

Department Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ECVS/ACVS

Aus der Abteilung Musculoskeletal Research Unit
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Der Einfluss eines definierten Defektes im subchondralen Knochen auf den
darüberliegenden Knorpel**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von

Roland Schubotz

Tierarzt

aus Elstertrebnitz (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. med. vet. Felix Ehrensperger, Korreferent

Zürich 2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Summary.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1. Problemstellung	6
1.2. Zielsetzung der Arbeit	6
1.3. Versuchsanordnung.....	7
2. Literatur.....	8
2.1. Das Schaf als Versuchstier zur Untersuchung von Knorpeldefekten und Knochenersatzmaterialien	8
2.2. Knorpel.....	8
2.3. Subchondraler Knochen	10
2.4. Osteoarthritis.....	11
2.5. Subchondraler Knochen und Knorpel als funktionelle Einheit und Wechselwirkungen im Bezug auf die Entstehung von Osteoarthritis.....	14
2.6. Knochenersatzmaterialien	16
2.6.1. Allgemeines	16
2.6.2. Autologer Knochen, Autograft	16
2.6.3. Die Hydroxylapatitkeramik Endobon®.....	17
2.7. Evaluierung Knorpel.....	18
2.7.1. Makroskopische Evaluierung.....	18
2.7.2. Mikroskopische Evaluierung	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Aufbau der Studie	19
3.2. Eingesetzte Materialien zur Defektfüllung.....	20
3.2.1. Autologer Knochen	20
3.2.2. Endobon ®	20
3.3. Versuchstiere	20
3.4. Versuchsvorbereitung.....	21
3.5. Operation	23
3.6. Probenaufbereitung und –auswertung.....	25
3.6.1. Gewinnung und Aufbereitung der Proben	25
3.6.2. Histologie.....	26
3.6.3. Biochemische und molekularbiologische Untersuchung	27
3.7. Evaluationsmethoden	28
3.7.1. Makroskopische Auswertung.....	28
3.7.2. Histomorphometrische Auswertung.....	28
3.7.3. Histologische Auswertung.....	29
3.7.4. Statistik	29

4. Resultate.....	30
4.1. Operationen	30
4.2. Postoperative Phase.....	30
4.3. Schlachtung und makroskopische Auswertung	31
4.4. Makroskopische Beurteilung des Knorpels.....	31
4.4.1. Deskriptive Bewertung des Knorpels.....	31
4.4.2. Auswertung nach Outerbridge	32
4.5. Histologische Auswertung.....	33
4.5.1. Histologische Auswertung nach Mankin.....	33
4.6. Auswertung nach biochemischen Parametern und Regulierung der mRNA	36
4.6.1. Messung Proteoglykan	36
4.6.2. Messung Kollagen.....	36
4.6.3. PCR- Messungen.....	37
4.7. Distanzen	37
4.8. Korrelationen	38
5. Diskussion	39
5.1. Versuchsmodell.....	39
5.2. Operationen und Verlauf	39
5.3. Probenaufbereitung- und auswertung.....	40
5.4. Ergebnisse.....	41
5.4.1. Deskriptive Auswertung	41
5.4.2. Auswertung nach Outerbridge	41
5.4.3. Auswertung nach Mankin und Bewertung der histologischen Befunde	42
5.4.4. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen	45
5.4.5. Nachweis von Kollagen II und Proteoglykan	45
5.5. Korrelationen	46
5.6. Statistik	47
5.7. Schlussbeurteilung	47
5.8. Zukunftsperspektive	48
6. Referenzen	49
7. Abbildungen.....	54
8. Anhang 1:.....	59
Tabellen.....	59
9. Tabellenverzeichnis	68
10. Abbildungsverzeichnis.....	68
11. Danksagung.....	69
12. Lebenslauf.....	70

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines definierten Defekts im subchondralen Knochen auf das Verhalten des darüberliegenden Gelenkknorpels untersucht. Dabei wurde dem zeitlichen Heilungsverlauf und der Abhängigkeit vom zur Defektfüllung verwendeten Knochenersatzmaterial besondere Beachtung geschenkt, ausserdem dem Abstand zwischen Defekt und Knorpel. An 18 Schafen wurde mittels eines standardisierten Verfahrens ein definierter, rechteckiger Defekt im subchondralen Knochen des Tibiaplateaus erzeugt und dieser bei 6 Versuchstieren mit der Hydroxyapatitkeramik Endobon® sowie bei 12 Schafen mit autologer Knochenspongiosa gefüllt. Eine Versuchsgruppe bestand jeweils aus 6 Tieren. Dabei wurde bei einer Gruppe Endobon® verwendet und bei 2 Gruppen autologe Spongiosa. Die Gruppe, bei der Endobon® verwendet wurde, sowie eine der Gruppen mit autologer Spongiosa als Implantat wurden nach 2 Monaten geschlachtet, die andere Gruppe mit autologem Knochen nach 2 Wochen. Es wurden Knochen- und Knorpelproben entnommen und diese makroskopisch, radiologisch, histologisch und biochemisch untersucht und beurteilt.

Die Operationen wurden wie geplant durchgeführt, die postoperative Phase gestaltete sich komplikationslos.

Die makroskopische Auswertung ergab keine wesentlichen Unterschiede der einzelnen Gruppen. Bei der histologischen Auswertung und der Evaluierung mit dem Mankin-System wurden Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar, welche allerdings nur im Teilbereich des Verhaltens der Zellen im kalzifizierten Knorpel statistisch signifikante Ergebnisse lieferten.

Der Grad der histologisch sichtbaren Knorpelschädigung und der Abstand von Defekt und Knorpel stehen im Zusammenhang, je geringer der Abstand, desto grösser der Grad der Knorpelschädigung.

Damit ist ein Zusammenhang zwischen Defektabstand und Knorpelschädigung nachweisbar, ein Zusammenhang zwischen Füllmaterial des Defekts und Grad der Knorpelschädigung ist anhand der vorliegenden Daten zu vermuten. Auch das Vorliegen von Reparations- und Regenerationsprozessen am Knorpel im zeitlichen Verlauf war festzustellen.

Generell lässt sich sagen, dass der Gelenkknorpel bei Schädigung des subchondralen Knochens degeneriert, auch dann, wenn er nicht direkt geschädigt wird.

Summary

The aim of this study was to evaluate the influence of a defect created in the subchondral bone on the overlying cartilage. We evaluated the healing time in comparing the influence of the material used for bone replacement and the effect of distance between the created defect and the cartilage. Eighteen sheep underwent a standardized surgery where a rectangular defect was created in the subchondral bone of the tibial plateau. This defect was filled with the hydroxyapatite Endobon® in 6 sheep and with autologous bone in the remaining 12 sheep. The 12 sheep with autologous bone were sacrificed either after 2 or 8 weeks and all the Endobon® sheep were sacrificed at 8 weeks. Every sheep underwent necropsy and samples were taken for the evaluation of subchondral bone and cartilage. The samples underwent macroscopic, radiographic, histologic and biochemical evaluation.

There was no complication during or after surgery in any of the sheep. Cartilage degeneration was prominent in all sheep with no difference on macroscopic evaluation between groups. Except for the type of cells in the calcified bone, also no histological differences were found based on the Mankin-score. There was a correlation between the amount of damage to the cartilage and the distance from the defect. The closer the defect, the more damage was found on the cartilage. A trend was also found between the material used to fill the defect and the level of damage. Endobon® had a tendency to cause more damage than the autologous bone. In conclusion, we determined that the destruction of the subchondral bone always leads to damage on the overlying cartilage.

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Gelenkknorpelschäden und Osteoarthritis als Folge von Gelenktraumen stellen eine der grössten Herausforderungen in der modernen Chirurgie dar. Während mittlerweile verschiedene Methoden des Knochen- und Knorpelersatzes zum Teil erfolgreich erprobt wurden^{1,2}, bleibt die Entstehung solcher Läsionen und besonders der Einfluss des subchondralen Knochens Gegenstand der Diskussion.

Bei der Erklärung der Entstehung der Osteoarthritis wird neben den zwei bekannten Hypothesen, welche vom primär zerstörten Knorpel und von auf den Knorpel wirkenden verstärkten Kräften ausgehen, eine dritte These, welche die verminderte mechanische Stabilität des subchondralen Knochens und dessen Mikrofrakturen einbezieht, oft unterschätzt³. Auch die Frage, ob andere Mechanismen ausserhalb der eigentlichen Knorpelmatrix eine Rolle spielen, so zum Beispiel die Rolle des subchondralen Knochens in der Ernährung und Regeneration des Knorpels, ist noch unzureichend beantwortet. Erst in letzter Zeit, vor allem auch durch den Fortschritt in der medizinischen bildgebenden Diagnostik, rückt der Zusammenhang von Schäden im subchondralen Knochen und meist darüber liegenden Knorpeldefekten in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Aufgrund der hohen gesellschaftlichen Bedeutung von Osteoarthritis und damit in Zusammenhang stehenden Erkrankungen ist eine Untersuchung dieses Aspektes sinnvoll, um eventuell neue therapeutische Ansätze und Methoden zu entwickeln. Neben der Bedeutung von Osteoarthritis beim Menschen wurde in einer Studie auch belegt, dass 33% aller Pferdepatienten intraartikuläre Veränderungen im Zusammenhang mit Osteoarthritis aufwiesen⁴. Auch hier wurden Veränderungen im subchondralen Knochen gefunden und mit der Entstehung von Osteoarthritis in Verbindung gebracht.

1.2. Zielsetzung der Arbeit

Mit der vorliegenden experimentellen Arbeit sollte der Einfluss eines definierten Defekts im subchondralen Knochen ohne direkte mechanische Schädigung des darüber liegenden Gelenkknorpels auf die Entstehung von Osteoarthritis untersucht werden. Als Modell wurde ein rechteckiger Defekt im Tibiaplateau verwendet, welcher mit entweder autologer

Knochenspongiosa oder einem synthetischen Knochenersatzstoff (Hydroxyapatit) gefüllt wurde. Mittels makroskopischer, histologischer und biochemischer Untersuchungen sollten das makroskopische Aussehen, die zellulären Reaktionen sowie biochemische und histologische Veränderungen des Knorpels nach verschiedenen Zeitintervallen untersucht werden. Dabei interessierte auch im Besonderen der Abstand zwischen Knorpel und Defekt. Die Studie basierte auf der Hypothese, dass in Folge eines subchondralen Defekts der darüber liegende Knorpel degeneriert, auch wenn primär kein Knorpelschaden verursacht wurde. Weiterhin wurde angenommen, dass je nach verwendetem Ersatzmaterial im Knochendefekt der Knorpelschaden unterschiedlich ausgeprägt sein würde. Der Gebrauch von autologer Knochenspongiosa sollte einem synthetischen Hydroxyapatit überlegen sein, indem eine schnellere Blutversorgung und Zellproliferation die Degeneration des darüber liegenden Knorpels verhindern sollte.

Das Schaf wurde als Versuchstier verwendet, um auf den Menschen möglichst gut übertragbare Ergebnisse zu gewinnen.

1.3. Versuchsanordnung

In dieser Studie wurden insgesamt 18 Schafe operiert. Zur Defektfüllung wurden bei jeweils 6 Schafen autologer Knochen und die Hydroxylapatitkeramik Endobon® eingesetzt. Diese Tiere wurden nach 2 Monaten geschlachtet. Eine andere Gruppe von 6 Schafen bekam zur Defektfüllung nur autologen Knochen implantiert und wurde bereits nach 2 Wochen geschlachtet. Die gewonnenen Proben wurden makroskopisch und radiologisch beurteilt, danach histologisch, histomorphometrisch und biochemisch untersucht.

2. Literatur

2.1. Das Schaf als Versuchstier zur Untersuchung von Knorpeldefekten und Knochenersatzmaterialien

Das Schaf eignet sich sehr gut als Versuchstier im Hinblick auf Knochen- und Knorpelheilung und die Übertragbarkeit der Resultate auf den Menschen, da Schafe eine ähnliche Knochenstruktur mit einer vergleichbaren Belastbarkeit wie der Mensch aufweisen^{5,6}. Die anatomischen Abweichungen sind gering⁷. Auch die Vergleichbarkeit mit bisherigen Ergebnissen und Forschungsarbeiten ist durch vorhergehende Forschungsprojekte^{2,8} gegeben. Die Primärheilung von Knochen ist für diese Spezies ausführlich beschrieben⁹. Die Verwendung von Schafen ist auch im Hinblick auf ethische und ethologische Aspekte vertretbar, da sie während des Versuchs unter annähernd natürlichen Bedingungen gehalten werden können. Auch der verhältnismässig unkomplizierte Umgang mit Schafen und die Tatsache, dass sie nach kleineren Eingriffen fast immer die operierte Gliedmasse belasten⁶, unterstreicht ihre Bedeutung für solche Forschungsprojekte.

2.2. Knorpel

Der Gelenkknorpel im diarthrotischen (oder „echten“) Gelenk bedeckt den subchondralen Knochen und ist mit diesem eng verbunden. Beim Gelenkknorpel handelt es sich um hyalinen Knorpel. Dieser weist an verschiedenen Stellen des Körpers eine unterschiedliche Dicke auf, wobei allgemein beim Menschen von etwa 1-5 mm ausgegangen werden kann¹⁰. Er zeigt beim jungen Tier eine bläulich-weiße Farbe und wird mit zunehmendem Alter gelblich. Die Hauptfunktionen des Gelenkknorpels bestehen in der Bildung der Gelenkflächen, dem Tragen und Verteilen von Kräften (Druck-, Torsions- und Scherkräften) sowie ihrer Weiterleitung auf den subchondralen Knochen¹¹ und der Verringerung der Oberflächenreibung im Gelenk in Verbindung mit der Synovialflüssigkeit^{12,13}. Das Gewebe des gesunden hyalinen Knorpels ist zellarm, besitzt weder Nerven noch Blutgefäße und auch Lymphgefäße fehlen^{3,14}. Als einziger bisher erwiesener Ernährungsmechanismus wird die Diffusion angesehen³. Dabei wandern die Nährstoffe über subsynoviale Gefäße in die Synovialflüssigkeit ein und durchdringen die dichte Gewebesubstanz des Knorpels. Abbauprodukte werden auf dem

entgegengesetzten Weg ausgeschleust. Der Knorpel bildet keine homologe Substanz, sondern lässt sich in verschiedene Schichten einteilen (Abb.1). Auf den nicht zum Knorpel zählenden subchondralen Knochen folgt die kalzifizierte Zone, welche von einigen Autoren zum Knorpel gerechnet wird, begrenzt durch die Grenzschicht oder Tidemark. Daran anschliessend befindet sich die tiefe Zone oder Radiärschicht. Es folgt die mittlere Zone oder Übergangsschicht und schliesslich die oberflächliche Zone oder Tangentialzone. Die Zellanordnung ist in den verschiedenen Schichten unterschiedlich. Die Schicht des kalzifizierten Knorpels enthält Zellen, welche stark von Hydroxyapatitkristallen überzogen sind. Die Zellen in der sogenannten Radiärschicht sind säulenartig und senkrecht zur Oberfläche angeordnet, während in der mittleren Zone die Zellen dagegen mehr zufällig angeordnet und abgerundet erscheinen. In der Tangentialzone sehen die Zellen eher länglich oder abgeplattet aus und richten sich parallel zur Knorpeloberfläche³.

Der hyaline Knorpel weist einen hohen Wassergehalt auf (über 70% der Masse beim gesunden, adulten Knorpel und 80% bei juvenilen Tieren). Basierend auf der Trockenmasse besteht der Knorpel aus 50% Kollagen, 35% Proteoglykanen, 10% Glycoproteinen und 3% Mineralstoffen, ausserdem aus etwa 1% Fett. Der Anteil an Chondrozyten schwankt zwischen 1% und 12% je nach Alter und Lokalisation des Gelenkknorpels¹⁵. Der Anteil des Kollagens lässt sich in verschiedene Arten von Kollagenfasern aufteilen. Insgesamt sind beim höheren Säugetier 27 verschiedene Unterarten von Kollagen bekannt¹⁶, wobei Kollagen vom Typ II deutlich überwiegt (mehr als 50%¹⁷). Des Weiteren spielen die Typen VI, IX, XI, XII und XIV eine ebenfalls wichtige Rolle, meistens vor allem die Vernetzung der verschiedenen Fibrillen untereinander oder die Entwicklungsphase betreffend¹⁸. Kollagen II ist dabei in Form von Fibrillen angeordnet, deren Kollagenmoleküle so verbunden sind, dass sie sich zu einem Viertel überlappen. Die Stabilisierung dieser Struktur geschieht durch chemische Bindungen zwischen spezifischen Aminosäuren, genannt Hydroxypyridin-Brücken¹⁹. Die Produktion von Kollagen Typ II erfolgt durch die Chondrozyten. Ein Abbau und die Erneuerung von Typ II- Kollagenfibrillen sind beim Jungtier möglich, beim erwachsenen Individuum scheint diese Regenerationsfähigkeit sehr begrenzt zu sein²⁰. Die Funktion anderer Kollagentypen ist nicht abschliessend geklärt. Typ IX und XI scheinen eine Rolle in der Stabilisierung der Fibrillenstruktur, gebildet vor allem aus Typ II- Kollagen, zu haben¹⁶.

Den anderen Hauptbestandteil der Knorpelmatrix bilden Proteoglykane. Sie bestehen aus einer oder mehreren Glykosaminoglykanketten (Polysaccharide), vor allem Chondroitinsulfat und Keratosulfat, welche kovalent an einen Proteinkern gebunden sind. Die Nomenklatur ist dabei nicht einheitlich, die momentan gültige Nomenklatur basiert auf dem jeweiligen

Protein, an das verschiedene Proteoglykane gebunden sind, zum Teil aber auch auf der Funktion der Proteoglykane oder ihrer Lokalisation^{15, 21}. Wichtige Proteoglykane sind Aggrecane (Aggregating Large Proteoglycan), Hyaluronan und die kleinen Proteoglykane, zu denen Biglycan und Decorin gehören²².

2.3. Subchondraler Knochen

Die Basis für den Gelenkknorpel bildet der subchondrale Knochen. Dabei gibt es je nach Autor und Art der Untersuchung verschiedene Definitionen dieser Struktur, viele Autoren schliessen die kalzifizierte Zone des Gelenkknorpels nicht in diesen Begriff ein^{3, 23}, andere rechnen diese Zone als funktionelle Einheit zur subchondralen Knochenplatte²⁴. Der Knorpel erscheint verzahnt mit der unregelmässigen Oberfläche des darunter liegenden Knochens. Die Hauptaufgaben des subchondralen Knochens sind die Aufnahme von Kräften, die auf das Gelenk wirken, und die Aufrechterhaltung der Gelenkfunktion²⁵.

Histologisch und biochemisch weist subchondraler Knochen die gleiche Struktur auf wie Knochenmaterial an anderen Lokalisationen des Körpers. Allerdings ist der Aufbau der subchondralen Knochenplatte leicht verändert und der Knochen ist dünner als Knochen an anderen Lokalisationen. Ausserdem ist das System der Havers'schen Kanäle parallel zum Gelenk angeordnet und nicht zur Längsachse des Knochens^{3, 26}. Der subchondrale Knochen enthält Knochenmark und trabekulären Knochen. Es sind in dieser Region viele arterielle Endaufzweigungen vorhanden, welche in unregelmässig grossen und verteilten Sinusoiden enden. Diese Sinusoide stehen in Verbindung mit tiefer liegenden venösen Ästen, welche einen deutlich quer verlaufenden Sinus bilden, der senkrecht zu den kleinen venösen Ästen steht.

