

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

**Untersuchung des Einflusses von Wachstumshormon HGF
auf die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels nach
Implantation autologer Knorpel-Knochen-Transplantate am
Beispiel des Kniegelenkes des Schafes**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tim Oliver Kleffner
aus Dortmund

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
23.07.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. C. O. Tibesku

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Steinmetz

Meinen Großeltern in Dankbarkeit gewidmet

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit
dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Zusammenfassung

Untersuchung des Einflusses von Wachstumshormon HGF auf die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels nach Implantation autologer Knorpel-Knochen-Transplantate am Beispiel des Kniegelenkes des Schafes

Einleitung: Der menschliche Körper hat nur eine sehr geringe intrinsische Fähigkeit zur Regeneration von hyalinem Knorpel. Knorpeldefekte, beispielsweise des Kniegelenks, versucht man mittels Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern aus gering belasteten Knorpelzonen in die Defekte in den Belastungszonen zu therapieren (osteo-chondrale Transplantation). In den vergangenen Jahren haben mehrere Studien den Einfluss von Wachstumshormonen auf die Regeneration von Knorpel zu beleuchten versucht. Der zum jetzigen Zeitpunkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückte „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) scheint unterstützend als Wachstumsfaktor auf die Knorpelregeneration zu wirken. In einem Kaninchenmodell konnte in vivo die Wirksamkeit des „Hepatocyte Growth Factor“ herausgestellt werden.

Ziel: Im Rahmen dieses Versuchsvorhabens soll untersucht werden, ob die zwischen den osteochondralen Transplantaten liegenden Zwischenräume durch Zugabe von Wachstumshormonen (HGF) mit hyalinem Gelenkknorpel anstelle Faserknorpel aufgefüllt werden können, oder ob zumindest ein gemischt fibrocartilaginärer Knorpel entsteht, dessen mechanische Eigenschaften dem Knorpel eines Gewicht tragenden Gelenkanteils annähernd nahe kommen. Bei der Auswertung der Studie stehen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Wirksamkeit der intraartikulären Zugabe von Hepatocyte Growth Factor zur autologen osteochondralen Transplantation
2. Histologische und immunhistologische Beurteilung des transplantierten und des ortständigen umgebenden Knorpels sowie der Zwischenräume
3. Mögliche Nebenwirkungen der intraartikulären Gabe des Wachstumsfaktors im Schafmodell

Methode: Beide Kniegelenke von acht Schafen wurden operiert, osteochondrale Zylinder aus der Femurkondyle einer Seite eines Kniegelenkes entnommen und in das kontralaterale Kompartiment desselben Kniegelenkes transplantiert. Die Schafe wurden dann in zwei Gruppen mit dann jeweils 16 Transplantaten aufgeteilt, wovon eine Gruppe dreimal pro Woche für insgesamt vier Wochen intraartikuläre HGF-Injektionen erhielt, in der Kontrollgruppe wurde isotone Kochsalzlösung injiziert. Nach einem Zeitraum von drei Monaten wurden die Tiere getötet und die Kniegelenke histologisch untersucht.

Ergebnisse: Die histologische Untersuchung zeigte ein komplettes Einwachsen der osteochondralen Transplantate im Knochenniveau, auf Höhe des Knorpels fand sich keinerlei Einwachsen oder Heilungstendenz. Die Bewertung des Knorpels nach einem modifizierten Mankin-Score ergab jedoch insgesamt geringere Anzeichen von Degeneration in der HGF-Gruppe. Makroskopisch degenerative Veränderungen wie Bildung von Osteophyten, Knorpelverdickung und synoviale Proliferation konnten in keiner der Gruppen beobachtet werden.

Schlussfolgerung: Diese Studie zeigt einen insgesamt positiven Effekt von HGF auf die Struktur von osteochondralen autologen Transplantaten, bei einem Untersuchungszeitraum von drei Monaten fand sich kein Einfluss auf die Heilung der Fissuren in den Randbereichen zwischen Transplantat und umgebendem Gelenkknorpel.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Knorpelgewebe	8
1.2	Knorpelschäden	12
1.2.1	Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung	13
1.2.2	Ätiologie	13
1.2.3	Spontanverlauf von Knorpelschäden	14
1.2.4	Reparaturantwort	16
1.2.5	Klassifikationen	18
1.2.6	Therapie	19
1.3	Wachstumsfaktoren	28
1.3.1	Hepatocyte Growth Factor (HGF)	31
1.3.2	Einfluss von HGF auf Knorpelzellen	36
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	38
2	Material und Methode	40
2.1	Versuchsaufbau	40
2.2	Operationsmethode	40
2.3	Probenentnahme und Aufarbeitung der Proben	41
2.4	Makroskopische Beurteilung	42
2.5	Gewinnung der histologischen Schnitte	42
2.6	Färbeverfahren	43
2.6.1	Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)	43
2.6.2	Safranin-O-Färbung	43
2.6.3	Immunhistochemische Färbung Kollagen I und II	43
2.7	Histologische Beurteilung	44
2.8	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Makroskopische Beurteilung	48
3.2	Histologische Auswertung	49
3.3	Immunhistochemie für Kollagen Typ I und Typ II	49
3.4	Vergleich der Transplantate und des umgebenden Knorpels in der Kontrollgruppe	51

3.5	Vergleich des umgebenden Gelenkknorpels in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe.....	54
3.6	Vergleich des Transplantatknorpels in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe.....	55
3.7	Evaluation des Gewebes zwischen transplantiertem und umgebendem Knorpel.....	57
4	Diskussion	59
4.1	Diskussion der Methodik.....	59
4.1.1	Tiermodellauswahl	59
4.1.2	Auswertung.....	61
4.1.3	Versuchsaufbau und Applikation des Wachstumsfaktors	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	65
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	81
7	Abbildungsverzeichnis	95
8	Tabellenverzeichnis	97
9	Abkürzungsverzeichnis	98
10	Lebenslauf	99
11	Danksagung	100
12	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	101
13	Ehrenwörtliche Erklärung.....	102
14	Anhang	103
14.1	Histologische Befunde.....	103
14.2	Tierversuchsgenehmigung.....	107

1 Einleitung

Gelenkknorpel hat aufgrund seiner Zusammensetzung die Fähigkeit, Belastungskräfte vom Vielfachen des eigenen Körpergewichts aufzunehmen, und ermöglicht als Gelenküberzug das reibungslose Gleiten in Gelenken und damit, besonders im Hinblick auf die gewichtstragenden Gelenke, die schmerzfreie Bewegung und Fortbewegung. Im Wesentlichen wird dies durch in der Knorpelmatrix gebundenes Wasser ermöglicht. Die Matrix selbst wird von den Knorpelzellen, den so genannten Chondrozyten, produziert. Trotz der mittlerweile bekannten Zusammensetzung der Matrix ist es bis dato noch nicht gelungen, ein adäquates Ersatzgewebe herzustellen, das in seinen Eigenschaften denen des natürlichen Gelenkknorpels entspricht [66].

1.1 Knorpelgewebe

Knorpelgewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben des Körpers und vereinigt Festigkeit und mechanische Belastbarkeit mit einer gewissen Elastizität. Es ist aus den Knorpelzellen, den Chondrozyten, und aus Interzellulärsubstanz, der so genannten Knorpelmatrix, aufgebaut. Die Zellen sind in die Matrix eingeschlossen, die fest, aber geringgradig elastisch verformbar ist. Knorpelgewebe enthält weder Blutgefäße noch Nerven, die Zellen werden mittels Diffusion durch die Interzellulärsubstanz ernährt.

Mit Ausnahme des Gelenkknorpels umhüllt faseriges Bindegewebe die Knorpelstücke als Perichondrium. Je nach Verhältnis von Zellen zu Matrix, sowie nach deren Zusammensetzung lassen sich drei Hauptarten von Knorpelgewebe unterscheiden.

Zum einen gibt es hyalinen Knorpel, der relativ viele Chondrozyten und eine Matrix aus Kollagenfibrillen enthält. Er kleidet als Gelenkknorpel die meisten der Gelenke im Körper aus.

Des Weiteren findet sich elastischer Knorpel, der dem hyalinen Knorpel ähnlich ist, der aber zusätzlich noch elastische Fasern enthält, die dem Knorpel große Elastizität in Geweben wie Ohrknorpel, Tuba auditiva oder Epiglottis verleiht.

Außerdem unterscheidet man von den beiden vorgenannten Knorpelgeweben noch den Faserknorpel. Im Faserknorpel herrschen als Bindegewebsknorpel mit geringer Zelldichte und weniger Matrix vor allem kollagene Fasern vor, die überwiegend aus Kollagen Typ I aufgebaut sind.

Der hyaline Knorpel kommt von den drei Knorpelarten am häufigsten vor, unter anderem als Gelenkknorpel. Die Chondrozyten, die Glykogen und Lipidtröpfchen enthalten, liegen einzeln oder in Gruppen von 2-8 Zellen, und bilden und erneuern die glykosaminoglykanreiche Grundsubstanz. Diese umgibt die Zellen und die Fasern. Die Knorpelmatrix bildet um jede Zellgruppe ein Territorium, welches als unmittelbar zu ihr zugehörig erscheint. Zellen plus dazugehörige Territorien werden als Chondrone bezeichnet. Als Interterritorials substanz wird die nicht einer Zellgruppe zuzuordnende Interzellulärsubstanz benannt. Die Matrix des hyalinen Knorpelgewebes besteht zu 60-70% aus Wasser, die Trockensubstanz setzt sich zu 40% aus Proteoglykanen und Proteoglykanaggregaten wie Aggrekan, zu ca. 40-50% aus Kollagenfasern und zu ca. 10% aus Mineralstoffen zusammen [77]. Die extrazelluläre Matrix aus Kollagenen, Proteoglykanen und nicht kollagenen Proteinen steuert den Wassergehalt des Knorpels, der wesentlich zu seinen biomechanischen Eigenschaften beiträgt.

Das Kollagen setzt sich aus Typ II, IX und XI zusammen. Typ II Kollagen nimmt hier mit 90-95% den Hauptanteil ein und ist aufgrund seiner Stärke für den enormen Belastungswiderstand verantwortlich. Ein Proteoglykanmolekül besteht aus einem zentralen Proteinkerngerüst, an das negativ geladene sulfatierte Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat und Keratansulfat gebunden sind. Vieler solcher Proteoglykanmonomere sind über Bindungsproteine an eine Hyaluronsäurekette gebunden und bilden so ein Proteoglykanaggregat. Die negativ geladenen Glykosaminoglykanseitenketten ziehen Wasser an, wodurch sich die Proteoglykane ausdehnen und so gegenüber Kompressionskräften belastbar sind. Gleichzeitig stoßen sich die gleichsinnig negativ geladenen Aggrekane ab, was ihnen ermöglicht, den ihnen größtmöglichen Raum einzunehmen [30, 65].

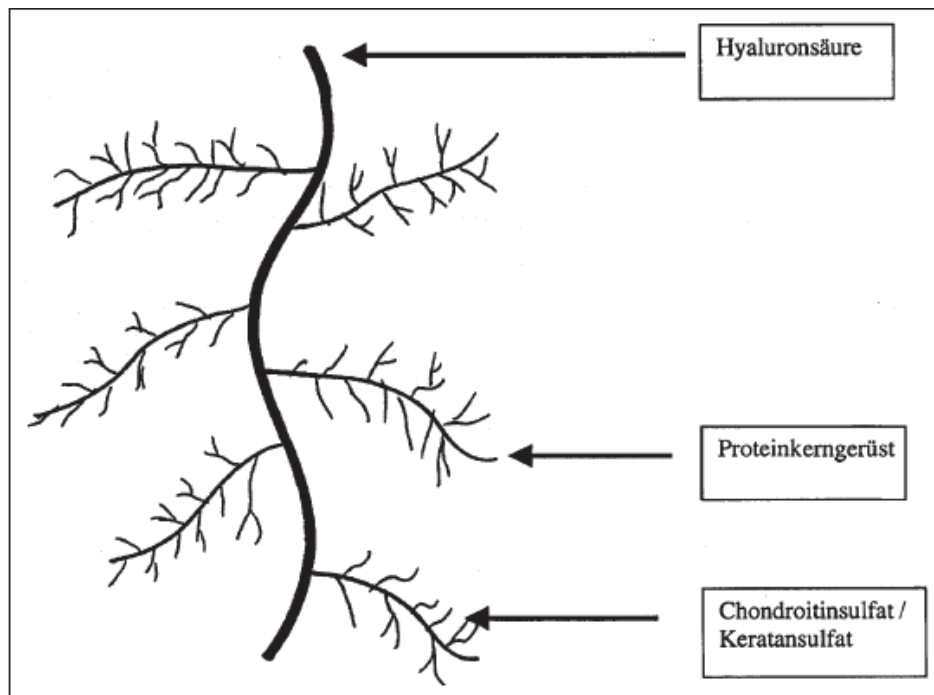


Abbildung 1: Aufbau eines Proteoglykanaggregates (aus: [30])

Die mechanischen Eigenschaften des Knorpels sind durch besondere Druckfestigkeit gekennzeichnet. Die Knorpelzellen mit umgebenden Territorien und die Proteoglykane der Interzellularsubstanz wirken als Druckpolster, die kollagenen Fibrillen wirken Spannungen entgegen, die durch Druckverformungen entstehen. Die Druckfestigkeit beträgt ca. 1.5 kp/mm^2 . Die Ernährung der Knorpelzellen geschieht durch Diffusion vom gefäßreichen Perichondrium ausgehend. Beim Gelenkknorpel, der kein Perichondrium aufweist, werden die Knorpelzellen von der Synovia ausgehend ernährt. Mit zunehmendem Alter kommt es zu Degenerationserscheinungen im Inneren des Knorpels, und zwar dort, wo die Stoffwechsellage am schlechtesten ist. Durch Umbau der Proteoglykane und Abnahme des Wassergehaltes kommt es bei zunehmender Einlagerung von Mineralsalzen langsam zur Verkalkung, welche wiederum die Diffusionsbedingungen verschlechtert.

Abgesehen von der Situation beim wachsenden Skelett ist die Regenerationsfähigkeit des Knorpels begrenzt. Beim Erwachsenen geht verletztes Knorpelgewebe durch Nekrose zugrunde und wird durch Bindegewebe ersetzt, welches sich später teilweise zu Faserknorpel differenzieren kann. Der Gelenkknorpel hat nur begrenzte Fähigkeiten zur Regeneration, da er zum einen nicht von Perichondrium umgeben ist und sich zum anderen nur von seiner Grenze zur Synovialmembran an den Seitenrändern regenerieren kann. Die dem Knochen anliegenden Regionen besitzen eine äußerst geringe

Regenerationsfähigkeit. Defekte des Gelenkknorpels sind daher in den meisten Fällen irreversibel [147].

Die Organisation und der molekulare Aufbau von Gelenkknorpel reflektiert dessen funktionelle Rolle. Das Zellvolumen beim Erwachsenen beläuft sich lediglich auf 2% des totalen Volumens, der Rest ist ausgiebig von der extrazellulären Matrix ausgekleidet, welche von den Chondrozyten synthetisiert wird. Die Zelldichte ist in der oberflächlichen Zone am höchsten und nimmt bis zur tiefen Zone auf den geringsten Gehalt ab. Der Aufbau ist in Zonen gestaltet.

Innerhalb der oberflächlichen dünnen Tangentialfaserschicht, die die oberflächlichen 10-20% der Dicke des Knorpels einnimmt, unterscheidet sich der Aufbau von Zellen und extrazellulärer Matrix von dem in den anderen Schichten. Die Chondrozyten erscheinen flach und relativ dicht parallel zur Oberfläche. Nur in der oberflächlichen Schicht synthetisieren diese spezialisierten Chondrozyten Lubricin oder „Superficial Zone Protein“, welches für die Gleiteigenschaften auf der Knorpeloberfläche verantwortlich sein soll [151]. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen dieses Molekül kann die Wiederherstellung der Oberflächenintegrität nach Defekten oder nach therapeutischen Interventionen überprüft werden. Die Zellen sind von einem dichten Netz parallel zueinander und parallel zur Oberfläche verlaufender dünner Kollagenfibrillen umhüllt. So erlangt die oberflächliche Schicht höchste Festigkeit, vor allem gegenüber Scher- und Zugkräften, aber auch gegenüber Druckbelastungen.

Die darunter liegende dickere, 40-60% einnehmende, mittlere Zone weist eine geringere Zelldichte mit den typischen morphologischen Merkmalen von hyalinem Knorpel auf. Die Zellen sind runder und dicker und die extrazelluläre Matrix ist reich an Proteoglykanaggregaten. In dieser Schicht sind die Kollagenfasern von größerem Durchmesser und nicht mehr streng parallel organisiert.

Zwischen mittlerer Zone und Kalzifizierungsschicht liegt die tiefe Zone, die etwa 30% einnimmt und die niedrigste Zelldichte und den höchsten Proteoglykangehalt aufweist. Damit findet sich in dieser Zone die höchste Druckstabilität, da der Durchmesser der Kollagenfibrillen maximal ist. Im Gegensatz hierzu ist der Kollagengehalt in dieser Zone allerdings am geringsten.

Die Kalzifizierungszone dient als Pufferzone mit intermediären mechanischen Eigenschaften zwischen Knorpel und darunter liegendem subchondralem Knochen. Die hier vorhandenen Chondrozyten erreichen einen Differenzierungsgrad, der dem enchondraler Knochenheilung entspricht. Die einzigartigen Eigenschaften dieser Zellen sind

für die Kalzifizierung dieser Schicht verantwortlich. Die Kollagenfasern inserieren hier, womit eine strukturelle Integration und mechanische Verankerung mit dem subchondralen Knochen erreicht wird [118].

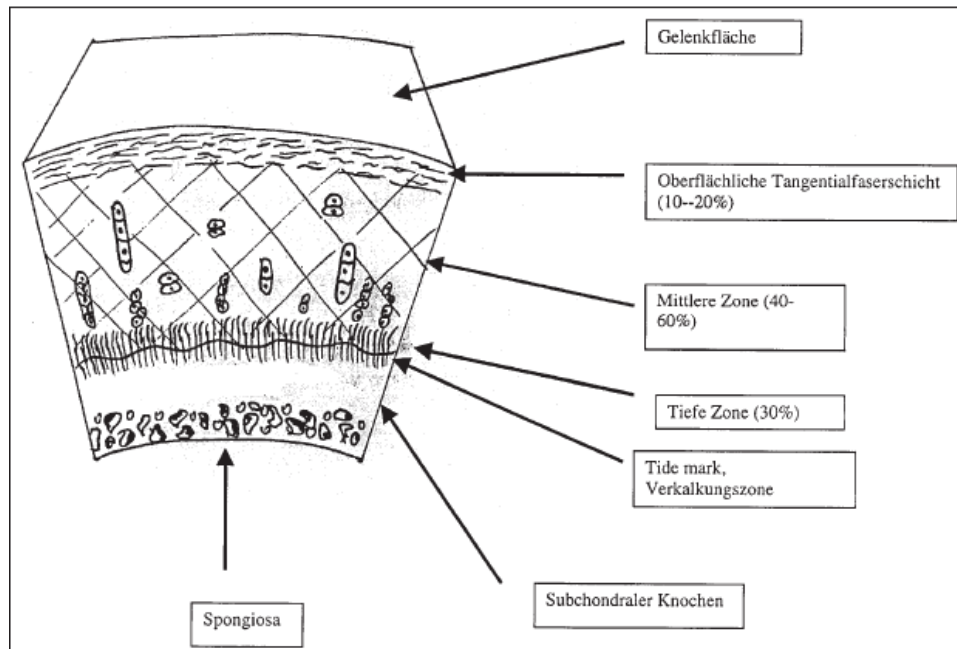


Abbildung 2: Zoneneinteilung und zelluläre Organisation im Gelenkknorpel (aus: [30])

1.2 Knorpelschäden

Knorpeldefekte treten häufig als Folge von Traumata oder Überbelastungen im Sport, oder als Folge von Erkrankungen wie der Osteochondrosis dissecans oder degenerativen Gelenkerkrankungen auf. Diese Knorpeldefekte führen in letzter Konsequenz zur Arthrose und im weiteren Verlauf zu typischen Symptomen wie Schmerzen und Schwellung, Krepitationen und Gelenkblockaden, hiervon sind immer häufiger auch jüngere Menschen betroffen.

Im Rahmen der sich entwickelnden Arthrose nach einem Knorpelschaden kommt es zu Umbauprozessen, welche auch auf den subchondralen Knochen übergreifen. Oft gehen diese Umbauprozesse mit reaktiven Veränderungen des Gelenkkapselapparates einher und führen letztendlich zum Verlust des Gelenkknorpels.

1.2.1 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung

Knorpelschäden und die im weiteren Verlauf damit assoziierte Arthrose sind immer häufiger anzutreffende Erkrankungen und die Zahl der betroffenen Patienten ist ansteigend. Oftmals sind schon junge, sportlich aktive Menschen betroffen. Hinzu kommt, dass durch die demografische Entwicklung die Bevölkerung im Durchschnitt immer älter wird und zunehmend auch bis ins hohe Alter aktiver ist. Sowohl die Zahl der Patienten, als auch die Zeitspanne, in welcher Patienten mit Symptomen und Folgen von Gelenkknorpelschäden leben müssen, wird also stetig zunehmen. Der ökonomische, psychologische und soziale Einfluss für den Patienten selbst, wie auch für Familie und Gesellschaft ist enorm. Nur für chirurgische Eingriffe aufgrund von Knorpelschäden am Knie beliefen sich die Kosten in den USA im Jahre 1999 auf ca. 971 Millionen Dollar - Tendenz steigend [66]. Hierzulande werden jährlich ca. 50000 Kniegelenksendoprothesen aufgrund einer Arthrose implantiert. In einer Studie aus Norwegen mit einem durchschnittlichen Patientenalter von 35 Jahren, in der 993 Kniegelenk-arthroskopien ausgewertet wurden, fand sich bei mehr als 650 der untersuchten Kniegelenke ein Gelenkknorpelschaden. Ein umschriebener Defekt mit degenerativen Veränderungen fand sich in 5% der Fälle, Defekte ohne degenerative Veränderungen fanden sich in 20% der Fälle. Die meisten der letztgenannten Defekte waren bei jüngeren Patienten mit einem Durchschnittsalter von 30 Jahren anzutreffen [4].

1.2.2 Ätiologie

Knorpelschäden entstehen entweder als umschriebener Defekt, beispielsweise als Folge eines Traumas, oder sind Teil einer degenerativen Gelenkerkrankung mit dem progressiven Verlust des Knorpelüberzuges der Gelenkflächen.

Die Degeneration von artikulärem Knorpelgewebe im Rahmen von Arthrose ist eine der häufigsten Ursachen für Schmerzen und eingeschränkte Beweglichkeit, insbesondere bei älteren Patienten. Degenerative Knorpelschäden können nach ihrer ätiologischen Entwicklung in primäre und sekundäre Arthrosen unterschieden werden.

Für die Entstehung von primären Arthrosen werden vor allem Systemfaktoren verantwortlich gemacht, wohingegen biomechanische Faktoren in eine sekundäre Arthrose münden. Der primären oder idiopathischen Arthrose lässt sich kein prädisponierender Faktor zuordnen, hier sind genetische Einflüsse von Bedeutung.

Die sekundäre Arthrose beschreibt einen Zustand nach einer definierten prädisponierenden Pathologie. Hierzu zählen beispielsweise die posttraumatische Arthrose und die Arthrose nach angeborenen oder in der Entwicklung aufgetretenen Beinachsenfehlstellungen. Weiterhin zählt hierzu die nach Hüftkopfnekrosen oder bei metabolischen Erkrankungen sowie durch endokrine Faktoren und Dysbalancen ausgelöste Arthrose. Diese Einteilung wird zunehmend von Autoren in Frage gestellt, da in der Beschreibung der Ätiologie der Arthrose biomechanische mit biochemischen und genetischen Faktoren eng verknüpft sind, in der Vielzahl der Fälle ist die Pathogenese multifaktoriell. Die individuellen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arthrose unterscheiden sich häufig von solchen, die für das Fortschreiten und die klinische Ausprägung verantwortlich sind. Viele Faktoren sind reversibel (Fettleibigkeit, Muskelatrophie) oder vermeidbar (berufliche bedingte Gelenkbelastung) und spielen daher eine wichtige Rolle bei Primär- und Sekundärprophylaxe einer Arthrose [98].

Im Gegensatz zum chronisch progressiven Verlauf einer arthrotischen Erkrankung des Gelenkknorpels tritt der umschriebene Gelenkknorpelschaden meist als akute oder subakute Verletzung auf. Die Hauptursache für umschriebene Knorpelschäden im Gelenkbereich sind Traumata mit Kontusionen des Knorpels oder Distorsionsverletzungen mit Abscherungen von Knorpel. Meist ist der Knorpelschaden nur Teil einer komplexen Gelenkbinnenschädigung mit begleitenden ligamentären oder ossären Verletzungen.

Die Osteochondrosis dissecans stellt eine weitere fokale Knorpelerkrankung dar, deren Genese jedoch strittig ist. Als Ursache werden posttraumatische Knorpelschäden und Durchblutungsstörungen in der subchondralen Knochenplatte diskutiert. In der Folge unterbindet die Knochennekrose die Nutrition des darüber liegenden Knorpels, was dann zum Untergang des Knorpels führt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ablösung eines Knorpel-Knochen-Fragmentes mit der Gefahr der Bildung freier Gelenkkörper.

1.2.3 Spontanverlauf von Knorpelschäden

Bei frischen traumatischen Knorpelschäden oder auch einer Osteochondrosis dissecans handelt es sich meist um umschriebene, fokale Knorpeldefekte bei ansonsten intakter Knorpelumgebung. Handelt es sich um einen klinisch symptomatischen Defekt, finden sich häufig Symptome wie eine Gelenkergussbildung, eine Hypertrophie der Gelenkinnenhaut oder eine Tendinitis in dem betreffenden Gelenk.

Bei Kindern und Jugendlichen kommt es, aufgrund des höheren intrinsischen Reparaturpotentials und je nach Ausmaß des Schadens, nicht selten zu einer spontanen Heilung des Knorpelschadens. Diese Situation stellt dagegen bei Erwachsenen eher die Ausnahme dar [27]. Zwar kann ein solcher Knorpeldefekt auch nach Schluss der Wachstumsfugen klinisch stumm verlaufen und selbst größere Defekte oder fortgeschrittene degenerative Veränderungen können beschwerdearm verbleiben. Insbesondere kleinere Defekte führen auch nach längerer Verlaufszeit nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer Arthrose.

Auf der anderen Seite ist aber auch unbestritten, dass die Größe des Defektes in direkter Relation zu dem Arthroserisiko steht, und zwar unabhängig vom Alter des Patienten [1]. Treten noch Begleitverletzungen wie Meniskus- oder Bandverletzungen hinzu, wird die Entstehung einer degenerativen Veränderung wesentlich begünstigt. Problematisch ist die Verkleinerung der Fläche und die Umverteilung der auf den Knorpel wirkenden Kräfte, was zu einer Überbeanspruchung des noch intakten Knorpels führt [124]. Hierdurch wird die Synthese von Botenstoffen stimuliert und die Knorpeldegeneration in Gang gesetzt. Knorpelschäden sind somit präarthrotische Faktoren und erhöhen, insbesondere wenn eine Beeinträchtigung der Gelenkbinnenstruktur hinzukommt, das sekundäre Arthroserisiko. Im Verlauf mehrerer Jahre kommt es dann zu einem vorzeitigen Gelenkverschleiß.

Als Charakteristikum der Arthrose gilt die Schädigung des Gelenkknorpels. Die Synovialmembran, die entzündlich mitreagiert, und der subchondrale Knochen sind jedoch in die stattfindenden Umbauprozesse miteinbezogen. Der Abbau der Knorpelmatrix führt zu einer makroskopisch dünneren Knorpelschicht. Aufgrund der beeinträchtigten Feinstruktur der Matrix und dem deshalb weicher werdenden Knorpel entstehen Fibrillationen, die letztendlich zu Ulzerationen bis in den tiefer liegenden Knochen führen können. Meist sind hiervon vorwiegend die Gewicht tragenden Teile des Knorpels betroffen. Selbst wenn der Knorpel zu Anfang dieses Prozesses in den verbleibenden Knorpelanteilen des Gelenkes noch intakt scheint, sind zumeist schon biochemische und metabolische Umbauprozesse im Gange. Der gesamte Knorpel ist metabolisch aktiv und es finden sich mehr Zellen, die in Clustern zusammen liegen. Dies ist Ausdruck des Versuches die entstandenen Defekte mit Ersatzgewebe aufzufüllen. Zeitgleich führen die Umbauprozesse am Knochen zur Verdickung des subchondralen Knochens und zu osteophytären Anbauten im Randbereich der Gelenke [85]. Pathophysiologisch findet sich in geschädigtem Knorpel eine Mischung aus de-

gradativen Vorgängen und Reparaturprozessen. In frühen Phasen dominiert der Versuch geschädigten Knorpel zu reparieren, was im weiteren Verlauf misslingt und so letztendlich zur völligen Zerstörung des Knorpels führt. Insgesamt ist das komplizierte Zusammenspiel aus den verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein entscheidender Faktor bei der Entstehung und Unterhaltung der Arthrose. Wichtig sind nicht die absoluten Konzentrationen einzelner Faktoren, sondern vielmehr das gestörte Gleichgewicht zwischen protektiven und destrukturierenden Mediatoren.

Wachstumsfaktoren, welche die Knorpelregeneration möglicherweise positiv beeinflussen können, und deren mögliche klinische Anwendungen sind in einem gesonderten Kapitel beschrieben.

1.2.4 Reparaturantwort

Aufgrund der Avaskularität des Knorpels, der von den Stammzellen im Knochen durch die dicke subchondrale Zone getrennt ist, unterscheidet sich die Reaktion auf Schädigung wesentlich von anderen Geweben [82]. Die übliche Reparaturantwort des Körpers bei Gewebeschädigung ist abhängig von Einblutung, Fibrineinwanderung und Fibrinvernetzung sowie der nachfolgenden Mobilisation von Zellen, Mediatoren und Wachstumsfaktoren. Die Auswirkungen einer lokalisierten mechanischen Knorpelschädigung sind vom Überleben von Chondrozyt und Matrix abhängig. Hier spielen die Größe und Tiefe sowie die Lokalisation der Schädigung eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Erkrankung. Insbesondere wenn der subchondrale Knochen nicht penetriert wird, kann oben genannte Wundheilung nicht stattfinden [128]. Sollte nur die Matrix von der Schädigung betroffen sein, machen die Chondrozyten von der Fähigkeit Gebrauch, neue Matrixmoleküle zu synthetisieren und können so wieder normale Eigenschaften herstellen. Sind die Chondrozyten in die Schädigung mit einbezogen, ist die Fähigkeit zur Reparatur eingeschränkt und führt nicht zu Regeneration von regelrechtem hyalinen Knorpel [65]. Als Reparaturantwort auf oberflächliche Verletzungen kann im Randbereich des Defektes und der angrenzenden Knorpelzone die vorübergehende Proliferation von Chondrozyten beobachtet werden. Diese Zellproliferation führt zu Chondrozytenhaufen, den so genannten Clustern, die auch in frühen Phasen der Osteoarthritis beobachtet werden und als „Cloning“ teilweise in die Bewertungsskalen der Arthrose eingegangen sind [28, 83]. Es kommt hier zu einer nur kurzen Matrixsynthese und mitotischen Aktivität, die adäquate Produktion von extrazellulärer Matrix bleibt aus. Derart oberflächliche Läsionen zeigen daher keine

Heilungstendenz, schreiten aber wohl auch nicht zu Arthrose fort. Kommt es zur Verletzung der vaskularisierten subchondralen Zone, wird der Defekt mit einem Fibrinpfropf gefüllt, einhergehend mit dem Einwandern von Zellen aus Blut und Knochenmark. Dieser Fibrinpfropf verbindet sich schnell fest mit den knöchernen Strukturen im Defekt, nicht so allerdings mit den seitlichen knorpeligen Begrenzungen. Die Reparatoren nach ein paar Tagen geht von der undifferenzierten mesenchymalen Stammzelle im Knochenmark aus, diese wandern in den Fibrinpfropf ein und füllen den Defekt so innerhalb weniger Wochen mit vaskularisiertem Narbengewebe. Die darauf folgende Ossifikation beginnt im knöchernen Teil der Defektheilung und schreitet von dort über die Seiten in das Zentrum des Defektes fort. Die ehemals aus hyalinem Knorpel bestehende Oberfläche wird nicht verknöchert, sondern mit Faserknorpel ähnlichem Gewebe ersetzt [57, 128]. Der Proteoglykangehalt nimmt im Laufe der Zeit immer mehr ab, die tangential oberflächliche Schicht wird nicht aufgebaut und es fehlt die für die Stabilität und Integrität so wichtige zonale Anordnung des Knorpelgewebes. Eine vollständige Vernetzung der Fasern des Reparationsgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel bleibt aus und die so fehlende mechanische Kompetenz macht den Bezirk anfällig gegenüber vertikalen Scherbewegungen, die im Laufe der Zeit zur Arthrose führen [19, 128, 149]. Neben der Größe und Tiefe des Defektes beeinflussen noch weitere Faktoren wie Alter, Körpergewicht und Begleiterkrankungen wie Meniskusschädigungen, Beinachsenfehlstellungen und Bandinstabilitäten die Heilung [30].

Für die Defektgröße ist ein proportionaler Zusammenhang mit der Heilungstendenz beschrieben und hat die Indikationsempfehlungen zur operativen Verfahrenswahl bei Knorpelschäden beeinflusst [45]. In einem Pferdmodell wurde beschrieben, dass Defekte kleiner als 3mm komplett verheilen, während ein proportionales Verhalten zwischen Defektgröße und fehlender Heilung bestand [32, 64]. Größere osteochondrale Läsionen werden oft mit Faserknorpel gefüllt, der im Wesentlichen aus Typ I Kollagen besteht [58]. Einhergehend hiermit finden sich im weiteren Verlauf diejenigen makroskopischen Veränderungen, die bei der Diagnosestellung der posttraumatischen Arthrose in der orthopädischen Praxis den radiologischen Kriterien wie Verschmälerung des Gelenkspalts, Knorpelschaden und Knorpelverlust entsprechen. Zusätzlich zeigen sich häufig osteophytäre Anbauten, subchondrale Sklerosezonen und zystische Knochenveränderungen.

1.2.5 Klassifikationen

Von entscheidendem Einfluss auf die weitere Therapieplanung ist die Einteilung der Knorpelschäden. Die im klinischen Alltag gebräuchlichen Einteilungen orientieren sich am arthroskopischen Befund des Schadens.

Die klinisch am häufigsten genutzte Klassifikation ist die nach Outerbridge [110]. Hier wird der Knorpelschaden nach dem arthroskopischen Erscheinungsbild in vier Schweregrade eingeteilt. Ein Knorpelschaden Grad I beschreibt eine Knorpelerweichung. Bei Grad II bestehen oberflächliche Knorpelaufbrüche und Fissuren. Grad III beschreibt tiefe Fissuren und Lappenbildungen, die bis zum subchondralen Knochen reichen. Bei Knorpelläsionen Grad IV liegt der subchondrale Knochen völlig frei und wird nicht mehr von Knorpel bedeckt.

Von Bauer und Jackson [6] wurde anhand von arthroskopisch beurteilten Knorpeldefekten in Kniegelenken eine weitere Einteilung vorgenommen, die auch eine Unterscheidung zwischen traumatischen und degenerativen Knorpelveränderungen zulässt. Typ I beschreibt einen linienförmigen Knorpelaufbruch, Typ II eine sternförmige Läsion, Typ III klassifiziert einen lappenförmigen Einriss und Typ IV bezieht sich auf einen Defekt vom Kratertyp. Diese ersten vier Einteilungen beziehen sich auf traumatische Läsionen, während Defekte vom Fibrillationstyp, der Typ V dieser Einteilung darstellt, und Defekte vom Degenerationstyp als Typ VI sich auf degenerative Veränderungen beziehen. Diese Klassifikation beschreibt auch vor allem die morphologische Einteilung des Schadens, für die Einschätzung der therapeutischen Konsequenzen kann besser die Einteilung der International Cartilage Research Society (ICRS) angewandt werden.

Das in Erweiterung der Outerbridge-Klassifikation 2003 veröffentlichte ICRS-Klassifikationssystem beschreibt die Ausdehnung des Knorpelschadens anhand der arthroskopischen Einschätzung der bereits debridierten Läsion unter Beachtung von Tiefe und Ausdehnung [22]. Diese Einteilung berücksichtigt die Tatsache, dass ein Defektareal nur nach Entfernung von Knorpelfragmenten und ausgefransten Bereichen realistisch beurteilt werden kann. Die Einteilung von Knorpelschäden nach der ICRS-Klassifikation ist wie folgt: Grad 0 bedeutet keine erkennbaren Defekte, Grad 1a beschreibt eine intakte Oberfläche mit Fibrillationen und leichter Erweichung, Grad 1b beschreibt zusätzlich Risse oder Fissuren. Als Grad 2 wird eine Läsion nach dem System klassifiziert, wenn die Läsionstiefe 50% der Knorpeldicke noch nicht überschreitet. Grad 3 a – d bezieht sich dann auf Knorpeldefekte, die 50% der Dicke des

Knorpels überschreiten und entweder noch nicht bis zur kalzifizierten Schicht, bis zur kalzifizierten Schicht, oder bis zur subchondralen Schicht reichen. Bei Grad 3d kommt zusätzlich Blasenbildung hinzu. Grad 4a und 4b bedeutet dann, dass eine vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte vorliegt.

1.2.6 Therapie

Patienten mit Knorpelschäden beschreiben, je nach Größe und Lokalisation des Defektes, oft wechselnde Ausprägungen des Schweregrades ihrer Erkrankung. Viele erleben spontane kurzfristige oder auch länger andauernde Remissionen ihrer Beschwerden unabhängig von der momentanen Behandlung. Grundsätzlich gibt es konservative und operative Therapiemöglichkeiten für Knorpelschädigungen.

Die konservativen Verfahren zielen auf eine Beschwerdelinderung vor allem in frühen Stadien ab, sie können die Progression des Krankheitsverlaufes aber nicht positiv beeinflussen. Besonders wenn ein höhergradiger Schaden vorliegt, müssen zusätzlich operative Behandlungen in Erwägung gezogen werden.

Für Erwachsene und vor allem für Jugendliche ist aufgrund der zu erwartenden Folgen einer Knorpelschädigung, die unbehandelt verbleibt, eine möglichst zeitnahe und situationgerechte Therapie der Läsion anzustreben. Im Vordergrund stehen hier die Wiederherstellung einer physiologischen Last- und Druckverteilung, sowie die Behandlung von Begleitpathologien, wie beispielsweise Fehlstellungen des Gelenkes, Meniskusinstabilitäten oder Bandläsionen.

1.2.6.1 Konservative Verfahren

Konservative Behandlungsmethoden von Knorpelschäden in frühen Stadien zielen vor allem darauf ab die individuelle Beschwerdesymptomatik zu verbessern.

Besonders Patienten mit geringerer Beschwerdeausprägung hilft oftmals schon die einfache Beratung den Lebensstil im Sinne von Gewichtsreduktion, Reduktion übermäßiger Aktivität und Implementierung eines speziellen Fitnessprogramms umzustellen, um den Umgang mit den Symptomen der eigenen Erkrankung zu erleichtern. Auch Möglichkeiten wie lokale Wärme- oder Kälteanwendung, Schuhranderrhöhungen, Knieschienen und Fersenspuffer kommen in Betracht. Eine tatsächliche Beeinflussung des Krankheitsverlaufes ist jedoch nicht nachgewiesen, meistens kann aber in Kombination mit Medikamenten eine Linderung der Beschwerden erzielt werden.

1.2.6.2 Medikamentöse Therapie

Bei der Beurteilung der medikamentösen Behandlungsstrategien von Knorpelschäden muss berücksichtigt werden, dass bis zu diesem Zeitpunkt der Langzeitverlauf nicht aufgehalten werden konnte. Es wird im Wesentlichen versucht, vorhandene Beschwerden zu lindern und die Progredienz der Erkrankung soweit wie möglich zu verlangsamen. Die Gabe kann systemisch oder lokal erfolgen.

Zur Verfügung stehen in erster Linie die nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), die zu den am häufigsten verschriebenen und gekauften Medikamenten zur Behandlung von Knorpelschäden und den sich daraus ergebenden Konsequenzen gehören. Positiv wirkt sich hier die antientzündliche und schmerzstillende Wirkung aus. Typische Vertreter dieser Stoffgruppe sind beispielsweise Diclofenac und Ibuprofen. Die ansonsten nebenwirkungsarmen Medikamente sind aber vor allem in der Langzeitanwendung auch für Nebenwirkungen wie gastrointestinale Ulzera und Blutungen sowie Nierenfunktionsstörungen verantwortlich. Der Wirkungsmechanismus zielt auf die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX-1) ab, um die Entzündungsaktivität durch herabgesetzte Prostaglandinsynthese zu verkleinern. Die Nebenwirkungen auf Magen, Niere und Thrombozytenfunktion führten dann zu der Entwicklung der selektiven COX-2 Isoenzym Inhibitoren, welche oben genannte Nebenwirkungen nicht mehr aufwiesen. Neben den deutlich höheren Kosten wurde im weiteren Verlauf die Zulassung für Patienten mit kardialen Risikoprofil wegen erhöhtem Auftreten von Todesfällen bei Langzeiteinnahme eingeschränkt.

Eine weiterer Therapieansatz sind intraartikuläre Injektionen mit Kortikosteroiden. Diese können aber lediglich die klinische Beschwerdesymptomatik günstig beeinflussen, ein zunächst vermuteter positiver Effekt auf die Knorpelregeneration konnte nicht bewiesen werden [131]. Eingesetzt wird diese Therapie vor allem bei fortgeschrittenen degenerativen Veränderungen und Knorpeldestruktionen, bei traumatischen Läsionen besteht keine Indikation für intraartikuläre Injektionen mit Kortikosteroiden. Außerdem ist zu bedenken, dass alle intraartikulären Injektionen mit dem Risiko der Gelenkinfektion behaftet sind.

Ebenso verhält es sich mit intraartikulären Hyaluronsäureinjektionen und sogenannten Chondroprotektiva. Bei der Behandlung von Knorpelschäden spielen diese Verfahren momentan vor allem bei höhergradigen Knorpelschäden im Rahmen von Arthrose eine Rolle. Die Verwendung von Hyaluronsäureinjektionen in arthrotische Gelenke gibt es bereits seit einigen Jahren, nachdem in besagten Gelenken eine verminderte Viskosität

und Elastizität der Synovialflüssigkeit beobachtet wurde. Die Injektionen können unterstützend auf elastischen und viskösen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit wirken und so die Symptome einer Arthrose lindern und die Funktion des Gelenkes verbessern [115]. Verschiedenste Studien haben sich mit der Effektivität und der Sicherheit der intraartikulären Hyaluronsäureinjektionen beschäftigt. Diese können konservative Maßnahmen wie beispielsweise die Physiotherapie nicht ersetzen, wohl aber den Verbrauch an NSAIDs und so die damit im Zusammenhang stehende Morbidität reduzieren. In einer prospektiv-randomisierten und placebokontrollierten Studie aus dem Jahre 2006 konnte eine signifikante Reduktion der Schmerzen und eine verbesserte Gelenkfunktion nach intraartikulärer Hyaluronsäureinjektion nachgewiesen werden [123].

Zu den sogenannten Chondroprotektiva gehören Chondroitinsulfat und Glucosamine. Es sind körpereigene Stoffe, denen nachgesagt wird, einen Einfluss auf Verlauf und Therapie der Arthrose zu haben, indem die erforderlichen Substrate zur Reparatur des Knorpels bereitgestellt werden. Der therapeutische Effekt soll auf der durch die Stoffe gesteigerten Proteoglykansynthese und dem verminderten Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen beruhen.

1.2.6.3 Operative Verfahren

Im Hinblick auf die chirurgischen Behandlungsoptionen lokalisierter Knorpeldefekte und den unterschiedlichen Erfolgsraten, ist die genaue Abwägung der verschiedenen vorhandenen Verfahren in Bezug auf die Indikationsstellung wichtig. Trotz der immer besser werdenden und überwiegend auch arthroskopisch durchführbaren Techniken zur Behandlung von Knorpeldefekten sind die erzielten Ergebnisse, vor allem im Hinblick auf den Langzeitverlauf, variabel. Noch kann keines der heute zugänglichen Verfahren den natürlichen Knorpel erhalten oder ersetzen und meist ist auch die Progression der Erkrankung nicht nachhaltig zu beeinflussen. Jedoch führen die meisten Verfahren in Abhängigkeit von der Indikationsstellung zu einer zumindest mittel- bis langfristigen Beschwerdebesserung und manchmal sogar zur Beschwerdefreiheit.

Es sind verschiedene chirurgische Verfahren zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten entwickelt worden, hierzu zählen sowohl Lavage und Debridement als auch knochenmarkstimulierende Verfahren wie Drilling, Mikrofrakturierung oder Abrasionsarthroplastik. Weitere Verfahren mit eher biologisch rekonstruktiver Zielsetzung sind die periostale oder perichondrale Transplantation, die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) und osteochondrale Transferverfahren wie die Mosaikplastik (OAT).

Lavage und Debridement besitzen eine rein symptomatische Wirkungsweise, sie ermöglichen bei vollschichtigen Knorpelschäden keine langfristige Beschwerdefreiheit. Durch die arthroskopische Lavage wird das Gelenk von Detritus und Entzündungsmediatoren frei gespült. Hiernach gaben nahezu die Hälfte der Patienten eine Beschwerdebesserung an, die bis zu 3 Jahren anhielt. Kombiniert mit dem Debridement ließen sich noch bessere Ergebnisse erzielen [67]. Beim Debridement, welches ebenfalls arthroskopisch durchgeführt wird, werden instabile und freie Knorpelfragmente mit Faßzangen und Shavern entfernt. Auch werden Knorpelränder geglättet, Meniskusrisse saniert und Osteophyten bei Bedarf abgetragen. Im Vergleich mit der Lavage allein konnte gezeigt werden, dass es bei mehr als der Hälfte der Patienten zu einer Beschwerdebesserung bis zu 5 Jahren kommt. Auch hier wird weder das Fortschreiten der Arthrose gestoppt, noch die Regeneration der Gelenkflächen stimuliert. Bei längeren Nachuntersuchungszeiträumen fand sich jedoch häufig eine Arthrose in dem betroffenen Kompartiment [91].

Auch die knochenmarkstimulierenden Techniken können arthroskopisch durchgeführt werden und haben als Wirkprinzip die Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle mit nachfolgender Einblutung und Einwanderung unspezifischer Zellen [57]. Beim Drilling oder der subchondralen Bohrung wird der Defekt über einen Draht mehrfach bis in die Vaskularisationszone angebohrt. Der erzeugte Fibrinpfropf differenziert sich aber zu fibrösen Narbengewebe, welches überwiegend Typ-I Kollagen Matrixgewebe von geringerer mechanischer Belastbarkeit enthält und meist sekundär verknöchert [13, 57]. Die Ergebnisse zeigen vor allem im kurzfristigen Bereich eine Beschwerdebesserung, die langfristig aber nicht zu erhalten war. Gute Ergebnisse wurden allerdings bei Knorpelschäden im Kindes- und Jugendalter mit noch offenen Wachstumsfugen erzielt [75]. Die Bildung des Fibrinclots bei der Mikrofrakturierung wird durch kleine Löcher erreicht, die mit engem Abstand in den subchondralen Knochen eingeschlagen werden. Vorher wird der Knorpelschaden von Knorpelresten und avitalem Gewebe befreit, sodass der subchondrale Knochen freiliegt. Der Abstand darf nicht zu eng gewählt werden, um nicht den zwischen den Löchern liegenden Knochen zu zerstören, die Tiefe der Perforation erfolgt bis etwa 4mm. Es sollen lediglich Mikrofrakturen der Trabekel auftreten, jedoch keine weitere Knochenzerstörung. Auch eine eventuelle Hitzenekrose wie beim Drilling wird vermieden. Mit den Erfolgsraten haben sich Steadman et al. intensiv beschäftigt, bei einem großen Patientenkollektiv und einem Follow-up von

mehreren Jahren konnte eine Beschwerdeverbesserung bei einem Großteil der Patienten nachgewiesen werden [137].

Die Abrasionsarthroplastik stellt eine Erweiterung des Drillings dar, hierbei wird der Knorpeldefekt bis zum angrenzenden Knochen debridiert und die freigelegte subchondrale Knochenoberfläche oberflächlich auf einer Dicke von 1 - 3mm mit einem Bohrer abgetragen. Auch hier füllt sich der entstandene neue Defekt mit Ersatzgewebe auf und auch hier ist der Effekt eher von kurzfristiger Dauer und kann in Abhängigkeit von Größe des Defektes und Alter des Patienten die Implantation eines künstlichen Kniegelenkes bestenfalls hinauszögern [73]. Oft berichten die Patienten aber von deutlichen postoperativen Schwierigkeiten und verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Beschwerdeverbesserung durch Debridement allein der Abrasionsarthroplastik allein oder auch in Kombination mit dem Debridement überlegen war [120]. Alle knochenmarkstimulierenden Techniken haben zum Nachteil, dass faserknorpelartiges Ersatzgewebe den Defekt auffüllt und der Knorpel in Abhängigkeit von der Defektgröße und der Belastung aufgrund seiner minderwertigen biomechanischen Eigenschaften wieder abgetragen wird, die Knorpelzerstörung also voranschreitet. Besonders ältere Patienten sind nur insuffizient mit markstimulierenden Techniken zu behandeln, da die intrinsische Heilungsfähigkeit in dieser Altersgruppe bekanntermaßen schlecht ist. Bei jungen Patienten mit noch nicht geschlossenen Wachstumsfugen sind diese Verfahren bei vollschichtigen Knorpelläsionen aufgrund der hohen intrinsischen Regenerationsfähigkeit indiziert und zu bevorzugen, im Erwachsenenalter können am besten kleine Knorpelschäden bis 2 cm² damit behandelt werden. Bei größeren Knorpeldefekten ist eher nachfolgend vorgestellten Verfahren wie Mosaikplastik und ACT der Vorzug zu geben [45].

Zu den wiederherstellenden Verfahren zählen die periostale und perichondrale Transplantation, die anfänglich eine gute Regeneration der Gelenkoberfläche zeigen. Im weiteren Verlauf entstehen jedoch häufig enchondrale Ossifikationen im Transplantat [13, 103]. Der Gedanke hinter diesem Prinzip fußt auf der Beobachtung, dass die mesenchymalen Stammzellen in Periost oder Perichondrium ihr chondrogenes oder osteogenes Potential behalten [95]. In verschiedenen Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine Knorpelbildung durch Aufnähen eines Periostlappens oder von einem Perichondriumtransplantat auf den Knorpeldefekt möglich ist [103]. Periost als biologische Prothese war schon seit längerem bekannt, neben den benötigten Zellen und der Matrix zum Einsprießen von Regeneratgewebe waren gleich lokale Wachs-

tumsfaktoren vorhanden [103, 104]. Anfänglich konnten auch Ergebnisse nachgewiesen werden, die die Bildung von Knorpelgewebe zeigten. Der Einfluss der Gelenkbewegung auf das chondrogene Potential führte zu vermehrten Untersuchungen bezüglich biomechanischer Stimulation. Durch Anwendung einer motorisierten Bewegungsschiene zur kontinuierlichen passiven Bewegung konnte die Qualität des postoperativen Ersatzgewebes noch verbessert werden [105, 106].

Perichondrale Transplantate, die in den Defekt gebracht werden, können sich ebenfalls zu hyalinem Knorpel differenzieren. Sie werden überwiegend aus der Rippenknochen-Knorpel-Grenze im Sternbereich entnommen und sind von der Größe oftmals limitiert, sodass häufig mehrere Rippen zur Deckung größerer Defekte benutzt werden müssen. Die Ergebnisse der klinisch mit dieser Methode behandelten Patienten waren zunächst gut, ein Großteil gab eine deutliche Beschwerdebesserung an, der Nachbeobachtungszeitraum war jedoch relativ kurz [24, 25].

Im weiteren Verlauf offenbart sich aber auch hier das gleiche Problem wie bei der Periostlappenplastik – die Ossifikationstendenz und die mangelnde Bindung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen. Dies ist, analog den stromalen Knochenmarkszellen, in der natürlicherweise osteoblastär ausgeprägten Differenzierungsweise von Vorläuferzellen dieser Herkunft begründet und trägt zur erheblichen Versagensquote beider Methoden bei [45, 57]. Die Langzeitresultate sind sowohl für die periostale als auch für perichondrale Transplantation enttäuschend [13, 14].

Wesentlich bessere Ergebnisse liefert die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT), die eine Erweiterung der Periostlappenplastik darstellt, und in den 1980er Jahren entwickelt wurde [18]. Hierbei wird im Vorfeld der eigentlichen ACT, und nachdem die Indikation gestellt ist, arthroskopisch vollschichtiger Knorpel aus einem nicht tragenden Gelenkbereich entnommen. Die darin enthaltenen Chondrozyten werden anschließend in Zellkultur unter sterilen Bedingungen vermehrt. Nachdem die Zellsuspension zur Verfügung steht, wird der Knorpeldefekt in einem zweiten Eingriff bis zum gesunden Randknorpel debridiert, ohne allerdings die subchondrale Zone zu eröffnen. Ein Periostlappen, meist aus dem proximalen medialen Tibiaplateau, wird auf den so präparierten Defekt aufgenäht und die vorbereiteten Chondrozyten darunter injiziert [19]. Phänotypisch stabile Chondrozyten überleben nach ihrer Retransplantation in vivo und leisten einen wesentlichen Beitrag zur qualitativ hochwertigen Defektauffüllung [37]. In einer Studie über einen Nachbeobachtungszeitraum von zwei bis neun Jahren mit einem Kollektiv von über 100 Patienten konnten gute Resultate nachgewiesen

werden. Von einem Teil der Patienten konnten arthroskopisch gewonnenen Biopsien histologisch nachuntersucht werden und in 80 Prozent der Biopsien wurde hyalinartiger Knorpel nachgewiesen [114]. Der Knorpel besitzt zwar nicht die zonale Struktur des unverletzten Gelenkknorpels, die biomechanische Belastbarkeit und biochemische Zusammensetzung entspricht aber weitgehend dem unverletzten hyalinen Knorpel und wird auch längerfristig beibehalten. Die Festigkeit kann bis zu 90 Prozent und mehr der Festigkeit gesunden hyalinen Knorpels aufweisen und ist damit diesbezüglich und auch in den biochemischen Eigenschaften dem Faserknorpel deutlich überlegen [113, 114, 121]. Das Transplantat unterliegt jedoch zunächst einem Umbauvorgang, sodass die endgültige Gewebequalität meist nicht vor dem Ablauf von 24 Monaten erreicht wird [121]. Im Verlauf korrelieren initial gute klinische Ergebnisse auch langfristig mit guten Resultaten, es besteht eine hohe Korrelation zwischen der Regeneration eines hyalinartigen Knorpels sowie guten Ergebnissen. Die Untersuchungszeiträume belaufen sich mittlerweile auf weit über 10 Jahre. Die ACT hat eine relativ geringe Komplikationsrate, am häufigsten tritt eine Transplantathypertrophie auf, die gut arthroskopisch behandelbar ist [114]. Transplantatverknöcherungen werden auch nach längeren Beobachtungszeiträumen nicht beobachtet. Die falsche Indikationsstellung oder Operationstechnik und auch eine unzureichende Qualität der angezüchteten Chondrozyten kann allerdings zu einem kompletten Transplantatversagen oder unzureichenden histologischen Ergebnissen führen [56]. Die Indikationsempfehlungen für die ACT bestehen momentan insbesondere größere Knorpeldefekte ab 4 cm², hier scheitern meist schon aus Gründen mangelnder technischer Durchführbarkeit andere biologische Rekonstruktionsverfahren. Dem Hauptnachteil, der Notwendigkeit eines zweiten offenen Eingriffes im Sinne einer Arthrotomie, was Adhäsionen und eine prolongierte Erholung bedeuten kann, stehen die Vorteile der Erhaltung der osteochondralen Integration, die Verwendung ausdifferenzierter Chondrozyten und die Möglichkeit zur Deckung großer Defektareale gegenüber.

Zu den osteochondralen Transferv Verfahren zählt die Mosaikplastik, hier werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus gering belasteten Knorpelzonen beispielsweise des Kniegelenks entnommen und in Defekte der Belastungszonen transplantiert. Die Technik, chondrale und osteochondrale Defekte mittels osteochondraler Transplantation zu therapieren, wurde erstmals 1964 erwähnt [148] und dann 1993 erneut aufgegriffen [90]. Im weiteren Verlauf wurde die technische Handhabung verbessert und auch ein arthroskopisches Vorgehen ermöglicht [52]. Die Anwendung allogener osteochondraler

Transplantate sollte wegen der schon von Transplantationen bekannten Komplikationen wie Infektionsrisiko und potentieller Immunogenität auf Sonderfälle beschränkt bleiben, bei denen alternative Verfahren aufgrund Defektgröße und Defekttiefe nicht mehr möglich sind. Des Weiteren ist die Vitalität der gefrorenen Knorpelzellen fraglich. Mittel- bis langfristige Verlaufsbeobachtungen sind in der Regel schlecht, da die Chondrozyten die Konservierung nicht überleben [60]. Wegen der erheblichen Komorbidität gilt das Gleiche bezüglich der Indikation für den posterioren Kondylen-transfer und die daraus entwickelte Methode der Mega-OATS [23].

Obwohl die Mosaikplastik ursprünglich für die Behandlung lokaler Knorpeldefekte in den Belastungszonen des Femurs entwickelt worden ist, wird sie mittlerweile auch im Bereich von Patella und Tibia sowie an anderen Gelenken wie Ellenbogen, Sprunggelenk und an der Schulter eingesetzt [61]. Bei der besonders im Bereich des Kniegelenkes häufig angewandten Methode der osteochondralen autologen Transplantation werden mit einem speziellen Instrumentarium aus den geringer belasteten proximalen lateralen oder medialen Arealen der Femurkondylen oder der interkondylären Notch Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen und in Knorpeldefekte der Belastungszonen transplantiert. Die Durchmesser der zylindrischen Autografts sind, bei einer Länge von 15 bis 25 mm, zwischen 4 bis 12 mm variierbar. Durch die Verwendung spezieller Rundmeißel können die Autografts mit uniformer Größe und Länge gewonnen werden. Der Durchmesser des Spenderzylinders ist immer geringfügig größer als der des Empfängertunnels, so dass der Spenderzylinder in Press-Fit-Technik mit festem Halt implantiert werden kann. Je nach Größe und Lokalisation sowohl des Defektes als auch der Spenderregion kann dies als arthroskopisches Vorgehen oder mittels Miniarthrotomie erfolgen.

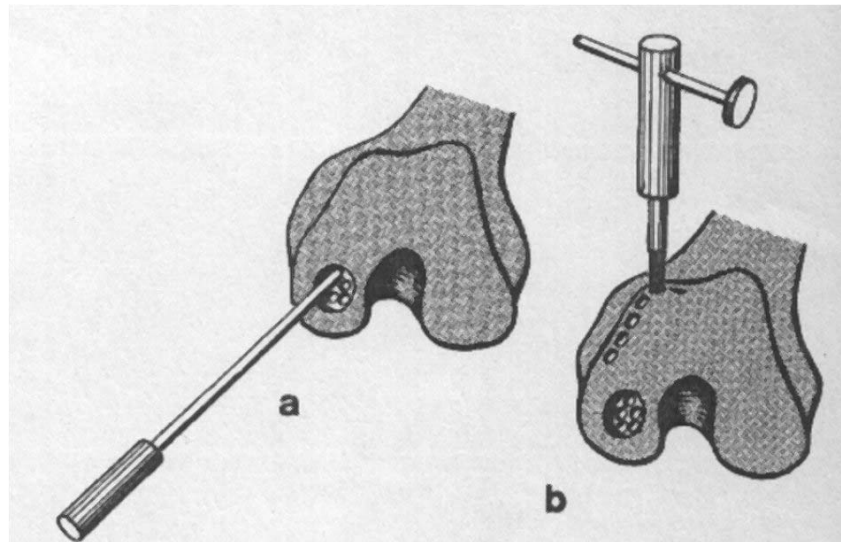


Abbildung 3: Technik der osteochondralen Transplantation (aus: [52])

Je größer die Zahl der zu transplanzierenden Zylinder, desto schwieriger wird ein arthroskopisches Vorgehen. Die Lokalisation, die Größe und die Tiefe des Defektes sollte präoperativ mittels Bildgebung für die Planung der Vorgehensweise abgeschätzt werden. Die Größe und das Ausmaß des Defekts werden dann nach Debridement bis zum Gesunden nochmals arthroskopisch mit dem Tasthaken evaluiert. Dann wird bestimmt, ob einer oder mehrere Zylinder transplantiert werden müssen. Im Anschluss hieran wird dann auch entschieden, ob ein arthroskopisches Vorgehen möglich ist, oder ob ein offener Zugang gewählt werden muss. Unter Zwei-Gelenk-Technik versteht man die Entnahme von Spenderzylindern aus einem Gelenk, beispielsweise dem Knie, und die Implantation in ein anderes Gelenk [30, 60]. Die klinischen Ergebnisse sind bei kleineren bis mittleren Defektgrößen gut und fußen auf Studien mit großen Patientenkollektiven, teilweise über einen Zeitraum von nunmehr über zehn Jahren. Über 90 Prozent der Patienten beschrieben eine deutliche klinische Besserung postoperativ, die sich auch über die Nachbeobachtungszeiträume hielt. Bei großflächigen, mit der Mosaikplastik behandelten Knorpelschäden, wurden jedoch hohe Komplikations- und Reoperationsraten beobachtet [51-54]. Probleme können schon perioperativ bei der Entnahme der Zylinder auftreten, diese können zu lang oder zu kurz geraten, es können Rotationsfehler beim Einpassen entstehen, oder im schlechtesten Fall können die Zylinder auch abbrechen. Die Transplantation erfordert ein präzises operatives Vorgehen, jeder Zylinder muss in exakter Höhe und Inklination zur umgebenden Gelenkknorpeloberfläche platziert werden. Sitzt er zu tief, erfährt er keinen normalen artikulären Druck und übernimmt somit keine Druckverteilung im Gelenk, was zu einer

weiteren Degradation des umgebenden Gelenkknorpels führen kann. Sitzt der einzelne Zylinder zu hoch, übernimmt er einen zu hohen Teil des Gelenkdruckes und braucht sich schneller auf, oder schädigt so die gegenüberliegende Knorpeloberfläche. Meist lässt sich die Länge mit speziellen Instrumenten noch anpassen, sollte dies allerdings nicht mehr möglich sein, muss ein neuer Zylinder gewonnen werden. Problem hierbei ist die mangelnde Verfügbarkeit von Spenderzylindern und die assoziierte Morbidität, die im Bereich der Entnahmestellen der Spenderzylinder auftritt. Postoperativ können Hämatome infolge von Nachblutungen aus den Entnahmestellen auftreten, im weiteren Verlauf kann es zu Infektionen, Sinterungen und Schmerzzuständen im femoropatellaren Gleitlager kommen [30, 61]. Nach Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle und Einbringen der Knorpel-Knochen-Zylinder konnte in Studien die Bildung von Faserknorpel mit den entsprechend minderwertigen tribologischen Eigenschaften dazwischen nachgewiesen werden [23]. Ein weiteres Problem dieser Technik ist die Inkongruenz der Knorpeloberfläche. Da sich die Oberflächenform der Zylinder aus den Bereichen, aus denen sie entnommen werden, von der des Empfängerareals unterscheidet, besteht die Gefahr der sekundär wirksamen pathologischen Stufenbildung zwischen den Oberflächen. Dieses wird naturgemäß umso wahrscheinlicher, je größer die Zahl der transplantierten Zylinder ist. Die resultierenden, abnormen Belastungsdrücke führen im schlechtesten Fall zum Absterben der Chondrozyten mit veränderten Stoffwechsellleistungen im und um das Transplantat, was eine weitere lokalisierte Knorpeldestruktion zur Folge hat. Die Grenzen dieser Methode werden dann je nach Defektlokalisationen spätestens bei etwa 3 bis 4 cm² Defektgröße erreicht [23, 45, 57].

1.3 Wachstumsfaktoren

Insgesamt ist das komplizierte Zusammenspiel aus verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein entscheidender Faktor bei der Regeneration nach Knorpelschäden und bei der Progression zu einer posttraumatischen Arthrose.

An dieser Stelle sollen Wachstumsfaktoren, welche die Knorpelregeneration möglicherweise positiv beeinflussen können, deren Wirkung am geschädigten Knorpel und mögliche klinische Anwendungen und Nebenwirkungen erläutert werden. Von besonderem Interesse ist hier der Hepatocyte Growth Factor (HGF).

Um das Einheilen der Transplantate insbesondere auf Knorpelniveau zu verbessern, sind bereits verschiedenste Versuche unternommen worden, diesen Prozess mit

Wachstumsfaktoren wie IGFs, BMPs, TGF- β und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) zu unterstützen. Wachstumsfaktoren sind Polypeptide die Zellteilung, Zellmigration, Zelldifferenzierung und Matrixsynthese stimulieren. Es ist bereits für verschiedene dieser Moleküle ein Effekt auf Chondrogenese und Metabolismus nachgewiesen worden. Die Freisetzung erfolgt aus den Zellen der knöchernen Matrix und den Zellen, die im Knorpelmetabolismus als Antwort auf osteochondrale Schädigung oder operative Intervention miteinander interagieren [26, 101]. Die meisten Wachstumsfaktoren wirken komplex eingebettet in Aktivierungs- und Hemmkaskaden, was die genaue Untersuchung von deren Wirkung, insbesondere in vitro, schwierig macht.

IGF-1 ist unter normalen Bedingungen der wesentliche homöostatische Faktor, der Matrixsynthese und Abbau kontrolliert. Serum und Synovialflüssigkeit haben in Kultur einen wesentlichen Einfluss auf den Knorpelumsatz, dieser Effekt geht jedoch mit Abwesenheit von IGF-1 verloren. Allerdings fand sich trotz erhöhter IGF-1 Konzentrationen im Gelenk gegenüber dem Serum ein Nichtansprechen osteochondraler Läsionen auf diesen Wachstumsfaktor, der mögliche Grund hierfür ist eine Überexpression und überschießende Bildung von IGF-1 Bindungsproteinen [89]. Dieses, in verschiedensten Studien nachgewiesene Nichtansprechen auf exogenes IGF-1, macht die therapeutische Applikation dieses Wachstumsfaktors problematisch [146].

TGF- β ist ein universell zellregulierendes Protein, welches in Knochenmark, Knorpel, Lymphozyten und anderen Geweben nachgewiesen worden ist und von dem verschiedene Untergruppen existieren [140]. Im Knorpel ist TGF- β , von den Chondrozyten produziert, in latenter Form vorhanden. Es beeinflusst die Proliferation von Chondrozyten, von Periost der Tibia und des Schädelknochens und von Osteoblasten [34, 101]. Die Wirkungen von TGF- β sind vielfältig, es scheint einen wesentlichen Teil im Netzwerk der Wachstumsfaktoren im Rahmen der Knorpelhomöostase zu haben. Viele Studien beziehen sich auf den proliferativen Effekt von TGF- β im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren [34, 109]. Im Gegensatz zur Reaktion auf IGF zeigt sich bei geschädigtem Knorpel eine gesteigerte TGF- β Sensitivität bei wiederholter Exposition, in einem Mausmodell konnte die zweifach gestiegene Proteoglykansynthese nach lokaler Applikation dieses Faktors in das Gelenk nachgewiesen werden. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass TGF- β Chondrozyten zu sensitiven Zellen umwandeln kann. Und die gesteigerte Sensitivität der Chondrozyten auf TGF- β im Rahmen der Arthrose deutet somit auf wiederholte TGF- β Exposition und damit auf die ent-

scheidende Funktion dieses Wachstumsfaktors bei der Progression von Arthrose [142, 144, 146]. Während die Gabe eines TGF-bindenden Rezeptors den Proteoglykanabbau im Modell einer experimentell induzierten Arthrose deutlich verschlechtert, verbessert die wiederholte intraartikuläre Gabe von TGF- β die Wiederherstellung des entzündungsbedingten Proteoglykanverlustes. Hierin zeigt sich die bedeutende Rolle dieses Moleküls in der endogenen Reparatur von Knorpeldefekten, während die Verbesserung der Defektheilung nach Administration darauf rückschließen lässt, dass sich die von TGF- β vermittelten endogenen Reparaturmechanismen noch verbessern lassen [46]. Ein unerwünschter Nebeneffekt ist allerdings die Bildung von Osteophyten, welcher durch oben genannte Applikation von TGF- β bindenden Rezeptoren und damit stattfindende Blockade des Moleküls verhindert werden konnte [46, 142, 146].

Die Bone Morphogenic Proteins (BMPs) sind ein Teil der TGF- β Großfamilie und bis dato sind viele verschiedene BMPs entdeckt worden. Sie sind integraler Bestandteil von osteochondralen Reparaturprozessen und können über enchondrale Ossifikation die Bildung von Knochen in Weichgeweben vermitteln [40]. Die Wirkung dieser Signalproteine beruht auf der Bindung an Oberflächenrezeptoren vieler verschiedener Zelltypen, insbesondere an denen undifferenzierter Stammzellen und noch im Wachstum befindlicher Zellen von Binde- und Stützgeweben. Auf der Grundlage ihrer variablen Expression haben die BMPs Einfluss auf die Chondrogenese und sind in verschiedenen Stufen mit der skelettalen und Weichgewebsentwicklung verknüpft [101]. Für Reparaturprozesse an vollschichtigen Knorpelschäden müssen vor der Knorpeldifferenzierung mesenchymale Stammzellen an den Ort der Schädigung einwandern. Die BMPs nehmen hier eine Vorreiterrolle ein, da sie für diese Aufgabe der ideale Wachstumsfaktor zu sein scheinen. In operativ konstruierten vollschichtigen Knorpeldefekten in einem Kaninchenmodell konnte eine deutlich gesteigerte Neubildung von subchondralem Knochen und ein verbessertes histologisches Erscheinungsbild des darüber liegenden Knorpels nachgewiesen werden, wenn die Defekte mit BMP-2 imprägnierten Kollagenschwämmen behandelt wurden. Auch fand sich während des Wiederherstellungsprozesses signifikant mehr Typ-II-Kollagen im Defektbereich [125]. Die intraartikuläre Injektion von BMP-2 in Gelenke von Mäusen hatte die schnelle und deutliche Steigerung der Proteoglykansynthese zur Folge, welche im Gegensatz zur Stimulation mit TGF- β aber von kürzerer Dauer war [142]. In dem Zusammenhang war ebenfalls auffällig, dass BMP-2 die chondrozytäre Proteoglykansynthese nur in Abwesenheit des, in entzündlichen Gelenkprozessen in hohen Konzentrationen an-

wesenden, katabolen Zytokins IL-1 steigern kann. TGF- β kann diese Effekte auch in Anwesenheit von IL-1 vermitteln [145]. Auch unter dem Einfluss von BMP-2 fanden sich osteophytäre Formationen in den Randbereichen des Gelenkes [142].

Der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) wird sowohl von Knorpelzellen als auch von der Hirnanhangsdrüse gebildet. Er wird in den chondrozytären Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung sowie bei der Frakturheilung exprimiert. Zunächst als Peptid mit mitogenen Eigenschaften auf Fibroblasten identifiziert, konnte auch ein wesentlicher Einfluß auf die chondrozytäre Proliferation nachgewiesen werden [34, 43]. Die intraartikuläre Injektion von bFGF in die Knie von heranwachsenden Ratten führte zu einer Vergrößerung der Knorpelfläche im Randbereich, also in dem Bereich, wo sich die meisten proliferierenden Zellen finden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Studien, in denen nach intraartikulärer Administration dieses Wachstumsfaktors keine morphologischen Veränderungen, allerdings in adultem Knorpel, nachgewiesen werden konnten [101]. Von Bedeutung scheinen also auch das Alter des Zielgewebes und die applizierte Dosis zu sein, was jeweils Einfluss auf anabole oder katabole Prozesse im Knorpelmetabolismus zu haben scheint [140]. Das Zeitintervall zwischen Schädigung und Wachstumsfaktorapplikation ist ebenfalls von Bedeutung, die frühe intraartikuläre Applikation führt zu deutlich weniger Faserknorpelbildung in vollschichtigen Defekten im Hasenmodell. Ebenfalls auffällig war die verbesserte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu einem chondrozytären Phänotyp, sowie die gesteigerte Proliferation von bereits ausdifferenzierten Chondrozyten und die erhöhte Konzentration von Typ-II-Kollagen und Proteoglykanen [43]. Verschiedenste Studien haben die Wirkung von bFGF auf Knorpelschäden untersucht und positive Effekte zeigen können [43, 133, 140], gerade die Unterschiede zwischen in vitro und in vivo Aktivität unterstützen aber die Vermutung, dass auch dieser Wachstumsfaktor in ein komplexes Netzwerk aus Signalkaskaden eingebunden ist [109]. bFGF ist ein potenter mitogener und proliferativer Faktor in vitro. In vivo beeinflusst bFGF die Heilung von oberflächlichen und vollschichtigen Knorpelschäden positiv und die anabolen Effekte scheinen die katabolen Einflüsse aufzuwiegen [101].

1.3.1 Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Das HGF System besteht aus dem Protein selbst, seinem Tyrosinkinase-Rezeptor c-met, dem HGF Aktivator (HGFA) und dem HGF Aktivator Inhibitor (HAI). In einen parakrinen und autokrinen Feedback Mechanismus eingebaut, bindet und aktiviert HGF

mesenchymalen Ursprungs an seinen Rezeptor c-met auf epithelialen Zellen. Diese reagieren dann mit unterschiedlichsten morphologischen und funktionellen Veränderungen. Conway et al. haben dieses System näher beschrieben [33]. HGF ist ein Wachstumsfaktor, der erstmals im Serum hepatektomierter Ratten identifiziert werden konnte. In vitro zeigte sich eine stark stimulierende Wirkung auf Leberzellwachstum, was die Namensgebung erklärt. Nach Klonen und den damit verbesserten Untersuchungsmöglichkeiten entpuppte sich HGF als multifaktorieller Wachstumsfaktor mit großem Potential. Vor allem die entdeckten angiogenen und proliferativen Eigenschaften auf eine Vielzahl von epithelialen Geweben sind von besonderem Interesse [31, 68]. Das HGF Molekül ist ein durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer, welches aus einer 69kDa schweren α -Kette und einer 34kDa schweren β -Kette besteht und durch enzymatische Hydrolyse mittels einer Serinprotease aus einer einkettigen Proform entsteht [96]. Die n-terminale Haarnadelschleife vermittelt die Rezeptor-Liganden Bindung, während die auf der α -Kette lokalisierten 4 gekräuselten Domänen K 1-4 für die Funktion und Aktivierung des HGF Rezeptors zuständig sind [68]. Der Genort für menschliches HGF liegt auf Chromosom 7 (7q21.1) und besteht aus 18 Exons und 17 Introns [44]. Die einkettige Proform von HGF, Pro-HGF, kann von mehreren Molekülen in die biologisch aktive Form umgewandelt werden. Das hierfür hauptverantwortliche Molekül ist eine Serinprotease, der HGF Aktivator (HGFA). Dieser Aktivator wird in inaktiver Form sezerniert und dann in verletzten Geweben durch andere Proteasen in seine aktive, HGF konvertierende Form umgewandelt. Enzyme, die diese Fähigkeit besitzen, sind unter anderem Thrombin [129], Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp und vom Zelltyp [84], sowie Faktor XIIa aus der Blutgerinnungskaskade [130]. Das Hauptorgan der Sekretion von HGFA ist die Leber, von wo HGFA in seiner Proform sezerniert wird und von Thrombin in die aktive Form umgewandelt wird [92]. Kürzlich sind zwei weitere Serinproteasen beschrieben worden, die durch Bindung an HGFA die Umwandlung von Pro-HGF zu HGF blockieren können [76]. Die Bezeichnung leitet sich auch hier wieder aus der Funktion ab, HGFA Inhibitor Typ 1 und Typ 2 (HAI-1 und HAI-2). Diese liegen einerseits zellmembran-gebunden vor und können hier reversibel an HGFA binden, andererseits kommen die Inhibitoren aber auch in gelöster Form vor und blocken so effektiv die HGFA Aktivierung [38, 119].

Der HGF-Rezeptor c-met wird von dem c-met Protoonkogen codiert und hauptsächlich auf epithelialen Zellen exprimiert. Er besteht aus einem zweikettigem Protein mit einer

50kDa schweren α -Kette und einer 145kDa schweren β -Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind [68]. Der Rezeptor ist ein integriertes Membranprotein, die α -Kette liegt an der Zelloberfläche während die β -Kette in der Zellmembran bis nach intrazellulär reicht und dort eine Tyrosinkinasedomäne besitzt. Die Bindung von HGF über die n-terminalen und die K-Domänen vermittelt eine Phosphorylierung des Rezeptortyrosinmoleküls, die über eine Rezeptor-Ligand vermittelte Konfigurationsänderung in ein Homodimer die Phosphorylierung weiterer Tyrosinmoleküle am intrazellulären Anteil der β -Kette ermöglicht [112]. Je nach disulfidhaltigem Molekül, welches an das jeweilige Phosphotyrosin bindet, werden unterschiedliche Zellantworten vermittelt. Die Stimulation von c-met durch HGF führt über intrazelluläre Signalkaskaden durch Phosphorylierung zur Aktivierung von Proteinkinase C und zur Mobilisation von Kalzium, was letztendlich die Zellproliferation und Zellbeweglichkeit beeinflusst [68]. Der c-met Rezeptor findet sich auf epithelialen Zellen in einer Vielzahl von Geweben und ist dort im Bereich der intrazellulären Zell-Zell-Verbindungen gemeinsam mit Zelladhäsionsmolekülen lokalisiert. Der Rezeptor wird neben HGF von einer Vielzahl von Molekülen stimuliert. Hierzu zählen unter anderem Epidermal Growth Factor, IL 1 und 6, TNF α und Steroidhormone wie Progesteron, Tamoxifen und Dexamethason [11].

HGF hat eine Vielzahl von Wirkungen auf unterschiedlichste Gewebe im Körper, er fördert die Zellmigration, die Proliferation von Hepatozyten, die Angiogenese und reguliert Morpho- und Organogenese in einer Vielzahl von Zellen [69]. Auslöser der HGF-Aktivierung ist der Gewebeschaden, HGF-mRNA konnte nach Leberschädigung in dem verletzten Lebergewebe, aber auch in erhöhten Konzentrationen in unverletztem Gewebe nachgewiesen werden [88]. HGF spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Heilung von verschiedenen anderen Geweben des Körpers [69]. Des Weiteren konnte HGF durch seine Fähigkeit Endothelzellproliferation, Endothelzellmotilität und die Neubildung von Gefäßen zu stimulieren, als potenter angiogener Faktor identifiziert werden [31]. Angiogenese ist ein wesentlicher Bestandteil von Wundheilung, allerdings auch von Tumorprogression und Metastasierung [68]. Der hochkomplexe Prozess der Angiogenese erfordert die Proliferation und Migration von epithelialen Zellen und die Modifikation von Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Kontakten mit epithelialen Zellen. Im Tierversuch mit Subkutangewebe oder Kornea konnte HGF das Einwachsen neuer Blutgefäße induzieren [31]. Die Stimulation von endothelialen Zellen von großem Netz beim Menschen mit HGF führte in Anwesenheit von aktiviertem tissue

Plasminogen-Activator (tPA) zum Auswachsen tubulärer Strukturen, was Rückschlüsse auf die zusammenwirkende Rolle dieser beiden Faktoren zulässt [93]. Auch für andere Wachstumsfaktoren ist ein verstärkender Effekt auf die HGF-vermittelte Angiogenese erwiesen [135]. Der c-met Rezeptor konnte zum Beispiel neben seiner Präsenz in epithelialen Zellen auch in den Zellen des Gefäßsystems und in Myozyten des Herzens nachgewiesen werden. Kombiniert mit dem Wissen um die leistungsfähigen mitogenen und angiogenen Eigenschaften von HGF ergibt sich hier möglicherweise eine Behandlungsmöglichkeit für periphere arterielle Verschlusskrankheit, Neoangiogenese nach Herzinfarkt oder eine Verbesserung der Durchblutung nach Restenose einer angioplastierten Herzkranzarterie [94]. In neuerer Zeit mehren sich die Hinweise auf einen protektiven Effekt von HGF bei cerebralen ischämischen Erkrankungen. In vorangegangenen Studien war gezeigt worden, dass HGF und sein Rezeptor c-met verschiedenste Reaktionen auf zellulärer Ebene auslösen können. Diese mitogenen, angiogenen, morphogenen und antiapoptischen Eigenschaften konnten auch für Zellen unterschiedlicher Gehirnregionen beschrieben werden. Insbesondere verbesserte HGF das Überleben von Neuronen in Hippocampus und Cortex im Verlauf des Alterungsprozesses in Kultur. Die neuroprotektiven Eigenschaften von HGF in vivo bei ischämischen Erkrankungen sind noch nicht in vollem Umfang verstanden. Vieles deutet darauf hin, dass HGF die Translokation des Apoptose induzierenden Faktors in den Nucleus nach ischämischer neuronaler Schädigung verhindert und so hippocampale Neurone vor dem Zelltod beschützt. Auch konnte das Wiedererlernen von Fähigkeiten und Gedächtnisleistung nach cerebralen embolischen Ereignissen durch HGF positiv beeinflusst werden, was vermutlich auf protektive Eigenschaften auf die Hirngefäße zurückzuführen ist [100].

In diesem Zusammenhang haben sich eine Vielzahl der Studien mit der Rolle von HGF bei der Regulation von Tumorprogression und Metastasierung beschäftigt, dies haben Jiang et al. näher beschrieben [68]. Die Modulation von interzellulären Kontakten im Tumorgewebe ist eine wesentliche Voraussetzung von metastatischer Ausbreitung, hier könnte die HGF-vermittelte Regulation von Tumorzellmatrix und Tumorendothel die intra- und extravasale Tumorzellausbreitung begünstigen. Diese Effekte sind von dem Protoonkogen c-met vermittelt.

HGF hat unterschiedliche Wirkungen auf eine große Zahl von Tumorzellen, die je nach Tumorgewebe mit verstärktem oder gehemmtem Wachstum, oder mit Apoptose reagieren können. Beim Magenkarzinom, beim Nierenzellkarzinom oder beim Pankreas-

karzinom erhöhte HGF die Proliferation und Motilität [39], während die Proliferation bei kolorektalen Karzinomen herabgesetzt war und dafür die Motilität gesteigert war [70, 71]. Über den c-met Rezeptor können je nach Tumor und Gewebe unterschiedliche Effekte auf Zellwachstum und Zelltod ausgelöst werden. In B-Zell-Vorläuferzellen kann durch HGF Wachstum ausgelöst werden, wohingegen der Zelltod in erythroleukämischen Zellen ausgelöst wird [63]. Die Voraussetzungen für die Metastasierung von Tumorzellen sind hochspezifische Schritte. Hierzu gehört der Verlust von Zell-Zell Adhäsionen im Bereich des Primärtumors, Adhäsion an und Invasion der Basalmembran und der extrazellulären Matrix und dann die Invasion des Gefäßsystems mit nachfolgender Fortbewegung zum Ort der Metastasierung. Hierbei muss die Tumorzelle das Immunsystem überleben, nach Anhaften an das Gefäßendothel das Gefäßsystem verlassen und am Zielort eine Neovaskularisation zur eigenen Ernährung und zum eigenen Wachstum aufbauen [72]. Die Stimulation von Tumorzelllinien mit HGF begünstigte die Zelldissoziation, vermutlich durch die Hemmung von Zell-Zell-Adhäsionsmechanismen [111]. Um die Basalmembran und extrazelluläre Matrix zu überwinden, bedienen sich die Tumorzellen der Integrinmoleküle. Diese fungieren als transmembranes Verbindungsglied zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett. Am Beispiel von c-met positiven B-Lymphom Zellen konnte gezeigt werden, dass HGF die Adhäsion an extrazelluläre Matrixmoleküle verbessert und die Invasion und Migration dieser Zellen unterstützt [152]. Nach der Adhäsion an Moleküle der extrazellulären Matrix müssen die Tumorzellen diese nun andauern und überwinden. Dieser Effekt wird durch proteolytische Enzyme und Zellmotilität begünstigt. HGF stimuliert die Invasion der extrazellulären Matrix in einer Vielzahl von Tumorzellen, unter anderem durch die Stimulation von matrixabbauenden Enzymen wie MMPs, Kollagenasen und Stromelysin. Die morphogenetischen Eigenschaften von HGF an der Zellmembran werden durch Actinfilamente, Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Zellkontakte im Junctionsbereich vermittelt. Ausgelöst wird hier eine Vielfalt von gewebsspezifischen Programmen, die Form und Aussehen der epithelialen Zelle verändern. Ist die Tumorzelle erst einmal in das Blutgefäßsystem eingewandert und hat dort überlebt, muss sie an anderer Stelle wieder durch das Gefäßendothel aus dem Gefäßsystem austreten. Hierzu machen sich Tumorzellen die vorhandenen Zell-Zell-Adhäsionsmechanismen zunutze, um nach initialem Andocken an das Endothel fest daran zu binden und die Zelle zu penetrieren. HGF verstärkt sowohl diese Bindung an das Endothel, als auch die Expression von CD 44 auf endothelialen Zellen. Dieses Molekül spielt eine ent-

scheidende Rolle bei der Tumorzell-Endothel Interaktion und der Metastasierung von Tumoren. Die stimulierende Wirkung von HGF auf die Zellmotilität von Tumorzellen konnte am Beispiel von verschiedenen soliden Tumoren und für das maligne Melanom nachgewiesen werden [70]. Ohne die Bildung neuer Blutgefäße könnte sowohl der Primärtumor, als auch eine Metastase nicht wachsen und überleben. Diese Neoangiogenese wird von HGF als potentem Stimulator wirkungsvoll unterstützt [31] und kann von anderen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) noch verstärkt werden [135]. HGF und der dazugehörige Rezeptor c-met sind dahingehend von großer klinischer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass der Rezeptor in vielen Krebsarten überexprimiert ist und diese Tumorzellen dann besonders sensibel auf HGF Stimulation reagieren. Auch konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von HGF und von c-met im Serum bei verschiedenen Tumorerkrankungen erhöht sind und mit der Prognose der Erkrankung korreliert werden könnte [153]. Durch die bisherigen Studien der HGF Wirkung auf Tumorprogression und Metastasierung, welche durch den c-met Rezeptor vermittelt wird, ergeben sich Angriffspunkte für eine antitumorale Therapie zum Beispiel durch HGF Antagonisten, bestimmte Interleukine (IL 4, IL 12) oder Invasions-hemmende Faktoren (IIFs) [141].

1.3.2 Einfluss von HGF auf Knorpelzellen

HGF fördert neben Proliferation und Chemotaxis auch die Angiogenese und Morphogenese in epithelialen Zellen [87]. Von besonderem Interesse ist hier die Rolle, die HGF im Zusammenhang mit Knorpelmetabolismus in vitro und in vivo spielt. Der HGF-Rezeptor c-met konnte in heranwachsenden Extremitäten nachgewiesen werden, was Rückschlüsse darauf zulässt, dass einige der mesenchymalen Zellen auf HGF reagieren [136]. In heranwachsenden Extremitäten geht der Knorpelbildung die Verdichtung mesenchymaler Zellen voran, die sich dann zu Knorpel differenzieren. Dieser Knorpel wird im weiteren Verlauf teilweise durch Knochen ersetzt, den so beschriebenen Vorgang nennt man enchondrale Ossifikation. Hierdurch bilden sich die Skelettstrukturen in Extremitäten im Wachstum [62]. Um die Auswirkungen von HGF auf die Knorpelentwicklung genauer zu untersuchen, isolierten Takebayashi et al. Chondrozyten aus Knie und Rippenknorpel von heranwachsenden Kaninchen und untersuchten die Auswirkungen von HGF auf Migration und Proliferation dieser Zellen. HGF stimuliert demnach die Migration von Chondrozyten in Kultur, weitere Aus-

wirkungen auf Fibroblasten in Extremitäten oder Synovia konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch die Proliferation der Chondrozyten wurde durch HGF stimuliert, was sich in einer dreifach gesteigerten DNA Synthese bei einer Konzentration von 3ng/ml HGF sowie einer gesteigerten Proteoglykansynthese in den Chondrozyten äußerte. Der HGF Rezeptor konnte ebenso auf den Chondrozyten nachgewiesen werden [138]. Auch andere Studien konnten die Beteiligung von HGF beim Extremitätenwachstum nachweisen. Jikko et al. untersuchten die Wirkung von HGF und dem dazugehörigen Rezeptor c-met auf Chondrozyten im Bereich der Wachstumsfuge. Dort proliferieren Knorpelzellen und bilden Kollagen Typ II und Proteoglykane aus. Im Rahmen der enchondralen Ossifikation hypertrophieren diese Chondrozyten, produzieren Typ X Kollagen und Alkalische Phosphatase (AP) und mineralisieren die sie umgebende extrazelluläre Matrix. Durch einwachsende Gefäße und Chondroklasten in die Zone der hypertrophen Chondrozyten und mineralisierten Matrix wird die Ossifikation vervollständigt. Bei Chondrozyten aus dem Bereich der Wachstumsfuge zeigte sich in Kultur die Expression von HGF und c-met, die im Verlauf des Entwicklungszyklus noch zunahm. Auch in vivo fand sich HGF und sein Rezeptor auf den Chondrozyten exprimiert, während sich hier aber nur schwach stimulatorische Wirkungen von HGF auf die Synthese von DNA und Proteoglykan darstellten. Der c-met Rezeptor wurde im Verlauf der Reifung der Wachstumsfuge auf den Chondrozyten herunter geregelt und die differenzierten Chondrozyten im Endstadium, die Typ X Kollagen und AP exprimierten, wurden in dieser Studie sogar durch HGF gehemmt [2]. Eine weitere Studie von Grumbles et al. hat auch den Effekt von HGF auf Knorpelzellen im Bereich der Wachstumsfuge in vivo am Rattenmodell und auf Chondrozyten in Kultur aus der proliferativen Zone untersucht. Hier fand sich sowohl in vivo als auch bei kultivierten Chondrozyten HGF-mRNA und Rezeptor-mRNA. Die Konzentrationen von Kollagen-II-mRNA und AP-mRNA konnten durch HGF etwa dreifach stimuliert werden. Den gleichen Effekt hatte auch die Zugabe von Calcitriol, einem aktiven Vitamin-D Metaboliten. Die Kombination beider Faktoren führte im Sinne eines Synergismus zu einer neunfach gesteigerten AP-mRNA-Synthese. Zusätzlich zur Rolle während der Skelettreifung könnte HGF also auch noch die hormonelle Sensitivität des Chondrozyten während Proliferation, Differenzierung und Apoptose modifizieren [48]. Pfander et al. haben die Verteilung und Expression von HGF und dem c-met Rezeptor in gesundem und arthrotischem Knorpel in vivo untersucht. In normalem Knorpel fanden sich immunhistochemisch HGF- und Re-

zeptorexpression vor allem in der tiefen Zone und im Bereich der kalzifizierten Zone, vereinzelt wurde der c-met Rezeptor noch in der Intermediär- und oberflächlichen Zone exprimiert. Dagegen fand sich im Rahmen der Untersuchung des geschädigten Knorpels eine verstärkte Anfärbbarkeit für HGF in tiefer Zone und mittlerer Zone, während der c-met Rezeptor in allen Zonen verstärkt präsent war. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf eine wesentliche Rolle von HGF und dem c-met Rezeptor bei der Progression von Arthrose zu [116]. Wieder andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass HGF bei Osteoarthrose von Osteoblasten vermehrt gebildet wird und dann in den Knorpel hinein diffundiert [49], oder sie bezweifeln eine wichtige Rolle von HGF im Zusammenhang mit dem Knorpelmetabolismus bei Arthrose [5]. Bhargava et al. haben Meniskusschäden, die mit Wachstumsfaktor-impregnierten Kollagenträgern behandelt wurden, *in vitro* untersucht. Verglichen wurden HGF und PDGF (Platelet Derived Growth Factor), diese führten im Gegensatz zu den Kontrollen zu Migration von Zellen in Richtung des Defektes. Die Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren schien hier den besten Effekt zu haben, nach wenigen Tagen wurde eine Zunahme der Zellen im Defektgebiet beobachtet und nach 4 Wochen fand sich doppeltbrechendes Material in der Polarisationsmikroskopie, was auf organisiertes Kollagen hindeutet [8]. Wakitani et al. beschrieben die makroskopischen Ergebnisse nach Behandlung iatrogen erzeugter, vollschichtiger Knorpeldefekte von 4mm im Durchmesser in Kaninchenknien mit intraartikulären HGF-Injektionen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Knorpelregenerationsgewebe histologisch eher fibroblastische Charakteristika aufwies, fand sich in der HGF behandelten Gruppe Färbeverhalten und Zellmorphologie ähnlich dem von Gelenkknorpel. Das Regenerationsgewebe der HGF Gruppe war dahingehend zwar der Kontrollgruppe überlegen, im Vergleich zu physiologischem, gesunden Knorpel aber von deutlich minderwertigerer Qualität [149, 150]. Außerdem konnten mitogene Effekte auf Chondrozyten und die Zellen von Menisken und Bändern nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu bFGF und TGF- β , die nach intraartikulären Injektionen als unerwünschten Nebeneffekt oft Knorpelverdickung, Synovialproliferation und Osteophytenbildung zur Folge hatten, fand sich dies bei HGF nicht [143].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Bisher gibt es eine Vielzahl von Behandlungsmöglichkeiten für Knorpelschäden, die von konservativen Verfahren über alternative Verfahren bis zu operativen Verfahren

reichen und die in unterschiedlichem Maße Linderung versprechen. Die autologe osteochondrale Transplantation ist ein anerkanntes Verfahren zur Behandlung von Knorpelschäden, problematisch erweist sich bei diesem Verfahren die fehlende Einheilung der Spenderzylinder auf Knorpel Ebene. Es ist bereits versucht worden, die Einheilung der Spenderzylinder durch die Zugabe von Wachstumshormonen zu stimulieren. In vorangegangenen Studien wurde mehrfach gezeigt, dass der hier untersuchte Hepatocyte Growth Factor den Knorpelzellmetabolismus positiv beeinflussen kann. Da sich eine Probengewinnung und Wachstumsfaktorapplikation beim Menschen zu diesem Zeitpunkt verbietet, sind Tierversuche nicht zu umgehen. Die Ätiologie und die Situation im Tiermodell sollten dem menschlichen Verlauf möglichst ähnlich sein.

Nachfolgend sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Die intraartikuläre Administration von Hepatocyte Growth Factor in der gewählten Konzentration verbessert die Einheilung der Knorpel-Knochen-Zylinder, die HGF behandelten Transplantate werden für den Teil Fissur eines modifizierten Mankin- Scores einen niedrigeren Wert aufweisen, was auf ein besseres Einheilen hindeutet.
2. Das entstehende Defektgewebe zwischen transplantiertem und ortsständigem Knorpel wird in den immunhistochemischen Färbungen höhere Anteile von Kollagen Typ II aufweisen und damit, im Gegensatz zum normalerweise entstehenden Faserknorpel mit vorherrschendem Kollagen Typ I, auf die Bildung eines hyalinartigen Ersatzgewebes hindeuten.
3. Die Qualität des transplantierten und des umgebenden Knorpels verbessert sich mit der Applikation von HGF, die HGF behandelte Gruppe erzielt damit im hier berücksichtigten modifizierten Mankin-Score einen geringeren Wert als die Kontrollgruppe. Insbesondere der transplantierte Knorpel wird geringere Degenerationserscheinungen und damit einen geringeren Wert im hier verwendeten Mankin-Score aufweisen.
4. Die intraartikuläre Gabe von Hepatocyte Growth Factor in der gewählten Konzentration ist im Schafmodell sicher und es finden sich keine Nebenwirkungen wie beispielsweise osteophytäre Anbauten, die bei anderen Wachstumsfaktoren beschrieben werden.

2 Material und Methode

2.1 Versuchsaufbau

Der Tierversuch und die Haltung der Tiere wurden unter der Tierversuchsnummer (G12/2000) von der Bezirksregierung Münster und dem Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster genehmigt.

Die Versuchsreihe wurde mit 8 ausgewachsenen, männlichen „Holsteiner“ Schafen durchgeführt. Die Böcke waren klinisch gesund und das Gewicht zum Zeitpunkt der Operation belief sich im Durchschnitt auf 95kg (Spannbreite 87-102kg).

Alle Schafe wurden in Vollnarkose an beiden Kniegelenken operiert, hierbei wurden autologe osteochondrale Transplantate aus dem Belastungsbereich der Femurkondyle entnommen, um in das jeweilige kontralaterale Kompartiment transplantiert zu werden.

Die Tiere wurden zwei Versuchsgruppen zu je vier Tieren zugeordnet. Beide Gruppen erhielten dreimal wöchentlich über einen Gesamtzeitraum von vier Wochen intraartikuläre Injektionen in beide behandelten Kniegelenke. Gruppe 1 wurde als Kontrollgruppe jeweils 1ml isotoner NaCl-Lösung, Gruppe 2 wurde als Versuchsgruppe 1µg rekombinanter humaner „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF), gelöst in 1ml Phosphatpuffer (R & D Systems GmbH, Wiesbaden, Germany) injiziert.

Die Tiere wurden drei Monate nach der Operation getötet, die Kniegelenke entnommen, histologisch aufgearbeitet und untersucht.

2.2 Operationsmethode

Die Operation wurde unter Aufsicht eines erfahrenen Anästhesisten durchgeführt. Alle Tiere erhielten zur Prämedikation initial eine intramuskuläre Injektion mit 1,5g Ketamin und wurden auf dem Rücken gelagert. Die Narkose wurde mit Propofol eingeleitet (2mg/kg) und mit 10mg/kg/h i.v. aufrechterhalten. Die Tiere wurden danach mit einem 38Ch Tubus intubiert und mit einem volumenkontrolliertem Modus beatmet (CPPV, Tidalvolumen 10ml/kg KG, Frequenz 12/min, PEEP 3mbar, FiO₂ 0,5). Wenn notwendig, wurde die Beatmungsfrequenz an einen endexpiratorischen Kohlendioxidgehalt von 35-40mmHG angepasst. Intraoperativ wurden die Tiere mit EKG,

Pulsoximetrie und endexpiratorischem Kohlendioxidgehalt überwacht. Die Flüssigkeitsgabe belief sich auf einen Bolus von 20ml/kg KG zur Narkoseeinleitung und die darauf folgende Dauerinfusion von NaCl (2ml/kg/h). Intraoperativ erfolgte eine Infektionsprophylaxe mit einem Cephalosporin-Antibiotikum (Mandokef®).

Anschließend wurden beide Kniegelenke grob rasiert und mit Enthaarungscreme (Pilca) vollständig enthaart, das Operationsfeld wurde mit Neokodan desinfiziert und steril abgedeckt.

In jeder Operation wurden die jeweiligen Versuchstiere an beiden Kniegelenken operiert. Das Kniegelenk wurde mit einer medial paramedianen Inzision der Haut und nachfolgender parapatellarer medialer Inzision der Kapsel eröffnet. Die Patella wurde nach lateral disloziert und ein Teil des Hoffa'schen Fettkörpers reseziert. Mit Hohlstanzen von 8mm Innendurchmesser und einer Wanddicke von 0,5mm wurde jeweils ein 10mm langer osteochondraler Zylinder aus der Belastungszone der Femurkondylen entnommen und in das kontralaterale Kompartiment transplantiert. Insgesamt wurden 32 Zylinder transplantiert. Die Gelenke wurden darauf sorgfältig mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült, der Wundverschluss erfolgte in zwei Schichten. Nach Verschluss der Gelenkkapsel mit Einzelknopfnähten (2-0 Vicrylfäden, Ethicon) wurde die Haut mit Einzelknopfnähten (Prolene 3-0, Johnson & Johnson) adaptiert. Zur postoperativen Schmerzmedikation wurde Novalgin® (Hoechst Marion Roussel) verwendet, außerdem wurde bei allen Tieren eine Infektionsprophylaxe mit dem Breitbandantibiotikum (Tardomycel®) als intramuskuläres Depot durchgeführt. Postoperativ konnten sich die Tiere frei bewegen.

Die eine Woche postoperativ durchgeführte klinische Untersuchung zeigte keine Kniegelenksergüsse, nachfolgend wurde mit den intraartikulären Injektionen dreimal wöchentlich über vier Wochen begonnen. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten so insgesamt 12 intraartikuläre Injektionen von jeweils 1ml isotoner NaCl-Lösung. Die Tiere der Versuchsgruppe erhielten korrespondierend intraartikuläre Injektionen von 1µg rekombinanter HGF, welcher in 1ml Phosphatpuffer gelöst worden war.

2.3 Probenentnahme und Aufarbeitung der Proben

Drei Monate postoperativ wurden die Schafe mit 2g Ketamin intramuskulär anästhesiert und mit intravenöser Injektion von 200ml 7,45% Kaliumchloridlösung getötet. Anschließend wurden beide Kniegelenke durch Querinzision der Patellarsehne eröffnet.

Es wurde aus beiden Gelenken der distale Femur entnommen und nach makroskopischer Beurteilung bei 80 Grad Celsius für die weitere Beurteilung tiefgefroren.

2.4 Makroskopische Beurteilung

Vor der Weiterverarbeitung der Proben wurden die Gelenke makroskopisch beurteilt. Es wurde auf Fibrillationen und Ulzerationen des Knorpels untersucht und die makroskopische Kongruenz des Transplantats mit dem umgebenden Knorpel bewertet.

2.5 Gewinnung der histologischen Schnitte

Nachdem die distalen Femurknochen in Formalinlösung (40% gepuffertes Formalin) aufgetaut und für drei Tage in 4%iger Formalinlösung fixiert worden waren, wurde jeweils der mediale und laterale Femurkondylus mit einer Laubsäge entnommen und für 14 Wochen in EDTA (20%, pH 7,4) bei 37°C entkalkt. Die Proben wurden über Nacht mit fließendem Leitungswasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 75% jeweils 6 Stunden und 90%, 100% Isopropylalkohol jeweils 2 Stunden, jeweils bei 45°C) entwässert und anschließend in Paraplast eingebettet (Isopropylalkohol und Paraffinmischung im Verhältnis 1:1 über Nacht, danach dreimal Paraffin für 2 Stunden, jeweils bei 60°C). Die endgültige Einbettung erfolgte mit der Einbettstation AP 280 der Firma Microm. Nachdem die Blöcke bei 6°C im Kühlschrank ausgehärtet waren, wurden mit dem Schlittenmikrotom der Firma Jung 5µm dicke Schnitte angefertigt, die entweder mit Eiweißglycerin (1 Tropfen auf 10ml destilliertes Wasser) für die Übersichtsfärbungen, oder mit destilliertem Wasser für die immunhistochemischen Färbungen auf Superfrost Plus Objektträgern der Firma Menzel fixiert wurden. Die Schnitte wurden bei 42°C auf dem Strecktisch und im Wärmeschrank gestreckt.

2.6 Färbeverfahren

2.6.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)

Die Schnitte wurden für zweimal 5 Minuten in Xylol, in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, jeweils zweimal 5 Minuten und 70% für 5 Minuten) und 5 Minuten destilliertem Wasser entparaffiniert. Es folgte die Hämatoxilin Färbung nach Mayer für 10 Minuten mit nachfolgender Wässerung für 15 Minuten, danach die Eosin Färbung für 5 Minuten. Die Schnitte wurden dann mit destilliertem Wasser und 70% Ethanol kurz gespült und eine aufsteigende Alkoholreihe (96%, 100% jeweils zweimal für 5 Minuten) hochgeführt. Der Alkohol wurde mit Xylol für zweimal 5 Minuten entfernt und die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Die Zellkerne, Kalk und Knorpelsubstanz erscheinen nun blau, das Zytoplasma, Bindegewebe und Erythrozyten sind in verschiedenen kräftigen Rottönen eingefärbt.

2.6.2 Safranin-O-Färbung

Die Schnitte wurden in Xylol (zweimal 5 Minuten) und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, jeweils zweimal 5 Minuten und 70% für 5 Minuten) und 5 Minuten destilliertem Wasser entparaffiniert. Nach 4 Minuten in Weigert's Eisen-hämatoxilin (Merck, Lösung A und B im Verhältnis 1:1) wurden die Proben kurz in angesäuerten Alkohol (1ml konzentrierte Salzsäure auf 100ml 70%igen Alkohol) gegeben und für 5 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Danach folgte die Färbung mit Echtgrün 0,02%, 30 Sekunden Spülung mit 1%iger Essigsäure und eine Färbung mit Safranin-O für 5 Minuten. Die Schnitte wurden dann mit destilliertem Wasser und 70% Ethanol kurz gespült und eine aufsteigende Alkoholreihe (96%, 100% jeweils zweimal für 5 Minuten) hochgeführt. Der Alkohol wurde mit Xylol für zweimal 5 Minuten entfernt und die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Die Zellkerne werden mit dieser Färbung schwarz, die Proteoglykane rot und das Zytoplasma grün angefärbt.

2.6.3 Immunhistochemische Färbung Kollagen I und II

Die Schnitte wurden entparaffiniert, für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert und mit destilliertem Wasser und Tris-Puffer (jeweils dreimal, pH 7,5) gespült. Jede Probe

wurde mit einem Fettstift (DAKO Pen, DAKO) umrandet und alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Antigenbindungsstellen wurden mit Proteinase K (DAKO, S3020) angedaut, dieser Vorgang wurde nach 5 Minuten mit eiskaltem Wasser gestoppt. Es folgten Spülungen mit Wasser für zweimal 2 Minuten, Tris-Puffer für dreimal 2 Minuten und Wasserstoffperoxid 3% für 10 Minuten und erneute Spülungen mit Wasser für zweimal 2 Minuten und Tris-Puffer für zweimal 5 Minuten. Nach diesem Waschvorgang wurden die Schnitte für 30 Minuten mit den Primärantikörpern (Antikörper Kollagen I, Verdünnung 1:5000 und Kollagen II, Verdünnung 1:200, DAKO) inkubiert. Darauf wurden die Schnitte zweimal für 3 Minuten erneut gespült und der Peroxidase Goat Anti Rabbit Sekundärantikörper aufgebracht. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde erneut zweimal 3 Minuten mit Tris-Puffer gespült. Die Färbung wurde mit AEC-Chromogen (gebrauchsfertig, Fa. DAKO, K3469) erreicht, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Die Proben wurden nach dieser Zeit sorgfältig mit Wasser gespült und zum Abschluss mit Balsam eingedeckt und dunkel gelagert.

In den Kontrollen wurden die Primärantikörper mit Tris-Pufferlösung ersetzt.

2.7 Histologische Beurteilung

Die histologische Beurteilung erfolgte in Anlehnung an den Mankin Score [83], der zur Bewertung des Schweregrades von Knorpelschäden allgemein anerkannt ist. Die Safranin-O-Anfärbbarkeit wurde außer Acht gelassen und dafür der Parameter Fissur aufgenommen, um besonders die Verbindung zwischen transplantiertem und umgebenden ortsständigem Knorpel beschreiben zu können und mit in die Bewertung einbeziehen zu können. Die Skala reicht hier von 0 bis 5, wobei 0 keine mikroskopisch sichtbare Fissur im Bereich der Verbindungszone zwischen Transplantat und umgebendem Knorpel beschreibt, 1 bezieht sich auf oberflächliche Fissuren, 2 auf Fissuren, die sich bis in die Übergangszone erstrecken, 3 auf Fissuren bis in die Radiärzone, 4 auf Fissuren bis in die verkalkte Zone und 5 auf Fissuren bis in den Bereich des subchondralen Knochens.

Struktur	Grad
Normal	0
Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
Pannus/Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
Fissuren bis zur Übergangszone	3
Fissuren bis zur Radiärzone	4
Fissuren bis zur Verkalkungszone	5
Komplette Desorganisation	6
Zelle	
Normal	0
Diffuse Hyperzellularität	1
Cloning	2
Hypozellularität	3
Tidemark Integrität	
intakt	0
durchkreuzt mit Blutgefäßen	1
Mäßiger Rückgang	2
Fissur	
Oberflächlich	1
Bis in die mittlere Zone reichend	2
Bis tiefen Zone reichend	3
Bis Kalzifizierungszone reichend	4
Bis subchondraler Knochen reichend	5

Tabelle 1: Modifizierter Mankin Score

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit kommerziell erhältlicher Statistiksoftware (Stat View, Version 5.0, SAS Institute Inc., Heidelberg, Germany).

Als Mittelwert bezeichnet man die Summe aller Messwerte einer Gruppe, dividiert durch die Anzahl der Messwerte, dies wird auch als arithmetisches Mittel bezeichnet. Das Minimum und Maximum ist jeweils der tiefste beziehungsweise der höchste Wert einer Messreihe. Die Standardabweichung (SD) im Rahmen einer normalverteilten Grundgesamtheit bezeichnet den Wert um den Mittelwert, in dem mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% ein beliebiger Wert x der Messreihe liegt.

Beim Vergleich der Gruppen untereinander wurde nach Überprüfung der Varianzgleichheit mit dem Levene-Test der modifizierte t-Test für unverbundene Stichproben und inhomogene Varianzen verwendet.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde zum Vergleich der histologischen Einteilungen, nach denen die verschiedenen Teile und Zonen des Knorpels beschrieben wurden, eingesetzt. Überprüft wurde die These, ob der transplantierte Knorpel der Kontrollgruppe höhere Werte als der HGF behandelte Knorpel im Gesamtwert und in den Untergruppen des modifizierten Mankin-Score zeigte.

Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde bei $p < 0,05$ angesetzt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

Alle Tiere haben die bilaterale Arthrotomie gut toleriert und konnten direkt nach Beendigung der Narkose auf allen vier Läufen stehen. Laufen, ohne dabei zu hinken, war den Tieren nach 4-5 Tagen möglich. Während der gesamten Studie wurden keine Infektionen oder sonstigen Komplikationen beobachtet. Zum Zeitpunkt der Tötung und Dissektion der Kniegelenke fanden sich keine Zeichen von Infektion, oder Arthrofibrose, oder Fibrillationen der Gelenkoberfläche.

3.1 Makroskopische Beurteilung

Zum Zeitpunkt der Dissektion der Kniegelenke fanden sich makroskopisch keine Osteophyten oder eine veränderte synoviale Oberfläche, auch fanden sich keine Hinweise auf beginnende degenerative Prozesse im Gelenk.

Die Transplantate konnten eindeutig identifiziert werden, da sich alle 32 Spenderzylinder klar gegenüber dem umgebenden Knorpel abgrenzen ließen.



Abbildung 4: Makroskopisches Bild der Transplantate in dem jeweiligen Kompartiment der Femurkondyle. Die Randbereiche sind gut abgrenzbar.

3.2 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung zeigte ein vollständiges Einwachsen aller Knorpel-Knochen-Zylinder im Knochenniveau, es fanden sich keine Hinweise auf nicht stattgefundenene Heilung auf Knochenebene.

Im Bereich des Knorpels fand sich allerdings weder in der HGF-Gruppe, noch in der Kontrollgruppe eine Integration der Transplantate in das umgebende Gewebe.

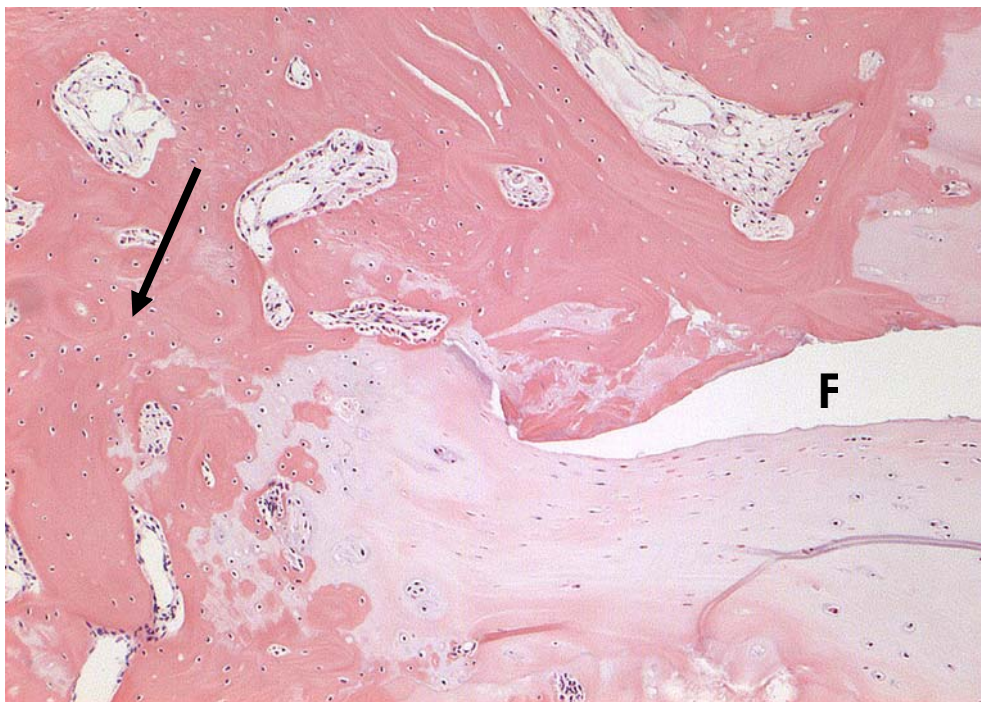


Abbildung 5: Bereich des Transplantat-Gelenkknorpel-Überganges. Knorpel mit Fissur (F), im tiefer liegenden Knochen ist das Implantat eingewachsen (Pfeil). HE-Färbung.

3.3 Immunhistochemie für Kollagen Typ I und Typ II

Fragestellung und Zielsetzung dieser Studie war unter anderem zu untersuchen, ob das überbrückende Gewebe zwischen transplantiertem und ortsständigem Knorpel aus überwiegend Faserknorpel mit minderen tribologischen Eigenschaften besteht, oder ob die Applikation von HGF die Struktur des Zwischengewebes positiv beeinflussen konnte. Der vorherrschende Kollagentyp des Gewebes wäre entweder Typ-I Kollagen im Faserknorpel, oder vermehrt Typ-II Kollagen bei hyalinartigem Knorpelgewebe. Insofern wäre eine deutliche Anfärbbarkeit des überbrückenden Gewebes in den immunhistochemischen Färbungen zu erwarten gewesen. Stattdessen fand sich in der

überwiegenden Zahl der Proben überhaupt kein Gewebe in dem Zwischenraum zwischen Transplantat und umgebendem Knorpel, die jeweils gut auf beiden Seiten der nachweisbaren Fissur abgrenzbar waren. Die Fissur reichte in nahezu allen Proben, gleich ob Kontrollgruppe oder mit Wachstumsfaktor behandelte Versuchsgruppe, bis auf das Knocheniveau. Eine Überbrückung auf Knorpelzebene hat überhaupt nicht stattgefunden.

Korrespondierend hierzu fand sich in den immunhistochemischen Färbungen für Kollagen Typ I keine Anfärbbarkeit in dem Fissurbereich, aber auch der angrenzende Knorpel von Transplantat und ortsständigem Gewebe zeigte keine Anfärbbarkeit für Kollagen Typ I.

Die immunhistochemischen Färbungen für Kollagen Typ II zeigten ebenfalls keine Anfärbbarkeit im Fissurbereich. Das korrespondierende Gewebe aus Transplantatknorpel und umgebendem Knorpel war hingegen bei allen Proben ähnlich gut für Kollagen Typ II anfärbbar (Abb. 6 und 7). Das Knorpelgewebe scheint nach Ablauf des Untersuchungszeitraumes seine Kollagenstruktur beizubehalten.



Abbildung 6: Mikroskopisches Bild der oberflächlichen Zone von transplantiertem Knorpel links und ortsständigem Gelenkknorpel rechts. Immunhistochemische Färbung Kollagen Typ I (Vergrößerung).



Abbildung 7: Mikroskopisches Bild der oberflächlichen Zone von transplantiertem Knorpel links und ortsständigem Gelenkknorpel rechts. Immunhistochemische Färbung Kollagen Typ II (Vergrößerung).

3.4 Vergleich der Transplantate und des umgebenden Knorpels in der Kontrollgruppe

Vergleicht man die Qualität des Knorpels der Spenderzylinder mit dem des umgebenden Knorpelgewebes der Kontrollgruppe, fallen deutliche Unterschiede auf, wenn oben erwähnter modifizierter Mankin-Score zugrunde gelegt wird. Der Knorpel der Spenderzylinder zeigt deutliche strukturelle Veränderungen gegenüber dem umgebenden Knorpel.

Bezogen auf den Parameter Struktur finden sich Werte von größer als 2 in 11 Proben des transplantierten Knorpels (Mittelwert $3,19 \pm 1,83$, $p = 0.001$), der umgebende Knorpel wies dagegen nur in 3 Proben Werte von über 2 auf (Mittelwert $1,25 \pm 0,77$).

Bezogen auf den Parameter Zellularität konnten keine Unterschiede zwischen Transplantatknorpel und ortständigem Knorpel ausgemacht werden, allerdings zeigten sich in beiden Geweben deutliche Veränderungen im Sinne einer Knorpeldegeneration. Alle 32 Proben zeigten wenigstens Cloning in der oberflächlichen Zone, während jeweils 4 Proben Hypozellularität als Degenerationsmerkmal aufwiesen (Mittelwert $2,25 \pm 0,45$).

Der Parameter Integrität der Knorpel-Knochen Grenze oder Tidemark unterschied sich zwischen Transplantatknorpel und umgebenden Knorpel dahingehend, dass im Gegensatz zum ortsständigen Knorpel (Mittelwert $1,19 \pm 0,54$) im Bereich des transplantierten Knorpels noch häufiger Blutgefäße kreuzen oder ein mäßiger Rückgang zu beobachten ist (Mittelwert $1,68 \pm 0,48$). Bei der Interpretation muss hier allerdings berücksichtigt werden, dass das der Untersuchungszeitraum nach 3 Monaten zu kurz sein könnte und die ossäre Reorganisation noch andauert.

Gesamt zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) zwischen den beiden untersuchten Knorpelgeweben, der transplantierte Knorpel weist einen deutlich schlechteren Gesamtscore (Mittelwert $7,13 \pm 2,31$) als der umgebende Knorpel auf (Mittelwert $4,69 \pm 1,35$).

	Umgebender Knorpel	Transplantat-Knorpel	Mann-Whitney-U-Test
	n = 16 [Mittelwert \pm SD]	n = 16 [Mittelwert \pm SD]	p-Wert
Struktur [0-6]	1,25 \pm 0,77	3,19 \pm 1,83	0,001
Zelle [0-3]	2,25 \pm 0,45	2,25 \pm 0,45	1,000
Tidemark [0-2]	1,19 \pm 0,54	1,68 \pm 0,48	0,012
Gesamt [0-11]	4,69 \pm 1,35	7,13 \pm 2,31	0,002

Tabelle 2: Histologischer Vergleich von umgebendem und transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe (modifizierter Mankin-Score).

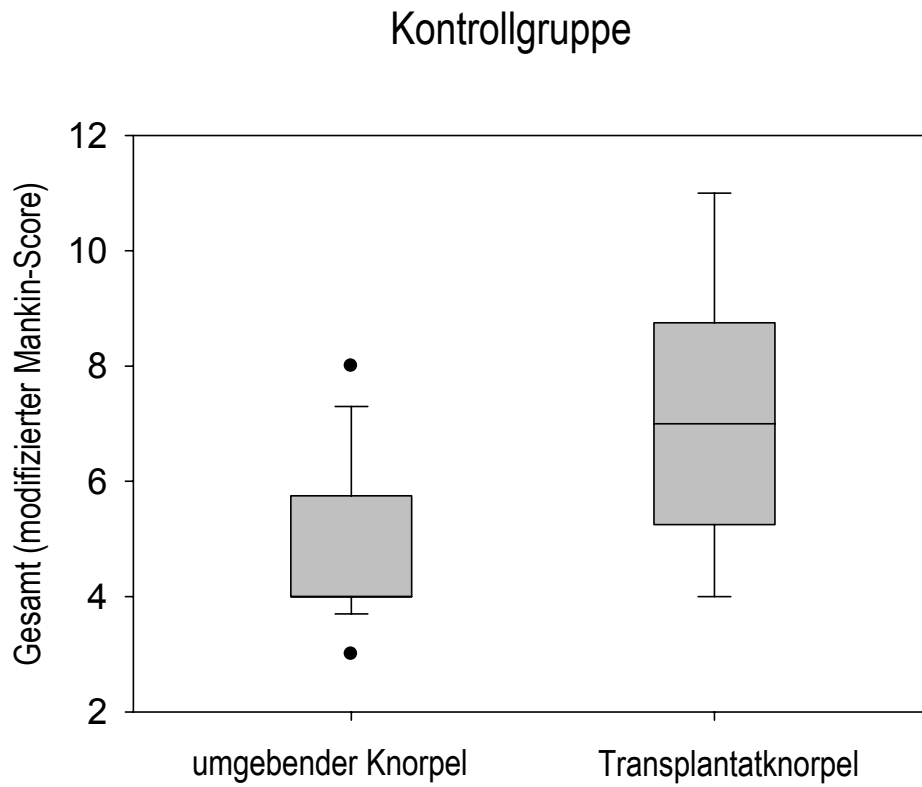


Abbildung 8: Histologischer Vergleich von umgebendem und transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe. Der Transplantatknorpel weist einen höheren Score und damit eine schlechtere Struktur auf.

3.5 Vergleich des umgebenden Gelenkknorpels in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe

Um zu überprüfen, ob die Applikation von HGF schädliche Einflüsse auf gesunden Knorpel haben könnte, wurde der ortsständige Knorpel aus der Kontrollgruppe mit dem der HGF-Gruppe verglichen. In der Struktur zeigten sich kaum Unterschiede, die Werte hier waren annähernd gleich (Mittelwert $1,25 \pm 0,77$ in der Kontrollgruppe versus Mittelwert $1,31 \pm 1,30$ in der HGF-Gruppe). Die Parameter Zelle und Tidemark wiesen in der HGF-Gruppe (Zelle: Mittelwert $1,94 \pm 0,57$ und Tidemark Integrität: $0,81 \pm 0,75$) gegenüber dem umgebendem Knorpel in der Kontrollgruppe (Zelle: Mittelwert $2,25 \pm 0,45$ und Tidemark Integrität: Mittelwert $1,19 \pm 0,54$) tendenziell bessere Werte auf, eine statistisch signifikanter Unterschied findet sich aber nicht. Somit findet sich aber auch kein schädigender Effekt von HGF auf den ortsständigen Gewebeknorpel.

	Umgebender Knorpel Kontrollgruppe n = 16 [Mittelwert \pm SD]	Umgebender Knorpel HGF-Gruppe n = 16 [Mittelwert \pm SD]	Mann-Whitney-U-Test p-Wert
Struktur [0-6]	$1,25 \pm 0,77$	$1,31 \pm 1,30$	0,680
Zelle [0-3]	$2,25 \pm 0,45$	$1,94 \pm 0,57$	0,096
Tidemark [0-2]	$1,19 \pm 0,54$	$0,81 \pm 0,75$	0,114
Gesamt [0-11]	$4,69 \pm 1,35$	$4,06 \pm 1,61$	0,215

Tabelle 3: Histologischer Vergleich von umgebendem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe (modifizierter Mankin-Score).

Vergleich umgebender Gelenkknorpel

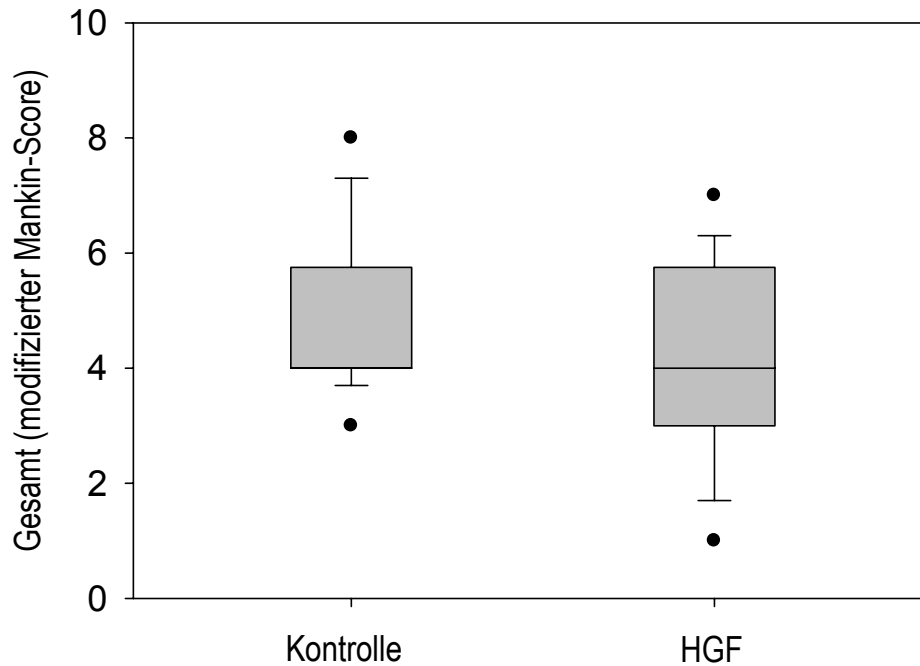


Abbildung 9: Vergleich von umgebendem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe. Es finden sich tendenziell bessere Werte in der HGF-Gruppe ohne statistische Signifikanz. Es findet sich aber damit auch kein schädigender Einfluss von HGF.

3.6 Vergleich des Transplantatknorpels in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe

Vergleicht man die Qualität des transplantierten Knorpels in Kontrollgruppe und HGF-Gruppe anhand des modifizierten Mankin-Score finden sich einige Unterschiede. Die Werte in der HGF-Gruppe sind in allen Kategorien tendenziell besser als in der Kontrollgruppe. Die Zellstruktur ist in der HGF-Gruppe mit einem Mittelwert von $2,38 \pm 1,54$ insgesamt besser als in der Kontrollgruppe, hier liegt der Mittelwert bei $3,19 \pm 1,83$. Die Integrität der Knorpel-Knochengrenze weist in der Kontrolle einen Mittelwert von $1,68 \pm 0,48$ auf, in der HGF-Gruppe ist dieser bei $1,38 \pm 0,72$.

Ein statistisch signifikanter Unterschied findet sich für den Parameter Zelle (Mittelwert Kontrolle $2,25 \pm 0,45$ versus Mittelwert HGF-Gruppe $2,00 \pm 0,00$; $p = 0,035$), hier zeigte sich in beiden Gruppen Cloning, aber keine diffuse Hypozellularität in der HGF-Gruppe. Der Gesamtwert ist in der HGF-Gruppe (Mittelwert $5,75 \pm 1,84$) verglichen mit der Kontrolle (Mittelwert $7,13 \pm 2,31$) besser, ist aber nicht statistisch signifikant ($p = 0,085$).

	Transplantatknorpel Kontrollgruppe	Transplantatknorpel HGF- Gruppe	Mann-Whitney-U- Test
	n = 16 [Mittelwert ± SD]	n = 16 [Mittelwert ± SD]	p-Wert
Struktur [0-6]	3,19 ± 1,83	2,38 ± 1,54	0,210
Zelle [0-3]	2,25 ± 0,45	2,00 ± 0,00	0,035
Tidemark [0-2]	1,68 ± 0,48	1,38 ± 0,72	0,207
Gesamt [0-11]	7,13 ± 2,31	5,75 ± 1,84	0,085

Tabelle 4: Histologischer Vergleich von transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe (modifizierter Mankin-Score).

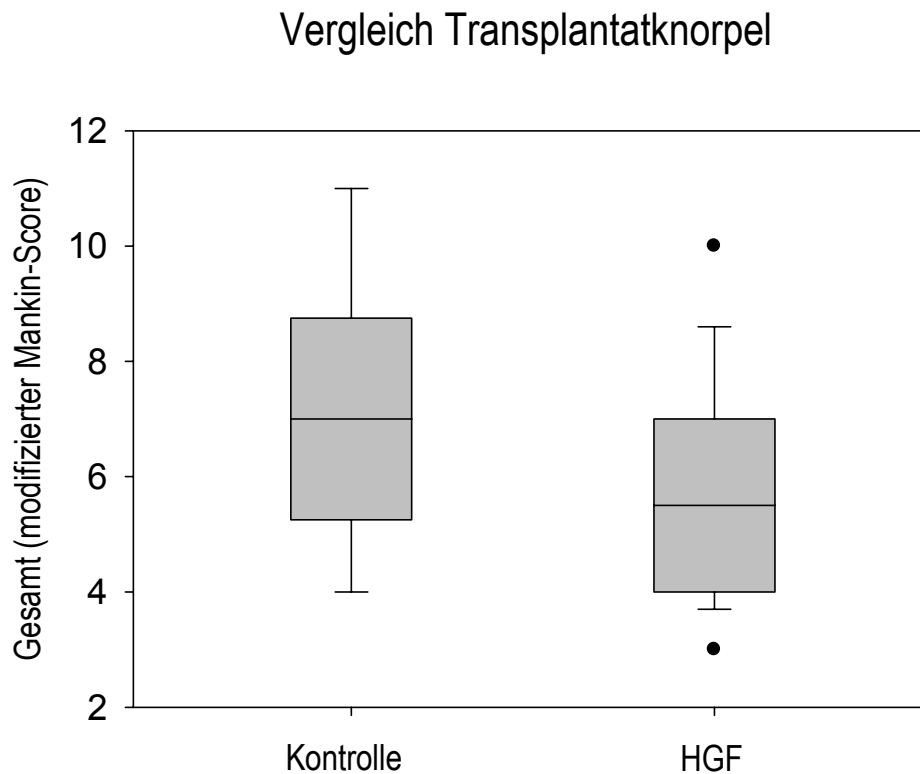


Abbildung 10: Vergleich von transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe. Die Struktur des Knorpels der HGF-Gruppe ist in allen Kategorien tendenziell besser, es findet sich aber keine statistische Signifikanz.

3.7 Evaluation des Gewebes zwischen transplantiertem und umgebendem Knorpel

Die histologische Auswertung des Gewebes, was den umgebenden Knorpel mit dem transplantierten Knorpel verbindet, zeigte keinerlei Einwachsen der Transplantate im Knorpelniveau, es fand sich in allen Proben beider Gruppen eine mehr oder weniger tief reichende Fissur zwischen den beiden Knorpelgeweben. In der Kontrollgruppe reichte diese Fissur in 12 von 16 Fällen bis zum subchondralen Knochen, in der HGF-Gruppe war dies bei 11 von 16 Proben der Fall. In drei Proben der Kontrollgruppe und in zwei Proben der HGF behandelten Gruppe erreichte die Fissur die Kalzifizierungszone. In nur einem Fall in der Kontrollgruppe und in drei Fällen der HGF-Gruppe war die Fissur oberflächlicher und reichte nur bis in die Radiärzone (Mittelwert Kontrollgruppe $4,63 \pm 0,81$; Mittelwert HGF-Gruppe $4,50 \pm 0,82$).

Die intraartikuläre Gabe von HGF hat die Integration der Transplantate im Knorpelniveau offensichtlich nicht beeinflusst.

	Kontrollgruppe	HGF-Gruppe	Mann-Whitney-U-Test
	n = 16 [Mittelwert \pm SD]	n = 16 [Mittelwert \pm SD]	p-Wert
Fissur [0-5]	$4,63 \pm 0,81$	$4,50 \pm 0,82$	0,633

Tabelle 5: Histologischer Vergleich der Zwischenzone zwischen ortsständigem und transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe (modifizierter Mankin-Score).

Vergleich Fissurzone

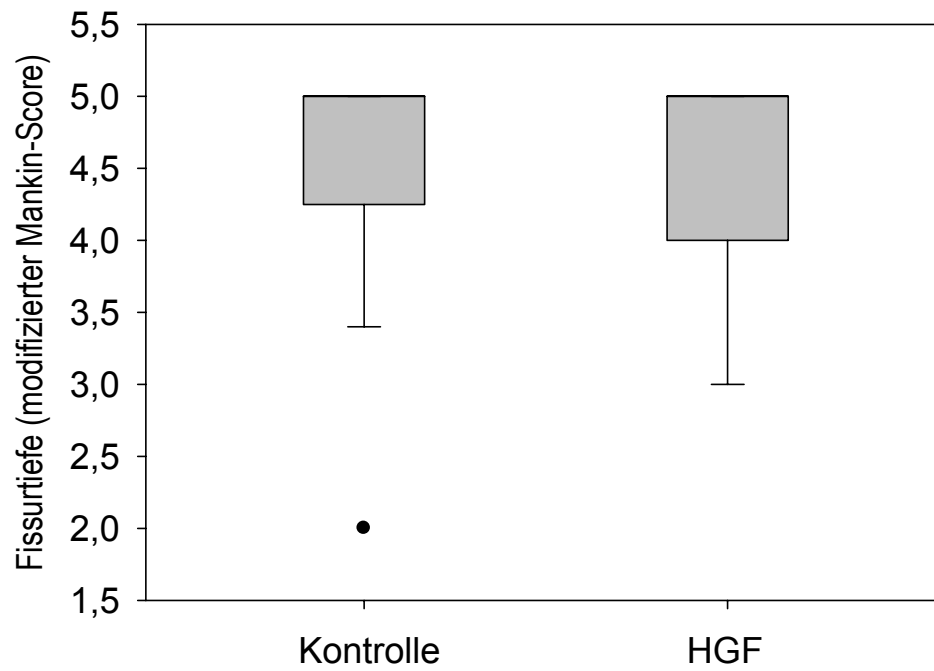


Abbildung 11: Vergleich der Fissurzone zwischen transplantiertem und ortsständigem Knorpel. Es findet sich kein Einwachsen, die Fissur reicht im Großteil der Fälle bis auf den Knochen.

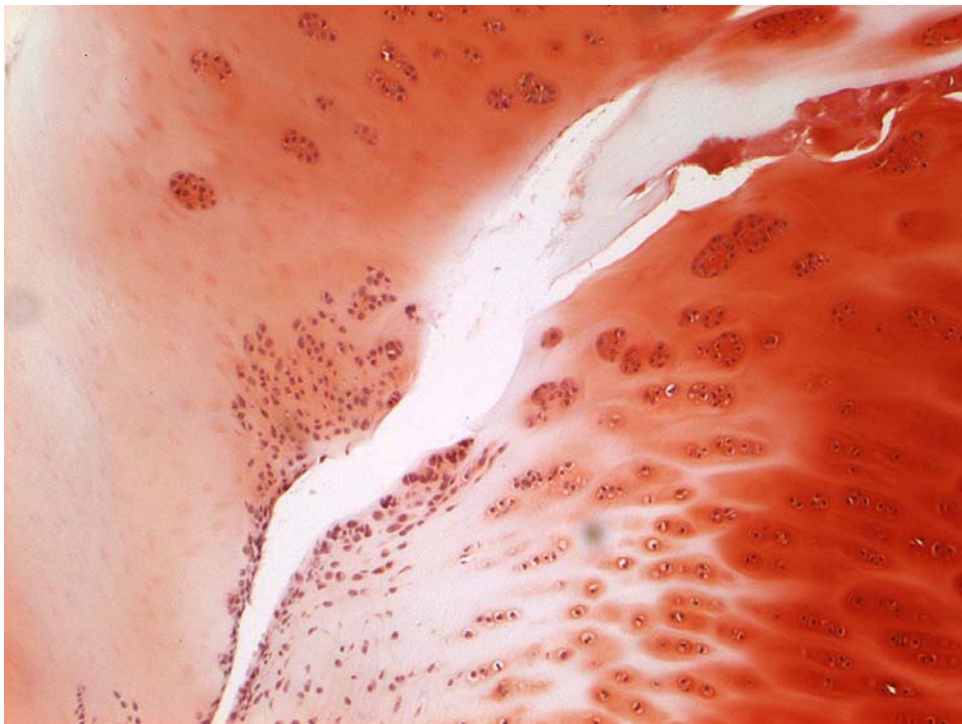


Abbildung 12: Fissur zwischen Implantat und umgebendem Gelenkknorpel. Hyperzellularität und Zellkloning als Zeichen der Gewebereaktion im Randbereich. Safranin-O-Färbung.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Tiermodellauswahl

Die bisher angewendeten und untersuchten Verfahren zur Regeneration von Knorpeldefekten führten bisher nicht zu einer Regeneration des Knorpels, sondern zu einer reparativen Defektheilung. Der menschliche Körper hat nur eine sehr geringe intrinsische Fähigkeit zur Regeneration von hyalinem Knorpel. Vielmehr bildet er als Reaktion auf die Schädigung der Gelenkknorpeloberfläche fibröses Ersatzgewebe. Dieser Faserknorpel ist auf seiner Oberfläche rauer, substantiell weicher und besitzt nicht die tribologischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels.

Diese biologischen Heilungsvorgänge können weder im Labor, noch an Leichen oder Modellen untersucht und kontrolliert werden. Die chondrale Regeneration ist nur am Lebendmodell unter dynamischen Bedingungen an einem Tier zu überprüfen. Die dynamischen Voraussetzungen beinhalten sowohl die Belastung des Implantates, als auch die aktive Beweglichkeit des Gelenkes unter Muskelspannung und unter aktivem Muskelzug. Diese Komponenten sind essentiell für die Festigkeit, die Homöostase und die Reparaturantwort des Knorpelgewebes. Diesen Ansprüchen können Untersuchungen am künstlichen Modell wie auch Untersuchungen am menschlichen Präparat nicht gerecht werden. Die Einheilungsvorgänge in Knorpel und Knochen sind ebenso wie die Muskelanspannungen an einem nicht lebenden Objekt nicht simulierbar und können nur im Tierexperiment erprobt werden. Dabei kommt es weniger darauf an, ob das Kniegelenk eines Tieres mit dem menschlichen Gelenk völlig übereinstimmt. Viel wichtiger ist die Überprüfung der Fragestellungen mit einem von dem Tier adaptierten Modell der Defektdeckung. Aus diesem Grunde sind vor einer klinischen Erprobungsphase am Menschen tierexperimentelle Untersuchungen nicht zu umgehen.

Problematisch ist sicherlich immer, die Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen zu übertragen. Knorpeldicke und die Reaktion der Chondrozyten auf Schädigung unterscheiden sich je nach gewählter Tierart wesentlich von Dicke des Knorpels und der Reparaturantwort beim Menschen, was ja auch von den unterschiedlichen Belastungsmustern abhängig ist. Außerdem unterliegen alle Tiermodelle dahingehend Restrik-

tionen, als dass sie die Schmerzlinderung als einen der wesentlichen Endpunkte der Beurteilung von Behandlungsmethoden von Knorpelschäden beim Menschen nicht zuverlässig reflektieren können. Trotz dieser Restriktionen haben Tiermodelle einen außerordentlichen Wert in der Evaluation von Vor- und Nachteilen neuer Behandlungsmethoden bei Knorpelschäden und den sich daraus im Verlauf ergebenden degenerativen Veränderungen [17].

Die Effektivität der Heilung kann auch von dem Alter der Tiere abhängen. Studien an heranwachsenden Tieren haben teilweise deutlichere Heilungserfolge herausgestellt als dies bei Studien mit ausgewachsenen Tieren der Fall ist [74]. Da diese Ergebnisse nur eingeschränkt und dann nur auf Knorpelschäden bei jungen Patienten anwendbar wären, wurde in der vorliegenden Studie für die Untersuchung der Einheilung osteochondraler Transplantate ein Tiermodell an ausgewachsenen Tieren gewählt.

Die häufigsten Studien zu Knorpelschäden und Knorpelreparatur werden am Kaninchenmodell durchgeführt. Problematisch erweist sich hierbei die dünne Knorpelschicht von in aller Regel unter 0,5mm Dicke. Auch die Gelenkmechanik und die Belastungszonen im Gelenk unterscheiden sich von der Situation beim Menschen und oft werden auch nicht Gewicht tragende Teile der Gelenke untersucht.

Um eine in der klinischen Anwendung und im klinischen Alltag häufige Situation bestmöglich zu reflektieren haben wir uns in Bezug auf die Fragestellung für ein Großtiermodell entschieden. Es soll die Situation der Heilung nach osteochondraler Transplantation in den Hauptbelastungszonen des Kniegelenkes untersucht werden. Das Schafmodell zur Simulation von Knorpelschäden und den sich daraus ergebenden Folgen ist wegen seiner anatomischen Ähnlichkeit des Kniegelenks zum menschlichen Kniegelenk etabliert. Sowohl die Knorpeldicke, als auch das chirurgisch allein schon wegen der Größe gut zu erreichende und zu präparierende Kniegelenk und damit auch die Reproduzierbarkeit des Defektes kommen hier der Situation beim Menschen am nächsten. Insbesondere die Aktivität der Tiere und die Belastungskräfte, die aufgrund des Gewichtes auf das Gelenk wirken, simulieren die Situation nach einem fokalen Knorpelschaden und erfolgter Operation gut. In der Literatur haben mehrere Autoren die Heilung von Knorpeldefekten anhand eines Schafmodells untersucht. Bruns hat in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts vollschichtige Knorpeldefekte an heranwachsenden und ausgewachsenen Schafen mit perichondralen Transplantaten behandelt [24]. Little et al. untersuchten die Auswirkungen auf den Knorpel des Kniegelenkes

nach Meniskusschädigung bei Hammeln [79] und auch andere Autoren wählten für die Simulation von Arthrose und Knorpelschäden ein Schafmodell [3].

4.1.2 Auswertung

Die häufigsten Modelle zu Knorpelschäden im Tierversuch sind zum einen die der degenerativen Gelenkerkrankungen und zum anderen die der chirurgisch induzierten Knorpelschäden.

Da degenerative Gelenkerkrankungen natürlicherweise im Lebensverlauf auftreten und nur langsam fortschreiten, sind die Untersuchungszeiträume lang. Oft können hier aber morphologische und auch epidemiologische Übereinstimmungen zur Erkrankung beim Menschen gefunden werden.

Im Gegensatz dazu spiegelt der chirurgisch induzierte Knorpelschaden eher den Fall der traumatischen Schädigung wider, welcher häufig in unserer immer aktiveren Gesellschaft vorkommt. Daher lassen auch die gefundenen Übereinstimmungen in der Pathologie Rückschlüsse auf den Progress und den Verlauf dieses Krankheitsbildes beim Menschen zu. Anhand des Modells des chirurgisch induzierten Knorpelschadens sind die Verläufe deutlicher schneller und schwerwiegender, was vor allem auch von der Größe des kreierte Defekts abhängig ist. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass im Gegensatz zur traumatischen Knorpelschädigung beim Menschen die betroffene Extremität im Tiermodell nicht geschont wird und so zur schnelleren Progression des Krankheitsbildes beiträgt. Die Untersuchungszeiträume können also in aller Regel kürzer gewählt werden [7].

Das hier gewählte Operationsverfahren wird häufig als chirurgische Therapieoption bei Knorpelschäden bis zu einer bestimmten Größe beim Menschen angewandt [30, 45, 50, 51, 54, 60, 61, 139].

Der wesentliche Parameter bei der Auswertung der Heilung eines Defektes ist dessen Tiefe und damit klärt sich die Frage ob chondrale oder osteochondrale Defektheilung untersucht wird. Wie oben beschrieben, hängt die Reparaturantwort in entscheidendem Maße davon ab, ob der subchondrale Knochen mit verletzt ist und so Zellen aus dem Knochenmark in den Defekt einwandern. Einige Studien beschäftigen sich mit der Simulation von Verletzungen, die ausschließlich auf die Knorpelschicht beschränkt bleiben. Hierbei wird der chondrale Defekt entweder nicht aufgefüllt, mit Faserknorpel aufgefüllt oder je nach Größe teilweise vollständig mit hyalinem Knorpel gedeckt. Wie dies, entgegen der üblichen Reparaturantwort, vonstatten geht ist noch weitestgehend

unklar. Die Zellen, die solche Defekte füllen, könnten einerseits mittels Blut und Knochenmark durch nicht erkannte Mikrofissuren im subchondralen Knochen in den Defekt gelangt sein, oder andererseits durch die begleitende Blutung der Synovia nach einem Trauma. Im Gegensatz dazu wurde im vorliegenden Modell die anerkannte Methode der Knorpel-Knochen Transplantation zur Behandlung von Knorpelschäden untersucht. Die Tiefe des Defektes reicht hier also in jedem Fall über die subchondrale Zone hinaus, sodass eine Heilung, zumindest mit einem gemischt fibrocartiliginärem Knorpel, zu erwarten gewesen wäre [57].

Für die Auswertung der Heilung von Knorpelschäden im Tierexperiment stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Untersucht werden können beispielsweise die biomechanischen oder biochemischen Eigenschaften des Regenerationsgewebes, oder die Qualität dieses Gewebes wird anhand histologischer Kriterien bewertet.

Die Limitierung dieser Auswertungsverfahren findet sich natürlich in dem Mangel wesentliche klinische Fragestellungen wie Schmerzlinderung oder Besserung der Funktion eines Gelenkes beurteilen zu können. Im Gegensatz zur rein histologischen Auswertung besteht bei der Evaluation von Knorpelschäden im Rahmen einer Arthroskopie zumindest die Möglichkeit zur Inspektion der Knorpeloberfläche oder zur Testung der Oberflächenbeschaffenheit mit dem Tasthaken. Auch auf bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie wird immer häufiger zurückgegriffen. Aber selbst hier korrelieren die Ergebnisse nicht zwangsläufig mit den Symptomen von Patienten und könnten als verlässliche Indikatoren für den Heilungserfolg gebraucht werden.

Unabhängig von diesen Limitierungen verwendet der Großteil der experimentellen Studien zu dem Thema histologische Kriterien zur Beurteilung der Reparaturvorgänge beim geschädigten Knorpel, da die wesentlichen Parameter der Heilung von Knorpelschäden so erfasst werden können. Es können Aussagen über die Art des Gewebes gemacht werden, welches den Defekt füllt, ebenso können die angrenzenden Strukturen, wie benachbarter Knorpel oder Knochen und deren Qualität bewertet werden [17]. Die unterschiedlichen Färbeverfahren können einen Hinweis auf die biochemische Zusammensetzung des untersuchten Gewebes geben. Die Safranin-O-Färbung färbt beispielsweise spezifisch Proteoglykane, während immunhistochemische Färbungen Aufschluss über die Kollagenstruktur geben können. In der vorliegenden Studie sollte anhand der immunhistochemischen Färbungen für Kollagen Typ I und II auf das Gewebe

rückgeschlossen werden, welches den Defektbereich zwischen Transplantatknorpel und umgebendem Knorpel füllt.

Der Grad der Knorpelschädigung wurde mit einem histologischen Score bewertet. An Bewertungssystemen gibt es zum einen den Pineda-Score, der vier Parameter bewertet und von 0 - 12 Punkten reicht. Neben prozentualer Füllung des Defektes werden auch die Wiederherstellung der osteochondralen Verbindung sowie Anfärbarkeit der Knorpelmatrix und Zellmorphologie bewertet [117]. Ein weiteres Graduierungssystem ist der komplexere O'Driscoll-Score, der auch ein semiquantitatives Bewertungssystem darstellt, und eine größere Anzahl von Zell- und Gewebeparametern bewertet. Er reicht von 0 - 24 Punkten [107].

Das klassische und am meisten angewandte Graduierungssystem ist das Grading nach Mankin, welches hier als Skala zur Einschätzung des Knorpelschadens gewählt wurde [83]. Der Mankin Score ist neben den anderen Bewertungssystem ein anerkanntes Verfahren zur Beurteilung der Knorpelqualität während des Heilungsprozesses. Einzig der Parameter der Safranin-Anfärbarkeit wurde adaptiert und vom Parameter Fissur ersetzt, um den Zwischenraum zwischen den beiden Knorpelgeweben besser beurteilen zu können. Auch andere Autoren haben modifizierte, auf dem Mankin-Score basierende Graduierungssysteme zur Bewertung von Knorpelschäden und Heilung verwendet [29, 74].

Diese Systeme sind im Ansatz einfach und arithmetisch auswertbar, allerdings muss die interindividuelle Varianz der Auswertungssicherheit berücksichtigt werden. Die subjektive Wahrnehmung durch den auswertenden Untersucher sollte bedacht werden, insbesondere wenn die Werte mit Werten aus anderen Untersuchungen, die durch andere Untersucher erhoben worden sind, verglichen werden sollen [17]. Auch kann mit diesen Graduierungssystemen, wie oben angeführt, eine Aussage über die klinische Wertigkeit der erhobenen Ergebnisse nicht getroffen werden.

4.1.3 Versuchsaufbau und Applikation des Wachstumsfaktors

Es gibt verschiedene Verfahren, um die Regeneration von Knorpelgewebe zu unterstützen. Sie erstrecken sich von der Verwendung von Trägersystemen und Matrixsystemen, über die Verwendung von neuen Zellpopulationen, bis hin zur Verwendung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Trägersysteme oder Matrizen unterstützen oder lenken Zellen, die neuen Knorpel produzieren sollen [118], neue Zellpopulationen werden meist vorher in Kultur gezüchtet und dann als autologe Chondrozyten in den

Defekt transplantiert. Diese bilden dort neuen Knorpel und decken den Defekt [21, 113]. Eine weitere Möglichkeit ist, die ortsständigen Chondrozyten mithilfe von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren zu stimulieren, und so die Reparatur von Knorpelschäden durch gesteigerte Proliferation, Migration und Syntheseleistung dieser Zellen anzuregen [17, 101]. Dieses Verfahren wurde hier gewählt, zusätzlich wurde die Applikation des Wachstumsfaktors HGF mit einer Prozedur verknüpft, die in den subchondralen Knochen reicht und so mutmaßlich Stammzellen aus dem Knochenmark zur Verfügung stellt.

Die Applikation des Wachstumsfaktors kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Die Verwendung von Wachstumsfaktoren setzt eine Methode beziehungsweise ein Träger- oder Transportsystem voraus, um den Wachstumsfaktor an den gewünschten Wirkungsort zu transferieren und dort gegebenenfalls ausreichend lange zu stabilisieren [20, 26]. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren meist weniger als eine Stunde beträgt und oft nur im Minutenbereich liegt [150]. Auch hier besteht die Möglichkeit einen Wachstumsfaktor in Trägersysteme oder künstlich produzierte Matrices zu integrieren, um so die Verfügbarkeit am Zielgewebe zu optimieren. Damit könnte dann das Einwachsen neuer Zellen unterstützt werden, und zusätzlich sogar die Bindung von neuen Zellen an das Zielgewebe verbessert werden, oder die Regeneration der Knorpeloberfläche begünstigt werden [26, 34]. Allerdings fanden Fujimoto et al., dass die Verwendung von Kollagengel und Kollagenschwämmen als Träger von bFGF zu einer gehemmten Zellintegration führte. Die direkte Applikation des Wachstumsfaktors führte immer noch zu den besten Ergebnissen [43]. Der Zeitpunkt, beziehungsweise der Beginn der Applikation, ist ebenfalls von Bedeutung. In derselben Studie zeigte sich auch, dass der positive Effekt von in diesem Fall bFGF, umso größer war, je schneller mit der Applikation des Faktors begonnen wurde.

Für diesen Versuch wurden daher 12 intraartikuläre Injektionen über einen Zeitraum von vier Wochen gewählt und mit den Applikationen wurde nach einer kurzen postoperativen Überwachungsperiode der Versuchstiere begonnen. Wakitani et al. [150] haben ebenfalls über vier Wochen jeweils dreimal wöchentlich HGF intraartikulär injiziert und danach keine weitere Behandlung durchgeführt. Die ersten positiven Effekte auf osteochondrale Schäden waren dort bereits nach sechs Wochen sichtbar.

Der Effekt von HGF auf Gelenkknorpel ist wie der Effekt anderer Wachstumsfaktoren dosisabhängig [138]. Für bFGF konnte bewiesen werden, dass die Synthese von Proteo-

glykanen, Proteinen und Kollagen unter höheren Dosen gesteigert werden konnte [34, 140]. Auch für TGF- β fand sich in dem Wirkungsprofil eine Dosisabhängigkeit für ein gesteigertes Reparaturpotential sowohl bei Knorpelschäden als auch in Bezug auf die Nebenwirkungen. Höhere Konzentrationen führten zu Osteophytenbildung und Verkalkungen der ligamentären Strukturen im Gelenk. Noch problematischer waren aber systemische Nebenwirkungen wie Leber- und Nierenfibrose. Die unerwünschten osteophytären Anbauten fanden sich auch nach intraartikulärer Injektion [146].

Wir haben für diesen Versuch eine Konzentration von 1 μ g HGF verdünnt in 1ml Lösung pro Injektion gewählt. Die vorhandene Literatur unterstützt diese Wahl der Dosierung. Der Effekt von HGF auf die Proliferation von Kaninchenchondrozyten in Kultur hat bei 3ng/ml ein Maximum erreicht und blieb auch bei höheren Konzentrationen von bis zu 10ng/ml konstant [138]. Die HGF Wirkung auf die DNA-Synthese von Hepatozyten in Ratten erreicht ihr Maximum bei 5-8ng/ml und bleibt auch bei so hohen Konzentrationen wie 100ng/ml annähernd gleich [86]. Die in dieser Studie gewählte Konzentration ist mit 1 μ g/ml noch um den Faktor 10 bis 100 höher. Wakitani et al. konnten zeigen, dass sich 100 μ l Tinte ins Kniegelenk von Kaninchen appliziert über das ganze Kniegelenk verteilen [150]. Wenn man die Größe des Kniegelenks des hier gewählten Schafmodells mit dem großen Puffer bei der Wahl der Konzentration von HGF berücksichtigt, kann von einer maximalen Verfügbarkeit und Stimulation, zumindest temporär, ausgegangen werden. Kritisch anzumerken bleibt, dass auf systemische Nebenwirkungen nicht explizit untersucht worden ist, aber wir haben zumindest keinen Hinweis darauf gefunden. Es haben sich aber auch keine lokalen Nebenwirkungen wie beispielsweise Osteophyten gefunden.

Im Gegensatz zu anderen Studien wurde ein einmaliger Untersuchungszeitraum von drei Monaten gewählt, da sich bis dato keine Unterschiede in der Heilungstendenz von Knorpel nach drei oder sechs Monaten gezeigt haben [9, 133, 150].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob die intraartikuläre Injektion von HGF ins Kniegelenk des Schafes die Qualität des Knorpels der osteochondralen Transplantate und das Gewebe zwischen transplantiertem und umgebendem Knorpel beeinflusst. Außerdem sollte gezeigt werden, ob die intraartikuläre Gabe von Hepatocyte Growth Factor im Schafmodell sicher ist, oder Nebenwirkungen zur Folge hat.

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Struktur des Knorpels der transplantierten Knorpel-Knochen Zylinder positiv von der intraartikulären HGF-Applikation beeinflusst werden konnte. Das Einheilen im Bereich des Knorpels wurde nicht beeinflusst. Weiterhin fanden sich auch keine nachteiligen Auswirkungen der HGF-Applikation im hier gewählten Tiermodell.

Die unbehandelten osteochondralen Transplantate wiesen, im Gegensatz zu dem unbehandelten umgebenden Knorpel, signifikant häufiger histologische Zeichen der Degeneration auf.

Der transplantierte Knorpel zeigte in der HGF-Gruppe bei der histologischen Auswertung weniger Zeichen einer Degeneration als der transplantierte Knorpel in der Kontrollgruppe. Daher schlossen wir, dass HGF die Knorpelstruktur der Knorpel-Knochen-Zylinder positiv beeinflussen kann.

Ob die Einheilung der Transplantate durch HGF verbessert werden konnte, war eine der wesentlichen Fragestellungen dieser Studie. Erstaunlicherweise konnte hier unabhängig von der Gruppe bei keiner der Proben ein Einheilen auf Knorpelniveau nachgewiesen werden. Die HGF-Applikation hatte also keinen Einfluss auf das Einheilen der Transplantate.

Die makroskopische und histologische Beurteilung des Gelenkknorpels offenbarte aber auch keinen wesentlichen nachteiligen Effekt von HGF auf Knorpel und Synovia, ebenso fanden sich keine osteophytären Anbauten (im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren). Daraus kann geschlossen werden, dass die intraartikuläre Injektion von HGF im Tiermodell ausreichend sicher ist - zumindest in der hier verwendeten Konzentration.

Die immunhistochemischen Färbungen auf Kollagen I und II ergaben korrespondierend zu diesen Ergebnissen keinen Nachweis von Kollagen I, wie es im Fissurbereich hätte erwartet werden können. Es wurde kein Defektknorpel gebildet, die Transplantate sind nur auf Knochenniveau eingehilt. Ein Einheilen im Knorpelniveau fand nicht statt. Auf der anderen Seite lässt die gleichmäßige Anfärbbarkeit mit Kollagen Typ II auch im Transplantatbereich Rückschlüsse auf ein zumindest partielles Überleben des hyalinen Knorpels zu. Wie sich dies im Langzeitverlauf darstellt bleibt zunächst unklar.

Die Heilung osteochondraler Läsionen und Knorpelschäden bleibt aufgrund des limitierten Reparaturpotentials von Gelenkknorpel problematisch [102].

Die osteochondrale autologe Transplantation (OAT) ist bisher die einzige Möglichkeit, hyalinen Gelenkknorpel in einen Defekt zu bringen und auch den darunter liegenden

Knochen in ein und derselben Prozedur zu ersetzen [10]. Grundlage des Verfahrens ist die ossäre Einheilung und das Überleben des hyalinen Knorpels [16]. Das Verfahren wird im klinischen Alltag häufig angewandt, entweder je nach Lokalisation und Größe des Defektes als arthroskopisches Vorgehen oder mittels Miniarthrotomie [16, 52].

Die Indikationen ergeben sich aus der Größe des osteochondralen Defektes, für die OAT sind dies hauptsächlich Defekte mit einer Größe zwischen 2 - 4 cm² [45]. Die klinischen Ergebnisse sind vor allem im kurz- und mittelfristigen Bereich viel versprechend [10, 50], auch die Ergebnisse von Nachbeobachtungszeiträumen von mittlerweile über zehn Jahren sind als gut zu bezeichnen [51, 55].

Die in diesen Untersuchungen erwähnten klinischen Resultate korrelieren aber nicht notwendigerweise mit arthroskopischen oder histologischen Befunden, vor allem weil die Bewertungssysteme andere sind. Eine Aussage über die klinische Wertigkeit der in unserer Studie erhobenen Befunde kann nur näherungsweise gemacht werden, da histologische Kriterien anhand eines semiquantitativen Score erhoben werden, was für die Fragestellung dieser Arbeit treffend ist. Bei klinischen, meist retrospektiven Studien ist das Hauptkriterium die Schmerzlinderung und die verbesserte Gelenkfunktion, während sich diese Befunde morphologisch nicht unbedingt bestätigen lassen.

Eine Aussage hierzu kann nicht gemacht werden, da in dieser tierexperimentellen Untersuchung nicht auf Kriterien wie Schmerzlinderung oder Gelenkfunktion untersucht wurde. Allenfalls kann man annehmen, dass sich die oben publizierten klinischen Ergebnisse auch hier wieder zu finden scheinen, da im postoperativen Verlauf keine Komplikationen beobachtet werden konnten und den Versuchstieren das Laufen ohne zu hinken bereits nach 4 - 5 Tagen wieder möglich war.

Es gibt nur wenige tierexperimentelle Studien zu dem Thema, Bodo et al. haben eine subchondrale Knochenzyste und eine Meniskusläsion eines Hinterlaufes eines Hengstes arthroskopisch diagnostiziert. Aufgefallen war das Tier durch Lahmen und nachfolgend wurde der zystische Defekt arthroskopisch mit Knorpel-Knochen-Zylindern aus weniger belasteten Bereichen der medialen Femurkondyle aufgefüllt. Die Einschränkung in der Fähigkeit zu laufen wurde vor und nach der Operation mittels einer Bewegungsanalyse ausgewertet. Nach Ablauf eines Jahres konnte eine deutliche Verbesserung sowohl des Lahmens beobachtet werden und in der Kontrollarthroskopie wurde eine intakte Knorpeloberfläche beschrieben [12]. Histologisch erweist sich das Überleben der Knorpelportion des Transplantates oftmals als problematisch, während die ossäre Integration beständig zu sein scheint. Hurtig et al. untersuchten die Qualität von osteochondralen

Transplantaten bei Pferden. Die Zylinder wurden arthroskopisch aus dem Femoropatellargelenk entnommen und in den bei Pferden oft von Verletzungen betroffenen Karpalbereich implantiert. In einer Kontrollarthroskopie nach sechs Monaten waren die Transplantate gut gegenüber dem umgebenden Knorpel abgrenzbar, aber insgesamt etwas weicher und blasser. In der histologischen Untersuchung nach dann insgesamt neun Monaten waren die knöchernen Anteile der Zylinder gut integriert, es fanden sich aber im Bereich des Transplantatknorpels Zeichen der Degeneration und nur wenig bis gar kein Defektgewebe in dem operierten Bereich [59]. Diese Beobachtungen werden von unseren Untersuchungsergebnissen bestätigt.

Beschrieben worden sind bis jetzt vereinzelt nicht nur Schäden des Transplantatknorpels durch die OAT, sondern auch Schäden des umgebenden Knorpels im Tiermodell. In einer Studie an Schafen konnte auch die Schädigung der dem Transplantat benachbarten Chondrozyten nachgewiesen werden. Als problematisch für den umgebenden Knorpel könnte sich hier die fehlende seitliche Abstützung herausstellen, da die Spenderzylinder im Knorpelniveau nur durch Punktkontakte mit dem umgebenden Gelenkknorpel an Ort und Stelle gehalten werden. Um eine langfristige ausreichende Stabilität gewährleisten zu können, ist eine kontinuierliche Seitabstützung vonnöten [57].

Generell wird davon ausgegangen, dass der Bereich zwischen transplantierten Knorpel-Knochen-Zylindern und umgebendem Gelenkknorpel durch Faserknorpel mit minderwertigen tribologischen Eigenschaften gefüllt wird. Makino et al. konnten in einem Kaninchenmodell bereits nach zwei Wochen die primäre Einheilung der Transplantate in den Knochen nachweisen. Der Bereich zwischen Transplantat und umgebenden Knorpel wurde mit Ersatzgewebe aufgefüllt. Der Transplantatknorpel war nach einem Gesamtuntersuchungszeitraum von 24 Wochen insgesamt dicker als der ortsständige Knorpel und zeigte im Vergleich zu diesem im weiteren Verlauf auch Zeichen der Degeneration. Untersucht wurden Knorpel-Knochen-Zylinder, die aus einem Bereich der Femurkondyle von Kaninchen entnommen wurden und dann in denselben Defekt wieder eingesetzt wurden. Auf diese Art und Weise konnte ein Maximum an Passgenauigkeit simuliert werden [81].

Zeichen der Degeneration beim Transplantatknorpel konnten wir auch nachweisen, die Beobachtung, dass der Übergangsbereich mit Defektgewebe aufgefüllt wurde, konnte hier nicht bestätigt werden. Es fand sich nicht nur keine Defektheilung, sondern überhaupt keine Einheilung in der Ebene des Knorpels. Eine Erklärung könnte hierfür

der Untersuchungszeitraum sein, der zu kurz gewählt gewesen sein könnte. Eine andere Erklärung könnten auch strukturelle Unterschiede des Knorpels bei Schafen im Gegensatz zur wesentlich dünneren Gelenkknorpelschicht bei Kaninchen sein.

Bestätigt werden die von uns erhobenen Ergebnisse diesbezüglich von Siebert et al., die das Einheilen osteochondraler Transplantate im Tiermodell mit Schafen untersucht haben. Sie konnten die ossäre Integration nach drei Monaten histologisch sowie radiologisch nachweisen, im Bereich des Knorpels findet jedoch auch nach sechs Monaten keine Integration des Spenderzylinders in die Randbereiche des gesunden umgebenden Knorpels statt. Der Randbereich um die Transplantate war zu allen Zeiten gut zu identifizieren, die Höhe des umgebenden Gewebes wurde aber erst nach einem Zeitraum von 6 Monaten erreicht [132]. Im Gegensatz dazu konnte durch Hangody et al. durch arthroskopisch gewonnene Stanzbiopsien im Verlauf von fünf Jahren histologisch vitales und hyalines Knorpelgewebe im Transplantatbereich nachgewiesen werden, während die Entnahmestellen im Spenderbereich von Faserknorpel bedeckt werden. Die Biopsien wurden aus dem Übergangsbereich zwischen Transplantat und ortsständigem Knorpel entnommen und zeigten eine gute Integration auch der Knorpelportion ohne Spalten- oder Rissbildung. Das Gewebe im Bereich zwischen den Transplantaten bestand aus Faserknorpel [52]. Binnet et al. untersuchten nach Refixation osteochondraler Frakturen ebenfalls Biopsien aus dem Knorpelübergangsbereich. Hier zeigte sich nach einem Untersuchungszeitraum von bis zu 10 Jahren keine Regeneration von normalem hyalinen Knorpel. Das Defektgewebe war arm an Chondrozyten und zeigte ein anderes Färbeverhalten als das reguläre chondrale Stroma [9].

Es wurde bisher mehrmals versucht mit Wachstumsfaktoren auf den Knorpelmetabolismus einzuwirken und die Heilung von Knorpelschäden zu verbessern. Fujimoto et al. konnten einen wesentlichen stimulatorischen Effekt von bFGF auf die Differenzierung von Chondrozyten und die Heilung bei vollschichtigen Defekten in Kaninchenknien nachweisen [43]. Der Effekt war dosisabhängig und der Wachstumsfaktor wurde mit einem Trägermolekül appliziert. Auch der Zeitpunkt schien eine Rolle zu spielen, da der Effekt umso größer war, je früher mit der Applikation begonnen wurde.

Für IGF wurde ein anaboler Effekt auf Knorpel und Matrix nachgewiesen, und ein Mangel an diesem Wachstumsfaktor könnte teilweise mit für die Ausbildung einer Osteoarthritis verantwortlich sein [101]. Erniedrigte Spiegel von IGF-1, oder erhöhte Spiegel von IGF-1 neutralisierenden Bindungsproteinen oder auch die gestörte Signal-

transduktion am IGF-1 Rezeptor führen allesamt zu verminderter Synthese und gesteigertem Abbau von Proteoglykanen [144]. Auch scheint eine Verbindung zwischen den intrazellulären Signalwegen von extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren zu bestehen. Ist nämlich die Bindung von Integrinen aus Chondrozyten an Kollagen Typ II gestört, ist auch die Signalübertragung von IGF-1 betroffen und damit ist dann auch die Homöostase und die Differenzierung des Chondrozyten beeinträchtigt [127]. Madry et al. haben die Heilung von osteochondralen Läsionen mit genetisch modifizierten Chondrozyten untersucht, die IGF-1 überexprimieren. Die Chondrozyten wurden in ein Alginat eingebettet, das Expressionsmuster zunächst *in vitro* beobachtet und die modifizierten Chondrozyten dann in osteochondrale Defekte der Trochlea bei Kaninchen transplantiert. Hier konnte dann neben der relevanten Sekretion von IGF-1 über einen verlängerten Zeitraum auch eine verbesserte Heilung der Defekte nachgewiesen werden [80].

TGF- β spielt eine entscheidende Rolle beim Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Wachstumsfaktoren und hat sowohl Eigenschaften eines antiinflammatorisch wirksamen Zytokins, als auch die eines anabolen Mediators in Form eines Wachstumsfaktors. Es hemmt zum einen den Abbau des Gelenkknorpels und zum anderen stimuliert TGF- β die Reparatur geschädigten Gelenkknorpels. Wenn die Wirkung von TGF- β beispielsweise durch Überexpression eines löslichen Rezeptors geblockt, finden sich typische Knorpeldegenerationserscheinungen im Gelenkknorpel transgener Mäuse [126]. Wird TGF- β direkt in murine Kniegelenke injiziert, wirkt es gegen IL-1 vermittelten Matrixabbau und fördert sogar die Reparatur der Knorpelmatrix in experimentell erzeugter Arthrose [46]. Darling et al. konnten an Knorpelgewebe aus dem Kniegelenk von Ziegen *in vitro* nachweisen, dass TGF- β einen starken proliferativen Effekt auf Chondrozyten in der oberflächlichen Zone des Knorpels hat [36]. Nachteilig erwiesen sich bei der Therapie von Knorpelschäden mit Wachstumsfaktoren aber häufig die osteophytären Anbauten, insbesondere durch IGF-1 und TGF- β , welches in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden konnte [101, 108, 146].

In der vorliegenden Literatur wurde für HGF eine wichtige Rolle für den Knorpelmetabolismus *in vivo* und *in vitro* beschrieben. Takebayashi et al. haben die Wirkung von HGF auf Migration und Proliferation von Chondrozyten aus Knie und Rippenknorpel heranwachsender Kaninchen untersucht. Hierbei konnte eine deutliche Steigerung von der Proteoglykansynthese im Chondrozyten beobachtet werden und auch die Proliferation und Migration der Chondrozyten wurde durch HGF stimuliert [138].

Wakitani et al. haben im Kaninchenmodell vollschichtige Knorpeldefekte mit intraartikulären Injektionen von HGF behandelt. Nach sechs Monaten hatte der in der Defektzone gebildete Knorpel makroskopisch ein ähnliches Erscheinungsbild wie der umgebende Knorpel. Histologisch waren die Zellmorphologie und die Anfärbarkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verbessert, aber im Vergleich zu gesundem Knorpel waren diese Parameter noch deutlich minderwertiger. Es fand sich aber keine Verdickung des Knorpels, keine Synovialproliferation oder die Bildung von Osteophyten [149, 150]. Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren wie bFGF oder TGF- β führte die intraartikuläre Gabe von HGF nicht zu osteophytären Anbauten [101, 143]. Bhargava et al. haben Meniskusschäden, die mit Wachstumsfaktor-imprägnierten Kollagenträgern behandelt wurden, *in vitro* untersucht. Verglichen wurde die Diffusion von PDGF und HGF in Meniskusgewebe gegen eine Kontrollgruppe, und ob die Heilung von Schäden in dem Bereich so verbessert werden konnte. Die histologische Auswertung nach zwei Wochen ließ, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, eine deutliche Anfärbarkeit des Gewebes für Proteoglykane um den Defekt herum erkennen, sowohl bei der Behandlung mit HGF als auch mit PDGF. Außerdem führten diese Behandlungen im Gegensatz zu den Kontrollen zu Migration von Zellen in Richtung des Defektes. Die Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren schien hier den besten Effekt zu haben, nach wenigen Tagen wurde eine Zunahme der Zellen im Defektgebiet beobachtet und nach 4 Wochen fand sich doppeltbrechendes Material in der Polarisationsmikroskopie, was auf organisiertes Kollagen hindeutet [8].

Es wurde auch versucht, die Einheilung von osteochondralen Transplantaten nach OAT durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu verbessern. Siebert et al. haben versucht, die Einheilung osteochondraler Transplantate durch die Zugabe von bFGF zu verbessern [133]. Das Studiendesign war anders gewählt, hier wurde der Spenderzylinder vor der Transplantation für 10min in bFGF getränkte Pufferlösung eingelegt und dann verpflanzt. Eine Gruppe von 10 Schafen wurde gegen eine Kontrollgruppe verglichen und die Einheilung der Zylinder nach 3 und 6 Monaten makroskopisch, mikroskopisch und radiologisch ermittelt. Die Transplantate waren in der Studie in jedem der beiden Untersuchungszeiträume gut gegen den umgebenden Knorpel abgrenzbar, die Demarkationslinie der Transplantate der Verumgruppe gegen den umgebenden Knorpel war allerdings weniger ausgeprägt, was auf einen positiven Effekt der Wachstumsfaktorapplikation hindeuten könnte. Die histologische und radiologische Auswertung zeigte dann aber die fehlende chondrale Integration in beiden Gruppen am Ende des Unter-

suchungszeitraumes, während die knöcherne Integration bereits nach 3 Monaten abgeschlossen war. Die Augmentation mit bFGF hat in diesem Fall zwar die ossäre Integration stimuliert, die Heilung auf der Ebene des Knorpels konnte aber auch nicht verbessert werden. In einer später folgenden Studie an Schafen haben Siebert et al. den Effekt von bFGF und BMP-2 auf die OAT miteinander verglichen und sind zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Makroskopisch schien die Integration der Knorpeltransplantate in der bFGF-Gruppe besser zu sein, aber histologisch und radiologisch fand sich in keiner der Gruppen die Integration auf Knorpel Ebene. Die Augmentation sowohl mit bFGF als auch mit BMP-2 konnte zwar ossären Heilungsprozess beschleunigen, hatte aber keinen Effekt auf die Integration auf Knorpel Ebene [134]. Diese Beobachtungen decken sich mit den von uns erhobenen Ergebnissen, obwohl der Effekt von HGF auf die ossäre Heilung fraglich ist. Die ossäre Integration war nach dem von uns gewählten Untersuchungszeitraum von 3 Monaten vollständig und die Einheilung des Knorpels wurde auch durch HGF nicht verbessert. In einer weiteren Studie haben Nakayama et al. ebenfalls den Effekt von bFGF-2 auf die Einheilung von osteochondralen Transplantaten untersucht und sind mit einem Kaninchenmodell zu anderen Ergebnissen gelangt. Der Wachstumsfaktor wurde mit Hilfe eines Kollagengels vor der osteochondralen Transplantation in den Defekt gegeben. Bereits nach drei Wochen zeigte sich keine Spaltenbildung mehr und die Integration der Transplantate in den Knochen war abgeschlossen. Auch die mechanischen Eigenschaften der Transplantate waren in der Wachstumsfaktorgruppe bereits nach drei Wochen und damit früher als in den Kontrollgruppen wieder normalisiert. Entzündliche Veränderungen oder Osteophyten konnten auch nach Ablauf von 12 Wochen nicht nachgewiesen werden [97]. Ob diese Ergebnisse nun auf der modifizierten Applikationsweise des Wachstumsfaktors beruhen, oder vielleicht in den strukturellen Unterschieden des Gelenkknorpels von Kaninchenknien begründet liegen, bleibt fraglich.

Zusammenfassend werden die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse bezüglich der Heilung der osteochondralen Transplantate von der vorhandenen Literatur unterstützt. Obwohl manchmal Faserknorpel nach osteochondraler Transplantation oder nach Re-fixation osteochondraler Frakturen nachgewiesen werden konnte, wurde bis jetzt beim Menschen oder im Großtiermodell eine Einheilung auf der Ebene des Knorpels in der Regel nicht beobachtet.

Eine Erklärung hierfür könnte die dickere Knorpelschicht und die damit veränderte Reparaturantwort im Gegensatz zur nachgewiesenen chondralen Integration im Klein-

tiermodell sein [81]. Mitverantwortlich könnten auch Probleme des umgebenden Knorpels sein. Häufig wird in einen Defektbereich hinein transplantiert, so dass die Vermutung nahe liegt, dass eine exakte Ausfüllung des Defektbereiches nicht immer gelingt und in geschädigten Knorpel hinein transplantiert wird. Diese Erklärung trifft klinisch sicherlich zu, ist in der hier durchgeführten Studie aber eher unwahrscheinlich, da ein Knorpel-Knochen-Zylinder aus einem gesunden Knorpelbereich entnommen worden ist und in einen anderen gesunden Bereich verpflanzt worden ist. Eine andere mögliche Ursache, die auch hier zutreffen könnte, ist der eventuell nachteilige Effekt der Operation auf den umgebenden Knorpel. Nicht nur eine Schädigung der transplantierten Chondrozyten durch die Press-Fit-Technik konnte gezeigt werden, auch der umgebende Knorpel wird durch die Stanzen in Mitleidenschaft gezogen [57, 122].

Außerdem konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden, dass der Transplantatknorpel hyaliner Knorpel bleibt, aber histologisch Zeichen einer Degeneration aufweist. Hangody et al. konnten bei arthroskopisch gewonnenen Biopsien aus dem Transplantatbereich nach OAT normale Oberflächenverhältnisse und normales Färbeverhalten von hyalinem Knorpel für Kollagen Typ II und Proteoglykane nachweisen [54]. Die normalen Oberflächenverhältnisse konnten wir nicht nachvollziehen, was möglicherweise in dem kürzeren Untersuchungszeitraum begründet ist, das Färbeverhalten von hyalinem Knorpel aber schon. Die von Rose et al. erhobenen Ergebnisse bei Patienten nach erfolgter osteochondraler autologer Transplantation korrelieren sehr gut mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden. Bei radiologischen Nachuntersuchungen mittels Magnetresonanztomographie konnte keine chondrale Integration der Zylinder nachgewiesen werden. In repräsentativen, arthroskopisch durchgeführten Biopsien aus dem Transplantatbereich und aus dem Übergangsbereich nach OAT fanden sich histologisch Zeichen der strukturellen Veränderung und Degeneration. Die Haupteigenschaften des hyalinen Knorpels wurden beibehalten und die Matrix bestand hauptsächlich aus Kollagen Typ II. Allerdings deuteten eine erhöhte Zelldichte in der tiefen Zone, Fissuren an der Oberfläche und Blutgefäße, die die Tidemark kreuzen, auf eine strukturelle Schädigung des Knorpels hin [122].

Die Langzeitauswirkungen dieser Beobachtungen bleiben zunächst unklar. Die bereits bekannten Nachteile der autologen osteochondralen Transplantation, wie die Schwierigkeit der Rekonstruktion einer ebenen Knorpeloberfläche, die unterschiedliche Dicke des Knorpels, die eingeschränkte Verfügbarkeit der Spenderzylinder und die Nekrose derselben, sollten nach diesen Ergebnissen noch kritischer betrachtet werden. Die histolo-

gischen Zeichen der Degeneration des Transplantatknorpels müssen im Laufe der Zeit sicher als eine zusätzliche Prädisposition zu degenerativen Veränderungen gewertet werden.

Allerdings werden die operativen Techniken ständig verbessert, hierdurch werden die Kollateralschäden des Verfahrens weiter reduziert. Feil et al. beschreiben die verbesserte Technik und Präzision der OAT mittels Diamant-Nass-Schleif-Verfahren im Gegensatz zur herkömmlichen Entnahme von Knorpel-Knochen-Zylindern. Die Wandstärke der diamantbeschichteten Fräse beträgt nur noch 0,4mm und trennt die spongiöse Struktur des Entnahmezylinders aus seiner Umgebung, ohne die originäre Knochenbälkchenform zu brechen, wie es bei herkömmlichen Entnahmeverfahren der Fall ist. Durch die feine Größenabstufung und maximale Präzision im Fertigungsgang lässt sich eine bisher nicht erreichte Passgenauigkeit des Zylinders in seinem neu geschaffenen Lager erzielen. Auch eine überlappende Anordnung der Zylinder ist mit der verbesserten Technik möglich und lässt eine Versorgung größerer Areale zu. Die Minimierung von Zwischenräumen innerhalb des transplantierten Areals minimiert die Ausbildung eines minderwertigen Regeneratgewebes und so wird eine wesentlich verbesserte Belastbarkeit erzielt. Die Entnahmestellen werden durch Zylinder vom Beckenkamm aufgefüllt, welche nach wenigen Wochen eine für den Bereich ausreichende Belastbarkeit erzielen, mit dieser Methode wird die Morbidität im Bereich der Hebedefekte reduziert [42]. Mit diesen verbesserten Techniken könnten auch die histologischen Strukturveränderungen des transplantierten Knorpels geringer ausfallen.

Bezüglich der Morbidität, die durch die Entnahme ausgelöst wird, gilt es verschiedene Punkte zu beachten. Die Morbidität und Veränderung im Bereich der Entnahmestellen konnten in dieser Studie nicht separat bewertet werden, da Entnahmestelle zugleich Verpflanzungsstelle ist. Es muss aber bedacht werden, dass in der vorliegenden Studie die Spenderzylinder aus einem Gewicht tragenden Teil des Knies in den kontralateralen Gewicht tragenden Teil desselben Knies verpflanzt worden sind. Klinisch findet sich diese Situation in der Regel nicht, da die Spenderzylinder aus einem nicht belasteten Bereich des Knies entnommen werden, um einen Knorpelschaden in einem belasteten Bereich auszubessern [57]. Diese Zylinder sollten nach allgemeinem Verständnis eine noch geringere Widerstandskraft als die in dieser Studie verwendeten Zylinder aus einem ebenfalls Gewicht tragendem Teil des Kniegelenkes aufweisen, was auch histologisch nachzuweisen sein dürfte. Die Strukturschädigungen des transplantierten Knorpels dürften damit im Vergleich noch deutlicher ausfallen.

Fraglich bleibt wiederum die klinische Wertigkeit so erhobener histologischer Befunde. Eine Studie zu den biomechanischen Kräften, die auf die Entnahmeregion wirken, hat diese Kräfte als hoch identifiziert. Bewertet wurden die Kniebeschwerden von Patienten, deren Knie nur als Spenderregion für Transplantate zur Reparatur von Knorpelschäden anderer Gelenkregionen diente. Hier fand sich kein Hinweis auf degenerative Veränderungen, die durch die Entnahme ausgelöst werden. Die Beschwerden der meisten Patienten waren nur vorübergehend und nahezu alle Patienten, die mit osteochondralen Zylindern aus dem Knie wegen talaren Knorpelschäden behandelt wurden, waren nach einem Jahr beschwerdefrei. Grund hierfür könnte die periphere Position und die relativ kleine Fläche, den die Zylinder im Entnahmebereich einnehmen, sein. Das Kniegelenk kann sich dann an die veränderte Belastungssituation adaptieren [55].

Klinisch scheinen sich diese Überlegungen zur Interpretation der histologischen Befunde, wie bereits oben erwähnt, nicht widerzuspiegeln. Die kurzfristigen Ergebnisse der osteochondralen autologen Transplantation sind gut [52], werden aber in aller Regel auch mit weniger aufwendigen Prozeduren wie Mikrofrakturierung und Pridie-Bohrung erreicht, obwohl der Knorpeldefekt dabei mit Faserknorpel mit minderwertigeren tribologischen Eigenschaften gefüllt wird [137]. Die neueren Studien belegen aber auch gute Langzeitergebnisse der klinischen retrospektiven Nachbeobachtungen nach OAT an einem großen Patientenkollektiv [55]. Von wesentlicher Bedeutung für die guten Erfolgsraten der OAT sind hierbei die richtige Indikationsstellung und die gleichzeitige oder zeitnahe Korrektur von Begleitpathologien wie Achsenfehlstellungen, Meniskus-schäden oder Kreuzbandrupturen.

In wie weit die HGF-Applikation die Ergebnisse verbessert hat, ist nicht klar. Die chondrale Integration konnte durch die HGF-Applikation nicht verbessert werden. Dafür war die Knorpelstruktur der Transplantate in der HGF Gruppe zwar tendenziell besser als in der Kontrollgruppe, ein signifikanter Unterschied fand sich allerdings nicht. Die Ergebnisse bezüglich der ossären Integration sind mit den Ergebnissen aus früheren Studien, die die Verbesserung der Einheilung osteochondraler Transplantate mittels Wachstumsfaktoren untersucht haben, vergleichbar [133, 134]. Der positive Effekt von HGF auf den Metabolismus von Knorpelzellen und die Knorpelheilung konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. HGF fördert neben Proliferation und Chemotaxis auch die Angiogenese und Morphogenese in epithelialen Zellen [87]. Pfander et al. konnten die Verteilung von HGF und dessen Rezeptor c-met in arthro-

tischen Knorpelpräparaten im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersuchen. Hier zeigte sich eine deutliche verstärkte immunhistochemische Anfärbbarkeit sowohl für HGF, als auch den dazugehörigen Rezeptor, was auf eine wesentliche Rolle bei den Regenerationsvorgängen bei arthrotisch geschädigtem Knorpel rückschliessen lässt [116]. Wakitani et al. haben vollschichtige Knorpeldefekte in Kaninchenknien mit HGF behandelt und gute Ergebnisse erzielen können. In der HGF-Gruppe entsprach das Färbeverhalten und die Zelldichte eher hyalinem Gelenkknorpel und auch der histologische Vergleich ergab in der HGF-Gruppe statistisch signifikant bessere Werte für den Regeneratknorpel im Vergleich mit der Kontrolle [149, 150]. Die Heilung von Knorpelschäden stellt sich auch aufgrund der avaskulären Natur des Gelenkknorpels als problematisch dar. HGF konnte auch als potenter angiogener Faktor identifiziert werden und diese Neoangiogenese könnte sich positiv auf die Knorpelheilung auswirken [47]. Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren kam es nicht zu Proliferation der Synovia oder zu osteophytären Anbauten bei der intraartikulären Applikation von HGF [150]. Die Proliferation von Chondrozyten wurde durch HGF stimuliert, was sich in einer dreifach gesteigerten DNA-Synthese, sowie einer gesteigerten Proteoglykansynthese in den Chondrozyten äußerte. Das könnte die etwas bessere Struktur des Transplantatknorpels in der HGF-Gruppe erklären. Weiterhin ist der Effekt von HGF auf Gelenkknorpel ebenso wie der Effekt anderer Wachstumsfaktoren dosisabhängig [138].

Es wäre zu überlegen, ob die intensiviertere Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors HGF eventuell zu besseren Ergebnissen führen würde. Zukünftig könnte versucht werden, die in vivo Aktivität von HGF exakter zu analysieren, oder die Applikation von Wachstumsfaktoren beispielsweise mittels einer Pumpe durchzuführen. In Betracht gezogen werden könnte eine implantierbare Pumpe, die den Faktor kontinuierlich oder in definierten Zeitabständen abgibt, oder die Integration des Wachstumsfaktors in ein Trägermolekül. O'Driscoll et al. und Sellers et al. konnten am Beispiel eines mit BMP-2 imprägnierten Kollagenschwammes die beschleunigte Regeneration des subchondralen Knochens und verbessertes Aussehen des darüber liegenden Knorpels nachweisen [102, 125]. Die Verwendung eines Zwei-Phasen Modells, in das ein Wachstumsfaktor eingebracht war, führte in einer anderen Studie aber zu keinem wesentlichen Unterschied bei der Heilung osteochondraler Defekte in Ziegen [99]. Das resorbierbare Polymermolekül bestand aus einer steiferen Zone für den subchondralen Knochen und aus einer flexiblen Phase, die in den darüber liegenden Knorpel integrieren sollte.

Des Weiteren könnte sich die Kombination von zwei Wachstumsfaktoren als vorteilhaft erweisen. Bhargava et al. konnten mit einer Kombination aus HGF und PDGF eine deutlich bessere Heilungstendenz bei Meniskusverletzungen beobachten, als mit einem Wachstumsfaktor allein. Zusätzlich wurde hier noch die Applikation über ein Trägermolekül untersucht [8]. Bradham et al. kombinierten bFGF und TGF- β als synergistisch wirkende Wachstumsfaktoren in einem Kulturmedium und untersuchten die Auswirkungen auf isolierte Kaninchenchondrozyten [15].

Auch der Transport mit Hilfe genetisch veränderter Zellen zum Zwecke der Überexpression eines bestimmten Wachstumsfaktors in einem bestimmten Gewebe wird erforscht [26, 34]. Für gentherapeutische Ansätze ist die Gelenksynovia in der Theorie das ideale Zielgewebe, da ein Kontakt mit dem Gelenkraum besteht und sie eine große Oberfläche besitzt. Transgene Produkte könnten von der Synovia in den Knorpel diffundieren und dort den Metabolismus der Chondrozyten beeinflussen [41]. Problematisch erweist sich allerdings die Tatsache, dass der Gentransfer meist nicht auf den Knorpel begrenzt bleibt. In einer Studie mit dem adenoviralen Transfer von TGF- β führte dies zum Tod der Versuchstiere [41]. Der selektive Transfer von Genexpression in Chondrozyten oder deren Vorläuferzellen könnte zu besseren Ergebnissen führen. Hier sind schon verschiedene Studien am Tiermodell in vivo und ex vivo durchgeführt worden, die in vivo Verwendung von Gentherapien bleibt allerdings problematisch [41, 78]. Von Bedeutung ist auch die Wahl des Transfersystems. Im Gegensatz zu nicht viralen Transfersystemen wie Plasmiden ist der Gentransfer mit einem viralen Vektor stabiler und effizienter. Der Nachteil insbesondere der retroviralen Vektoren ist aber deren onkogenes Potential. Neuere und besser kontrollierbare Vektorsysteme mit einem geringeren Risiko der Mutagenese und Tumorentstehung sind vonnöten und werden erforscht [154]. Aktuelle Strategien zielen darauf ab, die chondrozytäre Differenzierung in dem den Defekt füllenden Reparaturgewebe zu induzieren. Das beinhaltet die entweder die direkte Stimulation der Proliferation von Chondrozyten und Matrixsynthese, oder die indirekte mit Hilfe von Zelltransplantation. Wachstumshormone erfüllen diese Anforderungen und stellen daher viel versprechende Kandidaten für den Gentransfer dar. Problematisch ist wiederum eine ausreichend hohe Konzentration des gewünschten Wachstumsfaktors für eine ausreichend lange Zeit im richtigen Zielgewebe, und nur dort, zu erreichen. Diese Anforderung stellt sich insbesondere für lokale Knorpeldefekte als schwierig zu erfüllen heraus. Zielzellen könnten neben oben beschriebenen Synoviazellen auch Vorläuferzellen sein, die aus dem Knochenmark bei Verletzung einwandern,

oder differenzierte Chondrozyten, die in den Defekt transplantiert werden. Interessant ist dieser Ansatz, da er mit etablierten chirurgischen Verfahren, wie knochenmarkstimulierenden Techniken, ACT oder auch der OATS kombiniert werden könnte, um so die Verfügbarkeit und Wirksamkeit des Wachstumsfaktors zu steigern [35].

5 Zusammenfassung

In vorangegangenen Studien wurde der Einfluss des Wachstumshormons HGF auf die Regenerationsfähigkeit vollschichtiger Knorpeldefekte untersucht. In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob HGF die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels nach Implantation autologer Knorpel-Knochen-Transplantate am Beispiel des Kniegelenkes des Schafes positiv beeinflusst. Hierzu wurden beide Kniegelenke von acht Schafen operiert, osteochondrale Zylinder aus der Femurkondyle einer Seite eines Kniegelenkes entnommen und in das kontralaterale Kompartiment desselben Kniegelenkes transplantiert. Die Schafe wurden dann in zwei Gruppen mit jeweils 16 Transplantaten aufgeteilt, wovon eine Gruppe dreimal pro Woche für insgesamt vier Wochen intraartikuläre HGF-Injektionen erhielt, in der Kontrollgruppe wurde isotone Kochsalzlösung injiziert. Nach einem Zeitraum von drei Monaten wurden die Tiere getötet und die Kniegelenke histologisch untersucht.

Die Hypothese, dass HGF das Einwachsen der Knorpel-Knochen-Zylinder positiv beeinflussen kann, muss nach den vorliegenden Ergebnissen in Frage gestellt werden. Die histologische Untersuchung zeigte zwar ein komplettes Einwachsen der osteochondralen Transplantate im Knochniveau, auf Höhe des Knorpels fand sich jedoch keinerlei Einwachsen oder Heilungstendenz.

Die Hypothese, dass sich die Qualität des Zwischengewebes durch die Applikation des Wachstumsfaktors verbessern lässt, muss verworfen werden. Es konnte weder hyalinartiger Knorpel noch Faserknorpel nachgewiesen werden, tatsächlich fand sich überhaupt kein Gewebe zwischen transplantiertem Knorpel und umgebendem Knorpel. Sowohl die immunhistochemischen Färbungen als auch die übrigen Färbungen zeigten deutlich, dass die Fissuren in der Zwischenzone nicht beeinflusst werden konnten, eine Integration im Knorpelniveau fand nicht statt.

Die Hypothese, dass sich die Qualität des Knorpels durch die HGF-Applikation verbessern lässt, kann allenfalls für einen Teilbereich des modifizierten Mankin-Score bestätigt werden.

Der untersuchte Parameter „Zelle“ des oben genannten Score weist in der mit dem Wachstumsfaktor behandelten Gruppe einen geringeren Wert (Mittelwert $2,00 \pm 0,00$) als die unbehandelte Gruppe (Mittelwert $2,25 \pm 0,45$) auf, dieser Unterschied ist auch statistisch signifikant ($p = 0,035$). Jedoch ergab die Gesamtbewertung des Knorpels

nach diesem modifizierten Mankin-Score insgesamt geringere Anzeichen von Degeneration in der HGF-Gruppe, eine statistische Signifikanz fand sich jedoch nicht ($p = 0,085$). Der Gesamtwert in der HGF-Gruppe (Mittelwert $5,75 \pm 1,84$) stellte sich, verglichen mit der Kontrolle (Mittelwert $7,13 \pm 2,31$), zwar etwas besser dar. Aber eine Aussage darüber, ob sich die HGF-Applikation positiv auf die Qualität des Knorpels auswirkt, kann hieraus nicht abgeleitet werden.

In diesem Zusammenhang fanden sich aber für die unbehandelten Transplantate histologische Anzeichen der Degeneration, die statisch signifikant waren. Vergleicht man die Qualität des Knorpels der Spenderzylinder mit dem des umgebenden Knorpelgewebes der Kontrollgruppe, fallen deutliche Unterschiede auf, wenn oben erwähnter, modifizierter Mankin-Score zugrunde gelegt wird. Bezogen auf den Parameter Struktur finden sich Werte von größer als 2 in 11 Proben des transplantierten Knorpels (Mittelwert $3,19 \pm 1,83$, $p = 0,001$). Gesamt zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) zwischen den beiden untersuchten Knorpelgeweben, der transplantierte Knorpel weist einen deutlich schlechteren Gesamtscore auf (Mittelwert $7,13 \pm 2,31$) als der umgebende Knorpel (Mittelwert $4,69 \pm 1,35$). Daraus lässt sich schließen, dass der transplantierte Knorpel im Rahmen einer OAT im weiteren Verlauf degeneriert.

Die letzte der Hypothesen konnte hier bestätigt werden. Makroskopisch degenerative Veränderungen wie Bildung von Osteophyten, Knorpelverdickung und synoviale Proliferation konnten in keiner der Gruppen beobachtet werden, so dass von einem nebenwirkungsarmen Effekt von HGF ausgegangen werden kann.

Legt man diese Ergebnisse zugrunde, sollten die Langzeitergebnisse nach autologen osteochondralen Transplantationen kritisch verfolgt werden, insbesondere wenn Wachstumsfaktoren das Einheilen und die Qualität des Knorpels verbessern sollen. Die erfolgreiche Manipulation der Mikroumgebung des Gelenks mit Wachstumsfaktoren mit dem Ziel, die Synthese einer in den Eigenschaften dem hyalinen Knorpel ähnlichen Substanz zu ermöglichen, wird noch einige Forschung in Anspruch nehmen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aglietti P., Ciardullo A., et al., (2001): *Results of arthroscopic excision of the fragment in the treatment of osteochondritis dissecans of the knee*. Arthroscopy. 17(7): p. 741-746.
2. Akitoshi J., Yamashita K., et al., (1998): *The role of hepatocyte growth factor in growth plate cartilage*. Journal of Bone and Mineral Metabolism. 16(Number 3): p. 170-177.
3. Appleyard R.C., Ghosh P., and Swain M.V., (1999): *Biomechanical, histological and immunohistological studies of patellar cartilage in an ovine model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy*. Osteoarthritis Cartilage. 7(3): p. 281-294.
4. Aroen A., Loken S., et al., (2004): *Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies*. Am J Sports Med. 32(1): p. 211-215.
5. Bau B., McKenna L.A., et al., (2004): *Hepatocyte growth factor/scatter factor is not a potent regulator of anabolic and catabolic gene expression in adult human articular chondrocytes*. Biochem Biophys Res Commun. 316(4): p. 984-990.
6. Bauer M. and Jackson R.W., (1988): *Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification*. Arthroscopy. 4(2): p. 97-102.
7. Bendele A., McComb J., et al., (1999): *Animal models of arthritis: relevance to human disease*. Toxicol Pathol. 27(1): p. 134-142.
8. Bhargava M.M., Hidaka C., et al., (2005): *Effects of hepatocyte growth factor and platelet-derived growth factor on the repair of meniscal defects in vitro*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 41(8-9): p. 305-310.
9. Binnet M.S., Gurkan I., et al., (2001): *Histopathologic assessment of healed osteochondral fractures*. Arthroscopy. 17(3): p. 278-285.
10. Bobic V., (1999): *[Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions]*. Orthopade. 28(1): p. 19-25.
11. Boccaccio C., Gaudino G., et al., (1994): *Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF*. J Biol Chem. 269(17): p. 12846-12851.

12. Bodo G., Hangody L., et al., (2000): *Arthroscopic autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of subchondral cystic lesion in the medial femoral condyle in a horse*. Acta Vet Hung. 48(3): p. 343-354.
13. Bouwmeester P.S., Kuijer R., et al., (2002): *A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery*. J Orthop Res. 20(2): p. 267-273.
14. Bouwmeester S.J., Beckers J.M., et al., (1997): *Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee*. Int Orthop. 21(5): p. 313-317.
15. Bradham D.M. and Horton W.E., Jr., (1998): *In vivo cartilage formation from growth factor modulated articular chondrocytes*. Clin Orthop Relat Res, (352): p. 239-249.
16. Braun S. and Imhoff A.B., (2005): *Autologe Knochen-Knorpel-Transplantation*. Arthroskopie. 18(Number 3): p. 173-254.
17. Breinan H.A., Hsu H.P., and Spector M., (2001): *Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines*. Clin Orthop, (391 Suppl): p. S219-230.
18. Brittberg M., Faxen E., and Peterson L., (1994): *Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee osteoarthritis. A prospective 4-year followup of 37 patients*. Clin Orthop Relat Res, (307): p. 155-164.
19. Brittberg M., Lindahl A., et al., (1994): *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med. 331(14): p. 889-895.
20. Brittberg M., Nilsson A., et al., (1996): *Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes*. Clin Orthop Relat Res, (326): p. 270-283.
21. Brittberg M., Tallheden T., et al., (2001): *Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update*. Clin Orthop Relat Res, (391 Suppl): p. S337-348.
22. Brittberg M. and Winalski C.S., (2003): *Evaluation of cartilage injuries and repair*. J Bone Joint Surg Am. 85-A Suppl 2: p. 58-69.
23. Brucker P., Agneskirchner J.D., et al., (2002): *[Mega-OATS. Technique and outcome]*. Unfallchirurg. 105(5): p. 443-449.

24. Bruns J., Behrens P., and Silbermann M., (1997): *[The principle of autogeneic rib perichondrial transplantation in the treatment of deep articular cartilage defects]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 135(2): p. 138-144.
25. Bruns J. and Steinhagen J., (2003): *Treatment of deep hyalin cartilage defects with autologous perichondrial grafts*. Int J Sports Med. 24(5): p. 382-388.
26. Buckwalter J.A., (1998): *Articular cartilage: injuries and potential for healing*. J Orthop Sports Phys Ther. 28(4): p. 192-202.
27. Buckwalter J.A., (2002): *Articular cartilage injuries*. Clin Orthop Relat Res, (402): p. 21-37.
28. Buckwalter J.A. and Mankin H.J., (1998): *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. Instr Course Lect. 47: p. 487-504.
29. Bulstra S.K., Buurman W.A., et al., (1989): *Metabolic characteristics of in vitro cultured human chondrocytes in relation to the histopathologic grade of osteoarthritis*. Clin Orthop Relat Res, (242): p. 294-302.
30. Burkart A.C.I., A.B., (1999): *Therapie des Knorpelschadens*. Arthroskopie, (12): p. 279-288.
31. Bussolino F., Di Renzo M.F., et al., (1992): *Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth*. J Cell Biol. 119(3): p. 629-641.
32. Convery F.R., Akeson W.H., and Keown G.H., (1972): *The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses*. Clin Orthop. 82: p. 253-262.
33. Conway K., Price P., et al., (2006): *The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing*. Wound Repair Regen. 14(1): p. 2-10.
34. Coutts R.D., Sah R.L., and Amiel D., (1997): *Effects of growth factors on cartilage repair*. Instr Course Lect. 46: p. 487-494.
35. Cucchiari M. and Madry H., (2005): *Gene therapy for cartilage defects*. J Gene Med. 7(12): p. 1495-1509.
36. Darling E.M. and Athanasiou K.A., (2005): *Growth factor impact on articular cartilage subpopulations*. Cell Tissue Res. 322(3): p. 463-473.
37. Dell'Accio F., Vanlauwe J., et al., (2003): *Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix*

- formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation.* J Orthop Res. 21(1): p. 123-131.
38. Denda K., Shimomura T., et al., (2002): *Functional characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1.* J Biol Chem. 277(16): p. 14053-14059.
 39. Di Renzo M.F., Poulsom R., et al., (1995): *Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer.* Cancer Res. 55(5): p. 1129-1138.
 40. Erickson D.M., Harris S.E., et al., (1997): *Recombinant bone morphogenetic protein (BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner.* J Orthop Res. 15(3): p. 371-380.
 41. Evans C.H. and Robbins P.D., (1999): *Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy.* Rheum Dis Clin North Am. 25(2): p. 333-344.
 42. Feil R., Rübberdt A., and Ekkernkamp A., (2004): *Aktueller Stand der Behandlungsmöglichkeiten von Knorpeldefekten.* Trauma und Berufskrankheit. 6(Suppl. 4): p. 424-432.
 43. Fujimoto E., Ochi M., et al., (1999): *Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage.* Arch Orthop Trauma Surg. 119(3-4): p. 139-145.
 44. Fukuyama R., Ichijoh Y., et al., (1991): *Regional localization of the hepatocyte growth factor (HGF) gene to human chromosome 7 band q21.1.* Genomics. 11(2): p. 410-415.
 45. Gaissmaier C., (2003): *Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks: Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion.* Deutsches Ärzteblatt. 100(Heft 38): p. A-2448.
 46. Glansbeek H.L., van Beuningen H.M., et al., (1998): *Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints.* Lab Invest. 78(2): p. 133-142.
 47. Grant D.S., Kleinman H.K., et al., (1993): *Scatter factor induces blood vessel formation in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A. 90(5): p. 1937-1941.
 48. Grumbles R.M., Howell D.S., et al., (1996): *Hepatocyte growth factor and its actions in growth plate chondrocytes.* Bone. 19(3): p. 255-261.

49. Guevremont M., Martel-Pelletier J., et al., (2003): *Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HgF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage.* J Bone Miner Res. 18(6): p. 1073-1081.
50. Hangody L., Feczko P., et al., (2001): *Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle.* Clin Orthop, (391 Suppl): p. S328-336.
51. Hangody L. and Fules P., (2003): *Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience.* J Bone Joint Surg Am. 85-A Suppl 2: p. 25-32.
52. Hangody L., Kish G., et al., (1997): *Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 5(4): p. 262-267.
53. Hangody L., Kish G., et al., (1998): *Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice.* Orthopedics. 21(7): p. 751-756.
54. Hangody L., Rathonyi G.K., et al., (2004): *Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique.* J Bone Joint Surg Am. 86-A Suppl 1: p. 65-72.
55. Hangody L., Vasarhelyi G., et al., (2008): *Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results.* Injury. 39 Suppl 1: p. S32-39.
56. Horas U., Pelinkovic D., et al., (2003): *Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial.* J Bone Joint Surg Am. 85-A(2): p. 185-192.
57. Hunziker E.B., (2002): *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.* Osteoarthritis Cartilage. 10(6): p. 432-463.
58. Hunziker E.B. and Rosenberg L.C., (1996): *Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane.* J Bone Joint Surg Am. 78(5): p. 721-733.
59. Hurtig M., Pearce S., et al., (2001): *Arthroscopic mosaic arthroplasty in the equine third carpal bone.* Vet Surg. 30(3): p. 228-239.

60. Imhoff A.B. and Oetl G.M., (2000): *Arthroscopic and Open Techniques for Transplantation of Osteochondral Autografts and Allografts in Various Joints*. Surg Technol Int. VIII: p. 249-252.
61. Imhoff A.B., Oetl G.M., et al., (1999): *[Autologous osteochondral transplantation on various joints]*. Orthopade. 28(1): p. 33-44.
62. Ippolito E., Postacchini F., and Scola E., (1983): *Skeletal growth in normal and pathological conditions*. Ital J Orthop Traumatol. 9(1): p. 115-127.
63. Iwama A., Yamaguchi N., and Suda T., (1996): *STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family*. Embo J. 15(21): p. 5866-5875.
64. Jackson D.W., Lalor P.A., et al., (2001): *Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study*. J Bone Joint Surg Am. 83-A(1): p. 53-64.
65. Jackson D.W., Scheer M.J., and Simon T.M., (2001): *Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options*. J Am Acad Orthop Surg. 9(1): p. 37-52.
66. Jackson D.W., Simon T.M., and Aberman H.M., (2001): *Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium*. Clin Orthop, (391 Suppl): p. S14-25.
67. Jackson R.W. and Dieterichs C., (2003): *The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up*. Arthroscopy. 19(1): p. 13-20.
68. Jiang W., Hiscox S., et al., (1999): *Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer*. Crit Rev Oncol Hematol. 29(3): p. 209-248.
69. Jiang W.G. and Hiscox S., (1997): *Hepatocyte growth factor/scatter factor, a cytokine playing multiple and converse roles*. Histol Histopathol. 12(2): p. 537-555.
70. Jiang W.G., Lloyds D., et al., (1993): *Regulation of spreading and growth of colon cancer cells by hepatocyte growth factor*. Clin Exp Metastasis. 11(3): p. 235-242.

71. Jiang W.G., Puntis M.C., and Hallett M.B., (1993): *Monocyte-conditioned media possess a novel factor which increases motility of cancer cells*. Int J Cancer. 53(3): p. 426-431.
72. Jiang W.G., Puntis M.C., and Hallett M.B., (1994): *Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment*. Br J Surg. 81(11): p. 1576-1590.
73. Johnson L.L., (2001): *Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review*. Clin Orthop, (391 Suppl): p. S306-317.
74. Kim H.K., Moran M.E., and Salter R.B., (1991): *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. 73(9): p. 1301-1315.
75. Kocher M.S., Micheli L.J., et al., (2001): *Functional and radiographic outcome of juvenile osteochondritis dissecans of the knee treated with transarticular arthroscopic drilling*. Am J Sports Med. 29(5): p. 562-566.
76. Lee S.L., Dickson R.B., and Lin C.Y., (2000): *Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease*. J Biol Chem. 275(47): p. 36720-36725.
77. Leonhardt H., (1990): *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme Verlag: p. 134-137.
78. Lieberman J.R., Daluiski A., et al., (1999): *The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats*. J Bone Joint Surg Am. 81(7): p. 905-917.
79. Little C., Smith S., et al., (1997): *Histomorphological and immunohistochemical evaluation of joint changes in a model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy in sheep*. J Rheumatol. 24(11): p. 2199-2209.
80. Madry H., Kaul G., et al., (2005): *Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I)*. Gene Ther. 12(15): p. 1171-1179.
81. Makino T., Fujioka H., et al., (2001): *Histologic analysis of the implanted cartilage in an exact-fit osteochondral transplantation model*. Arthroscopy. 17(7): p. 747-751.
82. Mankin H.J., (1982): *The response of articular cartilage to mechanical injury*. J Bone Joint Surg Am. 64(3): p. 460-466.

83. Mankin H.J., Dorfman H., et al., (1971): *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. 53(3): p. 523-537.
84. Mars W.M., Zarnegar R., and Michalopoulos G.K., (1993): *Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA.* Am J Pathol. 143(3): p. 949-958.
85. Martel-Pelletier J., (1998): *Pathophysiology of osteoarthritis.* Osteoarthritis Cartilage. 6(6): p. 374-376.
86. Matsumoto K. and Nakamura T., (1992): *Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions.* Crit Rev Oncog. 3(1-2): p. 27-54.
87. Matsumoto K. and Nakamura T., (1996): *Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor.* J Biochem (Tokyo). 119(4): p. 591-600.
88. Matsumoto K., Tajima H., et al., (1992): *Identification and characterization of "injurin," an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor.* Proc Natl Acad Sci U S A. 89(9): p. 3800-3804.
89. Matsumoto T., Gargosky S.E., et al., (1996): *Identification and characterization of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP proteases in human synovial fluid.* J Clin Endocrinol Metab. 81(1): p. 150-155.
90. Matsusue Y., Yamamuro T., and Hama H., (1993): *Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption.* Arthroscopy. 9(3): p. 318-321.
91. Messner K. and Maletius W., (1996): *The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes.* Acta Orthop Scand. 67(2): p. 165-168.
92. Miyazawa K., Shimomura T., et al., (1993): *Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII.* J Biol Chem. 268(14): p. 10024-10028.

93. Morimoto A., Okamura K., et al., (1991): *Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture*. Biochem Biophys Res Commun. 179(2): p. 1042-1049.
94. Morishita R., Aoki M., et al., (2002): *Hepatocyte growth factor as cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease*. Endocr J. 49(3): p. 273-284.
95. Nakahara H., Goldberg V.M., and Caplan A.I., (1991): *Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo*. J Orthop Res. 9(4): p. 465-476.
96. Nakamura T., (1991): *Structure and function of hepatocyte growth factor*. Prog Growth Factor Res. 3(1): p. 67-85.
97. Nakayama J.I., Fujioka H., et al., (2007): *The effect of fibroblast growth factor-2 on autologous osteochondral transplantation*. Int Orthop.
98. Neame R. and Doherty M., (2005): *Osteoarthritis update*. Clin Med. 5(3): p. 207-210.
99. Niederauer G.G., Slivka M.A., et al., (2000): *Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats*. Biomaterials. 21(24): p. 2561-2574.
100. Niimura M., Takagi N., et al., (2006): *Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab. 26(11): p. 1354-1365.
101. O'Connor W.J., Botti T., et al., (2000): *The use of growth factors in cartilage repair*. Orthop Clin North Am. 31(3): p. 399-410.
102. O'Driscoll S.W., (1998): *The healing and regeneration of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am. 80(12): p. 1795-1812.
103. O'Driscoll S.W., (1999): *Articular cartilage regeneration using periosteum*. Clin Orthop Relat Res, (367 Suppl): p. S186-203.
104. O'Driscoll S.W. and Fitzsimmons J.S., (2001): *The role of periosteum in cartilage repair*. Clin Orthop, (391 Suppl): p. S190-207.
105. O'Driscoll S.W., Keeley F.W., and Salter R.B., (1988): *Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous*

- passive motion. A follow-up report at one year.* J Bone Joint Surg Am. 70(4): p. 595-606.
106. O'Driscoll S.W., Keeley F.W., and Salter R.B., (1986): *The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit.* J Bone Joint Surg Am. 68(7): p. 1017-1035.
 107. O'Driscoll S.W., Marx R.G., et al., (2001): *Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system.* Tissue Eng. 7(3): p. 313-320.
 108. Okazaki K., Jingushi S., et al., (1999): *Expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in developing osteophytes in murine experimental osteoarthritis and in rats inoculated with growth hormone-secreting tumor.* Endocrinology. 140(10): p. 4821-4830.
 109. Okazaki R., Sakai A., et al., (1996): *Effects of transforming growth factor beta s and basic fibroblast growth factor on articular chondrocytes obtained from immobilised rabbit knees.* Ann Rheum Dis. 55(3): p. 181-186.
 110. Outerbridge R.E., (1961): *The etiology of chondromalacia patellae.* J Bone Joint Surg Br. 43-B: p. 752-757.
 111. Pasdar M., Li Z., et al., (1997): *Inhibition of junction assembly in cultured epithelial cells by hepatocyte growth factor/scatter factor is concomitant with increased stability and altered phosphorylation of the soluble junctional molecules.* Cell Growth Differ. 8(4): p. 451-462.
 112. Peruzzi B. and Bottaro D.P., (2006): *Targeting the c-Met signaling pathway in cancer.* Clin Cancer Res. 12(12): p. 3657-3660.
 113. Peterson L., Brittberg M., et al., (2002): *Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability.* Am J Sports Med. 30(1): p. 2-12.
 114. Peterson L., Minas T., et al., (2000): *Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee.* Clin Orthop Relat Res, (374): p. 212-234.
 115. Petrella R.J. and Petrella M., (2006): *A prospective, randomized, double-blind, placebo controlled study to evaluate the efficacy of intraarticular hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee.* J Rheumatol. 33(5): p. 951-956.

116. Pfander D., Cramer T., et al., (1999): *Hepatocyte growth factor in human osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis Cartilage. 7(6): p. 548-559.
117. Pineda S., Pollack A., et al., (1992): *A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair*. Acta Anat (Basel). 143(4): p. 335-340.
118. Poole A.R., Kojima T., et al., (2001): *Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair*. Clin Orthop, (391 Suppl): p. S26-33.
119. Qin L., Denda K., et al., (1998): *Functional characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2*. FEBS Lett. 436(1): p. 111-114.
120. Rand J.A., (1991): *Role of arthroscopy in osteoarthritis of the knee*. Arthroscopy. 7(4): p. 358-363.
121. Roberts S., Hollander A.P., et al., (2001): *Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation*. Arthritis Rheum. 44(11): p. 2586-2598.
122. Rose T., Craatz S., et al., (2005): *The autologous osteochondral transplantation of the knee: clinical results, radiographic findings and histological aspects*. Arch Orthop Trauma Surg. 125(9): p. 628-637.
123. Salk R.S., Chang T.J., et al., (2006): *Sodium hyaluronate in the treatment of osteoarthritis of the ankle: a controlled, randomized, double-blind pilot study*. J Bone Joint Surg Am. 88(2): p. 295-302.
124. Schewe B. and Weise K., (2006): *Therapie von Knorpelschäden. Was ist gesichert?* Trauma und Berufskrankheiten. 8(Suppl 1): p. 49 - 54.
125. Sellers R.S., Peluso D., and Morris E.A., (1997): *The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am. 79(10): p. 1452-1463.
126. Serra R., Johnson M., et al., (1997): *Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis*. J Cell Biol. 139(2): p. 541-552.
127. Shakibaei M., John T., et al., (1999): *Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor*. Biochem J. 342 Pt 3: p. 615-623.
128. Shapiro F., Koide S., and Glimcher M.J., (1993): *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am. 75(4): p. 532-553.

129. Shimomura T., Kondo J., et al., (1993): *Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin*. J Biol Chem. 268(30): p. 22927-22932.
130. Shimomura T., Miyazawa K., et al., (1995): *Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator*. Eur J Biochem. 229(1): p. 257-261.
131. Shoemaker R.S., Bertone A.L., et al., (1992): *Effects of intra-articular administration of methylprednisolone acetate on normal articular cartilage and on healing of experimentally induced osteochondral defects in horses*. Am J Vet Res. 53(8): p. 1446-1453.
132. Siebert C.H., Miltner O., et al., (2001): *[Healing of osteochondral transplants-- animal experiment studies using a sheep model]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 139(5): p. 382-386.
133. Siebert C.H., Miltner O., et al., (2003): *Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF*. Arthroscopy. 19(2): p. 182-187.
134. Siebert C.H., Schneider U., et al., (2006): *Ingrowth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. 126(4): p. 247-252.
135. Silvagno F., Follenzi A., et al., (1995): *In vivo activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 15(11): p. 1857-1865.
136. Sonnenberg E., Meyer D., et al., (1993): *Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development*. J Cell Biol. 123(1): p. 223-235.
137. Steadman J.R., Rodkey W.G., and Briggs K.K., (2002): *Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes*. J Knee Surg. 15(3): p. 170-176.
138. Takebayashi T., Iwamoto M., et al., (1995): *Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes*. J Cell Biol. 129(5): p. 1411-1419.
139. Tibesku C.O., Szuwart T., et al., (2004): *Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation*. J Orthop Res. 22(6): p. 1210-1214.
140. Trippel S.B., (1995): *Growth factor actions on articular cartilage*. J Rheumatol Suppl. 43: p. 129-132.

141. Uchiyama A., Essner R., et al., (1996): *Interleukin 4 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of colon carcinomas*. J Cell Biochem. 62(4): p. 443-453.
142. van Beuningen H.M., Glansbeek H.L., et al., (1998): *Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation*. Osteoarthritis Cartilage. 6(5): p. 306-317.
143. van Beuningen H.M., van der Kraan P.M., et al., (1994): *Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint*. Lab Invest. 71(2): p. 279-290.
144. van den Berg W.B., (1999): *The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Z Rheumatol. 58(3): p. 136-141.
145. van den Berg W.B. and Bresnihan B., (1999): *Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1*. Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol. 13(4): p. 577-597.
146. van den Berg W.B., van der Kraan P.M., et al., (2001): *Growth factors and cartilage repair*. Clin Orthop, (391 Suppl): p. S244-250.
147. Wachtler F., (2000): *Histologie. Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Fakultas Univ. Verl.: p. 140-143.
148. Wagner H., (1964): *[Surgical Treatment of Osteochondritis Dissecans, a Cause of Arthritis Deformans of the Knee.]*. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot. 50: p. 335-352.
149. Wakitani S., Goto T., et al., (1994): *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am. 76(4): p. 579-592.
150. Wakitani S., Imoto K., et al., (1997): *Hepatocyte growth factor facilitates cartilage repair. Full thickness articular cartilage defect studied in rabbit knees*. Acta Orthop Scand. 68(5): p. 474-480.
151. Warman M.L., (2000): *Human genetic insights into skeletal development, growth, and homeostasis*. Clin Orthop Relat Res, (379 Suppl): p. S40-54.
152. Weimar I.S., de Jong D., et al., (1997): *Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes adhesion of lymphoma cells to extracellular matrix molecules via alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins*. Blood. 89(3): p. 990-1000.

153. Yamashita J., Ogawa M., et al., (1994): *Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer*. *Cancer Res.* 54(7): p. 1630-1633.
154. Yi Y., Hahm S.H., and Lee K.H., (2005): *Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions*. *Curr Gene Ther.* 5(1): p. 25-35.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Aufbau eines Proteoglykanaggregates (aus: [30]).....	10
Abbildung 2:	Zoneneinteilung und zelluläre Organisation im Gelenkknorpel (aus: [30]).....	12
Abbildung 3:	Technik der osteochondralen Transplantation (aus: [52]).....	27
Abbildung 4:	Makroskopisches Bild der Transplantate in dem jeweiligen Kompartiment der Femurkondyle. Die Randbereiche sind gut abgrenzbar.....	48
Abbildung 5:	Bereich des Transplantat-Gelenkknorpel-Überganges. Knorpel mit Fissur (F), im tiefer liegenden Knochen ist das Implantat eingewachsen (Pfeil). HE-Färbung.....	49
Abbildung 6:	Mikroskopisches Bild der oberflächlichen Zone von transplantiertem Knorpel links und ortsständigem Gelenkknorpel rechts. Immunhistochemische Färbung Kollagen Typ I (Vergrößerung).	50
Abbildung 7:	Mikroskopisches Bild der oberflächlichen Zone von transplantiertem Knorpel links und ortsständigem Gelenkknorpel rechts. Immunhistochemische Färbung Kollagen Typ II (Vergrößerung).	51
Abbildung 8:	Histologischer Vergleich von umgebendem und transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe. Der Transplantatknorpel weist einen höheren Score und damit eine schlechtere Struktur auf.....	53
Abbildung 9:	Vergleich von umgebendem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe. Es finden sich tendenziell bessere Werte in der HGF-Gruppe ohne statistische Signifikanz. Es findet sich aber damit auch kein schädigender Einfluss von HGF.....	55
Abbildung 10:	Vergleich von transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe. Die Struktur des Knorpels der HGF-Gruppe ist in allen Kategorien tendenziell besser, es findet sich aber keine statistische Signifikanz.....	56

- Abbildung 11: Vergleich der Fissurzone zwischen transplantiertem und ortsständigem Knorpel. Es findet sich kein Einwachsen, die Fissur reicht im Großteil der Fälle bis auf den Knochen..... 58
- Abbildung 12: Fissur zwischen Implantat und umgebendem Gelenkknorpel. Hyperzellularität und Zellkloning als Zeichen der Gewebereaktion im Randbereich. Safranin-O-Färbung. 58

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Modifizierter Mankin Score	45
Tabelle 2:	Histologischer Vergleich von umgebendem und transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe (modifizierter Mankin-Score).	52
Tabelle 3:	Histologischer Vergleich von umgebendem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe (modifizierter Mankin-Score).	54
Tabelle 4:	Histologischer Vergleich von transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe (modifizierter Mankin-Score).	56
Tabelle 5:	Histologischer Vergleich der Zwischenzone zwischen ortsständigem und transplantiertem Knorpel in der Kontrollgruppe und in der HGF-Gruppe (modifizierter Mankin-Score).	57

9 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenic Protein
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CPPV	Continuous Positive Pressure Ventilation
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FiO ₂	Sauerstoffgehalt
HE	Hämatoxilin-Eosin (-Färbung)
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGFA	HGF Aktivator
HAI	HGF Aktivator Inhibitor
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
ICRS	International Cartilage Research Society
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
mRNA	messenger RNA
MMP	Matrixmetalloproteasen
NSAID	nicht steroidale Antirheumatika
OAT	osteocondrale autologe Transplantation
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
SD	Standardabweichung
TGF	Transforming Growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

10 Lebenslauf

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Priv.-Doz. Dr. med. C.O. Tibesku, der mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglichte, für seine Unterstützung, die freundschaftliche Zusammenarbeit und seine unendliche Geduld.

Dr. rer. nat. T. Szuwart und seinem Team, den MTA's Fr. C. Kemming und Fr. S. Kupich, für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen und sonstigen Ressourcen sowie die hervorragende und freundschaftliche Zusammenarbeit und außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Den Herren Daniel Renger und Dr. med. Axel Haber für Ihre beständige Motivation und den Herren Alexis Bremer, Jan Sohnsmeyer und Felix Scherz für die Ratschläge und Unterstützung.

Fr. Dr. med. Stephanie Graefe für ihre Unterstützung und die gemeinsame Zeit im Labor.

Bei Sonja Hermann bedanke ich mich für ihre Motivation und ihre Geduld.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, sie haben mich jederzeit und in allen meinen Vorhaben unterstützt, ich kann mich immer auf sie verlassen.

12 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren:

In Marburg:

Fuchs, Tibesku

In Münster:

Arolt, Böcker, Brinkmann, Brug, Domschke, Friedrich, Harms, Hengst, Heese, Joos, Karch, Keil, Kleinheinz, Marschall, Pera, Piffko, Ringelstein, Schmitz, Senninger, Stoll, Szuwart, Winkelmann, van Aken

In Bochum:

Dermietzel, Eysel, Faustmann, Meller, Muhr, von Düring

In Essen:

Heusch, Peters, Stuschke

13 Ehrenwörtliche Erklärung

14 Anhang

14.1 Histologische Befunde

Bereich Gelenkknorpel (in Anlehnung an den Mankin-Score)

Kontrollgruppe

Probe	Struktur	Zelle	Tidemark	Gesamt	Fissur
Schaf 1 medial, rechts	3	2	1	6	5
Schaf 1 medial, links	1	2	1	4	5
Schaf 1 lateral, rechts	1	2	1	4	5
Schaf 1 lateral, links	1	2	1	4	2
Schaf 7 medial, rechts	1	2	0	3	5
Schaf 7 medial, links	1	2	1	4	4
Schaf 7 lateral, rechts	0	2	2	4	5
Schaf 7 lateral, links	1	2	1	4	4
Schaf 8 medial, rechts	1	2	1	4	4
Schaf 8 medial, links	1	2	1	4	5
Schaf 8 lateral, rechts	1	3	2	6	5
Schaf 8 lateral, links	1	2	1	4	5
Schaf 2 medial, rechts	3	3	2	8	5
Schaf 2 medial, links	1	2	1	4	5
Schaf 2 lateral, rechts	2	3	2	7	5
Schaf 2 lateral, links	1	3	1	5	5
Gesamt	20	36	19	75	74

Bereich Gelenknorpel (in Anlehnung an den Mankin-Score)
HGF-Gruppe

Probe	Struktur	Zelle	Tidemark	Gesamt	Fissur
Schaf 3 medial, rechts	4	2	0	6	5
Schaf 3 medial, links	1	0	0	1	5
Schaf 3 lateral, rechts	2	2	2	6	4
Schaf 3 lateral, links	0	2	1	3	5
Schaf 4 medial, rechts	1	2	1	4	5
Schaf 4 medial, links	1	2	1	4	5
Schaf 4 lateral, rechts	1	2	1	4	3
Schaf 4 lateral, links	0	2	1	3	5
Schaf 5 medial, rechts	4	2	0	6	5
Schaf 5 medial, links	3	2	2	7	5
Schaf 5 lateral, rechts	1	2	2	5	5
Schaf 5 lateral, links	0	2	1	3	3
Schaf 6 medial, rechts	1	2	1	4	3
Schaf 6 medial, links	1	2	0	3	5
Schaf 6 lateral, rechts	1	3	0	4	5
Schaf 6 lateral, links	0	2	0	2	4
Gesamt	21	31	13	65	72

Bereich Transplantatknorpel (in Anlehnung an den Mankin-Score)

Kontrollgruppe

Probe	Struktur	Zelle	Tidemark	Gesamt	Fissur
Schaf 1 medial, rechts	4	2	1	7	5
Schaf 1 medial, links	1	2	1	4	5
Schaf 1 lateral, rechts	3	2	1	6	5
Schaf 1 lateral, links	3	2	2	7	2
Schaf 7 medial, rechts	3	2	2	7	5
Schaf 7 medial, links	1	2	1	4	4
Schaf 7 lateral, rechts	1	2	2	5	5
Schaf 7 lateral, links	1	2	1	4	4
Schaf 8 medial, rechts	4	2	2	8	4
Schaf 8 medial, links	3	2	2	7	5
Schaf 8 lateral, rechts	4	3	2	9	5
Schaf 8 lateral, links	6	2	2	10	5
Schaf 2 medial, rechts	6	3	2	11	5
Schaf 2 medial, links	4	2	2	8	5
Schaf 2 lateral, rechts	6	3	2	11	5
Schaf 2 lateral, links	1	3	2	6	5
Gesamt	51	36	27	114	74

Bereich Transplantatknorpel (in Anlehnung an den Mankin-Score)

HGF-Gruppe

Probe	Struktur	Zelle	Tidemark	Gesamt	Fissur
Schaf 3 medial, rechts	3	2	2	7	5
Schaf 3 medial, links	1	2	2	5	5
Schaf 3 lateral, rechts	2	2	2	6	4
Schaf 3 lateral, links	1	2	2	5	5
Schaf 4 medial, rechts	1	2	1	4	5
Schaf 4 medial, links	4	2	1	7	5
Schaf 4 lateral, rechts	3	2	1	6	3
Schaf 4 lateral, links	4	2	1	7	5
Schaf 5 medial, rechts	2	2	0	4	5
Schaf 5 medial, links	6	2	2	10	5
Schaf 5 lateral, rechts	4	2	2	8	5
Schaf 5 lateral, links	1	2	1	4	3
Schaf 6 medial, rechts	3	2	2	7	3
Schaf 6 medial, links	1	2	2	5	5
Schaf 6 lateral, rechts	1	2	1	4	5
Schaf 6 lateral, links	1	2	0	3	4
Gesamt	38	32	22	92	72

14.2 Tierversuchsgenehmigung



Durchschrift

Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Prof. Dr. W. Winkelmann
Klinik und Poliklinik
für Allgemeine Orthopädie der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Straße 33

48129 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 12/2000)

6. April 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 26.01.2000, hier eingegangen am
27.01.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Winkelmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

Untersuchung des Einflusses von Wachstumshormonen auf die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels am Übergang zwischen transplantiertem und originärem Knorpel nach Implantation eines autologen Knorpel-Knochen-Transplantats in einem Tiermodell am Beispiel des Kniegelenkes des Schafes.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. W. Winkelmann
Klinik und Poliklinik
für Allgemeine Orthopädie der
Westf. Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Straße 33

48129 Münster

Frau
Dr. med. