien dokumentierten hingegen eine verbesserte osteochondrale Reparatur von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektfläche: 32 mm<sup>2</sup>) 6 Monate postoperativ im Schafmodell bei Verwendung dünnerer Mikrofrakturahlen (Ahlendurchmesser: 1 mm versus 1,2 mm; Defektlokalisation: mediale Femurkondyle) [243] sowie dünnerer Kirschner-Drähte (Bohrlochdurchmesser: 1 mm versus 1,8 mm; Defektlokalisation: mediale Trochlea) [68, 245]. Ein Instrumentendurchmesser von 1 mm entsprach im verwendeten Tiermodell bemerkenswerterweise dem physiologischen Trabekelabstand der subartikulären Spongiosa [68]. Der Einsatz von Mikrofraktur-Ahlenspitzen größeren Durchmessers induzierte in anderen Studien ferner eine ausgeprägtere Verdichtung des angrenzenden subchondralen Knochens [123, 320, 321]. Resümierend scheint - ähnlich der Bohrlochdichte - die ausgedehntere Schwächung des subchondralen Knochens durch Verwendung von Bohrern und Ahlen mit größerem Durchmesser den Effekt der potenziell verbesserten Rekrutierung von Knochenmarkinhalten im Zuge der osteochondralen Reparatur zu übersteigen [68, 230, 295].

Verschiedene Variablen im Design chirurgischer Bohrer und von Kirschner-Drähten wie beispielsweise Vortriebskraft, Rotationsgeschwindigkeit und Geometrie von Bohrer- und Drahtspitzen beeinflussen zudem die Wirksamkeit der subchondralen Anbohrung [48, 49, 89, 295]. Da Kirschner-Drähte in der Regel eine glatte Oberfläche und keine Helixwindungen besitzen, wird im Zuge des Bohrvorganges anfallendes Bohrmehl insuffizienter abtransportiert und an die Innenwand des Bohrkanals gepresst [48, 295, 322]. Hierdurch wird der angrenzende subchondrale Knochen zumindest vorübergehend kompaktiert und Reibungshitze entsteht [48, 89, 295, 322]. Folglich wird eine kontinuierliche Spülung mit kühlenden Lösungen während des Bohrvorganges empfohlen [48, 295]. Chirurgische Bohrer mit Helixwindungen oder integriertem Spülsystem ermöglichen hingegen einen verbesserten Abtransport von Bohrabrieb, reduzieren die entstehende Reibungshitze und optimieren den Zugang zum subchondralen Knochenmark [48, 89, 295]. Auch die Geometrie von Mikrofraktur-Ahlenspitzen beeinflusst die Form der erzeugten Knochenkanäle, das Ausmaß sowie die Art der induzierten Veränderungen im angrenzenden subchondralen Knochen und somit den generierten Therapieeffekt [48, 123, 230, 238, 295]. Beispielsweise bestimmt die Beschaffenheit der Ahlenspitze u.a. die Eindringtiefe in den subchondralen Knochen [123, 295]. Eine schmale und scharfe Spitze erleichtert ein Eindringen und reduziert angrenzende Knochenverdichtungen [123, 295]. Das Volumen des mittleren Ahlenspitzen-Drittels scheint den größten Einfluss auf die Mikrofrakturentstehung sowie Verdichtung des subchondralen Knochen zu haben [230, 295]. Onken et al. wiesen diesbezüglich auf, dass Ahlenspitzen mit einem geringen (hohen) Volumen weniger (mehr) Mikrofrakturen, jedoch einen ausgedehntere (geringere) Verdichtung des angrenzenden Knochens erzeugten [230].

Des Weiteren scheinen subchondrale Anbohrung und Mikrofrakturierung einen unterschiedlichen Effekt auf den subchondralen Knochen sowie die hiernach ablaufende osteochondrale Reparatur zu haben. So untersuchten Chen et al. im Kleintiermodell Kaninchen den Einfluss der subchondralen Anbohrung (Instrument: Microdrill-Bohrer; Bohrlochanzahl: 4; Bohrlochdurchmesser: 0,9 mm) sowie Mikrofrakturierung (4 Mikrofrakturen; Ahlendurchmesser: 1 mm) auf den subchondralen Knochen einen Tag nach Behandlung von vollschichtigen, debridierten Gelenkknorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 16 mm<sup>2</sup>) [48]. Die subchondrale Anbohrung wurde unter kontinuierlicher, kühlender Spülung durchgeführt. In der Mikro-CT-Bildgebung verdichtete die Mikrofrakturierung den direkt angrenzenden subchondralen Knochen und induzierte eine Versiegelung zum subchondralen Knochenmarkraum. Die subchondrale Anbohrung wiederum generierte Zugangskanäle mit glatten Rändern und freiem Zugang zum subchondralen Knochenmark. Interessanterweise rief die Mikrofrakturierung histologisch mehr Osteozytennekrosen durch eine ausgeprägtere Impaktierung und Frakturierung des angrenzenden subchondralen Knochens im Vergleich zur subchondralen Anbohrung hervor. Die kontinuierliche, kühlende Spülung während der subchondralen Anbohrung wiederum beugte in dieser Studie mögliche Hitzenekrosen suffizient vor. Wir transferierten diese Erkenntnisse in unser Studiendesign und führten die subchondrale Anbohrung ebenfalls unter kontinuierlicher Spülung mit Ringer-Lactat-Lösung durch. Interessanterweise beobachteten Zlotnik et al. in Minischweinen unmittelbar nach subchondraler Anbohrung vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 19,6 mm<sup>2</sup>) mit Kirschner-Drähten (3 Bohrlöcher; Bohrdurchmesser: 1,25 mm; Bohrtiefe: 6 mm) demgegenüber um die angelegten Bohrlöcher eine erheblichere Kompaktierung des subchondralen Knochens mit Erhöhung des relativen Knochenvolumens (BV/TV) im Vergleich zu einem *Microneed-ling* mit dünnerem Durchmesser (Anzahl: 3; Durchmesser: 0,9 mm; Tiefe: 8 mm). Verglichen mit einem *Microneedling* mit größerem Durchmesser (Anzahl: 3; Durchmesser: 1,2 mm; Tiefe: 8 mm) waren zudem ausgedehntere Knochenresorptionsvorgänge und eine verzögerte Knochenheilung 4 Wochen nach Markraumeröffnung zu erkennen.

Aus diesen Erkenntnissen resultierte die Entwicklung ausgesprochen dünner Nanofrakturahlen [21], Microneedling-Instrumente [322] sowie Bohrer [53]. Diese weisen einen Instrumentendurchmesser von 1-1,5 mm auf und ermöglichen einen verbesserte Eindringtiefe von 4-9 mm in den subchondralen Knochen hinein [21, 53, 123, 222, 320, 322], kompaktieren den angrenzenden subchondralen Knochen weniger ausgeprägt [93, 320, 322] und schaffen einen verbesserten Zugang zum subchondralen Knochenmarkraum [93, 320] im Vergleich zur konventionellen subchondralen Anbohrung sowie Mikrofrakturierung. Diese Weiterentwicklung der markraumeröffnenden Verfahren wird unter dem Begriff Microdrilling zusammengefasst [222]. Im Schafmodell resultierte die Verwendung genannter Nanofrakturahlen bereits in einer signifikant verbesserten osteochondralen Reparatur von vollschichten Knorpeldefekten (Defektlokalisation: mediale Femurkondyle; Defektfläche: 50,3 mm<sup>2</sup>) 6 Monate [320, 321] und 12 Monate [321] postoperativ im Vergleich zu Standard-Mikrofrakturahlen. Auch im Pferdemodell zeigten sich zufriedenstellende Ergebnisse 7 Monate nach Operation in der Behandlung teilschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 38,5 mm²) [57]. Im Schweinemodell wurden 4 Wochen nach Operation zwar weniger Resorptionsprozesse und eine gesteigerte Knochenheilung nach Microneedling (Durchmesser: 1,2 mm; Tiefe: 8 mm) von vollschichtigen Knorpeldefekten (Defektlokalisation: Trochlea; Defektfläche: 19,6 mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur subchondralen Anbohrung mit Kirschner-Drähten (Bohrlochdurchmesser: 1,25 mm; Bohrtiefe: 6 mm) beobachtet, signifikante Unterschiede in der induzierten Knorpelreparatur wurden zu diesem frühen Zeitpunkt jedoch noch nicht dokumentiert [322]. Die Behandlung vollschichtiger, debridierter Knorpeldefekte in menschlichen Kniegelenken mit 1,5 mm dicken Microdrill-Bohrern verbesserte indessen in einer retrospektiven Kohortenstudie die klinischen Resultate 6 und 12 Monate nach Operation und reduzierte die Rate von Revisionsoperationen im Vergleich zu Standard-Mikrofrakturahlen [20]. Gursoy et al. hingegen konnten bis 48 Monate nach Behandlung vollschichtiger Knorpeldefekte (Defektlokalisation: mediale und laterale Femurkondyle) keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Nanofrakturierung und Mikrofrakturierung mit Standardahlen hinsichtlich der resultierenden klinischen Ergebnisse finden [106]. Einschränkend muss hierzu erwähnt werden, dass im Rahmen dieser Studie Knorpeldefekte mit einer Defektgröße von 3,5  $cm^2 \pm 0.7 cm^2$  behandelt wurden. Dies entspricht allerdings nicht der empfohlenen Defektgröße von <2cm<sup>2</sup> zur Indikation markraumeröffnender Verfahren.

Insgesamt konnte die technische Anwendung markraumeröffnender Verfahren - im Speziellen der subchondralen Anbohrung - in den letzten Jahrzehnten insbesondere durch präklinische Studien kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert werden. So empfiehlt sich nach aktuellem Wissensstand die Verwendung dünner Instrumente mit ausreichender Eindringtiefe von mindestens 3-4 mm in der klinischen Anwendung. Zudem scheint der Einsatz von chirurgischen Bohrern und einer kontinuierlichen, kühlenden Spülung sinnvoll. Der Einfluss der Bohrlochdichte war jedoch bisher noch nicht ausreichend untersucht. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit ergänzen daher die bisherigen Daten um die wesentliche Erkenntnis, dass der positive Einfluss einer subchondralen Anbohrung kleinflächiger, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte auf die osteochondrale Reparatur unabhängig der verwendeten Bohrlochdichte scheint. Eine Anbohrung mit hoher Bohrlochdichte ist einer Anbohrung mit niedriger Bohrlochdichte im verwendeten Modell nicht überlegen.

## 8.3 Limitationen und Stärken der Arbeit

Eine Limitation der vorliegenden Studie ist, dass das Schafmodel die Gegebenheiten des menschlichen Kniegelenkes nicht optimal abbilden kann [2, 180, 227, 239]. So herrscht im Schaf u.a. eine vom humanen Modell abweichende Gelenkbiomechanik im Rahmen des vierbeinigen Ganges sowie eine andersartige Gelenkruheposition und -beweglichkeit [180, 252]. Gelenkanatomie und -biologie sind darüber hinaus trotz aller Ähnlichkeiten speziesspezifisch [180, 227]. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit glatte Kirschner-Drähte für die subchondrale Anbohrung angelehnt an vorgehende Tierstudien verwendet [235, 245]. Translationale Studien vermuten jedoch eine Überlegenheit chirurgischer Bohrer mit Helixwindungen hinsichtlich des Zugangs zum subchondralen Knochenmark sowie der negativen Auswirkungen auf den subchondralen Knochen [48, 322]. Durch Standardisierung des Anbohrungsprozesses in der gegenwärtigen Studie sollte jedoch ein Einfluss hierdurch auf die untersuchten Fragestellungen ausgeschlossen sein. Die aktuellen Untersuchungsergebnisse beziehen sich des Weiteren auf nur eine Defektlokalisation (laterale Trochlea). Da die osteochondrale Reparatur durch veränderte Biomechanik und Anatomie jedoch abhängig von der Defektlokalisation zu sein scheint [51, 52, 145, 160, 239], sollte die Gültigkeit der Studienergebnisse für andere Gelenklokalisationen in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. Eine weitere Limitation ist das zur klinischen Situation abweichende Nachbehandlungsschema. Die operierten Schafe belasteten postoperativ unmittelbar voll. Das Nachbehandlungsschema nach markraumeröffnenden Verfahren beinhaltet im klinischen Alltag wiederum eine mindestens sechswöchige Sohlenkontakt-Belastung, tägliche Motorschienenbehandlung und ggf. Beweglichkeitslimitierung durch eine Orthese [20]. Dies bewirkt im Vergleich zur klinischen Situation folglich eine höhere biomechanische Belastung von u.a. subchondralem Knochen und entstehendem Reparaturgewebe im Tiermodell. Nachbehandlungsprotokoll und Defektlokalisation wurden in der aktuellen Studie daher ebenfalls standardisiert, um einen Einfluss hierdurch möglichst zu minimieren. Die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf das menschliche Kniegelenk muss jedoch in klinischen Studien überprüft werden. Der mittelfristige Nachuntersuchungszeitpunkt 6 Monate postoperativ bedingt ferner weitere zukünftige Studien, die den Langzeitverlauf der osteochondralen Reparatur untersuchen.

Zu den Stärken der Arbeit zählt andererseits das verwendete Großtiermodell Schaf, welches zur präklinischen Knorpelforschung am Kniegelenk etabliert ist [64, 68, 95, 180, 227, 235, 243, 245]. Ähnlichkeiten der Gelenkanatomie und -biologie zum menschlichen Kniegelenk begünstigen zumindest eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse in den klinischen Kontext [180, 227]. Großtiermodelle im Allgemeinen spielen eine entscheidende Rolle in der Weiterentwicklung etablierter sowie Erforschung neuer chirurgischer Techniken [130, 180]. Basierend auf vorangegangenen Großtierstudien [68, 235, 241, 243] wurde 6 Monate als Nachbeobachtungszeitpunkt gewählt, was einen mittelfristigen postoperativen Verlauf verlässlich abbildet. Chirurgischer Zugang und weitere technische Variablen wurden anhand aktuellster Forschungsergebnisse ausgewählt [50, 68, 82, 231, 239] und bis auf die untersuchte Variable der Bohrlochdichte konstant gehalten. Dem aktuellen klinischen Trend hin zum Microdrilling [20, 21, 53, 123, 222, 321] folgend, untersuchten wir die Technik der subchondralen Anbohrung mit kleinem Durchmesser [68]. Die anatomischen [189] und biomechanischen [252] Unterschiede zwischen menschlichem und Schaf-Kniegelenk beachtend, repräsentiert eine Defektlokalisation im Bereich der lateralen Trochlea im vorliegenden Modell die häufigste Lokalisation von Knorpeldefekten im klinischen Alltag im Bereich der medialen Femurkondyle beim Menschen am besten [160, 239, 315]. Hiermit versuchten wir einen möglichst guten Transfer der Studienergebnisse in den klinischen Kontext zu gewährleisten. Überdies ist die verwendete Defektgröße (32 mm<sup>2</sup>) vergleichbar mit einem kleinen Knorpeldefekt (~1 cm<sup>2</sup>) im menschlichen Kniegelenk (Größenfaktor: ~2:1) [68, 227, 235, 245, 246]. Die osteochondrale Reparatur wurde mit Hilfe einer Vielzahl standardisierter und verlässlicher Methoden im Detail untersucht [86, 97, 151, 169, 197, 210, 214, 235, 240, 280, 290]. Die makroskopischen [97] und Mikro-CT- [86, 210] Verfahren sind hierbei kompatibel mit der aktuellen klinischen Diagnostik [32, 210, 223, 249].

#### 8.4 Schlussfolgerungen

## 8.4.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals den Einfluss der Bohrlochdichte auf die osteochondrale Reparatur von Gelenkknorpeldefekten. Die Hypothese, dass eine subchondrale Anbohrung mit einer

#### Diskussion

höheren Bohrlochdichte die osteochondrale Reparatur kleiner, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte gegenüber einer Behandlung mit niedriger Bohrlochdichte verbessert, wurde verworfen. Die Daten zeigten insgesamt keinen signifikanten Einfluss der Bohrlochdichte auf die induzierte osteochondrale Reparatur. Diese Erkenntnis erweitert wesentlich unser Wissen zur technischen Ausführung markraumeröffnender Verfahren [20, 21, 48–51, 53, 57, 66, 68, 82, 93, 123, 204, 230, 243, 245, 320, 321]. Des Weiteren analysierten wir den Einfluss der subchondralen Anbohrung per se auf die osteochondrale Reparatur und stellten sie einem alleinigen Defektdebridement vergleichend gegenüber. Die Hypothese, dass die subchondrale Anbohrung per se zu einer verbesserten Knorpelreparatur von kleinen, vollschichtigen Gelenkknorpeldefekten verglichen mit einem alleinigen Defektdebridement führt, konnten wir in unserem Modell bestätigen. Bemerkenswerterweise beobachteten wir sogar zu diesem mittelfristigen Untersuchungszeitpunkt einen effektiveren Schutz des angrenzenden Gelenkknorpels durch die verbesserte Knorpelreparatur. Vorangegangene präklinische Studienergebnisse [95, 107, 168] erweiterten wir durch detaillierte Analyse des gesamten subchondralen Knochens. Erstmals wurde aufgezeigt, dass ein Defektdebridement im Vergleich zu einer subchondralen Anbohrung in einer ausgeprägteren Schwächung sowohl der subchondralen Knochenplatte als auch der subartikulären Spongiosa - angezeigt durch eine signifikant verminderte Knochenmineraldichte - resultiert. Die Hypothese, dass die subchondrale Anbohrung dem Debridement hierbei unterlegen ist, wurde somit entkräftet. Die subchondrale Anbohrung verbesserte hingegen die Remodellierung des subchondralen Knochens. Weiterhin dokumentierten wir zum ersten Mal, dass ein alleiniges Defektdebridement die Querschnittsfläche induzierter intraläsionaler Osteophyten im Vergleich zu einer subchondralen Anbohrung vergrößert.

Insgesamt zeigt sich die subchondrale Anbohrung also unabhängig der Bohrlochdichte dem alleinigen Defektdebridement kleiner, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte in der osteochondrale Reparatur überlegen. Einerseits verdeutlichen die gegenwärtigen Studienergebnisse den Stellenwert der subchondralen Anbohrung in der Behandlung kleiner, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte, während das alleinige Defektdebridement in dieser Situation nicht sinnvoll erscheint. Andererseits liefern uns die aktuellen Daten neue Informationen zur technischen Anwendung markraumeröffnender Verfahren. Die gewonnenen Erkenntnisse haben eine hohe praktische Relevanz, müssen jedoch unter klinischen Bedingungen in der Zukunft bestätigt werden.

## 8.4.2 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten stellt ein aktives und dynamisches Forschungsfeld dar. Zahlreiche Weiterentwicklungen etablierter und Entwicklung neuartiger operativer Therapieverfahren erfolgten in den letzten Jahrzehnten. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die Verbesserung der technischen Durchführung und Indikationsstellung markraumeröffnender Verfahren [281]. Präklinische Tierstudien nehmen hierbei eine wichtige Rolle ein und untersuchten beispielsweise den Einfluss der verschiedenen technischer Variablen der Markraumeröffnung [50, 68, 204, 243, 245] sowie der Defektpräparation [66, 82] auf den subchondralen Knochen, den angrenzenden Knorpel, die Mobilisierung von Stammzellen und Wachstumsfaktoren sowie die induzierte osteochondrale Reparatur. Hierdurch wurden die resultierende faserknorpelartige Defektreparatur und Rekonstitution des subchondralen Knochens bereits zunehmend verbessert [57, 320, 321]. Die Erkenntnisse der aktuellen Arbeit, dass eine subchondrale Anbohrung unabhängig der Bohrlochdichte die osteochondrale Reparatur kleiner, vollschichtiger Gelenkknorpeldefekte gegenüber dem alleinigen Defektdebridement steigert, ergänzen dieses Wissen klinisch zweckmäßig. Die Daten zeigten überdies eine signifikante Schwächung des subchondralen Knochens durch ein alleiniges Defektdebridement. Ursächlich hierfür scheint u.a. eine Verletzung der subchondralen Knochenplatte im Rahmen des Debridierungsvorganges. Die Defektvorbereitung nimmt eine wichtige Rolle im Rahmen knorpelchirurgischer Eingriffe ein. Methoden zur genauen Abschätzung der Tiefe des Defektdebridements zur Schonung des subchondralen Knochens sollten daher in Zukunft weiter erforscht werden. Auch der Einfluss zusätzlicher Variablen der technischen Anwendung und hinsichtlich der Indikationsstellung markraumeröffnender Verfahren sollten in Zukunft beleuchtet werden, um die Oualität des erzeugten Reparaturgewebes sowie die klinischen Resultate weiter zu verbessern. Interessante Aspekte wären hierbei beispielsweise eine Weiterentwicklung des Bohrinstrumentariums (z.B. Bohrer-/Drahtdesign, Kühl-/Spülmechanismen) oder der Debridement-Instrumente.

Ein Problem bisheriger präklinischer Studien ist die hohe Heterogenität der Studienmodelle (u.a. Tierart und -alter, Defektgröße,-tiefe,-lokalisation, chirurgisches Instrumentarium, Untersuchungszeiträume, diagnostische Methoden). Hierdurch ist die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse untereinander limitiert und das Verständnis über den genauen Einfluss einzelner Variablen auf Chondrogenese und Osteogenese erschwert. In Zukunft sollten diese daher zunehmend standardisiert werden. Bisherige translationale Untersuchungen beleuchteten zudem vorwiegend den kurz- und mittelfristigen postoperativen Verlauf der osteochondralen Reparatur. Weitere Langzeit-Untersuchungen sind notwendig, um etwa die Bedeutung von Störungen der subchondralen Mikroarchitektur und subchondraler Sekundärveränderungen auf die langfristige Gelenkknorpelreparatur und Gelenkhomöostase zu klären. Des Weiteren müssen klinische Studien im Verlauf die Übertragbarkeit der gewonnenen präklinischen Erkenntnisse auf die klinische Situation überprüfen.

Trotz der therapeutischen Fortschritte resultiert die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten weiterhin lediglich in der Bildung eines faserknorpelartigen, bestenfalls hyalinähnlichen Reparaturgewebes. Ziel zukünftiger Forschung ist es daher, die Signalkaskaden und Abläufe der osteochondralen Reparatur weiter zu entschlüsseln und durch innovative therapeutische Maßnahmen auf Basis dieser Erkenntnisse günstig zu beeinflussen mit dem Ziel einer möglichst physiologischen Gelenkknorpelreparatur. Eine Vielzahl unterschiedlicher Biomaterialien zur Ergänzung nach Markraumeröffnung wurden bereits entwickelt, welche sich anhand ihres Aufbaus, ihrer Herkunft, ihres Aggregatzustandes sowie ihrer stofflichen Zusammensetzung unterscheiden [258, 259, 281, 295]. Ziele der teilweise sogar arthroskopisch in den Knorpeldefekt eingebrachten Biomaterialien sind, das durch die vorhergehende Markraumeröffnung entstandenen Blutkoagel zu stabilisieren und vor Ort zu halten, die induzierte Zellmigration, adhäsion und -differenzierung zu verbessern sowie den geschwächten subchondralen Knochen zu schützen [18, 281, 295]. In präklinischer und klinischer Erprobung sind zudem Verfahren der Transplantation von autologem, zerkleinertem Knorpel (*Minced Cartilage*) [194, 222] oder gentherapeutische Ansätze zur Verbesserung der Chondrogenese [83, 84, 104, 176, 179, 213, 311]. Klinische, randomisiert-kontrollierte Langzeitstudien auch mit Vergleich zu den bisher etablierten Therapiemethoden sind jedoch noch erforderlich.

# 9 Literaturverzeichnis

- Abraamyan T, Johnson AJ, Wiedrick J, Crawford DC (2022) Marrow Stimulation Has Relatively Inferior Patient-Reported Outcomes in Cartilage Restoration Surgery of the Knee: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. Am J Sports Med 50:858– 866
- Aigner T, Cook JL, Gerwin N, Glasson SS, Laverty S, Little CB, McIlwraith W, Kraus VB (2010) Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. Osteoarthritis Cartilage 18:2-6
- 3. Anderson DD, Brown TD, Radin EL (1993) The influence of basal cartilage calcification on dynamic juxtaarticular stress transmission. Clin Orthop Relat Res 286:298–307
- Anderson DE, Rose MB, Wille AJ, Wiedrick J, Crawford DC (2017) Arthroscopic Mechanical Chondroplasty of the Knee Is Beneficial for Treatment of Focal Cartilage Lesions in the Absence of Concurrent Pathology. Orthop J Sports Med 5:1-8
- 5. Angermann P, Harager K, Tobin LL (2002) Arthroscopic chondrectomy as a treatment of cartilage lesions. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 10:6–9
- Archer CW, Redman S, Khan I, Bishop J, Richardson K (2006) Enhancing tissue integration in cartilage repair procedures. J Anat 209:481–493
- Arkill KP, Winlove CP (2008) Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 16:708–714
- Armoiry X, Cummins E, Connock M, Metcalfe A, Royle P, Johnston R, Rodrigues J, Waugh N, Mistry H (2019) Autologous Chondrocyte Implantation with Chondrosphere for Treating Articular Cartilage Defects in the Knee: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. Pharmacoeconomics 37:879–886
- 9. Armstrong SJ, Read RA, Price R (1995) Topographical variation within the articular cartilage and subchondral bone of the normal ovine knee joint: a histological approach. Osteoarthritis Cartilage 3:25–33
- Arøen A, Løken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L (2004) Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. Am J Sports Med 32:211–215
- Arøen A, Heir S, Løken S, Engebretsen L, Reinholt FP (2006) Healing of articular cartilage defects. An experimental study of vascular and minimal vascular microenvironment. J Orthop Res 24:1069–1077

- Asik M, Ciftci F, Sen C, Erdil M, Atalar A (2008) The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee: midterm results. Arthroscopy 24:1214– 1220
- Augustin G, Davila S, Udilljak T, Staroveski T, Brezak D, Babic S (2012) Temperature changes during cortical bone drilling with a newly designed step drill and an internally cooled drill. Int Orthop 36:1449–1456
- 14. Becher C, Imhoff A (2021) Guidelines for the treatment of unicompartmental cartilage defects of the knee-Cartilage repair, osteotomy, mini-implant or arthroplasty? Orthopäde 50:88–95
- Beck A, Wood D, Vertullo CJ, Ebert J, Janes G, Sullivan M, Zheng MH (2021) Morphological Assessment of MACI Grafts in Patients with Revision Surgery and Total Joint Arthroplasty. Cartilage 13:526–539
- Beck A, Murphy DJ, Carey-Smith R, Wood DJ, Zheng MH (2016) Treatment of Articular Cartilage Defects With Microfracture and Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis Leads to Extensive Subchondral Bone Cyst Formation in a Sheep Model. Am J Sports Med 44:2629– 2643
- Bedi A, Feeley BT, Williams RJ 3rd (2010) Management of articular cartilage defects of the knee. J Bone Joint Surg Am 92:994–1009
- 18. Behrens P (2005) Matrixgekoppelte Mikrofrakturierung. Arthroskopie 18:193–197
- Bekkers JEJ, Inklaar M, Saris DBF (2009) Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review. Am J Sports Med 37:148–155
- Beletsky A, Naveen NB, Tauro T, Southworth TM, Chahla J, Verma NN, Yanke AB, Cole BJ (2021) Microdrilling Demonstrates Superior Patient-Reported Outcomes and Lower Revision Rates Than Traditional Microfracture: A Matched Cohort Analysis. Arthroscopy 3:629-638
- Benthien JP, Behrens P (2013) Reviewing subchondral cartilage surgery: considerations for standardised and outcome predictable cartilage remodelling: a technical note. Int Orthop 37:2139–2145
- 22. Bert JM (2015) Abandoning microfracture of the knee: has the time come? Arthroscopy 31:501–505
- Blanke M, Carl HD, Klinger P, Swoboda B, Hennig F, Gelse K (2009) Transplanted chondrocytes inhibit endochondral ossification within cartilage repair tissue. Calcif Tissue Int 85:421– 433
- 24. Blevins FT, Steadman JR, Rodrigo JJ, Silliman J (1998) Treatment of articular cartilage defects in athletes: an analysis of functional outcome and lesion appearance. Orthopedics 21:761-768

- Bobić V (1996) Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 3:262–264
- 26. Bora FW, Miller G (1987) Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. Hand Clin 3:325–336
- 27. Bötsch K (2007) Funktionelle Anatomie des Gelenkknorpels. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Breinan HA, Martin SD, Hsu HP, Spector M (2000) Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. J Orthop Res 18:781–789
- 29. Breinan HA, Hsu HP, Spector M (2001) Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. Clin Orthop Relat Res 391:219-230
- Brittberg M (2010) Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. Am J Sports Med 38:1259–1271
- 31. Brittberg M (2024) Treatment of knee cartilage lesions in 2024: From hyaluronic acid to regenerative medicine. J Exp Orthop 11:1-12
- Brittberg M, Winalski CS (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. J Bone Joint Surg Am 85:58–69
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331:889–895
- Brittberg M, Imhoff A, Madry H, Mandelbaum B (Hrsg) (2010) Cartilage repair: Current concepts. 1. Aufl. DJO Publications, Guildford
- 35. Brittberg M, Recker D, Ilgenfritz J, Saris DBF (2018) Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. Am J Sports Med 46:1343–1351
- Brockmeyer M, Madry H (2022) Produkte f
  ür die autologe Chondrozytentransplantation. Arthroskopie 35:1–8
- 37. Brown WE, Potter HG, Marx RG, Wickiewicz TL, Warren RF (2004) Magnetic resonance imaging appearance of cartilage repair in the knee. Clin Orthop Relat Res 422:214–223

- Buckland-Wright JC, Lynch JA, Macfarlane DG (1996) Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. Ann Rheum Dis 55:749–755
- Buckland-Wright JC, Lynch JA, Dave B (2000) Early radiographic features in patients with anterior cruciate ligament rupture. Ann Rheum Dis 59:641–646
- 40. Buckwalter JA (1983) Articular cartilage. Instr Course Lect 32:349–370
- 41. Buckwalter JA (1998) Articular cartilage: injuries and potential for healing. J Orthop Sports Phys Ther 28:192–202
- 42. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect 47:487–504
- Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR (1993) Soft-tissue aging and musculoskeletal function. J Bone Joint Surg Am 75:1533–1548
- 44. Bullough PG, Yawitz PS, Tafra L, Boskey AL (1985) Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. J Orthop Res 3:1–16
- Caplan AI, Goldberg VM (1999) Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. Clin Orthop Relat Res 367:12–16
- 46. Chahal J, Gross AE, Gross C, Mall N, Dwyer T, Chahal A, Whelan DB, Cole BJ (2013) Outcomes of osteochondral allograft transplantation in the knee. Arthroscopy 29:575–588
- 47. Chen G, Sun J, Lascau-Coman V, Chevrier A, Marchand C, Hoemann CD (2011) Acute Osteoclast Activity following Subchondral Drilling Is Promoted by Chitosan and Associated with Improved Cartilage Repair Tissue Integration. Cartilage 2:173–185
- 48. Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, Shive MS, Buschmann MD (2009) Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. J Orthop Res 27:1432–1438
- 49. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Ouyang W, Buschmann MD (2011) Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its relationship to articular cartilage resurfacing. Am J Sports Med 39:1731–1740
- Chen H, Hoemann CD, Sun J, Chevrier A, McKee MD, Shive MS, Hurtig M, Buschmann MD (2011) Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. J Orthop Res 29:1178–1184
- 51. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Lascau-Coman V, Buschmann MD (2013) Bone marrow stimulation induces greater chondrogenesis in trochlear vs condylar cartilage defects in skeletally mature rabbits. Osteoarthritis Cartilage 21:999–1007
- 52. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Picard G, Buschmann MD (2013) 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 31:1757–1764
- 53. Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD (2007) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. Osteoarthritis Cartilage 15:316–327
- 54. Choi K, Kuhn JL, Ciarelli MJ. Goldstein SA (1990) The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. J Biomech 23:1103–1113
- Clark JM, Huber JD (1990) The structure of the human subchondral plate. J Bone Joint Surg Br 72:866–873
- 56. Cokelaere S, Malda J, van Weeren R (2016) Cartilage defect repair in horses: Current strategies and recent developments in regenerative medicine of the equine joint with emphasis on the surgical approach. Vet J 214:61–71
- 57. Cokelaere SM, Vindas Bolaños RA, Both SK, Vullers M, Korthagen NM, van Weeren PR, Grauw JC de (2020) Nanofracturing: a new technique for bone marrow stimulation in equine cartilage repair. Pferdeheilkunde Equine Medicine 36:100–106
- 58. Cole BJ, Farr J, Winalski CS, Hosea T, Richmond J, Mandelbaum B, De Deyne PG (2011) Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. Am J Sports Med 39:1170–1179
- Cucchiarini M (2012) The Biology of Articular Cartilage: An Overview? Biol Syst Open Access 2:1–2
- 60. Cucchiarini M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. J Gene Med 7:1495–1509
- 61. Cucchiarini M, Henrionnet C, Mainard D, Pinzano A, Madry H (2015) New trends in articular cartilage repair. J Exp Orthop 2:8
- 62. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. Arthroscopy 13:456–460
- 63. Dijkgraaf LC, Bont LG de, Boering G, Liem RS (1995) Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. J Oral Maxillofac Surg 53:924–929
- 64. Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S (2005) Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage 13:655–664

- 65. Dozin B, Malpeli M, Cancedda R, Bruzzi P, Calcagno S, Molfetta L, Priano F, Kon E, Marcacci M (2005) Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. Clin J Sport Med 15:220–226
- 66. Drobnic M, Radosavljevic D, Cör A, Brittberg M, Strazar K (2010) Debridement of cartilage lesions before autologous chondrocyte implantation by open or transarthroscopic techniques: a comparative study using post-mortem materials. J Bone Joint Surg Br 92:602–608
- Duncan H, Jundt J, Riddle JM, Pitchford W, Christopherson T (1987) The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. J Bone Joint Surg Am 69:1212–1220
- Eldracher M, Orth P, Cucchiarini M, Pape D, Madry H (2014) Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. Am J Sports Med 42:2741–2750
- 69. Elmholt SB, Hede KC, Christensen BB, Thomsen JS, Lind M (2022) The Effect of Bone Marrow Stimulation for Cartilage Repair on the Subchondral Bone Plate. Cartilage 13:1-8
- 70. Epanomeritakis IE, Lee E, Lu V, Khan W (2022) The Use of Autologous Chondrocyte and Mesenchymal Stem Cell Implants for the Treatment of Focal Chondral Defects in Human Knee Joints-A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Mol Sci 23:1–28
- Everhart JS, Abouljoud MM, Flanigan DC (2019) Role of full-thickness cartilage defects in knee osteoarthritis (OA) incidence and progression: Data from the OA Initiative. J Orthop Res 37:77–83
- Feldkamp L, Davis LC, Kress J (1984) Practical Cone-Beam Algorithm. J Opt Soc Am 1:612–619
- Ficat RP, Ficat C, Gedeon P, Toussaint JB (1979) Spongialization: a new treatment for diseased patellae. Clin Orthop Relat Res 144:74–83
- 74. Fickert S, Gerwien P, Helmert B, Schattenberg T, Weckbach S, Kaszkin-Bettag M, Lehmann L (2012) One-Year Clinical and Radiological Results of a Prospective, Investigator-Initiated Trial Examining a Novel, Purely Autologous 3-Dimensional Autologous Chondrocyte Transplantation Product in the Knee. Cartilage 3:27–42
- Findlay DM, Kuliwaba JS (2016) Bone-cartilage crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. Bone Res 4:1–12
- 76. Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Bostrom M, Kim M, Pfeifer C, Meloni G, Dodge GR, Burdick JA, Schaer TP, Steinberg DR, Mauck RL (2015) Cartilage repair and subchondral bone remodeling in response to focal lesions in a mini-pig model: implications for tissue engineering. Tissue Eng Part A 21:850–860
- 77. Flanigan DC, Harris JD, Trinh TQ, Siston RA, Brophy RH (2010) Prevalence of chondral defects in athletes' knees: a systematic review. Med Sci Sports Exerc 42:1795–1801

- Fortier LA, Cole BJ, McIlwraith CW (2012) Science and animal models of marrow stimulation for cartilage repair. J Knee Surg 25:3–8
- 79. Franke O, Durst K, Maier V, Göken M, Birkholz T, Schneider H, Hennig F, Gelse K (2007) Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation. Acta Biomater 3:873–881
- 80. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD, McIlwraith CW (1999) Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. Vet Surg 28:242–255
- Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, Goodnight JL, McIlwraith CW (2003) Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. Clin Orthop Relat Res 407:215–227
- Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, McIlwraith CW (2006) Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. Am J Sports Med 34:1824–1831
- 83. Frisch J, Orth P, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Kohn D, Madry H, Cucchiarini M (2017) Genetic Modification of Human Peripheral Blood Aspirates Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Articular Cartilage Repair with a Focus on Chondrogenic Transforming Growth Factor-β Gene Delivery. Stem Cells Transl Med 6:249–260
- 84. Frisch J, Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Kohn D, Cucchiarini M (2017) Peripheral blood aspirates overexpressing IGF-I via rAAV gene transfer undergo enhanced chondrogenic differentiation processes. J Mol Med 21:2748–2758
- Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. J Bone Joint Surg Am 62:79–89
- Gao L, Orth P, Goebel LK, Cucchiarini M, Madry H (2016) A novel algorithm for a precise analysis of subchondral bone alterations. Sci Rep 6:1–12
- 87. Gao L, Orth P, Müller-Brandt K, Goebel LKH, Cucchiarini M, Madry H (2017) Early loss of subchondral bone following microfracture is counteracted by bone marrow aspirate in a translational model of osteochondral repair. Sci Rep 7:1–16
- Gao L, Orth P, Cucchiarini M, Madry H (2017) Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on in vitro and in vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells. Expert Rev Med Devices 14:717–732
- 89. Gao L, Goebel LKH, Orth P, Cucchiarini M, Madry H (2018) Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. Dis Model Mech 11:1–12

- Gao L, Orth P, Cucchiarini M, Madry H (2019) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. Am J Sports Med 47:222–231
- 91. Gao L, Cucchiarini M, Madry H (2020) Cyst formation in the subchondral bone following cartilage repair. Clin Transl Med 10:1-18
- 92. Gelse K, Klinger P, Koch M, Surmann-Schmitt C, Mark K von der, Swoboda B, Hennig FF, Gusinde J (2011) Thrombospondin-1 prevents excessive ossification in cartilage repair tissue induced by osteogenic protein-1. Tissue Eng Part A 17:2101–2112
- 93. Gianakos AL, Yasui Y, Fraser EJ, Ross KA, Prado MP, Fortier LA, Kennedy JG (2016) The Effect of Different Bone Marrow Stimulation Techniques on Human Talar Subchondral Bone: A Micro-Computed Tomography Evaluation. Arthroscopy 32:2110–2117
- 94. Gill TJ, McCulloch PC, Glasson SS, Blanchet T, Morris EA (2005) Chondral defect repair after the microfracture procedure: a nonhuman primate model. Am J Sports Med 33:680–685
- 95. Giordano M, Aulisa AG, Mastantuoni G, Gigante A, Guzzanti V (2011) Pridie's marrow stimulation technique combined with collagen matrix for cartilage repair. A study in a still growing sheep model. Int J Immunopathol Pharmacol 24:101–106
- Gobbi A, Karnatzikos G, Kumar A (2014) Long-term results after microfracture treatment for full-thickness knee chondral lesions in athletes. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 22:1986– 1996
- 97. Goebel L, Orth P, Müller A, Zurakowski D, Bücker A, Cucchiarini M, Pape D, Madry H (2012) 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 20:1046–1055
- 98. Goldring SR, Goldring MB (2016) Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. Nat Rev Rheumatol 12:632–644
- Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T (2010) Surgical management of articular cartilage defects of the knee. J Bone Joint Surg Am 92:2470–2490
- 100. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E (2010) The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 18:434–447
- 101. Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, Jung M (2008) The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. Lab Anim 42:71–82

- 102. Gowd AK, Cvetanovich GL, Liu JN, Christian DR, Cabarcas BC, Redondo ML, Verma NN, Yanke AB, Cole BJ (2019) Management of Chondral Lesions of the Knee: Analysis of Trends and Short-Term Complications Using the National Surgical Quality Improvement Program Database. Arthroscopy 35:138–146
- Green WT, Martin GN, Eanes ED, Sokoloff L (1970) Microradiographic study of the calcified layer of articular cartilage. Arch Pathol 90:151–158
- 104. Grol MW (2024) The evolving landscape of gene therapy strategies for the treatment of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 32:372–384
- 105. Gudas R, Simonaityte R, Cekanauskas E, Tamosiūnas R (2009) A prospective, randomized clinical study of osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondritis dissecans in the knee joint in children. J Pediatr Orthop 29:741–748
- 106. Gursoy S, Simsek M, Akkaya M, Işık C, doğan M, Bozkurt M (2019) Micro or Nano Does not affect the Functional Outcomes in the Midterm Follow-up. Int J Contemp Med Res 6:1–5
- 107. Hamanishi M, Nakasa T, Kamei N, Kazusa H, Kamei G, Ochi M (2013) Treatment of cartilage defects by subchondral drilling combined with covering with atelocollagen membrane induces osteogenesis in a rat model. J Orthop Sci 18:627–635
- Handley CJ, Lowther DA, McQuillan DJ (1985) The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage. Cell Biol Int Rep 9:753–782
- 109. Hangody L, Füles P (2003) Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of fullthickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. J Bone Joint Surg Am 85:25–32
- 110. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I (1997) Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 5:262–267
- 111. Hannon CP, Bayer S, Murawski CD, Canata GL, Clanton TO, Haverkamp D, Lee JW, O'Malley MJ, Yinghui H, Stone JW (2018) Debridement, Curettage, and Bone Marrow Stimulation: Proceedings of the International Consensus Meeting on Cartilage Repair of the Ankle. Foot Ankle Int 39:16–22
- Harada Y, Wevers HW, Cooke TD (1988) Distribution of bone strength in the proximal tibia. J Arthroplasty 3:167–175
- Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. FASEB J 6:861–870
- 114. Harrison MH, Schajowicz F, Trueta J (1953) Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. J Bone Joint Surg Br 35:598–626

- 115. Hayashi S, Nakasa T, Ishikawa M, Nakamae A, Miyaki S, Adachi N (2018) Histological Evaluation of Early-Phase Changes in the Osteochondral Unit After Microfracture in a Full-Thickness Cartilage Defect Rat Model. Am J Sports Med 46:3032–3039
- 116. Hede K, Christensen BB, Olesen ML, Thomsen JS, Foldager CB, Lind MC (2020) CARGEL Bioscaffold improves cartilage repair tissue after bone marrow stimulation in a minipig model. J Exp Orthop 7:26
- 117. Henderson IJP, La Valette DP (2005) Subchondral bone overgrowth in the presence of fullthickness cartilage defects in the knee. Knee 12:435–440
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. Arthroscopy 18:730–734
- 119. Hoburg A, Niemeyer P, Laute V, Zinser W, Becher C, Kolombe T, Fay J, Pietsch S, Kuźma T, Widuchowski W, Fickert S (2021) Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroid Technology Is Superior to Arthroscopic Microfracture at 36 Months Regarding Activities of Daily Living and Sporting Activities after Treatment. Cartilage 13:437–448
- 120. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD (2005) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. J Bone Joint Surg Am 87:2671–2686
- 121. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, Hurtig M, Buschmann MD (2007) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. Osteoarthritis Cartilage 15:78–89
- 122. Hoemann CD, Chen G, Marchand C, Tran-Khanh N, Thibault M, Chevrier A, Sun J, Shive MS, Fernandes MJG, Poubelle PE, Centola M, El-Gabalawy H (2010) Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. Am J Sports Med 38:1845–1856
- 123. Hoemann CD, Gosselin Y, Chen H, Sun J, Hurtig MB, Carli A, Stanish WD (2013) Characterization of initial microfracture defects in human condyles. J Knee Surg 26:347–355
- 124. Holmdahl DE, Ingelmark BE (1951) The contact between the articular cartilage and the medullary cavities of the bones. Acta Anat (Basel) 12:341–349
- 125. Hristu R, Stanciu SG, Dumitru A, Paun B, Floroiu I, Costache M, Stanciu GA (2021) Influence of hematoxylin and eosin staining on the quantitative analysis of second harmonic generation imaging of fixed tissue sections. Biomed Opt Express 12:5829–5843

- 126. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29:577–580
- 127. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA (2016) Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. Biomaterials 98:1–22
- Hubbard MJ (1996) Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. J Bone Joint Surg Br 78:217–219
- Hulth A (1993) Does osteoarthrosis depend on growth of the mineralized layer of cartilage? Clin Orthop Relat Res 287:19–24
- Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 10:432–463
- Hunziker EB, Quinn TM (2003) Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. J Bone Joint Surg Am 85:85–92
- Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. J Bone Joint Surg Am 78:721–733
- Hunziker EB, Michel M, Studer D (1997) Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. Microsc Res Tech 37:271–284
- 134. Imhof H, Breitenseher M, Kainberger F, Rand T, Trattnig S (1999) Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. Top Magn Reson Imaging 10:180–192
- 135. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F (2000) Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. Invest Radiol 35:581–588
- 136. Imhoff FB, Fucentese SF, Harrer J, Tischer T (2021) The influence of axial deformities and their correction on the development and progression of osteoarthritis. Orthopäde 50:378–386
- 137. Insall J (1974) The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. Clin Orthop Relat Res 101:61–67
- Ishimaru JI, Kurita K, Handa Y, Goss AN (1992) Effect of marrow perforation on the sheep temporomandibular joint. Int J Oral Maxillofac Surg 21:239–242
- 139. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon WM (2001) Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. J Bone Joint Surg Am 83:53–64
- Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. Arthroscopy 2:54–69

- Johnson LL (1991) Characteristics of the immediate postarthroscopic blood clot formation in the knee joint. Arthroscopy 7:14–23
- Johnson LL (2001) Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. Clin Orthop Relat Res 391:306-17
- Johnson LL, Spector M (2015) The New Microfracture: All Things Considered. Arthroscopy 31:1028–1031
- Johnson VL, Hunter DJ (2014) The epidemiology of osteoarthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol 28:5–15
- 145. Jung M, Breusch S, Daecke W, Gotterbarm T (2009) The effect of defect localization on spontaneous repair of osteochondral defects in a Gottingen minipig model: a retrospective analysis of the medial patellar groove versus the medial femoral condyle. Lab Anim 43:191–197
- 146. Karpinski K, Häner M, Bierke S, Petersen W (2021) Matrix-induced chondrogenesis is a valid and safe cartilage repair option for small- to medium-sized cartilage defects of the knee: a systematic review. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 29:4213–4222
- Kellgren JH, Lawrence JS (1957) Radiological assessment of osteo-arthrosis. Ann Rheum Dis 16:494–502
- 148. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW (2008) Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. Eur Cell Mater 16:26–39
- 149. Kiernan JA (Hrsg) (1999) Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. 3.Aufl. Butterworth-Heinemann, Oxford
- 150. Kim SJ, Shetty AA, Kurian NM, Ahmed S, Shetty N, Stelzeneder D, Shin YW, Cho YJ, Lee SH (2020) Articular cartilage repair using autologous collagen-induced chondrogenesis (ACIC): a pragmatic and cost-effective enhancement of a traditional technique. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 28:2598–2603
- Kim Y-J, Sah RLY., Doong J-YH, Grodzinsky AJ (1988) Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. Anal Biochem 174:168–176
- 152. Klinger P, Surmann-Schmitt C, Brem M, Swoboda B, Distler JH, Carl HD, Mark K vd, Hennig FF, Gelse K (2011) Chondromodulin 1 stabilizes the chondrocyte phenotype and inhibits endochondral ossification of porcine cartilage repair tissue. Arthritis Rheum 63:2721–2731
- 153. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007) A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. J Bone Joint Surg Am 89:2105–2112

- 154. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Ludvigsen TC, Løken S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2016) A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. J Bone Joint Surg Am 98:1332–1339
- 155. Kohn D (Hrsg) (2016) Expertise Knie. 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 156. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M (2009) 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 37:33–41
- 157. Kon E, Ronga M, Filardo G, Farr J, Madry H, Milano G, Andriolo L, Shabshin N (2016) Bone marrow lesions and subchondral bone pathology of the knee. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 24:1797–1814
- 158. Kowalczuk M, Musahl V, Fu FH (2018) Cochrane in CORR®: Surgical Interventions (Microfracture, Drilling, Mosaicplasty, and Allograft Transplantation) for Treating Isolated Cartilage Defects of the Knee in Adults. Clin Orthop Relat Res 476:16–18
- 159. Kraeutler MJ, Aliberti GM, Scillia AJ, McCarty EC, Mulcahey MK (2020) Microfracture versus drilling of articular cartilage defects: a systematic review of the basic science evidence. Orthop J Sports Med 8:1-7
- 160. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, Südkamp N (2006) Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. Osteoarthritis Cartilage 14:1119–1125
- Kuettner KE (1992) Biochemistry of articular cartilage in health and disease. Clin Biochem 25:155–163
- Lajeunesse D, Reboul P (2003) Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. Curr Opin Rheumatol 15:628–633
- 163. Lane LB, Villacin A, Bullough PG (1977) 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 59:272–278
- 164. Lang G (Hrsg) (2012) Histotechnik: Praxislehrbuch f
  ür Biomedizinische Analytik. 2. Aufl. Springer, Wien New York
- 165. Lepage SIM, Robson N, Gilmore H, Davis O, Hooper A, St John S, Kamesan V, Gelis P, Carvajal D, Hurtig M, Koch TG (2019) Beyond Cartilage Repair: The Role of the Osteochondral Unit in Joint Health and Disease. Tissue Eng Part B Rev 25:114–125
- 166. Lerebours F, ElAttrache NS, Mandelbaum B (2016) Diseases of Subchondral Bone 1. Sports Med Arthrosc Rev 24:44–49

- 167. Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos N, Zhang C, Zheng MH (2013) Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. Arthritis Res Ther 15:1–12
- 168. Lind M, Larsen A, Clausen C, Osther K, Everland H (2008) Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 16:690–698
- 169. Little CB, Smith MM, Cake MA, Read RA, Murphy MJ, Barry FP (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. Osteoarthritis Cartilage 18:80-92
- Lotz JC, Gerhart TN, Hayes WC (1991) Mechanical properties of metaphyseal bone in the proximal femur. J Biomech 24:317–329
- 171. Lu Y, Xu Y, Yin Z, Yang X, Jiang Y, Gui J (2013) Chondrocyte migration affects tissue-engineered cartilage integration by activating the signal transduction pathways involving Src, PLCγ1, and ERK1/2. Tissue Eng Part A 19:2506–2516
- 172. Lubowitz JH (2015) Arthroscopic microfracture may not be superior to arthroscopic debridement, but abrasion arthroplasty results are good, although not great. Arthroscopy 31:506
- 173. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J (2005) The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. J Mol Histol 36:207–215
- 174. Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J (2006) The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. BMC Musculoskelet Disord 7:1–8
- 175. Madry H, Pape D (2008) Autologous chondrocyte transplantation. Orthopäde 37:756–763
- 176. Madry H, Kaul G, Cucchiarini M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2005) Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). Gene Ther 12:1171–1179
- Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 18:419–433
- 178. Madry H, Grün UW, Knutsen G (2011) Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. Dtsch Ärztebl Int 108:669–677
- Madry H, Orth P, Cucchiarini M (2011) Gene Therapy for Cartilage Repair. Cartilage 2:201– 225
- Madry H, Ochi M, Cucchiarini M, Pape D, Seil R (2015) Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. J Exp Orthop 2:1–12

- 181. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, Berruto M, Engebretsen L, Filardo G, Angele P (2016) Early osteoarthritis of the knee. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 24:1753–1762
- Madry H, Orth P, Cucchiarini M (2016) Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. J Am Acad Orthop Surg 24:45-46
- Madry H, Gao L, Eichler H, Orth P, Cucchiarini M (2017) Bone marrow aspirate concentrateenhanced marrow stimulation of chondral defects. Stem Cells Int 2017:1–13
- Magnuson PB (1946) Technic of debridement of the knee joint for arthritis. Surg Clin North Am 26:249–266
- Makovicka JL, Patel KA, Hassebrock JD, Hartigan DE, Wong M, Chhabra A (2019) Arthroscopic Evaluation of Knee Cartilage Using Optical Reflection Spectroscopy. Arthrosc Tech 8:399-405
- Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Joint Surg Am 64:460–466
- 187. Marchand, Chen G, Tran-Khanh N, Sun J, Chen H, Buschmann MD, Hoemann CD (2012) 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 18:508–519
- Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vécsei V (2006) Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. Eur J Radiol 57:24–31
- Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. Comp Med 51:292–299
- 190. Mastbergen SC, Pollmeier M, Fischer L, Vianen ME, Lafeber FPJG (2008) The groove model of osteoarthritis applied to the ovine fetlock joint. Osteoarthritis Cartilage 16:919–928
- 191. Mathieu C, Chevrier A, Lascau-Coman V, Rivard GE, Hoemann CD (2013) Stereological analysis of subchondral angiogenesis induced by chitosan and coagulation factors in microdrilled articular cartilage defects. Osteoarthritis Cartilage 21:849–859
- 192. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H (1993) Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. Arthroscopy 9:318–321
- 193. McCarthy HS, McCall IW, Williams JM, Mennan C, Dugard MN, Richardson JB, Roberts S (2018) Magnetic Resonance Imaging Parameters at 1 Year Correlate With Clinical Outcomes Up to 17 Years After Autologous Chondrocyte Implantation. Orthop J Sports Med 6

- 194. McCormick F, Yanke A, Provencher MT, Cole BJ (2008) Minced articular cartilage--basic science, surgical technique, and clinical application. Sports Med Arthrosc Rev 16:217–220
- 195. McCormick F, Harris JD, Abrams GD, Frank R, Gupta A, Hussey K, Wilson H, Bach B, Cole B (2014) Trends in the surgical treatment of articular cartilage lesions in the United States: an analysis of a large private-payer database over a period of 8 years. Arthroscopy 30:222–226
- 196. McEldowney AJ, Weiker GG (1995) Open-knee Magnuson debridement as conservative treatment for degenerative osteoarthritis of the knee. J Arthroplasty 10:805–809
- Meachim G (1972) Light microscopy of indian ink preparations of fibrillated cartilage. Ann Rheum Dis 31:457–464
- 198. Meachim G, Roberts C (1971) Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee. J Anat 109:317–327
- 199. Messner K (1993) Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. J Biomed Mater Res 27:1527–1532
- 200. Messner K, Maletius W (1996) The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. Acta Orthop Scand 67:165–168
- 201. Michaelis JC, Oláh T, Schrenker S, Cucchiarini M, Madry H (2022) A high-resolution crossspecies comparative analysis of the subchondral bone provides insight into critical topographical patterns of the osteochondral unit. Clin Transl Med 12:1-7
- 202. Migliorini F, Eschweiler J, Spiezia F, van de Wall BJM, Knobe M, Tingart M, Maffulli N (2021) Arthroscopy versus mini-arthrotomy approach for matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the knee: a systematic review. J Orthop Traumatol 22:1–8
- 203. Milz S, Putz R (1994) Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. J Anat 185:103–110
- 204. Min BH, Choi WH, Lee YS, Park SR, Choi BH, Kim YJ, Jin LH, Yoon JH (2013) Effect of different bone marrow stimulation techniques (BSTs) on MSCs mobilization. J Orthop Res 31:1814–1819
- 205. Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T (2009) Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. Am J Sports Med 37:902–908
- 206. Mistry H, Connock M, Pink J, Shyangdan D, Clar C, Royle P, Court R, Biant LC, Metcalfe A, Waugh N (2017) Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess 21:1–294

- 207. Mitchell N, Shepard N (1976) The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. J Bone Joint Surg Am 58:230–233
- 208. Mithoefer K, Williams RJ, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG (2005) The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. J Bone Joint Surg Am 87:1911–1920
- 209. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR (2009) Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. Am J Sports Med 37:2053–2063
- 210. Mithoefer K, Venugopal V, Manaqibwala M (2016) Incidence, Degree, and Clinical Effect of Subchondral Bone Overgrowth After Microfracture in the Knee. Am J Sports Med 44:2057– 2063
- 211. Módis L, Botos A, Kiviranta I, Lukácskó L, Helminen HJ (1996) Differences in submicroscopic structure of the extracellular matrix of canine femoral and tibial condylar articular cartilages as revealed by polarization microscopical analysis. Acta Biol Hung 47:341–353
- Moran CJ, Pascual-Garrido C, Chubinskaya S, Potter HG, Warren RF, Cole BJ, Rodeo SA (2014) Restoration of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 96:336–344
- 213. Morscheid YP, Venkatesan JK, Schmitt G, Orth P, Zurakowski D, Speicher-Mentges S, Menger MD, Laschke MW, Cucchiarini M, Madry H (2021) rAAV-Mediated Human FGF-2 Gene Therapy Enhances Osteochondral Repair in a Clinically Relevant Large Animal Model Over Time In Vivo. Am J Sports Med 49:958–969
- 214. Müller G, Hanschke M (1996) Quantitative and qualitative analyses of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue. Connect Tissue Res 33:243–248
- 215. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. National Academies Press, Washington, D.C.
- 216. Nehrer S, Chiari C, Domayer S, Barkay H, Yayon A (2008) Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study. Clin J Sport Med 466:1849–1855
- 217. Newman AP (1998) Articular cartilage repair. Am J Sports Med 26:309-324
- 218. Niemeyer P, Porichis S, Steinwachs M, Erggelet C, Kreuz PC, Schmal H, Uhl M, Ghanem N, Südkamp NP, Salzmann G (2014) Long-term outcomes after first-generation autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee. Am J Sports Med 42:150–157
- 219. Niemeyer P, Albrecht D, Andereya S et al (2016) Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). Knee 23:426–435

- 220. Niemeyer P, Feucht MJ, Fritz J, Albrecht D, Spahn G, Angele P (2016) Cartilage repair surgery for full-thickness defects of the knee in Germany: indications and epidemiological data from the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU). Arch Orthop Trauma Surg 136:891–897
- 221. Niemeyer P, Becher C, Brucker PU, Buhs M, Fickert S, Gelse K, Günther D, Kaelin R, Kreuz P, Lützner J, Nehrer S, Madry H, Marlovits S, Mehl J, Ott H, Pietschmann M, Spahn G, Tischer T, Volz M, Walther M, Welsch G, Zellner J, Zinser W, Angele P (2018) Stellenwert der matrixaugmentierten Knochenmarkstimulation in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks: Konsensusempfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. Z Orthop Unfall 156:513–532
- 222. Niemeyer P, Albrecht D, Aurich M et al (2022) Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden am Kniegelenk. Z Orthop Unfall 161:57–64
- 223. Noyes FR, Stabler CL (1989) A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. Am J Sports Med 17:505–513
- 224. O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Gallay SH, Fitzsimmons JS (2001) Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. Tissue Eng 7:313–320
- 225. Oegema TR, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC (1997) The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. Microsc Res Tech 37:324–332
- 226. Oláh T, Madry H (2018) The Osteochondral Unit: The Importance of the Underlying Subchondral Bone. In: Farr J, Gomoll AH (Hrsg) Cartilage Restoration: Practical Clinical Applications.
  2. Aufl. Springer, Cham, S 13–22
- 227. Oláh T, Cai X, Michaelis JC, Madry H (2021) Comparative anatomy and morphology of the knee in translational models for articular cartilage disorders. Part I: Large animals. Ann Anat 235:1–18
- 228. Oldershaw RA (2012) Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. Int J Exp Pathol 93:389–400
- 229. Oliver-Welsh L, Griffin JW, Meyer MA, Gitelis ME, Cole BJ (2016) Deciding How Best to Treat Cartilage Defects. Orthopedics 39:343–350
- 230. Onken T, Gao L, Orth P, Cucchiarini M, Bohle R, Rupf S, Hannig M, Madry H (2020) Investigation of microstructural alterations of the human subchondral bone following microfracture penetration reveals effect of three-dimensional device morphology. Clin Transl Med 10:1-5
- 231. Orth P, Madry H (2013) A low morbidity surgical approach to the sheep. BMC Musculoskelet Disord 14:1471–2474

- 232. Orth P, Madry H (2015) Advancement of the Subchondral Bone Plate in Translational Models of Osteochondral Repair: Implications for Tissue Engineering Approaches. Tissue Eng Part B Rev 21:504–520
- 233. Orth P, Madry H (2015) Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. Histol Histopathol 30:911–919
- 234. Orth P, Madry H (2016) Knorpeldefekte. Natürlicher Verlauf und autologes Reparaturpotenzial. Arthroskopie 29:68–74
- 235. Orth P, Goebel L, Wolfram U, Ong MF, Gräber S, Kohn D, Cucchiarini M, Ignatius A, Pape D, Madry H (2012) Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. Am J Sports Med 40:828–836
- 236. Orth P, Zurakowski D, Wincheringer D, Madry H (2012) Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model. Tissue Eng Part C Methods 18:329–339
- 237. Orth P, Cucchiarini M, Kaul G, Ong MF, Gräber S, Kohn DM, Madry H (2012) Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. Osteoarthritis Cartilage 20:1161–1169
- 238. Orth P, Cucchiarini M, Kohn D, Madry H (2013) Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair. Translational data and clinical evidence. Eur Cell Mater 25:299–316
- 239. Orth P, Meyer HL, Goebel L, Eldracher M, Ong MF, Cucchiarini M, Madry H (2013) Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. J Orthop Res 31:1772–1779
- 240. Orth P, Cucchiarini M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn DM, Madry H (2013) Parathyroid hormone 1-34 improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. Osteoarthritis Cartilage 21:614–624
- 241. Orth P, Zurakowski D, Alini M, Cucchiarini M, Madry H (2013) Reduction of sample size requirements by bilateral versus unilateral research designs in animal models for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods 19:885–891
- 242. Orth P, Cucchiarini M, Wagenpfeil S, Menger MD, Madry H (2014) PTH 1-34-induced alterations of the subchondral bone provoke early osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 22:813–821
- 243. Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiarini M, Madry H (2016) Small-diameter awls improve articular cartilage repair after microfracture treatment in a translational animal model. Am J Sports Med 44:209–219
- 244. Orth P, Gao L, Madry H (2020) Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 28:670–706

- 245. Orth P, Eldracher M, Cucchiarini M, Madry H (2020) Small-Diameter Subchondral Drilling Improves DNA and Proteoglycan Content of the Cartilaginous Repair Tissue in a Large Animal Model of a Full-Thickness Chondral Defect. J Clin Med 9:1–15
- 246. Osterhoff G, Löffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P (2011) Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. Knee 18:98–103
- 247. Otte P (1958) Die Regenerationsunfähigkeit des Gelenkknorpels. Z Orthop Ihre Grenzgeb 90:299–303
- 248. Oussedik S, Tsitskaris K, Parker D (2015) Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review. Arthroscopy 31:732–744
- 249. Outerbridge RE (1961) The etiology of chondromalacia patellae. J Bone Joint Surg Br 43:752– 757
- 250. Ozmeriç A, Alemdaroğlu KB, Aydoğan NH (2014) Treatment for cartilage injuries of the knee with a new treatment algorithm. World J Orthop 5:677–684
- 251. Pan J, Zhou X, Li W, Novotny JE, Doty SB, Wang L (2009) In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. J Orthop Res 27:1347–1352
- 252. Pape D, Madry H (2013) The preclinical sheep model of high tibial osteotomy relating basic science to the clinics: standards, techniques and pitfalls. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 21:228–236
- 253. Pape D, Filardo G, Kon E, van Dijk CN, Madry H (2010) Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 18:448–462
- 254. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. Acta Anat (Basel) 143:335–340
- 255. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. Clin Orthop Relat Res 391:26-33
- 256. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1984) Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. J Anat 138:113–138
- 257. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1987) Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. J Orthop Res 5:509–522
- 258. Pot MW, Gonzales VK, Buma P, IntHout J, van Kuppevelt TH, de Vries RBM, Daamen WF (2016) Improved cartilage regeneration by implantation of acellular biomaterials after bone marrow stimulation: a systematic review and meta-analysis of animal studies. PeerJ 4:1-26

- 259. Pot MW, van Kuppevelt TH, Gonzales VK, Buma P, IntHout J, de Vries RBM, Daamen WF (2017) Augmented cartilage regeneration by implantation of cellular versus acellular implants after bone marrow stimulation: a systematic review and meta-analysis of animal studies. PeerJ 5:1-21
- 260. Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints: proceedings of the British Orthopaedic Association. J Bone Joint Surg Br 41:618–619
- Pugh JW, Rose RM, Radin EL (1973) Elastic and viscoelastic properties of trabecular bone: dependence on structure. J Biomech 6:475–485
- Pugh JW, Radin EL, Rose RM (1974) Quantitative studies of human subchondral cancellous bone. Its relationship to the state of its overlying cartilage. J Bone Joint Surg Am 56:313–321
- 263. Qiu YS, Shahgaldi BF, Revell WJ, Heatley FW (2003) Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. Osteoarthritis Cartilage 11:810–820
- Radin EL (1995) Osteoarthrosis--the orthopedic surgeon's perspective. Acta Orthop Scand Suppl 266:6–9
- 265. Radin EL, Paul IL (1970) Does cartilage compliance reduce skeletal impact loads? The relative force-attenuating properties of articular cartilage, synovial fluid, periarticular soft tissues and bone. Arthritis Rheum 13:139–144
- 266. Radin EL, Rose RM (1986) Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. Clin Orthop Relat Res 213:34–40
- Radin EL, Paul IL, Tolkoff MJ (1970) Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. Arthritis Rheum 13:400–405
- 268. Radin EL, Burr DB, Caterson B, Fyhrie D, Brown TD, Boyd RD (1991) Mechanical determinants of osteoarthrosis. Semin Arthritis Rheum 21:12–21
- 269. Ray CS, Baxter GM, McIlwraith CW, Trotter GW, Powers BE, Park RD, Steyn PF (1996) Development of subchondral cystic lesions after articular cartilage and subchondral bone damage in young horses. Equine Vet J 28:225–232
- 270. Rosenberg L (1971) Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 53:69–82
- 271. Saltzman BM, Riboh JC (2018) Subchondral Bone and the Osteochondral Unit: Basic Science and Clinical Implications in Sports Medicine. Sports Health 10:412–418

- 272. Sanders TL, Pareek A, Obey MR, Johnson NR, Carey JL, Stuart MJ, Krych AJ (2017) High rate of osteoarthritis after osteochondritis dissecans fragment excision compared with surgical restoration at a mean 16-year follow-up. Am J Sports Med 45:1799–1805
- 273. Sansone V, Girolamo L de, Pascale W, Melato M, Pascale V (2015) Long-term results of abrasion arthroplasty for full-thickness cartilage lesions of the medial femoral condyle. Arthroscopy 31:396–403
- 274. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, Vandekerckhove B, Almqvist KF, Claes T, Handelberg F, Lagae K, van der Bauwhede J, Vandenneucker H, Yang KGA, Jelic M, Verdonk R, Veulemans N, Bellemans J, Luyten FP (2008) Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. Am J Sports Med 36:235–246
- 275. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Almqvist KF, Verdonk R, Bellemans J, Luyten FP (2009) Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. Am J Sports Med 37:10-19
- 276. Schinhan M, Gruber M, Vavken P, Dorotka R, Samouh L, Chiari C, Gruebl-Barabas R, Nehrer S (2012) Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. J Orthop Res 30:214–220
- 277. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T (2010) Basic methods in histopathology of joint tissues. Osteoarthritis Cartilage 18:113-6
- 278. Schöttle PB, Agneskirchner JD, Imhoff AB (2001) Transplantation osteochondraler Zylinder an verschiedenen Gelenken - Technik und Ergebnisse. In: Erggelet C, Steinwachs M (Hrsg) Gelenkknorpeldefekte. Steinkopff, Heidelberg, S 93–108
- 279. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH (Hrsg) (2018) Prometheus LernAtlas - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 5. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
- 280. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) 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 79:1452–1463
- 281. Shah SS, Lee S, Mithoefer K (2021) Next-Generation Marrow Stimulation Technology for Cartilage Repair: Basic Science to Clinical Application. JBJS Rev 9:1-12

- 282. Shahgaldi BF, Amis AA, Heatley FW, McDowell J, Bentley G (1991) Repair of cartilage lesions using biological implants. A comparative histological and biomechanical study in goats. J Bone Joint Surg Br 73:57–64
- 283. Shamis LD, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S (1989) Effect of subchondral drilling on repair of partial-thickness cartilage defects of third carpal bones in horses. Am J Vet Res 50:290– 295
- 284. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of fullthickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 75:532–553
- 285. Shirazi R, Shirazi-Adl A, Hurtig M (2008) Role of cartilage collagen fibrils networks in knee joint biomechanics under compression. J Biomech 41:3340–3348
- 286. Shive MS, Restrepo A, Totterman S, Tamez-Peña J, Schreyer E, Steinwachs M, Stanish WD (2014) Quantitative 3D MRI reveals limited intra-lesional bony overgrowth at 1 year after microfracture-based cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage 22:800–804
- 287. Singh I (1978) The architecture of cancellous bone. J Anat 127:305-310
- Siu WS, Qin L, Cheung WH, Leung KS (2004) A study of trabecular bones in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography.
   Bone 35:21–26
- 289. Smilie IS (1957) Treatment of osteochondritis dissecans. J Bone Joint Surg Br 39:248-260
- 290. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76–85
- 291. Sniekers YH, Intema F, Lafeber FPJG, van Osch GJVM, van Leeuwen JPTM, Weinans H, Mastbergen SC (2008) A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models. BMC Musculoskelet Disord 9:1–11
- 292. Solheim E, Hegna J, Strand T, Harlem T, Inderhaug E (2018) Randomized Study of Long-term (15-17 Years) Outcome After Microfracture Versus Mosaicplasty in Knee Articular Cartilage Defects. Am J Sports Med 46:826–831
- 293. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports Health 1:461–468
- 294. Spahn G, Hofmann GO, Conrad T, von Engelhardt LV, Jerosch J (2018) Joint-preserving operative therapies in osteoarthritis. OUP 7:388–395
- 295. Stachel N, Madry H, Orth P (2022) Aktuelle Empfehlungen zur knochenmarkstimulierenden Technik auf Basis präklinischer Erkenntnisse. Arthroskopie 35:319–327

- 296. Stachel N, Orth P, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiarini M, Madry H (2022) Subchondral Drilling Independent of Drill Hole Number Improves Articular Cartilage Repair and Reduces Subchondral Bone Alterations Compared With Debridement in Adult Sheep. Am J Sports Med 50:2669–2679
- 297. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK (1997) Microfracture technique for fullthickness chondral defects: Technique and clinical results. Oper Tech Orthop 7:300–304
- 298. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. Clin Orthop Relat Res 391:362–369
- 299. Steadman JR, Miller BS, Karas SG, Schlegel TF, Briggs KK, Hawkins RJ (2003) The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. J Knee Surg 16:83–86
- 300. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK (2010) Microfracture: Its History and Experience of the Developing Surgeon. Cartilage 1:78–86
- 301. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U (2007) Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. Arthritis Res Ther 9:213
- 302. Steinwachs MR, Guggi Th, Kreuz PC (2008) Marrow stimulation techniques. Injury 39:26-31
- 303. Totlis T, Marín Fermín T, Kalifis G, Terzidis I, Maffulli N, Papakostas E (2021) Arthroscopic debridement for focal articular cartilage lesions of the knee: A systematic review. Surgeon 19:356–364
- 304. Trengove A, Di Bella C, O'Connor AJ (2022) The Challenge of Cartilage Integration: Understanding a Major Barrier to Chondral Repair. Tiss Eng Part B Rev 28:114–128
- Trueta J (1963) Studies on the etiopathology of osteoarthritis of the hip. Clin Orthop Relat Res 31:7–19
- 306. Utsunomiya H, Gao X, Cheng H, Deng Z, Nakama G, Mascarenhas R, Goldman JL, Ravuri SK, Arner JW, Ruzbarsky JJ, Lowe WR, Philippon MJ, Huard J (2021) Intra-articular Injection of Bevacizumab Enhances Bone Marrow Stimulation–Mediated Cartilage Repair in a Rabbit Osteochondral Defect Model. Am J Sports Med 49:1871-1882
- 307. Vachon A, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S (1986) Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. Am J Vet Res 47:2637–2645
- 308. Vanlauwe J, Saris DBF., Victor J, Almqvist KF, Bellemans J, Luyten FP (2011) Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters. Am J Sports Med 39:2566–2574

- 309. Vasara AI, Hyttinen MM, Lammi MJ, Lammi PE, Långsjö TK, Lindahl A, Peterson L, Kellomäki M, Konttinen YT, Helminen HJ, Kiviranta I (2004) Subchondral bone reaction associated with chondral defect and attempted cartilage repair in goats. Calcif Tissue Int 74:107–114
- 310. Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L (2010) Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: Long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging technique. Am J Sports Med 38:943–949
- 311. Venkatesan JK, Schmitt G, Speicher-Mentges S, Orth P, Madry H, Cucchiarini M (2022) Effects of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Overexpression of Bone Morphogenetic Protein 3 on the Chondrogenic Fate of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Hum Gene Ther 33:950–958
- 312. Wagner H (1964) Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. ZOrthop Ihre Grenzgeb 98:333–355
- 313. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 76:579–592
- Weißenberger M, Heinz T, Boelch SP, Niemeyer P, Rudert M, Barthel T, Reppenhagen S (2020) Is debridement beneficial for focal cartilage defects of the knee: data from the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU). Arch Orthop Trauma Surg 140:373–382
- 315. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T (2007) Articular cartilage defects: Study of 25,124 knee arthroscopies. Knee 14:177–182
- Williams Iii RJ, Brophy RH (2008) Cartilage repair procedures: clinical approach and decision making. Instr Course Lect 57:553–561
- 317. Wu Q, Kim KO, Sampson ER, Di C, Awad H, O'Brien T, Puzas JE, Drissi H, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Zuscik MJ, Rosier RN (2008) Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice. Arthritis Rheum 58:3132– 3144
- 318. Yanke AB, Lee AS, Karas V, Abrams G, Riccio ML, Verma NN, Bach BR, Cole BJ (2019) Surgeon Ability to Appropriately Address the Calcified Cartilage Layer: An In Vitro Study of Arthroscopic and Open Techniques. Am J Sports Med 47:2584–2588
- 319. Zamborsky R, Danisovic L (2020) Surgical Techniques for Knee Cartilage Repair: An Updated Large-Scale Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. Arthroscopy 36:845–858

- 320. Zedde P, Cudoni S, Giachetti G, Manunta ML, Masala G, Brunetti A, Manunta AF (2016) Subchondral bone remodeling: comparing nanofracture with microfracture. An ovine in vivo study. Joints 4:87–93
- 321. Zedde P, Cudoni S, Manunta L, Passino ES, Masala G, Brunetti A, Uboldi FM, Manunta AF (2017) Second Generation Needling Techniques for the Treatment of Chondral Defects in Animal Model. Joints 5:27–33
- 322. Zlotnick HM, Locke RC, Stoeckl BD, Patel JM, Gupta S, Browne KD, Koh J, Carey JL, Mauck RL (2021) Marked differences in local bone remodelling in response to different marrow stimulation techniques in a large animal. Eur Cell Mater 41:546–557

## **10** Publikationen

#### **10.1 Publikationen**

#### 10.1.1 Orginalarbeiten

**Stachel N**, Orth P, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiarini M, Madry H (2022) Subchondral Drilling Independent of Drill Hole Number Improves Articular Cartilage Repair and Reduces Subchondral Bone Alterations Compared With Debridement in Adult Sheep. <u>*Am J Sports Med*</u> 50(10):2669–2679. (*Impact Factor* 2022: 6,1)

#### 10.1.2 Übersichtsarbeiten

**Stachel N**, Madry H, Orth P (2022) Aktuelle Empfehlungen zur knochenmarkstimulierenden Technik auf Basis präklinischer Erkenntnisse. *Arthroskopie* 35(5):319–327. (*Impact Factor* 2022: 0,2)

### 10.2 Vorträge

**Stachel N**, Orth P, Kohn D, Menger MD, Cucchiarini M, Madry H. Die subchondrale Anbohrung chondraler Defekte verbessert die Knorpelreparatur gegenüber einem alleinigen Debridement im translationalen Großtiermodell. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2017 (Berlin)* 

**Stachel N**, Orth P, Kohn D, Menger MD, Cucchiarini M, Madry H. Die subchondrale Anbohrung chondraler Defekte verbessert die Knorpelreparatur gegenüber einem alleinigen Debridement im Schafmodell. *Jahrestagung der Saarländischen Chirurgenvereinigung e.V. 2018 (Kirkel); Nominierung für den Nachwuchspreis*  Orth P, Stachel N, Zurakowski D, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Subchondral drilling improves articular cartilage repair independent of drill hole number in vivo. *European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery & Arthroscopy Congress 2018 (Glasgow, GB)* 

## 10.3 Posterpräsentationen

**Stachel N**, Orth P, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiarini M, Madry H. Subchondral drilling independent of drill hole number improves articular cartilage repair and reduces subchondral bone alterations compared to debridement. *Osteoarthritis Research Society International World Congress 2022 (Berlin)* 

## 11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung der Universität des Saarlandes erstellt.

An erster Stelle möchte ich *Herrn Prof. Dr. med. Henning Madry* für seine unermüdliche Unterstützung und unverzichtbaren Ratschläge im Zuge der gesamten Arbeit danken. Die Arbeit am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung war für mich sehr lehrreich und für meinen weiteren Weg prägend.

Auch gilt *Herrn Prof. Dr. med. Patrick Orth* mein herzlicher Dank, der mir stets ein kompetenter und zuverlässiger Ansprechpartner war. Seine Empfehlungen waren mir immer eine große Hilfe.

*Frau Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiarini* bin ich ebenfalls für Ihre gute Betreuung im Rahmen der Laborarbeiten sehr dankbar.

Ich möchte mich bei allen *Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung*, insbesondere bei *Frau Gertrud Schmitt, Herrn Dr. rer. nat. Jagadeesh Venkatesan* und *Herrn Dr. rer. nat. Tamás Oláh*, für Ihre Hilfestellungen im Labor sowie die herzliche Teamatmosphäre bedanken.

Mein großer Dank gilt auch *Herrn David Zurakowski* für seine Unterstützung im Rahmen der statistischen Analysen sowie *Herrn Prof. Dr. med. Michael Menger*, *Herrn Prof. Dr. med. Matthias Laschke* und den *Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie Homburg* für Ihre Hilfe u.a. bei der Tierhaltung und den operativen Eingriffen.

*Meiner Familie* und *meiner Freundin Julia* bin ich für Ihre stetige und liebevolle Unterstützung sowie Ihr Verständnis, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, von Herzen dankbar.

# 12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.