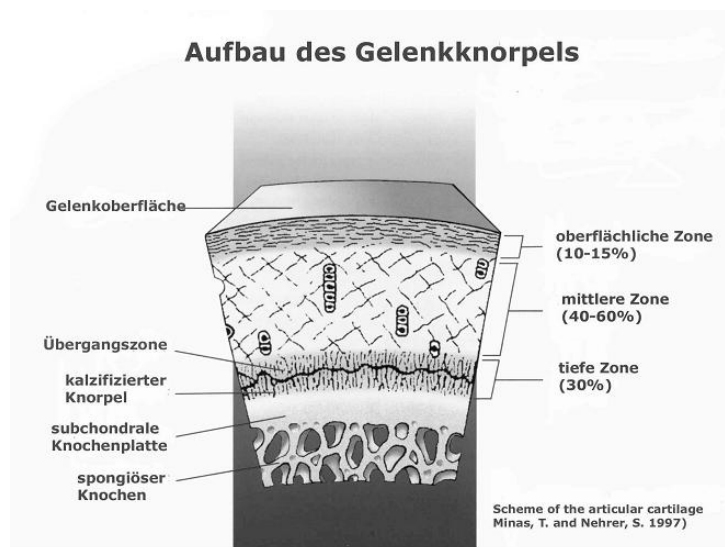


Abb. 1: Aufbau des Gelenkknorpels (nach Minas, T. und Neher, S., Current concepts in the treatment of articular cartilage defects, Orthopedics. 20:525-38)

2.4. Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) bezeichnet laut Definition eine primär nicht-entzündliche Störung der beweglichen Gelenke, welche charakterisiert ist durch Degeneration und dem Verlust von Gelenkknorpel und der Entstehung von neuem Knochen auf der Gelenkoberfläche und an den Gelenkrändern^{3, 27}. Da diese Definition oft die mit Osteoarthritis bezeichneten Veränderungen und Symptome nur unzureichend beschreibt, definierte sie das „American College of Rheumatology“ folgendermassen: OA bezeichnet eine heterogene Gruppe von Bedingungen, welche zu Gelenksymptomen führen und zusammen mit der gestörten Integrität des Gelenkknorpels sowie dazugehörigen Veränderungen im darunter liegenden Knochen an den Gelenkrändern auftreten²⁸. Es werden drei verschiedene Hypothesen für die Entstehung von Osteoarthritis angenommen³. Die erste Hypothese geht von einem primär zerstörten Knorpel mit gestörten biochemischen Eigenschaften aus, welcher dadurch unter normaler Belastung nicht mehr seine Funktion ausfüllen kann. Die zweite Hypothese basiert auf der Annahme, dass normale Kräfte zu einer Schädigung des gesunden Knorpels führen können, es damit zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen durch die geschädigten Chondrozyten kommt, was schliesslich zu Fibrillation des Knorpels mit folgender Zerstörung der Vernetzung der

Proteoglykane führt. Ein dritter möglicher Mechanismus für die Entstehung von Osteoarthritis ist derjenige, der in dieser Arbeit speziell betrachtet wird. Dabei führen mechanische Belastungen zu Mikrofrakturen im subchondralen und im epiphysären trabekulären Knochen. Bei Überschreitung einer gewissen Anzahl von solchen Rissen soll der trabekuläre Knochen nicht mehr in der Lage sein, dieses durch Umbauprozesse und Knochenheilung auszugleichen. Dies führt zu einer verringerten Dichte der subchondralen Knochenplatte und die Fähigkeit zum Ausgleichen von auf das Gelenk wirkenden Kräften sinkt. Nachfolgend geschieht dann eine mechanische Schädigung des Gelenkknorpels auf dem in der zweiten Hypothese beschriebenen Weg^{29, 30}.

Eine sowohl in der Erklärung der Entstehung von Osteoarthritis als auch in der Diagnostik von osteoarthritischen Veränderungen wichtige Frage ist die Bedeutung von verschiedenen bioaktiven Molekülen und Enzymen⁴. Auch wenn Osteoarthritis als nicht primär entzündliche Erkrankung definiert wird, spielen verschiedene Entzündungsmediatoren und ähnliche Stoffe eine bedeutende Rolle. Dazu gehören Zytokine, vor allem Interleukin I, Prostaglandine und Stickoxid. Ausserdem sind die Matrix Metalloproteinasen und die Aggrecanasen daran beteiligt. Eine Messung dieser Faktoren kann eine Aussage über den Grad der Knorpelschädigung geben.

Interleukin 1 ist ein Peptid, welches in zwei Isoformen, Il-1 α und Il-1 β , vorkommt. Es scheint sowohl an der Ausbildung als auch an der Verstärkung von entzündlichen Gelenkerkrankungen sowie an Abbauprozessen im Knorpel beteiligt zu sein⁴. Il-1 regt die Chondrozyten und Synovialzellen an Stickoxid, Prostaglandin E2 (PGE2), andere Prostaglandine und Matrix-Metalloproteinasen freizusetzen³¹. Erhöhte Werte an Il-1 sind in der Synovia und dem Knorpelgewebe von Patienten mit Osteoarthritis gefunden worden^{32- 34}. Die Fähigkeit von Il-1 β , den hyalinen Knorpel zur Freisetzung von Prostaglandinen und daraufhin zur Ausbildung von degenerativen Veränderungen anzuregen, ist experimentell nachgewiesen³⁵. Vergleichbare katabole Effekte auf den Knorpel hat Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), wobei Il-1 und TNF α oft synergistisch wirken. Die Signalübertragung beider Zytokine ist ähnlich³⁶.

Prostaglandine kommen vielfältig im Körper vor und steuern verschiedenste Prozesse. Sie binden sich an Rezeptoren bei sensiblen Nervenendigungen, fördern die Impulsleitung und führen zu verstärkten Schmerzempfindungen³⁷. Bei der Betrachtung von OA ist vor allem PGE2 zu erwähnen³⁸. Die Synthese von PGE2 wird durch Il-1 stimuliert und reguliert^{39, 40}. In osteoarthritischem Knorpel von Pferden sind höhere Werte von PGE2 gefunden worden als in

normalem Knorpel⁴¹. Für die PGE2-Produktion von Phospholipiden der Zellwand ist das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) verantwortlich⁴².

Stickoxid (NO) als freies Radikal ist ebenfalls an der Ausbildung von OA beteiligt, zumindest sind höhere Konzentrationen in Knorpelzellen und der Synovia von osteoarthritischen Gelenken gefunden worden^{41, 43}. Es wird von Chondrozyten synthetisiert⁴⁴ und an der Synthese ist NOS (Nitric Oxide Synthase) entscheidend beteiligt. Die Synthese von NOS ist ebenfalls durch IL-1 beeinflussbar, indem sie nach Stimulation mit IL-1 ansteigt⁴⁵. Durch die Applikation eines selektiven Inhibitors der iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), einer Isoform der NOS, konnte experimentell eine Verminderung von osteoarthritischen Strukturveränderungen im Knorpel gezeigt werden⁴⁶.

Bei der Knorpeldegeneration spielen ausserdem die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) eine hervorzuhebende Rolle. Diese Enzyme benötigen Zn^{2+} für ihre Aktivierung, auch Kalzium ist zur Entfaltung ihrer vollen Wirksamkeit wichtig. Sie besitzen die Fähigkeit, Teile der extrazellulären Matrix an vorbestimmten Lokalisationen zu spalten⁴⁷. Die Matrix-Metalloproteinasen bilden eine Gruppe mit verschiedenster Zusammensetzung und Funktion, momentan sind mehr als 66 verschiedene Arten an MMPs bekannt⁴⁷. So werden MMP-1, MMP-8 und MMP-13 als Kollagenasen klassifiziert, deren Funktion die Spaltung von Kollagenfibrillen in spezielle (definierte) Fragmente ist. Diese Fragmente werden weiter denaturiert, indem sie durch Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) weiter abgebaut werden⁴⁸. MMP-3, MMP-10 und MMP-11 sind Stromelysine, welche unter anderem Prokollagenasen aktivieren und auch für die Degradierung von Proteoglykanen verantwortlich sind³⁸. Die Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen für die Untersuchung an Patienten mit Osteoarthritis ist in mehreren Studien belegt, in denen signifikant höhere Werte an MMP, speziell MMP-1 und MMP-3 in im Sinne von OA verändertem Knorpel⁴⁹ und in Synovialflüssigkeit gefunden worden sind⁵⁰.

2.5. Subchondraler Knochen und Knorpel als funktionelle Einheit und Wechselwirkungen im Bezug auf die Entstehung von Osteoarthritis

Nachdem lange Zeit die Rolle des subchondralen Knochens in der Entstehung und Ausbildung von Knorpelschäden und Osteoarthritis unterschätzt wurde, ist in neueren Untersuchungen wieder näher auf diesen Aspekt eingegangen worden^{23, 25}. Deswegen ist der Terminus „Osteochondrales Gewebe“ für beide geprägt worden. Dies bezieht alle Gewebe ein, welche die Gelenkfläche bilden oder sie unterstützen²⁵.

Ein häufig erwähnter Aspekt dabei ist die Reaktion des subchondralen Knochens auf Kräfte und Belastungen, welche auf das Gelenk und damit sowohl auf den Knorpel als auch auf den subchondralen Knochen wirken. Besondere Bedeutung wird dabei einem grossen Festigkeitsgefälle innerhalb des subchondralen Knochens beigemessen²⁹. Ein durch die mechanische Beanspruchung des Knochens ausgelöster Prozess von Modeling und Remodeling (Knochenauf- und -abbau) wird als eine der Ursachen angesehen, für Veränderungen im subchondralen Knochen verantwortlich zu sein^{25, 51}. Die genauen Mechanismen sind dabei noch immer nicht vollständig bekannt, allerdings sind Mikrofrakturen im subchondralen Knochen von verschiedenen Autoren gefunden und damit in Zusammenhang gebracht worden^{52, 53}. Diese traten sowohl im trabekulären Knochen⁵³ als auch in der Schicht des kalzifizierten Knorpels⁵⁴ auf. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Festigkeitsunterschiede zwischen dem „weicheren“ Knorpel und dem „härteren“ subchondralen Knochen dieser eher durch die auf das Gelenk wirkenden Kräfte, vor allem Scherkräfte, geschädigt wird und Mikroläsionen aufweist²⁹. In Folge dessen entstehen im kalzifizierten Knorpel, der kortikalen Endplatte und dem subchondralen Knochen Blutungen, Gewebsnekrosen und Knochenmarködeme²³. Durch wiederholte kleinste Verletzungen sowohl im kalzifizierten Knorpel als auch im subchondralen Knochen soll ein Reparaturmechanismus in Gang gesetzt werden, welcher schliesslich auch durch die folgende Aktivierung von Osteoblasten, Osteoklasten sowie fibrovaskulärem Gewebe zu einem Umbau des subchondralen Knochens sowie der Mineralisationszone des Knorpels führt^{54, 55}. Es ist aber nicht definitiv zu beweisen, ob Mikrofrakturen und Mikrorisse als Ursachen für Knorpeldegeneration und Osteoarthritis in Frage kommen oder nur Prozesse sind, die zwar damit in Zusammenhang stehen, aber die Veränderungen selbst nicht auslösen⁵⁶. Die arthroskopische Sichtbarkeit von solchen Läsionen ist durch den darüber liegenden Knorpel eher unwahrscheinlich, auch auf Standard-Röntgenaufnahmen stellen sie sich nicht immer dar. Deshalb wurde die Darstellung von Mikroläsionen im subchondralen Knochen durch den

Fortschritt in der Bildgebenden Diagnostik, vor allem der Einführung des MRI (Magnetic Resonance Imaging), deutlich vereinfacht⁵⁷. Die zu starke Belastung (Overloading) von Knorpel und subchondralem Knochen wird oft für die schon beschriebenen Strukturveränderungen in beiden verantwortlich gemacht. In Studien an Kaninchen⁵¹, Hunden⁵⁸ und an Pferden⁵⁹ konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch experimentelle Überbelastung Mikrofrakturen hervorzurufen, welche histologisch oder mittels MRI sichtbar gemacht wurden. Makroskopisch sichtbare Knorpelveränderungen wurden nach einer Zeit von 6 Monaten in einer Studie an Hunden beschrieben⁶⁰.

Weitere Untersuchungen des Zusammenhangs von subchondralem Knochen, Knorpel und ihre Rolle bei der Entstehung von Osteoarthritis beschäftigten sich mit der Ernährung des Knorpels und den Einfluss des subchondralen Knochens darauf⁶¹. Als bestätigt gilt der Ernährungsweg des Knorpels auf dem synovialen Weg³. Inwiefern ein anderer Weg, vor allem über Gefäße im subchondralen Knochen, eine Rolle spielt, ist weiterhin nur zu vermuten. Dabei scheint das Alter des Tieres eine Rolle zu spielen, bei noch nicht ausgewachsenen Individuen war in einer Studie an Kaninchen eine Ernährungsfunktion über den subchondralen Knochen feststellbar, bei adulten Tieren nicht mehr⁶². Neuere Untersuchungen konnten auch bei erwachsenen Tieren nach funktioneller Trennung zwischen subchondraler Knochenplatte und Gelenkknorpel nach einer längeren Zeit osteoarthritisähnliche Knorpelveränderungen feststellen, was den Verdacht eines Ausfalls der nutritiven Versorgung des Knorpels nahe legt. Allerdings zeigten sich diese Veränderungen erst nach 3 Jahren, vorher werden keine Veränderungen beschrieben⁶³.

2.6. Knochenersatzmaterialien

Da dieser Aspekt in dieser Arbeit eher eine untergeordnete Rolle spielt, soll nur kurz und im Bezug auf die verwendeten Materialien darauf eingegangen werden.

2.6.1 Allgemeines

Die Gründe für die Verwendung von Knochenersatzmaterialien können verschieden sein. Klinisch relevant ist vor allem der Ersatz von Knochen bei Defekten ab einer bestimmten Grösse. Allgemein ist definiert, dass Knochendefekte ab einer bestimmten Grösse, sogenannte „critical size defects“, nicht spontan wieder heilen können⁶⁴. Die Ursache für die Entstehung solcher Defekte können Frakturen, aber auch Tumoren oder Zysten sein. Da die mechanische Stabilität und der Zusammenhang des Knochens möglichst erhalten werden sollten ist die Auffüllung dieser Defekte nötig. Die idealen Anforderungen an ein Ersatzmaterial sind dabei festgelegt mit Osteogenese, Osteointegration, Osteokonduktion und Osteoinduktion⁶⁵. Osteogenese bezeichnet die Fähigkeit, direkt neuen Knochen zu bilden, als Osteointegration bezeichnet man die Fähigkeit des Knochenersatzstoffes, sich an eine bestehende Knochenoberfläche ohne die Ausbildung einer fibrösen Kapsel zu binden. Osteokonduktivität bezeichnet die Funktion des Knochenersatzstoffes, mit seiner Oberfläche als Leitschiene für das Einwachsen von mesenchymalen Zellen zu dienen. Osteoinduktion schliesslich bezeichnet die Fähigkeit, die eigentliche Knochenneubildung anzuregen¹. Für die Auffüllung von Defekten gibt es mehrere Möglichkeiten, bevorzugt Knochen, entweder als Autograft, also vom gleichen Individuum gewonnen, oder als Allograft, das heisst von einem Individuum der gleichen Spezies gewonnen. Knochengewebe, gewonnen von einer anderen Spezies, wird als Xenograft bezeichnet¹. Falls dies nicht möglich ist, werden auch Hydroxylapatit-, Trikalziumphosphatkeramiken, oder Kombinationen zwischen autologem Knochen und einem anderen Knochenersatzstoff¹ verwendet, um nur die wichtigsten zu nennen.

2.6.2 Autologer Knochen, Autograft

Das autogene Knochentransplantat stellt noch immer den sogenannten „Goldstandard“ bei der Beurteilung der verschiedenen Knochenersatzmaterialien dar⁶⁶. Es bietet als bisher einzig bekanntes Knochentransplantat die Erfüllung aller Anforderungen an ein ideales

Knochen-Transplantat. Ausser den schon erwähnten Eigenschaften zählen dazu je nach Beschaffenheit (kortikal oder spongiös) eine gute mechanische Stabilität und die Minimierung von Risiken, entstehend durch biologische Inkompatibilitäten. Auch diese Art der Transplantation besitzt Nachteile, so etwa eine verlängerte Dauer des Eingriffs, die Möglichkeit lokaler Komplikationen an der Entnahmestelle und den begrenzten Vorrat an autologer Spongiosa⁶⁷.

2.6.3 Die Hydroxylapatitkeramik Endobon®

Hydroxylapatitkeramiken (HA) kann man einteilen in rein synthetisch hergestellte HA-Keramiken und HA-Keramiken, welche durch eine spezielle Behandlung aus natürlichen Ausgangsstoffen hergestellt werden. Bei den HA-Keramiken, welche aus natürlichen oder biologischen Ausgangsmaterialien hergestellt sind, gibt es Keramiken, hergestellt direkt aus Tierknochen und speziell behandelt oder auch aus Algen bzw. Korallen, bei welchen das vorliegende Kalziumkarbonat erst in Hydroxylapatit mittels thermischer und chemischer Behandlung umgewandelt werden muss⁶⁸. HA ist allgemein gekennzeichnet durch eine gute Gewebsverträglichkeit und schnelles Einwachsen von Knochen¹. Allerdings ist eine vollständige Durchbauung aufgrund der extrem langsamen oder gar nicht vorhandenen Resorbierbarkeit nicht möglich⁶⁹. Bei Endobon® handelt es sich um eine Hydroxylapatitkeramik, welche aus boviner Spongiosa hergestellt wird. Diese wird einer Pyrolyse bei Temperaturen bis ca. 900°C unterzogen, anschliessend einem Sinterungsprozess bei über 1200°C über mehrere Stunden unterworfen. Sie ist sowohl als Block, Zylinder als auch in Granulatform in Anwendung. In wissenschaftlichen Studien wird eine gute mechanische Stabilität und Bioverträglichkeit beschrieben^{70, 71}.

2.7. Evaluierung Knorpel

2.7.1. Makroskopische Evaluierung

Damit es die Möglichkeit gibt, Knorpel beziehungsweise Knorpelveränderungen zu beurteilen und einen verbindlichen Standard einzuführen, empfiehlt die „International Cartilage Repair Society (ICRS)“, dass die makroskopische Beurteilung nach dem System von Outerbridge erfolgt⁷². Dieses System wurde ursprünglich für die Beurteilung der Chondromalazia Patellae entwickelt⁷³. Bei arthroskopischen Untersuchungen wurde die Reproduzierbarkeit dieses Systems überprüft⁷⁴ und bestätigt.

2.7.2. Mikroskopische Evaluierung

Ein System zur Bewertung von histologisch sichtbaren Veränderungen bei osteoarthritisch verändertem Knorpel stellt das „histological- histochemical grading system (HHGS)“ dar, welches von Mankin 1971 etabliert wurde⁷⁵. Es wird auch heute, zum Teil abgewandelt⁷⁶, als System zur Beurteilung von Knorpelveränderungen angewendet. Einige Autoren zweifeln die Reproduzierbarkeit des HHGS an und fordern die Etablierung eines neuen Systems⁷⁷.

3. Material und Methoden

3.1. Aufbau der Studie

In dieser tierexperimentellen Studie wurden insgesamt 18 Schafe eingesetzt. Dabei erfolgte eine Einteilung in Gruppen von jeweils 6 Schafen, von denen sich 12 Schafe in einer längeren Studie von 8 Wochen und 6 Tiere in einer kürzeren Studie von 2 Wochen befanden.

Die Gruppeneinteilung erfolgte nach dem eingesetzten Material, in der Langzeitstudie wurde bei 6 Schafen autologer Knochen und bei 6 Tieren die Hydroxylapatitkeramik Endobon® (Firma Biomet Merck) verwendet, in der Kurzzeitstudie bei 6 Tieren autologer Knochen.

Der Defekt wurde jeweils an der medialen Seite im Tibiaplateau gesetzt, 4 mm unterhalb des Gelenkknorpels (Abb.2).

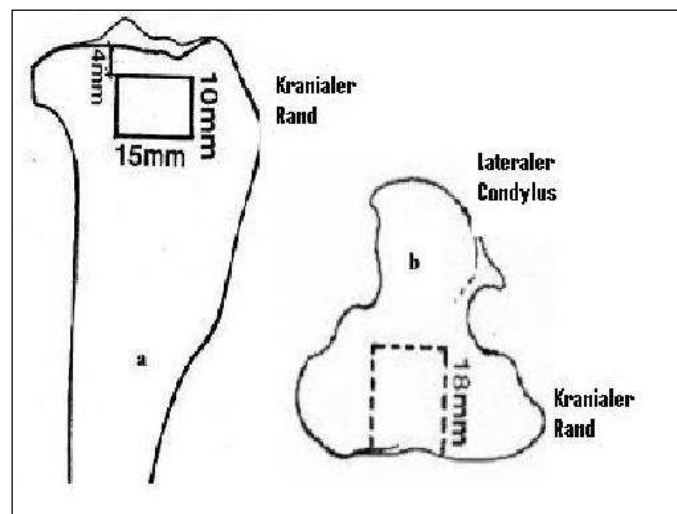


Abb.2 : Lokalisation des Defektes

3.2. Eingesetzte Materialien zur Defektfüllung

3.2.1. Autologer Knochen

Als autologer Knochen wurde der bei der Defektherstellung entnommene Knochen verwendet. Dieser wurde mit Hilfe einer Knochenknabberzange (Rongeur) mechanisch zerkleinert und gleich wieder in den Defekt eingesetzt.

3.2.2. Endobon®

Bei der Verwendung der Hydroxylapatitkeramik Endobon® wurde die Formulierung Endobon® Granules II mit 2,8- 5,6 mm Korngrösse verwendet.

3.3. Versuchstiere

Die in diesem Tierexperiment eingesetzten Tiere waren alle zwischen 18- 20 Monate alt. Es handelte sich um Schafe der Rasse Weisses Alpenschaf. Die Geschlechterverteilung wurde zufällig gewählt und umfasste sowohl weibliche als auch männlich- kastrierte Schafe. Das Körpergewicht betrug zwischen 42 und 68 kg, durchschnittlich 56,3 kg. (Tab. 1). Der Versuch entsprach den geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen der Schweiz und wurde von den kantonalen Veterinärbehörden genehmigt (Bewilligungsnummer 188/2004).

Tabelle 1 : Liste der operierten Schafe

Schafnummer	Geschlecht	Material	Operationsdatum	Schlachtdatum
2107	männlich*	Autograft	14.12.2004	14.02.2005
2108	männlich*	Autograft	14.12.2004	14.02.2005
2109	männlich*	Autograft	14.12.2004	14.02.2005
2110	männlich*	Autograft	15.12.2004	14.02.2005
2111	weiblich	Autograft	15.12.2004	14.02.2005
2112	weiblich	Autograft	15.12.2004	14.02.2005
2113	weiblich	Endobon	20.01.2005	21.03.2005
2114	weiblich	Endobon	20.01.2005	21.03.2005
2115	weiblich	Endobon	20.01.2005	21.03.2005
2116	weiblich	Endobon	25.01.2005	21.03.2005
2117	weiblich	Endobon	25.01.2005	21.03.2005
2118	männlich*	Endobon	25.01.2005	21.03.2005
2119	männlich*	Autograft	17.05.2005	01.06.2005
2120	männlich*	Autograft	17.05.2005	01.06.2005
2121	männlich*	Autograft	17.05.2005	01.06.2005
2122	männlich*	Autograft	18.05.2005	01.06.2005
2123	männlich*	Autograft	18.05.2005	01.06.2005
2124	männlich*	Autograft	18.05.2005	01.06.2005

(männlich* = männlich kastriert)

3.4 Versuchsvorbereitung

Alle Schafe entstammten der Nachzucht der eigenen Schafherde, welche als Maedi/ Visna-Virus Antikörper negativ gilt, da alle Mutterschafe und Neuzukäufe serologisch am Virologischen Institut der Vetsuisse Fakultät der Universität Bern untersucht wurden. Alle Versuchstiere erhielten zwei Mal im Abstand von 6- 8 Wochen eine Grundimmunisierung mit

Pulpyvax®-T s.c. (Essex Tierarznei, Vertrieb Provet AG, Lyssach, Schweiz) gegen Breinierenkrankheit und Tetanus, welche nach einem Jahr wiederholt wurde.

Die Versuchsschafe verblieben bis eine Woche vor der Operation in einem Stall mit Weidegang. Dort wurde regelmässige Klauenpflege und antiparasitäre Behandlung nach einem an die Befallsituation angepassten Behandlungsplan mittels Triclabendazol/ Levamisol p.o. (Endex® 19,5 %, 1 ml/ 5 kg, Novartis AG, Bale, Schweiz) sowie Ivermectin s.c. (Ivomec®, 0,5ml/25kg; Biokema, Crissier- Lausanne, Schweiz) durchgeführt und die Tiere dabei gleichzeitig auf ihren Gesundheitszustand hin untersucht.

Eine Woche vor dem Operationstermin wurden die Versuchstiere in einen Stall des Tierspitals Zürich transportiert. Zur Minimierung von Operations- und Narkoserisiken wurde den Schafen drei Tage präoperativ Blut mittels eines Vacutainersystems (Belliver Industrial Estate, Plymouth, Grossbritannien) entnommen und im Labor der Vetsuisse Fakultät Zürich hämatologisch und chemisch untersucht. Die Tiere erhielten 24 Stunden vor Beginn der Operation keine Nahrung mehr, wobei der freie Zugang zu Wasser gewährleistet war.

Sie wurden erneut einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, dabei wurden Herz und Lunge auskultiert und die innere Körpertemperatur gemessen.

Die weitere Vorbereitung bestand darin, die Schafe zu wiegen und den Operationsbereich sowie den Hals im Bereich der Drosselrinne zu scheren.

3.5 Operation

Die Prämedikation am Operationstag wurde mit Medetomidin i.m. (Domitor®; 0.005mg/kg; Dr. E. Gräub AG, Bern, Schweiz) und Buprenorphin i.m. (Temgesic®; 0.01mg/kg; Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) durchgeführt.

Nach 20 Minuten wurde den Tieren im Operationssaal die vorher geschorene Halsseite mit Hibiscrub®- Seife gewaschen sowie mit 70 %igem Alkohol und Hibitane® Tinktur (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) entfettet und desinfiziert. Ein venöser Zugang wurde mittels eines Venenverweilkatheters (Vygonüle S® G14; Vygon GmbH; Aachen; Deutschland) in die Vena jugularis gelegt und ein IN-Stopper (Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) als Verschlussvorrichtung verwendet. Die Fixation des Katheters in der Haut erfolgte mit einem nicht resorbierbaren Nahtmaterial (Supramid® 2/0; Aesculap AG & Co.; Tuttlingen; Deutschland).

Präoperativ wurde den Schafen eine Antibiose mit Benzylpenicillin i.v. (30.000 I.U./kg; Penicillin Natrium; G. Streuli &Co.AG, Uznach, Schweiz) und Gentamycin i.v. (6 mg/kg; G.Streuli &Co. AG, Uznach, Schweiz) verabreicht, zusätzlich das nicht-steroidale Antiphlogistikum Carprofen (4 mg/kg; Rimadyl®; Pfizer; Vertrieb Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz). Equines Tetanusantitoxin s.c. (3000 I.U./Tier; Tetanus-Serum Intervet; Vertrieb Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) wurde ebenfalls präoperativ bei allen Versuchstieren angewendet.

Zur anschliessenden Narkoseeinleitung wurden Ketamin i.v. (Narketan 10®; 2mg/kg; Vetoquinol AG, Belp, Schweiz) und Diazepam i.v. (Valium®; Roche Pharma AG, Rheinach, Schweiz) verwendet, bei Bedarf ausserdem Propofol i.v. (Propofol®1%, 2-4mg/kg, Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz,).

Eine lokale Anästhesie des Kehlkopfes erfolgte mit einem Sprühstoss Lidocain (Xylocain® Spray; 10mg/Tier; Astra Pharmaceutica AG; Dietikon, Schweiz), zur anschliessenden Intubation wurden Endotrachealtuben der Grössen 11-14 verwendet. Die Anästhesie wurde mit 1-1,5% Isofluran (Forene®; Abbott AG; Baar, Schweiz) aufrechterhalten. Zur Blutdruckmessung wurde ein arterieller Ohrkatheter verwendet, die Versuchstiere erhielten während der Operation eine Infusion mit Ringerlaktat und Ketamine. Eine Augensalbe (Vitamin A Dispersa®; Novartis AG; Basel, Schweiz) sollte die Cornea vor Austrocknung schützen.

Das Versuchstier wurde in Seitenlage auf dem Operationstisch gelagert, dabei wurde das obenliegende Hinterbein nach craniodorsal ausgebunden. Das unten liegende Bein, an

welchem operiert wurde, lag der Unterlage auf. Das Operationsfeld wurde nachrasiert sowie mit Hibiscrub®- Seife gewaschen. Die aseptische Vorbereitung erfolgte weiter mit Alkohol(70%) und Hibitane- Tinktur (SSL Healthcare AG, Reinach, Schweiz).

Das Operationsfeld wurde mit sterilen Einwegtüchern abgedeckt.

Für die Operation wurde ein Kleintier-Fragmentset (Synthes GmbH, Oberdorf, Schweiz) verwendet. Der Zugang zur Tibia erfolgte von medial. Die ca. 5cm lange Inzision erfolgte mit einer Skalpellklinge Nr.22. Die weitere Präparation der Haut und Subkutis bis zum Tibiaplateau sowie die Blutstillung wurden mit einem Elektrokauter (Bechtold Elektrotom 80; Vertrieb Hausmann, St.Gallen, Schweiz) durchgeführt. Nach erfolgtem Zugang zur proximalen Tibia wurde mit Kanülen (20G 2 3/4“ Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien) die Lage des Gelenkspalts distal des Meniskus lokalisiert, danach mittels einer speziell für diesen Versuch angefertigten Schablone (Dipl.-Ing. Stabler, HTWK Leipzig) die genaue Lokalisation des späteren Defekts festgelegt. Dabei wurde die Schablone so angelegt, dass sich die proximalen Bohrlöcher 4 mm unterhalb des knöchernen Gelenkranfes befanden. Die Bohrlöcher wurden zur Markierung des späteren rechteckigen Knochendefekts verwendet. Dieser Defekt war 15mm breit, 10 mm hoch und 18 mm tief und befand sich direkt cranial vor dem medialen Seitenband. Die Schablone wurde mit Steinmann-Pins 2,0 (Synthes GmbH, Oberdorf, Schweiz) befestigt. Mit Hilfe einer Kleintier- Knochenbohrmaschine und eines Bohrers (2,3 mm) wurden die Löcher vorgebohrt, deren Verbindung später den Defekt bilden sollte. Die Tiefe der Bohrlöcher wurde mit einem Tiefenmessgerät bestimmt. Danach wurde ein Osteotom benutzt, um die Löcher zum gewünschten, rechteckigen Defekt zu verbinden. Die Kortikalis des Defekts wurde ausgestemmt und der tiefer gelegene Teil mit einem scharfen Löffel in seine endgültige Form gebracht. Nun wurde das zur Defektfüllung vorgesehene Material eingebracht.

Beim autologen Knochen wurde der aus dem Defekt entfernte Knochen, welcher mit Hilfe einer Knochenzange zerkleinert wurde, in den Defekt eingefüllt.

Die Hydroxylapatitkeramik Endobon, welche in der Formulierung Endobon® Granules II mit 2,8- 5,6 mm Korngrösse verwendet wurde, kam nach den Anwendungshinweisen des Herstellers zum Einsatz. Zuerst wurden die Granula in steriler Kochsalzlösung unter Vakuum in einer 20ml Spritze entlüftet, danach fand eine ebenfalls unter Vakuum ausgeführte Durchtränkung mit steril entnommenem Blut vor der Implantierung statt.

Abschliessend wurden die Faszie und die Subcutis mit je einer fortlaufenden Naht (Polyglactin; Vicryl® 2-0; Johnson& Johnson Intl., Brüssel, Belgien) geschlossen. Der

Hautverschluss erfolgte mit Klammern (Davis+ Geck Appose ULC®; Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland).

Danach wurden jeweils eine mediolaterale und eine caudocraniale Röntgenaufnahme angefertigt. Den Schafen wurde eine Ohrmarke mit projektbezogener Nummer und Farbe eingezogen. Sie wurden elektronisch mittels Mikrochip (Data Mars SA, Vertrieb Provet AG, Lyssach, Schweiz) subkutan auf der linken Halsseite gekennzeichnet.

Die Tiere wurden direkt nach der Operation im noch nicht wachen Zustand zu mindestens einem anderen Schaf in eine frisch eingestreute Box verbracht, wo ihnen Heu angeboten wurde. Am Operationstag bekamen die Tiere noch zweimal im vierstündigen Abstand Buprenorphin i.m, die Antibiose mit Benzylpenicillin i.v und Gentamycin zweimal täglich wurde am Operationstag und an den 3 folgenden Tagen fortgeführt, ebenso die einmal tägliche Verabreichung des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Carprofen i.v.. Danach wurde der Venenverweilkatheter entfernt.

Danach wurden die Versuchstiere in grösseren Gruppen in einen Laufstall verbracht, in dem sie immer noch etwas eingeschränkt, aber doch einen gewissen Auslauf besaßen.

3.6. Probenaufbereitung und –auswertung

3.6.1. Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Die Versuchstiere wurden nach 8 beziehungsweise 2 Wochen geschlachtet (Tab.1). Beide Tibiae, die der operierten Gliedmasse sowie die der anderen Seite als Kontrolle, wurden unter Schonung des Kniegelenks herausgetrennt und freipräpariert. Die Präparate wurden sofort mit Eis gekühlt und je ein Röntgenbild von mediolateral und craniocaudal (50kV, 1s, 3mA; Faxitron X-Ray Systems; Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA) angefertigt. Die Tibia wurde dann in eine Haltevorrichtung eingespannt und das jeweilige Tibiaplateau mit dem operierten Bereich sowie der dazugehörige Gelenkknorpel wurden fotografiert (Minolta Dimage 7®). Danach wurden Knorpelproben mit Hilfe eines Skalpell oberhalb des Bereichs des Defekts im subchondralen Knochen, jedoch ausserhalb des Bereichs, der für die histologische Untersuchung vorgesehen war, gewonnen. Die Knorpelproben wurden auf Kryoröhrchen (Nunc® CryoTube® Vials 1,8ml, Nunc A/S Roskilde, Dänemark) verteilt und diese Probenröhrchen sofort in einen Behälter mit flüssigem

Stickstoff zur Kühlung gegeben. Mit einer Bandsäge (Kolbe Maschinenteknik GmbH, Elchingen, Deutschland) wurden der Bereich des Defekts einschliesslich des darüberliegenden Gelenkknorpels bei der operierten Gliedmasse und der gleiche Bereich der Kontrollgliedmasse ausgesägt, ein kleiner Teil davon mittels eines Osteotoms abgetrennt und ebenfalls in ein Kryoröhrchen gegeben, welches in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurde. Die Gefrierproben wurden für die spätere RNA- Bestimmung verwendet.

3.6.2. Histologie

Die für die histologischen Schnitte vorgesehenen Probenstücke wurden in 50ml Falcon Probenröhrchen mit 4% gepufferten Formalin fixiert und in dieser Lösung etwa eine Woche bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschliessend wurden diese Proben mit Wasser gewaschen, der Austausch des Wassers erfolgte dabei drei Mal im Abstand von 20 Minuten. Daran schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe an, um die Proben zu dehydrieren. Die Proben wurden in 50%igen Alkohol gegeben, welcher drei Mal im Abstand von 30 Minuten gewechselt wurde. Diese Methode wurde fortgesetzt mit je zweimaligem Verbringen der Proben in zuerst 70%igen Alkohol und danach 80%igen Alkohol, immer für 12 Stunden. Es folgten 12 Stunden in 90% und 12 Stunden in 96% sowie anschliessend viermal je 12 Stunden in 100%igem Alkohol. Die Entfettung der Proben geschah jetzt mit Xylol unter Vakuum bei Raumtemperatur. Das Xylol wurde nach einem Tag gewechselt, danach verblieben die Proben weitere drei Tage in Xylol, wieder unter Vakuum und bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben eine Woche lang unter Vakuum bei 4°C in Methylmetacrylat infiltriert. Das Methylmetacrylat wurde aus Methacrylsäure-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) im Verhältnis 89,5: 10: 0,5 hergestellt, welche 10 Minuten lang in einem Magnetruhrer gemischt wurden. Dann gelangten die Proben zur Einbettung mit Methylmetacrylat in spezielle luftdichte Teflonformen und wurden in ein ca. 30°C warmes Wasserbad gegeben, um sie aushärten zu lassen. Die ausgehärteten Proben konnten nun mit Hilfe von Plastikaufsätzen und Historesin-Plasikkleber (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) aus den Formen entnommen werden. Mit einer Präzisionsinnenlochsäge (Leica SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden aus den so gewonnen Blöcken 300µm starke Dickschnitte gesägt. Von diesen Schnitten wurde eine Mikroradiographie (27kV, 12s, 3mA; Faxitron X-Ray Systems; Hewlett Packard, MC Minnville Division, Oregon, USA) angefertigt und anschliessend wurden sie einen Tag lang unter Stahlplatten gepresst. Danach wurden diese

Schnitte mit Alkohol entfettet und mit einem Schnellkleber (Cementis CA 12, Merz+Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf Acropalträger geklebt. Danach wurden die Schnitte mit einer Schleif- und Poliermaschine (Planopol-V 401; Struers A/S, Rodovre, Dänemark) auf eine Dicke von etwa 40µm geschliffen und mit Toluidinblau angefärbt.

Ausserdem wurden Dünnschnitte für eine histologische Untersuchung angefertigt. Dabei wurden mit einem Mikrotom (Leica RM 2155; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) 5µm dünne Schnitte hergestellt und mit Toluidinblau sowie der Von Kossa Färbung mit Mc Neal's Tetrachrom gegengefärbt.

3.6.3. Biochemische und molekularbiologische Untersuchung

Die Proben für die biochemische Untersuchung wurden nach der Entnahme und der kurzzeitigen Aufbewahrung in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei Minus 80 °Celsius eingefroren. Das weitere Vorgehen war von dem zu bestimmenden Parameter abhängig. Sie verliefen nach einem standardisierten Protokoll. Im Einzelnen sind der Kollagen- und Proteoglykangehalt im Knorpel bestimmt worden, ausserdem die mRNA von GAPDH, Cox-2, iNOS, Il-1beta sowie MMP3 und MMP6 und MMP13.

Die Bestimmung des Kollagen- und Proteoglykangehalts der Knorpelproben erfolgte nach festgelegten Protokollen⁷⁸⁻⁸⁰ mittels kommerziell erhältlicher Kits, welche nach Anleitung der Hersteller verwendet wurden.

Die Bestimmung der mRNA erfolgte über den Schritt einer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), wie bereits früher beschrieben^{81, 82}. Die RNA- Isolierungsmethode verlief nach standardisierten Protokollen^{83, 84}. Dabei wurde in einem ersten Schritt mRNA extrahiert, danach in cDNA umgewandelt und in einem Reverse Transkriptase- Schritt messbar gemacht. Die Messung geschah mittels eines speziellen Messgeräts (TaqMan®-Analysator, ABI Prism® 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Biosystems, Forster City, USA). Die verwendeten Primer sind aus Tabelle 18 im Anhang I ersichtlich.

3.7. Evaluationsmethoden

3.7.1 Makroskopische Auswertung

Die makroskopische Auswertung des Gelenkknorpels erfolgte leicht modifiziert nach dem System von Outerbridge (Tab.2). Dabei wurde der Knorpel von zwei Personen anhand der Aufnahmen nach der Schlachtung beurteilt.

Tabelle 2: Makroskopische Beurteilung der Knorpeloberfläche nach Outerbridge

Grad	Beschreibung
0	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter weisser Oberfläche und guter Konsistenz
I	Erweichung der Oberfläche, aber glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation
II	Oberfläche aufgefasert mit Einrissen und deutlicher Fibrillation
III	Tiefe Fissuren, Ulcus bzw. Krater mit instabilen oder unterminierten Rändern, subchondraler Knochen nicht erreicht
IV	Vollschicht- Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen (Knochenglatze)

3.7.2 Histomorphometrische Auswertung

Zur histomorphometrische Beurteilung wurden die angefertigten Dickschnitte mit einem Makroskop (Leica M 420®) bei 8-facher Vergrößerung in Verbindung mit einer Kamera (Leica DC 200®) in die entsprechenden Software (Leica IM 1000®) eingelesen. Es wurde pro Schnitt eine Aufnahme angefertigt. Auf der Aufnahme waren immer der proximalste Teil des ursprünglichen Defektes und der gesamte Knorpel zu sehen.

Die Messung des Abstandes zwischen dem subchondralen Knochen und Knorpel erfolgte mit der im Programm IM 1000® integrierten Routine zur Distanzmessung. Dabei wurden die Punkte zur Abstandsmessung so festgelegt, dass der distale Punkt der Linie genau am Rand zwischen Knochenersatz und umliegendem Knochen und der proximale Punkt an der unteren Kante der kalzifizierten Knorpelzone festgesetzt waren (Abb.2). Dabei wurde der Abstand zwischen Knorpel und Defekt an mindestens 7 Stellen, gleichmässig verteilt über das gesamte Bild, gemessen und ein Durchschnittswert errechnet.

3.7.3 Histologische Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach einem modifizierten⁸⁵ HHGS (histological-histochemical-grading-system, Mankin- System), dargestellt in Tab.3. Dieses System wurde auf zwei Gesichtsfelder des Mikroskops angewendet und danach die Werte addiert.

Tabelle 3 : HHGS zur Knorpelbeurteilung

I	Struktur	Grad
	a. normal	0
	b. Oberfläche unregelmässig	1
	c. Pannus und Oberfläche unregelmässig	2
	d. Spalt bis in die Übergangsschicht	3
	e. Spalt bis in die Radialschicht	4
	f. Spalt bis in die kalzifizierte Schicht	5
	g. totale Disorganisation	6
II	Zellen	Grad
	a. normal	0
	b. diffuser Zellreichtum	1
	c. Clusters	2
	d. Zellarmut	3
III	Toluidin O-Färbung	Grad
	a. normal	0
	b. Färbung leicht reduziert	1
	c. Färbung mittelgradig reduziert	2
	d. Färbung stark reduziert	3
	e. keine Färbung sichtbar	4
IV	Integrität der Grenzlinie (Tidemark)	Grad
	a. intakt	0
	b. mit Blutgefässen durchbrochen	1
V	Zellen im kalzifizierten Knorpel	Grad
	c. Zellen vorhanden	0
	d. keine Zellen im kalzifizierten Knorpel	1

Dieses System wurde auf zwei Gesichtsfelder des Mikroskops angewendet und danach die Werte addiert.

3.7.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte mittels eines Computerprogrammes (SPSS, Version 11 für Mac OS X, 2006, SPSS Inc. ®, Chicago, USA). Die Ergebnisse der Scoresysteme und der biochemischen Untersuchung wurden mit dem faktoriellen Anova-Test analysiert. Dabei galt ein p-Wert von <0,05 als statistisch signifikant.

4. Resultate

4.1. Operationen

Die Operationen verliefen bei allen 18 Schafen erfolgreich. Dabei stellte sich die Herstellung des exakt standardisierten Defekts schwieriger als erwartet dar. Einen bedeutenden Einfluss spielte dabei einerseits die Lagerung des Versuchstiers, welche nicht immer gleich gewählt werden konnte, andererseits auch die Wahl des Instruments zur Herstellung des Defektes im subchondralen Knochen. Das verwendete Osteotom erwies sich zwar in den vorangegangenen Versuchen als brauchbar, allerdings konnte, speziell an den Defekträndern, nicht immer ein exakt gleicher Defekt erzeugt werden. Das galt vor allem für die Richtung in die Tiefe des Defektes. Auch bei genauer Positionierung des Osteotoms auf der kortikalen Oberfläche, war eine genaue Führung des Instrumentes in die Tiefe nicht immer möglich, da im relativ harten subchondralen Knochen die schräg angeschliffene Instrumentenspitze zum Teil von der Originalrichtung abgeleitet und nicht ganz parallel zur Knorpeloberfläche geführt wurde. Somit liess sich auf diese Weise nicht immer der gleiche Abstand zur Knorpeloberfläche einhalten. Die Höhe und Breite des Defektes konnten durch das Template und die Vorbohrung mit den Kirschner Drähten sehr gut standardisiert werden.

Das Einbringen des autologen Knochens und des Endobon® war problemlos möglich.

4.2 Postoperative Phase

Grössere Komplikationen waren nicht zu verzeichnen, bei allen Schafen war postoperativ eine leichte Lahmheit der operierten Gliedmasse (etwa Grad 2 von 5) zu beobachten, die jedoch im Laufe der nächsten 4 Tage vollständig verschwand. Eine lokale Schwellung und leichte Hämatombildung an der Stelle des operativen Zugangs waren ebenfalls zu beobachten. Diese blieben bei den Schafen der 2- Wochen-Gruppe bis zur Schlachtung erhalten, bei den anderen Schafen bildeten sie sich erwartungsgemäss ohne Behandlung zurück.

4.3 Schlachtung und makroskopische Auswertung

Bei der Schlachtung und Präparation der Knochen fiel bei allen Schafen der 2-Wochen-Gruppe eine blutige Infiltrierung der Haut über dem Defekt auf. Der Defekt selbst war bei den Schafen der 2-Wochen –Gruppe noch deutlich sichtbar, bei den Schafen der 2-Monats-Gruppe mit Endobon® ebenfalls, bei den Schafen der 2-Monats-Gruppe mit autologem Knochen erheblich weniger. Bei Eröffnung des Gelenks zeigte sich die Synovialmembran weitgehend unversehrt, es war weder eine stark vermehrte Menge Synovialflüssigkeit noch eine blutige Infiltration der Synovialflüssigkeit der operierten Seiten zu beobachten. Die Synovialflüssigkeit war in Menge und Konsistenz vergleichbar der Synovialflüssigkeit der jeweiligen Kontrollseiten, unabhängig vom verwendeten Knochenersatz.

4.4 Makroskopische Beurteilung des Knorpels

4.4.1 Deskriptive Bewertung des Knorpels

Bei der Beurteilung nach der Schlachtung zeigte sich bei allen Tieren deutlich ein Unterschied zwischen Op-Seite und Kontrollseite. Während die Kontrollseite in allen Fällen unverändert erschien, gab es bei der Op- Seite oberhalb des Defekts verschiedene, makroskopisch sichtbare Veränderungen. Dazu zählten Risse, Defibrillation und bei einem Tier (Nr. 2113) sogar ein sichtbarer Einbruch des Knorpels bis auf den subchondralen Knochen. Diese Befunde wurden mit dem System nach Outerbridge bewertet.

4.4.2 Auswertung nach Outerbridge

Die makroskopische Auswertung der einzelnen Proben nach dem System von Outerbridge ist aus den Tabellen 3 und 4 im Anhang I ersichtlich.

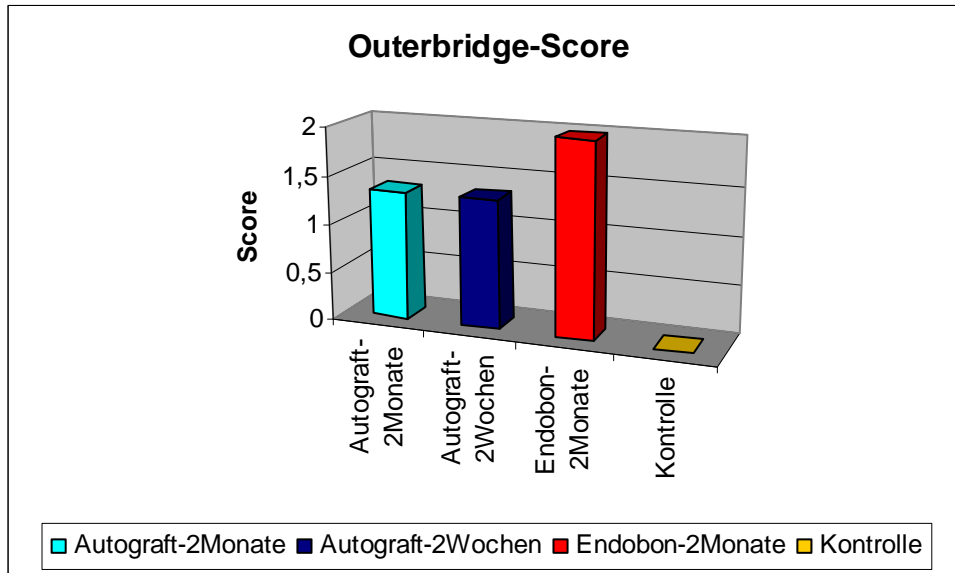


Abb. 3: Graphische Darstellung der Medianwerte der Auswertung der Knorpelproben nach dem Outerbridge- Score, Messwerte und Standardabweichungen dokumentiert in Tab. 3 und 4, Anhang I

Der Mittelwert der beobachteten Veränderungen des Knorpels, bewertet nach dem System von Outerbridge, ergab deutliche Unterschiede. Dabei stellt ein höherer Wert jeweils die deutlichere Veränderung dar. Die Veränderungen zeigten sich am deutlichsten bei der Gruppe mit dem Hydroxyapatit Endobon® nach 2 Monaten. Die beiden Gruppen, bei denen Autografts verwendet wurden, wiesen unabhängig von der Zeit den gleichen Wert für die makroskopisch sichtbaren Veränderungen auf. Zwischen den einzelnen Implantatmaterialien konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede im Bezug auf die makroskopisch nach der Schlachtung feststellbaren Veränderungen festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zeigten sich allerdings zwischen den operierten Seiten und den jeweiligen als standardisiert angenommenen Kontrollseiten ($p < 0,000$).

4.5. Histologische Auswertung

4.5.1 Histologische Auswertung nach Mankin

Die Aufschlüsselung der einzelnen Scores ist aus Tabellen 5 und 6 im Anhang I ersichtlich.

Bei der statistischen Auswertung wurden folgende Resultate erzielt:

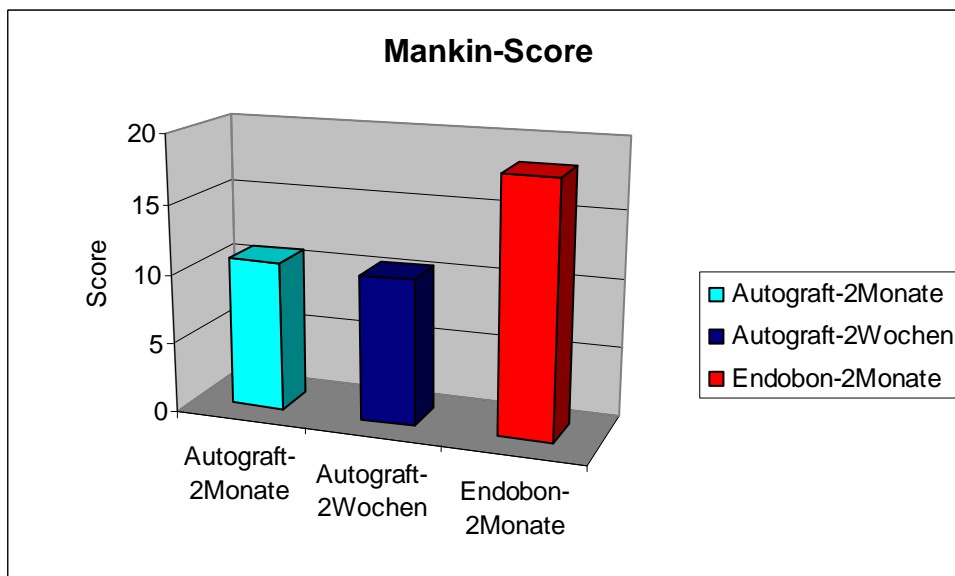


Abb. 4: Graphische Darstellung der Medianwerte der histologischen Auswertung der Knorpelproben nach dem Mankin-Score, Messwerte und Standardabweichungen dokumentiert in Tab. 5 und 6, Anhang I

Die Auswertung der Histologieschnitte nach dem System von Mankin zeigt eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Dabei ist zu beachten, dass auf eine Evaluierung der Kontrollseiten verzichtet wurde, da bei den untersuchten Kontrollseiten keine Knorpelveränderungen gefunden und damit ein standardisierter Knorpel als Kontrolle angenommen wurde. Auch beim Mankin-Score bedeutet der jeweils höhere Wert eine stärkere Veränderung. Die deutlichsten Knorpelveränderungen waren wiederum in der Gruppe mit Endobon® zu beobachten, gefolgt von der 2-Monats-Gruppe, bei der autologer Knochen verwendet wurde und der Autograft-Gruppe nach 2 Wochen. Zu finden waren, wie in den Tabellen 5 bis 8 in Anhang I beschrieben, Strukturveränderungen, Zellveränderungen, Veränderungen in der Anfärbbarkeit des Knorpels sowie eine veränderte Integrität der Grenzlinie. Auch der Zellgehalt im kalzifizierten Knorpel wies Veränderungen auf, die im Folgenden beschrieben werden.

Ein signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen den einzelnen Implantaten konnte nicht erzielt werden. Dabei ist vor allem die relativ hohe Standardabweichung des Gesamtscores von 10,405 innerhalb der Endobon®- Gruppe zu beachten. Bei der Aufschlüsselung nach den jeweiligen Einzelkriterien des Scoresystems konnten die Unterschiede besser sichtbar gemacht werden. Der Vergleich der Werte für die Strukturveränderungen (Abb.5) ergab nahezu signifikante Werte ($p=0,053$), indem die Endobon®- Gruppe die höchsten Werte und damit Degeneration der Knorpeloberfläche aufwies.

Die am deutlichsten feststellbaren Unterschiede bestanden zwischen der 2-Wochen- Gruppe mit Autograft und der Gruppe, bei welcher Endobon® verwendet wurde ($p=0,059$).

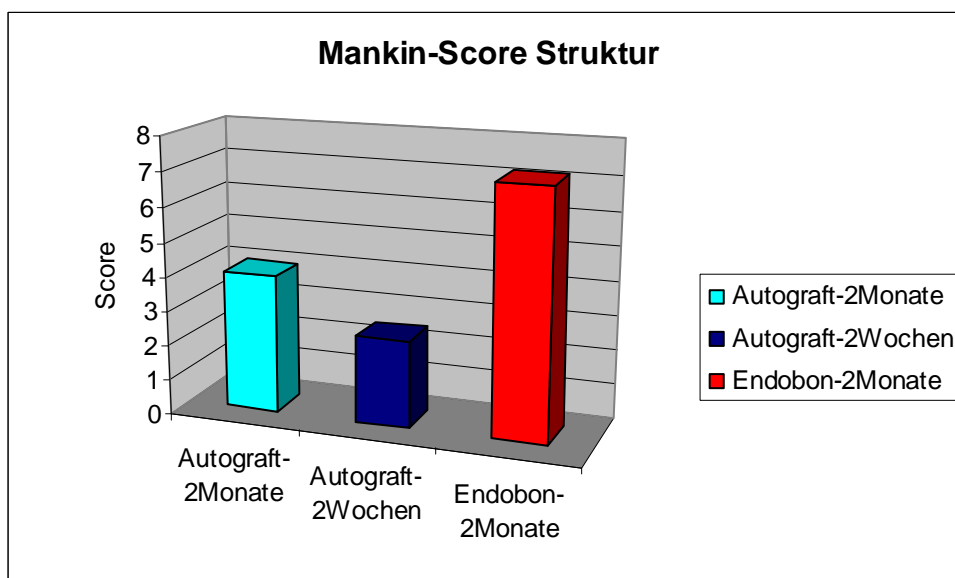


Abb. 5 : Graphische Darstellung der Medianwerte der histologischen Auswertung der Knorpelproben nach dem Mankin- Teilscore Struktur, Messwerte und Standardabweichungen dokumentiert in Tab. 5 und 6, Anhang I

Ein statistisch signifikanter Wert konnte für die Auswertung der Zellveränderungen im kalzifizierten Knorpel erreicht werden. Dabei wies die Gruppe, bei der Endobon verwendet wurde, die stärkste Verminderung der Zellzahl auf, gefolgt von der Gruppe mit Autograft nach 2 Wochen. Die geringsten Veränderungen wies die Autograft- Gruppe nach 2 Monaten auf. Bei den Autografts nach 2 Monaten und Endobon® zeigten sich dabei die deutlichsten, statistisch signifikanten Unterschiede ($p= 0,015$).

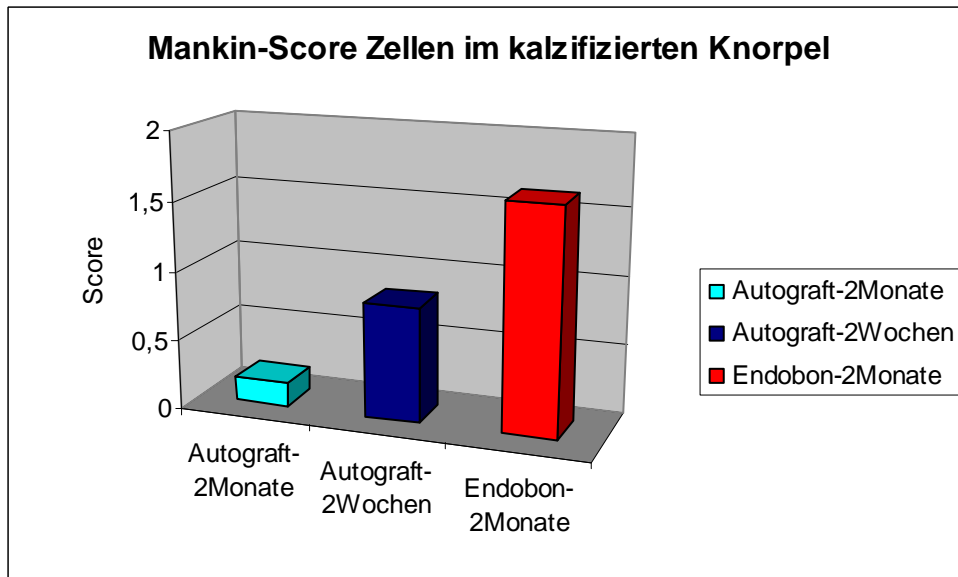


Abb. 6 : Graphische Darstellung der Medianwerte der histologischen Auswertung der Knorpelproben nach dem Mankin- Teilscore Zellen im kalzifizierten Knorpel, Messwerte und Standardabweichungen dokumentiert in Tab. 5 und 6, Anhang I

4.6 Auswertung nach biochemischen Parametern und Regulierung der mRNA

Die effektiven Messwerte sind in Tabellen 9 bis 14 im Anhang I dokumentiert.

4.6.1 Messung Proteoglykan

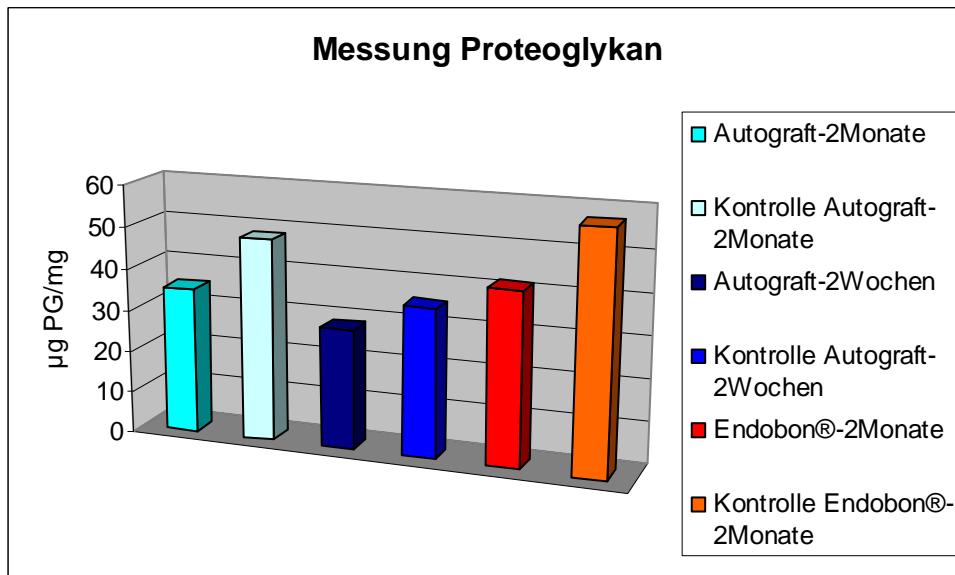


Abb. 7: Graphische Darstellung der Medianwerte der Proteoglykan-Messwerte, Messwerte und Standardabweichungen dokumentiert in Tab. 11 und 12, Anhang I

Für die Bestimmung des PG (Abb.7) war gesamthaft ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das verwendete Implantat nachweisbar ($p=0,025$). Auch zeigten sich die Werte der jeweiligen Kontrollseiten immer erhöht im Vergleich zu den OP-Seiten. Bei der Aufschlüsselung der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wies der Vergleich zwischen der Gruppe mit Autograft nach 2 Wochen und der Gruppe mit Endobon® nach 2 Monaten eine starke Tendenz auf ($p=0,066$).

4.6.2 Messung Kollagen

Die Kollagenmessung sowohl von Kontrollen wie auch dem Knorpel der operierten Extremität zeigte keinen statistisch signifikanten und damit nur schwierig verwertbaren Unterschied zwischen den einzelnen Testgruppen. Die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen waren durchweg recht hoch und unterschiedlich. Nichts desto trotz war eine

Tendenz nachweisbar, dass die Gruppe mit Endobon® nach 2 Monaten wiederum die höchsten Werte aufwies, gefolgt von der Gruppe mit Autografts nach 2 Monaten. Die tiefsten Mittelwerte zeigten die Autografts nach 2 Wochen, wobei durch die grosse Standardabweichung dieser Wert mit Vorsicht zu interpretieren ist.

4.6.3 PCR- Messungen

Die Messungen der MMPs und Enzyme (iNos, Cox-2, IL-1 und IL-6) stiessen auf technische Probleme. Die mittels quantitativer Real Time Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmten Werte, welche die Zahl der Zyklen (CT) angaben, bevor die Detektion der entsprechenden Moleküle möglich war, zeigten insgesamt sehr hohe Zahlen für die CT- Zyklen auf. Das galt auch für das interne House-keeping Gene, GAPDH, welches als Kontrollwert bestimmt wurde und durchweg über 30 Zyklen lag. Die Normalwerte von GAPDH-CT für Knorpelgewebe liegen in unserem Labor zwischen 21-24 CT.

Für die Bestimmungen von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 traten keinerlei statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Ebenfalls war keine Signifikanz in den Messungen von Il-1b und Il-6 und iNOS sowie Cox-2 im Bezug auf die verwendeten Materialien zu erzielen.

Deutliche Unterschiede wies die Messung der Mittelwerte der GAPDH-CT zwischen den verschiedenen Gruppen auf ($p=0,016$). Bei Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander lässt sich diese Signifikanz allerdings nicht nachweisen.

4.7 Distanzen

Die mittels Abstandsmessung bestimmten Mittelwerte der Distanzen zwischen Knorpel und Defekt (Anhang I, Tabelle 7) bewegten sich etwa im vorher festgelegten Bereich von 4 Millimeter. Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

4.8 Korrelationen

Eine negative Korrelation zwischen der Distanz von Defekt zu Knorpel und den Knorpelveränderungen, bestimmt mit dem Mankin-Score, war signifikant nachweisbar ($p=0,037$). Diese signifikante Korrelation erschien auch in den Teilbereichen des Scoresystems, so bei den zellulären Veränderungen ($p=0,048$) und der Anfärbarkeit der Zellen ($p=0,012$). Zwischen der Distanz und dem Teilscore der Zellen im kalzifizierten Knorpel wurde der statistisch signifikante Zusammenhang nur knapp verfehlt ($p=0,056$).

Eine negative Korrelation bestand ebenfalls zwischen Distanz und dem Grad der makroskopisch auswertbaren Knorpelschädigung, allerdings nicht im statistisch signifikanten Bereich.

Zwischen Distanz und Veränderungen bei biochemischen Parametern sowie zellulären Markern (PG, Kollagen, MMPs, ILs) konnte eine positive Tendenz zwar hergestellt, aber nicht signifikant bewiesen werden.

Die makroskopisch sichtbaren Knorpelveränderungen, bewertet nach dem System von Outerbridge, und die mikroskopisch registrierten Knorpelschäden standen deutlich signifikant positiv im Zusammenhang ($p=0,021$).

Die Auswertung im Bezug auf einen Zusammenhang zwischen der während des Versuchs vergangenen Zeit und den festgestellten Knorpelveränderungen zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Zeit und der Messung von PG ($p=0,015$), GAPDH ($p=0,030$), Cox-2 ($p=0,028$) sowie MMP-3 ($p=0,029$). Diese Werte korrelierten alle positiv.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang von definierten Defekten im subchondralen Knochen ohne direkte mechanische Schädigung des darüber liegenden Knorpels auf die Integrität des Gelenkknorpels untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Abstand des Defekts im subchondralen Knochen vom Knorpel eine Rolle in der Knorpelschädigung spielt. Ebenfalls konnte ein Einfluss des verwendeten Materials zur Defektfüllung auf den Knorpel und den Grad der Knorpelschädigung aufgezeigt werden. So wurden die deutlichsten Veränderungen bei den mit Endobon® gefüllten Defekten im Vergleich zu den Autografts gefunden.

5.1. Versuchsmodell

Das Schaf erwies sich als geeignet für dieses Versuchsmodell. In verschiedenen Arbeiten ist seine Knochen- und Knorpelheilung ausreichend untersucht worden^{86, 87}. Es bietet als entwicklungsgeschichtlich hochstehendes Tier den Vorteil, dass eine Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf den Menschen möglich ist⁶. Die Tiere tolerierten den Eingriff sehr gut. Während nach 2 Wochen noch eine leichte Schwellung über dem Defekt und eine kurzfristige Lahmheit beobachtet werden konnte, war nach 2 Monaten, unabhängig vom verwendeten Material zur Defektfüllung, keine postoperative Schwellung oder Ähnliches mehr zu bemerken.

5.2. Operationen und Verlauf

Der Ablauf der Operationen war bei allen Tieren komplikationslos und erfolgreich. Dabei stellte sich die genaue Herstellung des Defekts als die eigentliche Herausforderung dar, da der Defekt erst vormarkiert, dann ausgebohrt und mit einem Osteotom ausgemeißelt wurde. Da diese Methode teilweise besonders an den Defekträndern zu fehlerhaften Stellen führte, sollte sie in einer späteren Studie erneut überprüft werden. Als Alternative bietet sich hierbei der Einsatz von Er:Yag- Laser an. Ein deutlicher Vorteil dieser neuen Technik wäre der exakt zu gestaltende Defekt sowie die geringeren negativen Effekte auf die Knochenheilung⁸⁸. Als weitere Alternative bietet sich der Einsatz eines sogenannten Piezoelektrischen Skalpell an, welches nach Erfahrungen aus anderen Studien und einem Folgeprojekt eine bessere

Handhabbarkeit aufweist⁸⁹. Als weitere Herausforderung erwies sich die Einhaltung des vorher definierten Abstandes vom Defektrand zum Knorpel, die trotz Einsatzes einer Schablone nicht exakt bei allen Tieren, auch aus Gründen der bei biologischen Objekten vorhandenen Varianz, eingehalten werden konnte. Für die Variabilität war vor allem die nicht immer exakte Schnittführung mit dem Osteotom, dessen Weg durch den subchondralen Knochen nicht immer einhundertprozentig genau manipuliert werden konnte, verantwortlich. Auch hierfür könnte der Gebrauch eines Lasers im Zusammenhang mit Computer- oder Robotergesteuerten Kontrollmechanismen Abhilfe schaffen. Allein schon die Verwendung eines Piezoelektrischen Skalpells würde die Situation deutlich verbessern, da durch die optimale Handhabung des Instrumentariums eine feinere Schnittführung möglich sein würde. Auch wenn die Schnitttechnik optimiert werden könnte, so verlief die weitere Heilung des Defekts bei allen Schafen ohne nennenswerte Probleme und trotz der Variabilität konnten doch deutliche Korrelationen zwischen dem Abstand des Knochendefektes zum darüber liegenden Gelenkknorpel und dessen Degeneration als Folge dieses Defektes gefunden werden.

5.3 Probenaufbereitung- und auswertung

Die Probengewinnung verlief ohne Komplikationen. Allerdings konnte nicht für alle Proben die vor allem für die Untersuchung mittels PCR wichtige genau gleiche Zeitspanne bis zum Tiefgefrieren eingehalten werden, da jeweils 3 Tiere gleichzeitig geschlachtet und erst anschliessend die Proben gewonnen wurden. Die Extremitäten wurden zwar sofort abgetrennt, in Plastiksäcke eingewickelt und in den Kühlraum bei 4°C gelegt, doch bis die Knochenprobe der letzten Extremität nach dem Röntgen mit dem Faxitron gewonnen und tiefgefroren werden konnte, verging eine Zeitspanne von etwa 2 Stunden. Es könnte möglich sein, dass dadurch endogene RNAsen bereits einen Teil der mRNA abgebaut hatten. Dazu kam, dass eventuell auch eine zu geringe Menge an Probenmaterial für die PCR- Routine gewonnen werden konnte, so dass noch eine genügend grosse Knochen- bzw. Knorpelprobe zur histologischen Verarbeitung übrig blieb. Beides könnte dafür verantwortlich sein, dass eine zuverlässige Auswertung der mRNA- Proben fraglich war beziehungsweise die CT- Werte so hoch wurden, dass eine Auswertung nicht mehr möglich war. Auffällig war jedoch auch, dass

diese Probleme vor allem bei der Gruppe mit Hydroxyapatit festgestellt wurden. Inwiefern eine besondere Reaktion des Knochensatzstoffes dies beeinflusste, war nicht zu klären.

So wäre zum Beispiel denkbar, dass es Absorptionsprobleme der RNA an das Hydroxyapatit gab, welches ein Herauslösen mit den üblichen Methoden der RNA- Gewinnung nicht erlaubte. Von früheren Versuchen in unserem Labor ist uns bekannt, dass die Gewinnung von RNA schon aus normalen Knochen von Schafen grosse Probleme bereiten kann⁸².

Bei der Auswertung ergab sich ein Problem bei der 2- Monatsgruppe, bei der autologer Knochen angewendet wurde. Hier war der eigentliche Defekt nur noch schwer vom umgebenden Knochen zu unterscheiden, was dazu führte, dass einige Schnitte mehrfach angefertigt werden mussten. Auch wenn die Defektgrenze nicht mehr deutlich sichtbar war, so konnte doch anhand der Remodelingaktivitäten des Knochens die ursprüngliche Grenzlinie in den meisten Fällen schliesslich identifiziert werden.

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Deskriptive Auswertung

Die makroskopischen Befunde bei der Schlachtung ergaben deutlich den Hinweis, dass eine direkte Schädigung des Gelenks nicht vorhanden war. Die Synovialmembran war nicht zerstört, auch zeigte sich die Synovialflüssigkeit weitgehend unverändert und frei von blutiger Infiltration. Damit konnte eine entzündliche Reaktion, allein bedingt durch die vorangegangene Operation, oder auch eine direkte Schädigung des Gelenks ausgeschlossen werden.

5.4.2 Auswertung nach Outerbridge

Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Gruppen Unterschiede in der Ausprägung von makroskopisch sichtbaren Knorpelveränderungen aufwiesen. Der Knorpel über dem Defekt war in jedem Fall bei den operierten Tieren verändert. Die Knorpelveränderungen zeigten sich, wie in der Arbeitshypothese angenommen, am deutlichsten bei den Tieren, bei denen zur Defektfüllung Hydroxyapatit verwendet wurde. Sie waren aber auch bei allen anderen Versuchstieren leicht feststellbar. Zum Vergleich wurde hier ein standardisierter unveränderter Knorpel der jeweils kontralateralen Extremität herangezogen. Knorpel- und

Knochenproben der Kontrollseite wurde für die PCR- Messung gewonnen und diente zur internen Standardisierung. Auf die histologische Auswertung des Knorpels und Knochen der Kontrollseiten wurde jedoch verzichtet. Der hohe Kosten- und Arbeitsaufwand bei der Verarbeitung von nicht dekalzifizierten Knochenproben und das eigentliche Interesse am Vergleich der beiden Versuchsgruppen liess einen solchen Aufwand nicht gerechtfertigt erscheinen.

5.4.3 Auswertung nach Mankin und Bewertung der histologischen Befunde

Die mikroskopisch sichtbaren und klassifizierbaren Knorpelveränderungen ergaben den deutlichsten Beweis für die verwendete Arbeitshypothese. Auch hier waren Veränderungen im Sinne von Osteoarthritis des Knorpels über dem Defekt in allen Fällen zu beobachten. Dies war in unterschiedlicher Ausprägung sichtbar. Aufzufinden waren Veränderungen, die den verschiedenen Kriterien von Tabelle 3 entsprachen. Der Gesamtscore ergab zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, allgemein wiesen aber die Defekte, welche mit Endobon® gefüllt wurden, den höheren Mankin- Score im Vergleich zu den mit Autograft gefüllten Defekten auf, also die deutlich stärkeren Veränderungen. Hierbei ist aber eine sehr hohe Standardabweichung innerhalb der Gruppe mit Endobon® zu beachten. Für diese Unterschiede können mehrere Gründe verantwortlich gemacht werden. Die Annahme, dass es durch die Verwendung von autologem Knochen zu einer schnelleren Blutversorgung und Zellproliferation im Vergleich zur Verwendung eines synthetischen Hydroxyapatits kommt, scheint sich zu bewahrheiten. Der Weg der Knorpelernährung über den darunter liegenden Knochen, wie von verschiedenen Autoren vermutet⁶³, kann mit diesen Ergebnissen untermauert werden, da bekanntlich die Revaskularisierung im autologen Knochen der von Endobon® überlegen ist⁹⁰. Dafür spricht nicht zuletzt auch die verminderte Zellzahl im Bereich der kalzifizierten Knorpelzone. Da der Knorpel selbst zum Zeitpunkt der Operation nie geschädigt wurde, kann diese Verminderung nur durch eine unterbrochene Zufuhr entweder von wichtigen Ernährungsstoffen für die Zellen und /oder etwa gar durch eine verminderte Proliferation von sich differenzierenden Mesenchymalzellen aus dem subchondralen Knochen erklären. Für die letztere Theorie spricht vor allem die Tatsache, dass bei vollständigen Knorpeldefekten die Zellen zur Reparation ebenfalls aus dem subchondralen Knochen stammen. Diese Eigenschaft wird auch therapeutisch bei der sogenannten Microfracture Technik⁹¹ erfolgreich genutzt. Der Schluss, dass auch beim gesunden Knorpel eine kontinuierliche Regeneration analog des Knochenmodelings von der subchondralen Knochenplatte aus erfolgt, mag etwas deutlicher in den Bereich der realen Möglichkeiten

gerückt sein. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden schon früher bei der Untersuchung bei Knochenersatz mit photooxidierten osteochondralen Transplantaten, die ebenfalls in unserem Labor durchgeführt wurden, gezogen. Auch dort wurde eine Repopulation der primär toten Transplantate mit Zellen aus der subchondralen Knochenplatte und im Falle der Mosaicplasty sogar aus dem Pannus nachgewiesen. In allen Fällen wurde postuliert, dass die photooxidierten Transplantate nach dem Prinzip der „Tissue Guided Regeneration“ und identisch mit dem Knochen durch „Creeping Substitution“⁹² ersetzt wurden. Deutlicher belegen die Resultate auch die Annahme, dass unterschiedliche mechanische Eigenschaften der subchondralen Knochenplatte zu verschiedenen starken Knorpelveränderungen führen²⁹. Die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der verwendeten Hydroxyapatitkeramik und von autologem Knochen sind hinreichend untersucht worden^{70,93}. Dabei ist davon auszugehen, dass die autologe Knochenspongiosa aufgrund der Zerkleinerung der Knochenstücke und der trabekulären Eigenschaften letztlich elastischer auf die mechanische Belastung reagierten als die relativ harten Granula des Endobon®. Ähnliche Ergebnisse wurden schon in früheren Versuchen mit Phosphatkeramiken im subchondralen Knochen bei Pferden erzielt. Dort erlaubte der Einsatz von Hydroxyapatitblöcken keine funktionelle Knorpelreparation im Gegensatz zu den brüchigeren, deutlich schneller resorbierbaren und damit letztendlich weicheren bzw. im Effekt elastischeren Tricalciumphosphatblöcken⁹⁴. Es ist also trotz der verpassten Signifikanz in diesem Bereich davon auszugehen, dass die veränderten Belastungsverhältnisse, das heisst eine erhöhte Steifigkeit durch Hydroxyapatite Granula im subchondralen Knochen, in unserem Versuch schliesslich die verstärkten Knorpelveränderungen bewirkten. Dies wurde in nachfolgenden Untersuchungen mit Seidenmatrices, die zwar widerstandsfähig jedoch deutlich elastischer sind, im gleichen Tiermodell weitgehend bestätigt. Trotz deutlich verringertem Abstand des subchondralen Knochendefektes von der Knorpeloberfläche waren die Knorpelveränderungen weniger deutlich als bei den Endobon® Granula und eher vergleichbar mit den Ergebnissen der autologen Knochengrafts (Publikation in Vorbereitung).

Die Unterschiede im Mankin-Score zwischen den beiden Autograft- Gruppen im Zeitverlauf sind statistisch zwar nicht aussagekräftig, jedoch ist zu beachten, dass keine Verschlechterung der Knorpelsituation eingetreten ist. Also ist entweder davon auszugehen, dass der Einfluss der vergangenen Zeit auf die Ausprägung des Knorpeldefekts keine bedeutende Rolle spielt oder es innerhalb der vergangenen Zeit zwischen 2 Wochen und 2 Monaten zu Reparations- oder Regenerationvorgängen am Knorpel kommt. Dies ist als wahrscheinlicher anzunehmen, da wir, wie nachfolgend beschrieben, die am stärksten messbaren Veränderungen im

kalzifizierten Knorpel finden. Damit können die gefundenen Defekte der kalzifizierten Knorpelzone wie Defekte eingeordnet werden, welche die gesamte Dicke des Knorpels umfassen (so genannte “full thickness defects“). Von diesen Defekten ist bekannt, dass sie durch intrinsische Aktivitäten, ausgehend von der Zone des kalzifizierten Knorpels, das Potential zur Knorpelregeneration haben^{95, 96}. Auch diese Resultate unterstützen unsere Arbeitshypothese, dass Knorpel vom subchondralen Knochen ausgehend remodeliert und regeneriert werden kann.

Bei der Aufschlüsselung der einzelnen Parameter innerhalb des Scoresystems werden die vorher beschriebenen Tendenzen deutlicher. Es zeigt sich, dass der Wert für die Zellen im kalzifizierten Knorpel einen signifikanten Unterschied zwischen der Autograft- Gruppe und der Endobon®- Gruppe, jeweils nach 2 Monaten, aufweist. Hier zeigt sich damit ein erheblich stärkerer Grad der Veränderung der Knorpelbasis, also der Struktur, die sich räumlich am Nächsten beim Defekt befindet, bei Verwendung eines Hydroxyapatits im Vergleich zu autologem Knochen. Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl Zellzerstörung als auch Zellregeneration im Knorpel vornehmlich von der Knorpelbasis und dem subchondralen Knochen her erfolgen, solange der Knorpel nicht direkt mechanisch geschädigt wird. Verschiedene Reparaturmechanismen spielen bei der Reparation und Regeneration des Knochens eine Rolle⁹⁶. Allerdings haben wir hier keinen der modellhaft beschriebenen Defekte vorliegen, weder einen Defekt, welcher nur den Knorpel betrifft, noch einen Defekt, welcher sowohl Knorpel als auch subchondralen Knochen einbezieht, auch wenn die hier gefundenen Veränderungen diesen “ full thickness defects“ eher ähneln. Allerdings ist nach den vorliegenden Untersuchungen eine Knorpelregeneration, ausgehend von der Knorpeloberfläche⁹⁷ nicht belegbar. Die deutlich aktivere Zone bei den Autografts stellte eindeutig die Bedeutung der Knorpelbasis und der damit verbundenen subchondralen Knochenplatte dar. Anders lässt sich die Zellarmut im Bereich der kalzifizierten Knorpelzone bei der Endobon®- Gruppe nicht erklären. Diese Bedeutung wird weiterhin bei genauer Betrachtung des Mankinscores für die Struktur des Knorpels über dem Defekt unterstrichen. Auch dort ist die Überlegenheit von autologem Knochen gegenüber Endobon® messbar, wobei leider aus oben erwähnten Gründen der Tierzahlen die Signifikanz hier knapp nicht erreicht werden konnte.

5.4.4 Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen

Die mRNA von Cox2, iNOS, Il1b, Il6, MMP1, MMP3 und MMP13 wurden jeweils im Vergleich zur nicht operierten Seite bestimmt. Wie anfangs beschrieben, müssen wegen technischer Probleme die Resultate mit Vorsicht beurteilt werden. Ein statistischer Zusammenhang mit der Ausbildung von Osteoarthritis konnte im Gegensatz zu den makroskopischen und mikroskopischen Knorpelbefunden hier nicht aufgezeigt werden. Bei den Matrixmetalloproteinasen war ein Anstieg im Knorpel der operierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite erwartet worden^{49, 98}. Dies war so nicht feststellbar. MMP1 war nicht im messbaren Bereich vorhanden, MMP 3 zeigt sich uneinheitlich, es ist kein deutlicher Unterschied zwischen OP- Seite und Kontrollseite sichtbar, bei Endobon® weist die Kontrollseite sogar einen etwas höheren Wert als die Op-Seite auf, allerdings bei einer hohen Standardabweichung. Auch die Messung von MMP13 zeigt nicht das erwartete Bild. Nur bei der Gruppe mit Autograft nach 2 Monaten ist eine leichte Erhöhung gegenüber der Kontrollseite festzustellen, die anderen beiden Gruppen bestätigen diese Tendenz aber nicht.

Die Messung von Il1b und Il6 ergab keine verwertbaren Ergebnisse.

iNOS ist wie erwartet etwas niedriger im Knorpel der operierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite, allerdings auch hier im statistisch nicht belegbaren Bereich.

Auch der Nachweis für eine höhere Inflammation durch eine Erhöhung der Cox-2 zwischen OP- Seite und Kontrollseite konnte nicht erbracht werden, diese Werte bewegen sich sowohl für OP- wie auch für Kontrollseite ungefähr im gleichen Bereich.

5.4.5 Nachweis von Kollagen II und Proteoglykan

Ein im vorliegenden Versuch besserer Indikator für das Vorliegen von Reparatur- oder Regenerationsvorgängen war die erhöhte Menge an Kollagen II im Knorpel über dem jeweiligen Defekt, immer im Vergleich zur Kontrollseite⁹⁹. Die Menge des Kollagen II im Knorpel der OP- Seiten ist immer höher als die Menge im Knorpel der Kontrollseite. Allerdings war auch hier, bedingt durch eine sehr hohe Standardabweichung, keine Signifikanz zu erzielen. Dass unter den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede darzustellen waren, ist nicht weiter verwunderlich. Offenbar ist die Tatsache des Bestehens eines Defekts und der damit veränderten zellulären Situation und Ernährungsbasis für die Schädigung des darüber liegenden Knorpels von viel grösserer Bedeutung als das von uns

verwendete Füllmaterial. Immerhin deuten die Resultate darauf hin, dass die Schädigung und die Syntheseaktivität des darüber liegenden Knorpels bei der härteren Endobon®- Unterlage grösser waren als bei der Gruppe der Autografts.

Die Menge an Proteoglykan im Knorpel der OP- Seiten war niedriger als die Menge, welche im Knorpel der Kontrollseiten gemessen wurde. Dies kann als Hinweis auf einen grösseren Verlust beziehungsweise auch eine verminderte Synthese angesehen werden, da sich bei Veränderungen zwar die Synthese, aber auch die Degradierung von Proteoglykanen steigert¹⁰⁰. Im Verlauf von 2 Monaten erhöhte sich der Proteoglykangehalt bei der Gruppe der Autografts wieder, was zumindest auf eine erhöhte Synthese und gewisse Regeneration der Knorpelmatrix hindeutet. Der Proteoglykangehalt kann auch in der Synovialflüssigkeit bestimmt werden, da diese bei Verlust in die Synovia abgegeben werden. Dort sind in unserem Fall keine Messungen durchgeführt worden, was sich als interessant für einen Folgeversuch erweisen könnte, da es Hinweise auf den aktuellen Verlust bzw. auf eine erhöhte Synthese von Proteoglykanen geben würde¹⁰¹.

Abschliessend muss zu den Messungen der mRNA festgehalten werden, dass eine deutliche Herausarbeitung der Ergebnisse durch eine zu geringe Probenmenge und auch durch zeitliche Verzögerungen bei der Probengewinnung erschwert wurden. Auch die Möglichkeit einer Kontamination der Proben ist trotz genauester Einhaltung der Anforderungen an eine gute Laborarbeit nicht in jedem Fall auszuschliessen.

5.5 Korrelationen

Ein Zusammenhang zwischen der Distanz vom Defekt zum Knorpel und der Zerstörung des Knorpels konnte deutlich aufgezeigt werden. Bei Auswertung der mikroskopisch aufgezeichneten Knorpelveränderungen (Mankinscore) ist dies statistisch signifikant nachzuweisen. Damit ist der Teil der Ausgangsthese, auf der diese Arbeit basiert, deutlich zu belegen. Die Knorpelschädigung ist also umso grösser, je näher sich der Defekt am Knorpel befindet, auch wenn der eigentliche Knorpel nicht beschädigt wird. Hier wird der Zusammenhang in einigen Teilbereichen des Scores wie Zellgehalt und Anfärbbarkeit des Knorpels signifikant untermauert.

5.6 Statistik

Da aus tierschützerischen Überlegungen immer eine relativ geringe Tierzahl gewählt wurde, ist in vielen Fällen eine Signifikanz nicht feststellbar oder zumindest knapp verfehlt. Auch wirkt sich eine oft feststellbare hohe Standardabweichung problematisch auf die statistische Auswertung aus. Bei einer höheren Tierzahl wäre davon auszugehen, dass sich gewisse Tendenzen verstärken würden und die Arbeitshypothese noch mit anderen Zahlen zu untermauern wäre. Doch aus ethischen Gründen werden bei der Versuchstierbewilligung die Erhöhungen der Gruppengrößen von den lokalen Behörden zu recht restriktiv gehandhabt. In unserer Studie wäre eine Erhöhung der Tierzahlen zum Zwecke der Statistik vielleicht wünschenswert, jedoch nicht zwingend notwendig gewesen. Dies hätte vielleicht deutlicher Unterschiede zwischen den Gruppen zum Ausdruck gebracht, doch ist in 100% der Fälle bei 18 Tieren bewiesen worden, dass die Schaffung eines subchondralen Defektes ohne primäre Schädigung des Gelenkknorpels zu einer schweren Degeneration des darüber liegenden Knorpels geführt hatte. Auch konnte eine statistisch relevante Korrelation zwischen dem Abstand des Defektes zu dem darüber liegenden Knorpel hergestellt werden. Trotzdem ist auch mit dieser geringen Tierzahl pro Gruppe ein deutliches Ergebnis erzielbar gewesen. Mit einer 100%-igen Erfolgsrate war dem ursprünglichen Ziel der Studie, nämlich die Wichtigkeit der Integrität des subchondralen Knochens für einen gesunden Gelenkknorpel zu beweisen, Genüge getan und eine Erhöhung der Tierzahlen pro Gruppe aus lediglich statistischen unter Vernachlässigung von ethischen Gründen war nicht angebracht.

5.7 Schlussbeurteilung

Es konnte mit dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass der Gelenkknorpel in Folge eines subchondralen Defektes degeneriert, auch wenn der Knorpel nicht direkt mechanisch geschädigt wird. Unterschiedliche Materialien zur Defektfüllung scheinen dabei, bedingt durch verschiedene mechanische Eigenschaften und die Fähigkeit, sich in das umgebende Gewebe zu integrieren, einen unterschiedlichen Einfluss auf den Grad der Knorpeldegeneration zu haben. So erwies sich autologe Spongiosa einem synthetischen Hydroxyapatit(Endobon®) im Hinblick auf die geringeren negativen Auswirkungen auf den Knorpel als überlegen.

Der Abstand zwischen Defekt und Knorpel spielt dabei eine entscheidende Rolle, je geringer der Abstand gewählt wurde, desto stärker degenerierte der Knorpel.

5.8 Zukunftsperspektive

Die in dieser tierexperimentellen Arbeit erzielten Ergebnisse sollten in einer weiterführenden Untersuchung zur Grundlage der Beantwortung einiger sich aus den Resultaten ergebender Fragen und Erkenntnisse genutzt werden.

So ist der Mechanismus, auf welchem die Zerstörung des Knorpels beruht, weiterhin ungeklärt. Ob es sich um eine alleinige Störung der Knorpelernährung handelt oder andere Mechanismen wie Mikrofrakturen im subchondralen Knochen beteiligt sind^{25, 102}, konnte mit dieser Studie nicht abschliessend geklärt werden. Um diese Mechanismen zu untersuchen, bietet sich der Einsatz moderner bildgebender Diagnostikverfahren wie der Einsatz von MRI an. Auch die Möglichkeit einer längerfristigen Evaluierung des Knorpels, zum Beispiel durch arthroskopische Untersuchungen am lebenden Tier, kann dabei genutzt werden. Erstrebenswert wäre auch die Markierung von Mesenchymalzellen im subchondralen Knochen, um deren Migration und möglicher Differenzierung in der kalzifizierten Knorpelzone verfolgen zu können. Das würde möglicherweise abschliessend die Zellverminderung in dieser Zone nach Setzung eines subchondralen Knochendefektes erklären. Entsprechende vorbereitende Arbeiten sind in unserem Labor bereits unternommen worden.

Auch mechanische Messungen, um die auf den Knorpel wirkenden Kraftverhältnisse zu untersuchen, auch um die Theorie der alleinigen Überbelastung des Knorpels als Ursache für seine Degeneration zu entkräften, sollten in einer Folgestudie einbezogen sein.

In der praktischen Anwendung kann schon jetzt gesagt werden, dass bei Verwendung von Knochenersatzstoffen nicht nur der umgebende Knochen und die Auswirkungen darauf, sondern auch der Knorpel und seine Integrität zu beachten sind.

6. Referenzen

1. von Rechenberg, B., *Bone Grafts and Replacement*, in Auer, Stick, *Equine Surgery*. 1999. p. 639- 643.
2. von Rechenberg, B., et al., *The use of photooxidized, mushroom-structured osteochondral grafts for cartilage resurfacing--a comparison to photooxidized cylindrical grafts in an experimental study in sheep*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12(3): p. 201-16.
3. Caron, J.P., *Synovial Joint Biology and Pathobiology*, in Auer J.A., Stick J. *Equine Surgery*. 1992, W.B.Saunders. p. 671- 678.
4. Schlueter, A.E. and M.W. Orth, *Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes*. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 2004. 1(4): p. 221-231.
5. Duda, G.N., et al., *Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep*. *J Biomech*, 1998. 31(3): p. 201-10.
6. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S56-65.
7. Allen, M.J., et al., *The surgical anatomy of the stifle joint in sheep*. *Vet Surg*, 1998. 27(6): p. 596-605.
8. von Rechenberg, B., et al., *Changes in subchondral bone in cartilage resurfacing--an experimental study in sheep using different types of osteochondral grafts*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. 11(4): p. 265-77.
9. Schenk, R.K. and H.R. Willenegger, [Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)]. *Unfallheilkunde*, 1977. 80(5): p. 155-60.
10. Mankin, H.J., V. C. Mow, et al., *Articular cartilage structure, composition and function.*, in *Orthopedic basic science : biology and biomechanics of the musculoskeletal system*, T.A.E.a.S.R.S. J. A. Buckwalter, Editor. 2000, American Academy of Orthopaedic Surgeons: Rosemont, Ill. .
11. Buckwalter, J.A., *Articular cartilage*. *Instr Course Lect*, 1983. 32: p. 349-70.
12. Radin, E.L. and I.L. Paul, *A consolidated concept of joint lubrication*. *J Bone Joint Surg Am*, 1972. 54(3): p. 607-13.
13. Swann, D.A., et al., *Role of hyaluronic acid in joint lubrication*. *Ann Rheum Dis*, 1974. 33(4): p. 318-26.
14. Muehleman, C. and C.H. Arsenis, *Articular cartilage. Part I. The normal joint*. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1995. 85(5): p. 277-81.
15. Todhunter, R.J., *Anatomy and Physiology of Synovial Joints*, in *Joint Disease in the Horse*, C.W.T. McIlwraith, G. W., Editor. 1996, W.B.Saunders: Philadelphia, PA. p. 1-28.
16. Eyre, D.R., *Collagens and cartilage matrix homeostasis*. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(427 Suppl): p. S118-22.
17. Vachon, A.M., et al., *Biochemical analysis of normal articular cartilage in horses*. *Am J Vet Res*, 1990. 51(12): p. 1905-11.
18. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. *Arthritis Res*, 2002. 4(1): p. 30-5.
19. Eyre, D.R., M.A. Paz, and P.M. Gallop, *Cross-linking in collagen and elastin*. *Annu Rev Biochem*, 1984. 53: p. 717-48.
20. Repo, R.U. and N. Mitchell, *Collagen synthesis in mature articular cartilage of the rabbit*. *J Bone Joint Surg Br*, 1971. 53(3): p. 541-8.
21. Buckwalter, J.A. and L.C. Rosenberg, *Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein*. *J Biol Chem*, 1982. 257(16): p. 9830-9.

22. *Roughley, P.J. and E.R. Lee, Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. Microsc Res Tech, 1994. 28(5): p. 385-97.*
23. *Imhof, H., et al., Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. Invest Radiol, 2000. 35(10): p. 581-8.*
24. *Milz, S. and R. Putz, Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. J Anat, 1994. 185 (Pt 1): p. 103-10.*
25. *Kawcak, C.E., et al., The role of subchondral bone in joint disease: a review. Equine Vet J, 2001. 33(2): p. 120-6.*
26. *Hvid, I., Mechanical strength of trabecular bone at the knee. Dan Med Bull, 1988. 35(4): p. 345-65.*
27. *Hough, A.J., Pathology of Osteoarthritis, in Arthritis and Allied Conditions : A Textbook of Rheumatology, K. WJ, Editor. 1997, Wilkins & Wilkins: Baltimore. p. 1945.*
28. *Sarzi-Puttini, P., et al., Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. Semin Arthritis Rheum, 2005. 35(1 Suppl 1): p. 1-10.*
29. *Radin, E.L. and R.M. Rose, Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. Clin Orthop Relat Res, 1986(213): p. 34-40.*
30. *Dequeker, J., L. Mokassa, and J. Aerssens, Bone density and osteoarthritis. J Rheumatol Suppl, 1995. 43: p. 98-100.*
31. *Sadowski, T. and J. Steinmeyer, Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 2001. 9(5): p. 407-15.*
32. *Smith, J.B., et al., Occurrence of interleukin-1 in human synovial fluid: detection by RIA, bioassay and presence of bioassay-inhibiting factors. Rheumatol Int, 1989. 9(2): p. 53-8.*
33. *Ruggeri, R., et al., Differential expression of IL-1 and TNF receptors in inflammatory arthritis and osteoarthritis. Boll Soc Ital Biol Sper, 1996. 72(1-2): p. 15-20.*
34. *Morris, E.A., et al., Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. Am J Vet Res, 1990. 51(1): p. 59-64.*
35. *Frean, S.P., et al., Influence of interleukin-1beta and hyaluronan on proteoglycan release from equine navicular hyaline cartilage and fibrocartilage. J Vet Pharmacol Ther, 2000. 23(2): p. 67-72.*
36. *Liacini, A., et al., Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. Exp Cell Res, 2003. 288(1): p. 208-17.*
37. *Kallings, P., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Vet Clin North Am Equine Pract, 1993. 9(3): p. 523-41.*
38. *Hedbom, E. and H.J. Hauselmann, Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. Cell Mol Life Sci, 2002. 59(1): p. 45-53.*
39. *May, S.A., R.E. Hooke, and P. Lees, Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. Res Vet Sci, 1992. 52(3): p. 342-8.*
40. *May, S.A., R.E. Hooke, and P. Lees, Equine chondrocyte activation by a variety of stimuli. Br Vet J, 1992. 148(5): p. 389-97.*
41. *von Rechenberg, B., et al., Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE2) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. Equine Vet J, 2000. 32(2): p. 140-50.*
42. *Hardy, M.M., et al., Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. Arthritis Rheum, 2002. 46(7): p. 1789-803.*

43. Farrell, A.J., et al., Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 1992. 51(11): p. 1219-22.
44. Stadler, J., et al., Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol*, 1991. 147(11): p. 3915-20.
45. Orth, M.W., T.L. Peters, and J.N. Hawkins, Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulphate. *Equine Vet J Suppl*, 2002(34): p. 224-9.
46. Pelletier, J., et al., Reduction in the structural changes of experimental osteoarthritis by a nitric oxide inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. 7(4): p. 416-8.
47. Jones, C.B., D.C. Sane, and D.M. Herrington, Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*, 2003. 59(4): p. 812-23.
48. Dioszegi, M., P. Cannon, and H.E. Van Wart, Vertebrate collagenases. *Methods Enzymol*, 1995. 248: p. 413-31.
49. Dean, D.D., et al., Levels of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol*, 1987. 14 Spec No: p. 43-4.
50. Martel-Pelletier, J. and J.P. Pelletier, Neutral proteases in human osteoarthritic synovium: quantification and characterization. *J Rheumatol*, 1987. 14 Spec No: p. 38-40.
51. Radin, E.L., et al., Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res*, 1984. 2(3): p. 221-34.
52. Burr, D.B. and M. Hooser, Alterations to the en bloc basic fuchsin staining protocol for the demonstration of microdamage produced in vivo. *Bone*, 1995. 17(4): p. 431-3.
53. Mori, S., R. Harruff, and D.B. Burr, Microcracks in articular calcified cartilage of human femoral heads. *Arch Pathol Lab Med*, 1993. 117(2): p. 196-8.
54. Sokoloff, L., Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol Lab Med*, 1993. 117(2): p. 191-5.
55. Lane, L.B. and P.G. Bullough, Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 1980. 62(3): p. 372-5.
56. Burr, D.B. and E.L. Radin, Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthritis? *Rheum Dis Clin North Am*, 2003. 29(4): p. 675-85.
57. Potter, H.G., et al., Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. An evaluation with use of fast-spin-echo imaging. *J Bone Joint Surg Am*, 1998. 80(9): p. 1276-84.
58. Lahm, A., et al., An experimental canine model for subchondral lesions of the knee joint. *Knee*, 2005. 12(1): p. 51-5.
59. Norrdin, R.W., et al., Subchondral bone failure in an equine model of overload arthrosis. *Bone*, 1998. 22(2): p. 133-9.
60. Lahm, A., et al., Articular cartilage degeneration after acute subchondral bone damage: an experimental study in dogs with histopathological grading. *Acta Orthop Scand*, 2004. 75(6): p. 762-7.
61. Duncan, H., et al., The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*, 1987. 69(8): p. 1212-20.
62. Honner, R. and R.C. Thompson, The nutritional pathways of articular cartilage. An autoradiographic study in rabbits using ³⁵S injected intravenously. *J Bone Joint Surg Am*, 1971. 53(4): p. 742-8.
63. Malinin, T. and E.A. Ouellette, Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(6): p. 483-91.

64. Schmitz JP, H.J., *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res.*, 1986. 205: p. 299-308.
65. Moore, W.R., S.E. Graves, and G.I. Bain, *Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg*, 2001. 71(6): p. 354-61.
66. Rueger, J.M., [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]. *Unfallchirurg*, 1996. 99(3): p. 228-36.
67. Rueger, J.M., [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopade*, 1998. 27(2): p. 72-9.
68. Tröster, S.D., *Die Hydroxylapatitkeramik Endobon®- Eine alternative Therapiemöglichkeit für Knochendefekte, in Jahrbuch der Orthopädie 1993, R.u.v.S.-S. Venbrocks, G., Editor. 1993, Biermann Verlag: Zülpich, FRG. p. 230-246.*
69. Bucholz RW, C.A., Holmes R., *Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. Clin Orthop.*, 1989. 240: p. 53-62.
70. Heise, U., J.F. Osborn, and F. Duwe, *Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. Int Orthop*, 1990. 14(3): p. 329-38.
71. Jensen, S.S., et al., *Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. Int J Oral Maxillofac Implants*, 1996. 11(1): p. 55-66.
72. Kleemann, R.U., et al., *Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(11): p. 958-63.
73. Outerbridge, R.E., *The etiology of chondromalacia patellae. J Bone Joint Surg Br*, 1961. 43-B: p. 752-7.
74. Cameron, M.L., K.K. Briggs, and J.R. Steadman, *Reproducibility and reliability of the outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically. Am J Sports Med*, 2003. 31(1): p. 83-6.
75. Mankin, H.J., et al., *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. J Bone Joint Surg Am*, 1971. 53(3): p. 523-37.
76. Kim, H.K., M.E. Moran, and R.B. Salter, *The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. J Bone Joint Surg Am*, 1991. 73(9): p. 1301-15.
77. Ostergaard, K., et al., *Histologic/histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage: reproducibility and validity. Arthritis Rheum*, 1997. 40(10): p. 1766-71.
78. Stegemann, H. and K. Stalder, *Determination of hydroxyproline. Clin Chim Acta*, 1967. 18(2): p. 267-73.
79. Schwartz, D.E., et al., *Quantitative analysis of collagen, protein and DNA in fixed, paraffin-embedded and sectioned tissue. Histochem J*, 1985. 17(6): p. 655-63.
80. Petit, B.e.a. in *40th Annual Meeting, Orthopedic Research Society. 1994.*
81. Schneider-Häfliger, R.C., *Die Knochenheilung unter Berücksichtigung der spontanen Regulation durch Wachstumsfaktoren und Einsatz eines synthetischen Knochenersatzes, in Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich. 2002, Universität Zürich: Zürich.*

82. Leutenegger, C.M., et al., *Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalcified bone tissue embedded in methyl methacrylate*. *Calcif Tissue Int*, 1999. 65(5): p. 378-83.
83. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nat Protoc*, 2006. 1(2): p. 581-5.
84. Martin, I., et al., *Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. 9(2): p. 112-8.
85. Fiechter, R.M.-E., *Am Schafmodell reproduziertes Femoroacetabuläres Impingement, häufigste Ursache der frühen Osteoarthritis beim nichtdysplastischen Hüftgelenk des Menschen*, in *Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Vetsuisse-Fakultät*. 2005, Universität Zürich: Zürich.
86. Waselau, A.C., et al., *The effect of cartilage and bone density of mushroom-shaped, photooxidized, osteochondral transplants: an experimental study on graft performance in sheep using transplants originating from different species*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2005. 6: p. 60.
87. Nuss, K.M., et al., *An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bone*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2006. 7(1): p. 67.
88. Lewandrowski, K.U., et al., *Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in laser and drill osteotomies*. *Lasers Surg Med*, 1996. 19(1): p. 40-5.
89. Hoigne, D.J., et al., *Piezoelectric osteotomy in hand surgery: first experiences with a new technique*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2006. 7: p. 36.
90. Hing, K.A., et al., *Biomechanical assessment of bone ingrowth in porous hydroxyapatite*. *J Mater Sci Mater Med*, 1997. 8(12): p. 731-6.
91. Frisbie, D.D., et al., *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*, 1999. 28(4): p. 242-55.
92. Phemister, D.B., *Repair of bone in the presence of aseptic necrosis resulting from fractures, transplantations, and vascular obstruction*. 1930. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. 87(3): p. 672.
93. Hing, K.A., S.M. Best, and W. Bonfield, *Characterization of porous hydroxyapatite*. *J Mater Sci Mater Med*, 1999. 10(3): p. 135-45.
94. Rose, P.L., et al., *Effect of beta-tricalcium phosphate in surgically created subchondral bone defects in male horses*. *Am J Vet Res*, 1988. 49(3): p. 417-24.
95. Frisbie, D.D., et al., *Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses*. *Am J Sports Med*, 2006. 34(11): p. 1824-31.
96. Redman, S.N., S.F. Oldfield, and C.W. Archer, *Current strategies for articular cartilage repair*. *Eur Cell Mater*, 2005. 9: p. 23-32; discussion 23-32.
97. Dowthwaite, G.P., et al., *The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population*. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 6): p. 889-97.
98. Sabatini, M., et al., *Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(1): p. 171-80.

99. *Lohmander, L.S., Articular cartilage and osteoarthritis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. J Anat, 1994. 184 (Pt 3): p. 477-92.*
100. *Lohmander, L.S., Molecular markers of cartilage turnover. A role in monitoring and diagnosis of osteoarthritis. Articular Cartilage and Osteoarthritis, ed. S. Keattner K, R, Peyron JG, Hascall VC. 1992, New York: Raven Press. 653- 667.*
101. *Tulamo, R.M., et al., Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. Am J Vet Res, 1996. 57(6): p. 932-7.*
102. *Frisbie, D.D., et al., Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. Clin Orthop Relat Res, 2003(407): p. 215-27.*

7. Abbildungen



Abb. 8

Anlegen der Schablone zum Vorbohren der Löcher (Probeoperation)

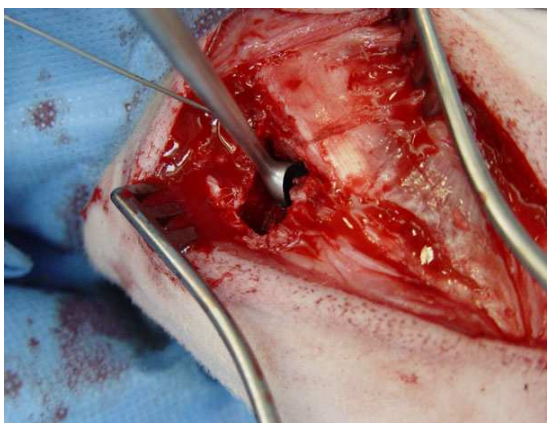


Abb. 9

Endgültige Ausgestaltung des Defekts mittels eines scharfen Löffels



Abb. 10

Einbringen des Knochenersatzmaterials in den Defekt (Endobon®)



Abb. 11

Schwellung und blutige Infiltration um den Defekt, sichtbar bei der Schlachtung nach 2 Wochen

Nr. 2122, 2 Wochen Autograft



Abb. 12

Einbruch des Knorpels bis auf den subchondralen Knochen (Pfeil),

Nr. 2113, Endobon®



Abb. 13

Knorpelveränderung über dem Defekt (Pfeil), deutlich ist der Verlust der glänzenden Knorpeloberfläche, Outerbridge –Score 1, keine Fibrillation oder Kraterbildung, Nr. 2124, 2 Wochen Autograft

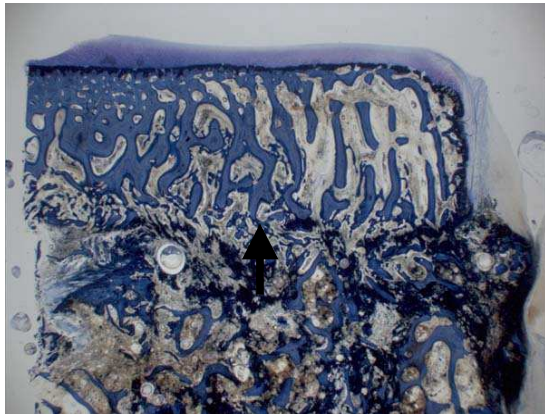


Abb. 14

Autologer Knochen nach 2 Wochen, der Zusammenhang zwischen autologem Implantat und subchondralem Knochen ist erhalten, die Grenze zwischen Implantat und originalem Knochen (Pfeil) ist gut abgrenzbar, der Knorpel erscheint makroskopisch wenig verändert. (Nr. 2122, Autograft); Dickschnitt Färbung: Toluidin Blau

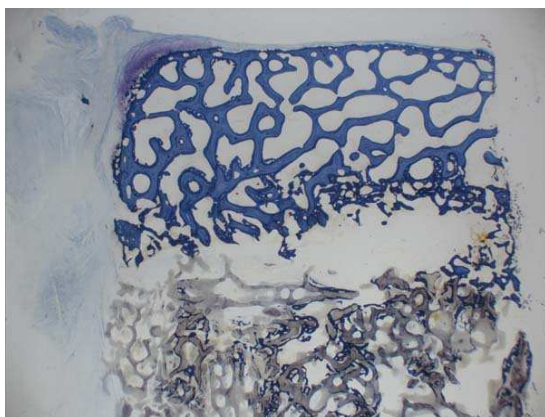


Abb. 15

Endobon® nach 2 Monaten. Hier ist kaum eine Integration des Knochenerstzmaterials sichtbar. Der Knorpel ist stark verändert, zum Teil kaum noch sichtbar. (Nr. 2117, Endobon®) Dickschnitt Färbung: Toluidin Blau

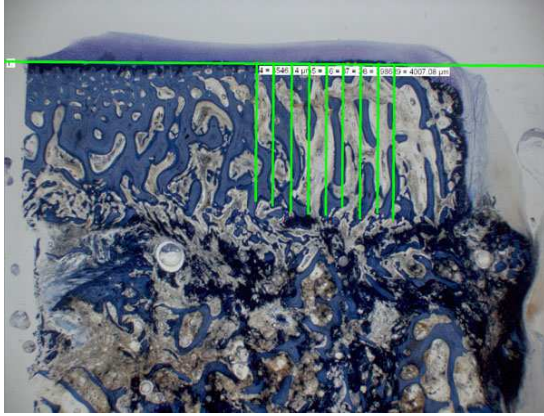


Abb.16

Abstandsmessung zwischen Knorpel und Defekt,

Nr. 2122 Autograft

Dickschnitt

Färbung: Toluidin Blau

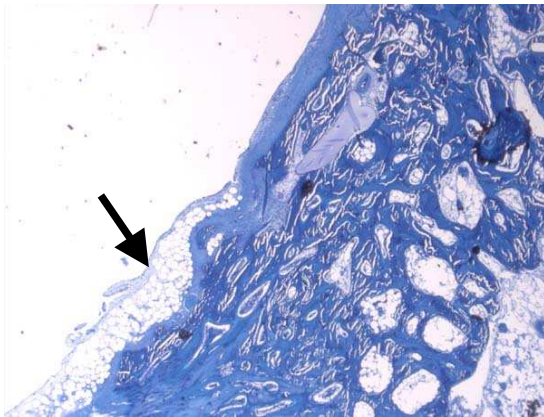


Abb. 17

Endobon® nach 2 Monaten, die Knorpeloberfläche über dem Defekt erscheint aufgelöst, zum Teil sind Knorpelzellen durch

Fettzellen ersetzt (Pfeil). Nr. 2114, Endobon® Dünnschnitt: (x 10)

Färbung: Toluidin Blau



Abb. 18

*Autologer Knochen nach 2 Monaten, die Integrität der Grenzschicht ist nicht mehr vorhanden, die Zone des kalzifizierten Knochens ist durchbrochen (Pfeil), Nr.2107, Autograft
Dünnschnitt
Färbung: Toluidin Blau*

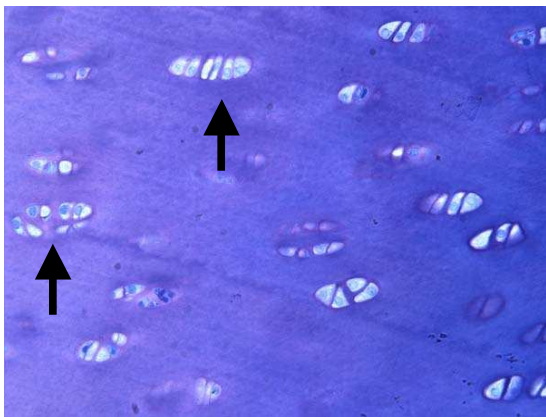


Abb. 19

*Autologer Knochen nach 2 Monaten, deutliche Zusammenlagerung der Knorpelzellen (Pfeile), Clusterbildung, Nr.2108 Autograft
Dünnschnitt
Färbung: Toluidin Blau*

8. Anhang 1:

Tabellen

Tabelle 4: Auswertung nach Outerbridge und Distanz

Nummer	Implantat	Outerbridge	Distanz(mm)
2107	Autograft-2mo	1	4.646,24
2107	auto-control-2mo	0	
2108	Autograft-2mo	2	4.992,75
2108	auto-control-2mo	0	
2109	Autograft-2mo	2	3.173,23
2109	auto-control-2mo	0	
2110	Autograft-2mo	1	3.461,49
2110	auto-control-2mo	0	
2111	Autograft-2mo	1	3.360,55
2111	auto-control-2mo	0	
2112	Autograft-2mo	1	7.492,68
2112	auto-control-2mo	0	
2113	Endobon-2mo	4	2.561,28
2113	Endo-control-2mo	0	
2114	Endobon-2mo	1	3.190,00
2114	Endo-control-2mo	0	
2115	Endobon-2mo	1	7.307,34
2115	Endo-control-2mo	0	
2116	Endobon-2mo	2	4.918,15
2116	Endo-control-2mo	0	
2117	Endobon-2mo	2	4.304,71
2117	Endo-control-2mo	0	
2118	Endobon-2mo	2	3.096,79
2118	Endo-control-2mo	0	
2119	Autograft-2w	1	3.832,21
2119	auto-control-2w	0	
2120	Autograft-2w	1	4.318,38
2120	auto-control-2w	0	
2121	Autograft-2w	2	4.640,75
2121	auto-control-2w	0	
2122	Autograft-2w	1	3.810,64
2122	auto-control-2w	0	
2123	Autograft-2w	2	4.201,93
2123	auto-control-2w	0	
2124	Autograft-2w	1	5.204,66
2124	auto-control-2w	0	

Tabelle 5: Statistische Auswertung Outerbridge –Score und Distanz

Implantat	Outerbridge	Std.D.	Distanz in μm	Std.D. in μm
Auto-2Mo	1,33	0,516	4521,1567	1634,30747
Auto-2Wo	1,33	0,516	4334,7617	528,30413
Endo-2Mo	2,00	1,095	4229,7117	1737,78850
Total	-	-	4361,8767	1330,88455

Tabelle 6: Ergebnisse Mankin- Score

Nummer	Implantat	Mankin	Mstruktur	MZellen	MTol	MTide	MZellenKalzKnorpel
2107	Autograft-2mo	14	5	3	4	2	0
2108	Autograft-2mo	13	5	3	2	2	0
2109	Autograft-2mo	15	3	4	6	2	1
2110	Autograft-2mo	12	6	2	2	2	0
2111	Autograft-2mo	2	0	2	0	0	0
2112	Autograft-2mo	9	5	3	0	1	0
2113	Endobon-2mo	30	12	6	8	2	2
2114	Endobon-2mo	25	12	4	5	2	2
2115	Endobon-2mo	7	4	1	1	1	0
2116	Endobon-2mo	4	0	0	0	2	2
2117	Endobon-2mo	22	7	5	6	2	2
2118	Endobon-2mo	22	8	4	6	2	2
2119	Autograft-2w	12	1	3	4	2	2
2120	Autograft-2w	14	4	3	6	1	0
2121	Autograft-2w	8	3	2	3	0	0
2122	Autograft-2w	8	1	2	1	2	2
2123	Autograft-2w	11	4	2	4	1	0
2124	Autograft-2w	10	2	2	3	2	1

Tabelle 7: Statistische Auswertung der Gesamt Scores nach Mankin

Implantat	Mankin	Std.D.
Auto-2Mo	10,83	4,792
Auto-2Wo	10,50	2,345
Endo-2Mo	18,33	10,405
Total	13,22	7,353

Tabelle 8: Statistische Auswertung nach Mankin –Score Struktur, Zellen und Anfärbbarkeit

Implantat	MStruktur	Std.D.	MZellen	Std.D.	MToluidin	Std.D.
Auto-2Mo	4,00	2,191	2,83	0,753	2,33	2,338
Auto-2Wo	2,50	1,378	2,33	0,516	3,50	1,643
Endo-2Mo	7,17	4,665	3,33	2,338	4,33	3,141
Total	4,56	3,518	2,83	1,425	3,39	2,453

Tabelle 9: Statistische Auswertung nach Mankin –Score Integrität der Grenzschicht und den Zellen im kalzifizierten Knorpel

Implantat	MTidemark	Std.D.	MZellen im kalz. Knorpel	Std.D.
Auto-2Mo	1,50	0,837	0,17	0,408
Auto-2Wo	1,33	0,816	0,83	0,983
Endo-2Mo	1,33	0,408	1,67	0,816
Total	1,56	0,705	0,89	0,963

Tabelle 10: Messwerte biochemische Parameter I

Nummer	Implantat	Cox2	iNOS	IL1b	IL6
2107	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00	45,00
2107	auto-control-2mo	45,00	39,99	45,00	45,00
2108	Autograft-2mo	45,00	40,58	45,00	45,00
2108	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00	45,00
2109	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00	45,00
2109	auto-control-2mo	45,00	40,74	45,00	45,00
2110	Autograft-2mo	37,99	39,64	45,00	45,00
2110	auto-control-2mo	45,00	40,59	45,00	45,00
2111	Autograft-2mo	39,15	38,86	45,00	45,00
2111	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00	45,00
2112	Autograft-2mo	37,71	35,98	45,00	45,00
2112	auto-control-2mo	32,82	33,06	45,00	45,00
2113	Endobon-2mo	35,92	35,65	45,00	45,00
2113	Endo-control-2mo	45,00	45,00	45,00	45,00
2114	Endobon-2mo	45,00	45,00	45,00	45,00
2114	Endo-control-2mo	41,46	41,27	45,00	45,00
2115	Endobon-2mo	43,40	38,55	45,00	45,00
2115	Endo-control-2mo	43,76	38,76	45,00	45,00
2116	Endobon-2mo	43,90	41,58	45,00	45,00
2116	Endo-control-2mo	45,00	40,83	45,00	45,00
2117	Endobon-2mo	42,53	37,88	45,00	45,00
2117	Endo-control-2mo	45,00	39,39	45,00	45,00
2118	Endobon-2mo	45,00	37,17	45,00	45,00
2118	Endo-control-2mo	41,33	34,58	45,00	45,00
2119	Autograft-2w	45,00	40,04	45,00	45,00
2119	auto-control-2w	37,65	40,83	45,00	45,00
2120	Autograft-2w	38,06	40,11	45,00	45,00
2120	auto-control-2w	45,00	45,00	45,00	45,00
2121	Autograft-2w	45,00	39,17	45,00	45,00
2121	auto-control-2w	40,57	45,00	45,00	45,00
2122	Autograft-2w	36,12	45,00	45,00	45,00
2122	auto-control-2w	40,46	38,00	45,00	45,00
2123	Autograft-2w	36,66	38,50	45,00	45,00
2123	auto-control-2w	37,45	38,00	45,00	41,11
2124	Autograft-2w	38,25	40,45	45,00	45,00
2124	auto-control-2w	38,85	40,80	45,00	45,00

Tabelle 11: Messwerte biochemische Parameter II

Nummer	Implantat	MMP1	MMP3	MMP13
2107	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00
2107	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2108	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00
2108	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2109	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00
2109	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2110	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00
2110	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2111	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00
2111	auto-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2112	Autograft-2mo	45,00	45,00	45,00
2112	auto-control-2mo	45,00	33,46	37,19
2113	Endobon-2mo	45,00	28,35	32,49
2113	Endo-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2114	Endobon-2mo	45,00	45,00	35,60
2114	Endo-control-2mo	45,00	45,00	34,85
2115	Endobon-2mo	45,00	45,00	45,00
2115	Endo-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2116	Endobon-2mo	45,00	45,00	45,00
2116	Endo-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2117	Endobon-2mo	45,00	38,44	45,00
2117	Endo-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2118	Endobon-2mo	45,00	45,00	45,00
2118	Endo-control-2mo	45,00	45,00	45,00
2119	Autograft-2w	45,00	36,50	45,00
2119	auto-control-2w	45,00	37,21	33,85
2120	Autograft-2w	45,00	36,47	38,33
2120	auto-control-2w	45,00	45,00	45,00
2121	Autograft-2w	45,00	37,31	45,00
2121	auto-control-2w	45,00	37,73	45,00
2122	Autograft-2w	45,00	45,00	36,13
2122	auto-control-2w	45,00	45,00	45,00
2123	Autograft-2w	45,00	37,45	45,00
2123	auto-control-2w	45,00	33,60	37,86
2124	Autograft-2w	45,00	45,00	37,55
2124	auto-control-2w	45,00	45,00	45,00

Tabelle 12: Messwerte biochemische Parameter III

Nummer	Implantat	µg Collagen/mg	µg PG/mg
2107	Autograft-2mo		
2107	auto-control-2mo	179,50	53,82
2108	Autograft-2mo	249,00	43,34
2108	auto-control-2mo	156,83	38,84
2109	Autograft-2mo	126,00	41,60
2109	auto-control-2mo	160,80	48,76
2110	Autograft-2mo	150,83	33,98
2110	auto-control-2mo	136,50	42,02
2111	Autograft-2mo	161,38	25,62
2111	auto-control-2mo	104,70	68,17
2112	Autograft-2mo	166,14	30,76
2112	auto-control-2mo	135,17	38,55
2113	Endobon-2mo	252,75	34,27
2113	Endo-control-2mo	178,25	70,09
2114	Endobon-2mo	159,00	23,99
2114	Endo-control-2mo	165,17	59,76
2115	Endobon-2mo	236,67	35,72
2115	Endo-control-2mo	195,75	77,91
2116	Endobon-2mo	178,50	60,55
2116	Endo-control-2mo	100,50	60,63
2117	Endobon-2mo	175,40	51,36
2117	Endo-control-2mo	158,60	31,94
2118	Endobon-2mo	163,21	42,35
2118	Endo-control-2mo	139,00	41,85
2119	Autograft-2w	248,88	17,91
2119	auto-control-2w	116,57	32,84
2120	Autograft-2w	117,70	26,41
2120	auto-control-2w	127,24	47,22
2121	Autograft-2w	339,33	22,92
2121	auto-control-2w	92,73	11,70
2122	Autograft-2w	87,23	29,32
2122	auto-control-2w	242,54	72,90
2123	Autograft-2w	86,27	42,08
2123	auto-control-2w	223,58	23,03
2124	Autograft-2w	108,62	33,61
2124	auto-control-2w	112,33	25,64

Tabelle 13: Statistische Auswertung Messwerte Kollagen und Proteoglykan

Implantat	µg Collagen/mg	Std.D.	µg PG/mg	Std.D.
KontrolleAutograft-2 Monate	145,583	25,9650	48,3609	11,39523
KontrolleAutograft-2 Wochen	152,498	63,3766	35,5546	21,73934
Autograft-2 Monate	170,670	46,4526	35,0599	7,41772
Autograft-2 Wochen	164,671	104,9623	28,7092	8,47075
KontrolleEndobon®-2 Monate	156,211	33,2713	57,0210	17,24458
Endobon®-2 Monate	194,255	40,0764	41,3743	13,06040
Total	163,790	56,8371	41,1851	16,32238

Tabelle 14: Statistische Auswertung Messwerte Cox2 und iNOS

Implantat	Cox2	Std.D.	iNOS	Std.D.
KontrolleAutograft-2 Monate	42,97	4,972	40,73	4,379
KontrolleAutograft-2 Wochen	40,00	2,789	41,27	3,151
Autograft-2 Monate	41,64	3,712	40,84	3,570
Autograft-2 Wochen	39,85	4,073	40,54	2,297
KontrolleEndobon®-2 Monate	43,59	1,770	39,97	3,424
Endobon®-2 Monate	42,62	3,422	39,30	3,409
Total	41,78	3,636	40,44	3,239

Tabelle 15: Statistische Auswertung Messwerte Il-1b und IL-6

Implantat	Il-1b	Std.D.	IL-6	Std.D.
KontrolleAutograft-2 Monate	45,000	0,000	45,000	0,000
KontrolleAutograft-2 Wochen	45,000	0,000	44,351	1,590
Autograft-2 Monate	45,000	0,000	45,000	0,000
Autograft-2 Wochen	45,000	0,000	45,000	0,000
KontrolleEndobon®-2 Monate	45,000	0,000	45,000	0,000
Endobon®-2 Monate	45,000	0,000	45,000	0,000
Total	45,000	0,000	45,000	0,649

Tabelle 16: Statistische Auswertung Messwerte MMP1, MMP3, MMP13

Implantat	MMP1	Std.D.	MMP3	Std.D.	MMP13	Std.D.
KontrolleAutograft-2 Monate	45,00	0,000	43,08	4,711	43,70	3,188
KontrolleAutograft-2 Wochen	45,00	0,000	40,59	5,036	41,95	4,891
Autograft-2 Monate	45,00	0,000	45,00	0,000	45,00	0,000
Autograft-2 Wochen	45,00	0,000	39,62	4,185	41,17	4,257
KontrolleEndobon®-2 Monate	45,00	0,000	45,00	0,000	43,31	4,146
Endobon®-2 Monate	45,00	0,000	41,13	6,791	41,35	5,742
Total	45,00	0,000	42,40	4,521	42,75	4,071

Tabelle 17: Statistische Auswertung Messwert GAPDH

Implantat	GAPDH	Std.D.
KontrolleAutograft-2 Monate	33,3675	2,26499
KontrolleAutograft-2 Wochen	31,1950	0,90721
Autograft-2 Monate	34,3575	1,71967
Autograft-2 Wochen	31,4792	1,31055
KontrolleEndobon®-2 Monate	31,6842	2,00961
Endobon®-2 Monate	31,8008	1,48376
Total	32,3140	1,93988

Tabelle 18: Verwendete Primer

Primer –Sequenz 5’- 3’	Beschreibung
ATACCCTCAAGATTGTCAGCAATGCCT CCT	Sonde der ovinen GAPDH
TGGGCGTGAACCACGAG	forward- Primer der ovinen GAPDH
AGTCCCTCCACGATGCCA	reverse- Primer der ovinen GAPDH
GAATCAAGGTGTATGA	Sonde der ovinen Cox-2
CATGCCAGAATCGAGGTGTATGTA	forward- Primer der ovinen Cox-2
CGGGAGTGGGTTTCAGGAGT	reverse- Primer der ovinen Cox-2
CCTAAACAGATGAAGAGCTGCACCCA ACA	Sonde des ovinen Il1-b
ATGAGCTGTTATTTGAGGTTGATGG	forward- Primer des ovinen Il1-b
TGTAGGTCGACGTCTAAAGAGT	reverse- Primer des ovinen Il1-b
GTAGGTAGTACTTAGGGTTTTCA	Sonde der ovinen iNOS
TGACTTTCCAAGACACGCTTCA	forward- Primer der ovinen iNOS
AGAAGGCCAAAGGGGATCTCTCCTGC A	reverse- Primer der ovinen iNOS

9. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 : Liste der operierten Schafe.....	21
Tab. 2: Makroskopische Beurteilung der Knorpeloberfläche nach Outerbridge.....	28
Tab. 3 : HHGS zur Knorpelbeurteilung.....	29
Tab. 4: Auswertung nach Outerbridge und Distanz.....	59
Tab. 5: Statistische Auswertung Outerbridge –Score und Distanz.....	60
Tab. 6: Ergebnisse Mankin- Score.....	60
Tab. 7: Statistische Auswertung der Gesamt Scores nach Mankin.....	60
Tab. 8 : Statistische Auswertung nach Mankin –Score Struktur, Zellen und Anfärbarkeit.....	61
Tab. 9: Statistische Auswertung nach Mankin –Score Integrität der Grenzschicht und den Zellen im kalzifizierten Knorpel.....	61
Tab. 10: Messwerte biochemische Parameter I.....	62
Tab. 11: Messwerte biochemische Parameter II.....	63
Tab. 12: Messwerte biochemische Parameter III.....	64
Tab. 13: Statistische Auswertung Messwerte Kollagen und Proteoglykan.....	65
Tab. 14: Statistische Auswertung Messwerte Cox2 und iNOS.....	65
Tab. 15: Statistische Auswertung Messwerte Il-1b und IL-6.....	65
Tab. 16: Statistische Auswertung Messwerte MMP1, MMP3, MMP13.....	66
Tab. 17: Statistische Auswertung Messwert GAPDH.....	66
Tab. 18: Verwendete Primer.....	67

10. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Aufbau des Gelenkknorpels.....	11
Abb.2 : Lokalisation des Defektes.....	19
Abb. 3: Graphische Darstellung der Medianwerte der Auswertung der Knorpelproben nach dem Outerbridge- Score.....	32
Abb. 4: Graphische Darstellung der Medianwerte der histologischen Auswertung der Knorpelproben nach dem Mankin- Score.....	33
Abb. 5 : Graphische Darstellung der Medianwerte der histologischen Auswertung der Knorpelproben nach dem Mankin- Teilscore Struktur.....	34
Abb. 6 : Graphische Darstellung der Medianwerte der histologischen Auswertung der Knorpelproben nach dem Mankin- Teilscore Zellen im kalzifizierten Knorpel.....	35
Abb. 7: Graphische Darstellung der Medianwerte der Proteoglykan-Messwerte.....	36
Abb. 8-10: Probeoperation und Operationen.....	54-55
Abb. 11-13: Sektionsbefund.....	55-56
Abb. 14-16: Histologie (Dickschnitte).....	56-57
Abb. 17-19: Histologie (Dünnschnitte).....	57-58

11. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Professor Dr. **Brigitte von Rechenberg** für die Überlassung des Themas und die herausragende und geduldige sowohl fachliche als auch menschliche Betreuung bedanken. Sie hat mir geholfen, meinen Horizont nicht nur auf dem Gebiet der Veterinärmedizin zu erweitern.

Des Weiteren danke ich Professor Dr. **Jörg Auer** für die Möglichkeit, die Dissertation an der Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Zürich anfertigen zu können.

Herrn Professor Dr. **Felix Ehrensperger** danke ich für die Korrektur der Arbeit als Korreferent.

Meinen Projektpartnern **Lorenz Uebersax** und Dr. **Lorenz Meinel** danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Professor **Larry Galuppo** und Dr. **Charles Mamisch** danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung und Evaluierung der Makroskopiebilder und Histologieschnitte.

Ein herzlicher Dank gilt Frau **Kati Zlinszky**, Frau **Sabina Wunderlin** und Frau **Käthi Kämpf** für die Einweisung und Hilfe bei der Herstellung der Histologieschnitte.

Bei Herrn **Adrian Fairburn** möchte ich mich für die Anleitung und Durchführung der Messung der biochemischen Parameter bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch beim Ehepaar **Knüsel** und den **Tierpflegern** am Tierspital für die Betreuung der Versuchstiere sowie bei den **Anästhesisten** des Tierspitals für die hervorragende Anästhesie der Schafe.

Für die schöne Zeit und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei meinen „Mit-Doktoranden“ in der **MSRU**: Alessa Waibel, Oliver Genot, Ruth Fiechter, Jens D. Langhoff, Ny Hery Andrianaly, Sandra Hanses, Inka Schlemmer, Corinne Invernizzi, Cecile von Dörnberg, Niels Ohlig, Tanja Apfel und Katrin Völter; ausserdem auch bei den anderen Mitarbeitern der MSRU Dr. Sabine Koch und Dr. Katja Nuss.

Der grösste Dank geht an meine Eltern **Roswitha** und **Eckehart Schubotz**, die mich immer unterstützt haben.

12. Lebenslauf

Name: Roland Schubotz

Geburtsdatum : 27. Juni 1975

Geburtsort : Borna bei Leipzig

Nationalität : Deutschland

1982- 1990 : POS Bertolt Brecht Elstertrebnitz

1990- 1994 : Geschwister- Scholl- Gymnasium Zeitz

1994- 1995 : Zivildienst Ökologische Station Borna

1995- 2001 : Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig

2001 : Approbation

2001- 2002 : Assistenztierarzt Dr. B. Schurig, Ostrau (Sachsen)

2002- 2004 : Assistenztierarzt Tierärztliche Fachklinik für Pferde Bayreuth

2004- 2008 : Anfertigung der Dissertation an der Musculoskeletal Research Unit des Departments Pferde der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich

seit 2006 : Assistenztierarzt an der Kleintier- und Pferdeklinik Dr. Leuenberger in Staffelbach, AG; seit 2007 : Tierklinik 24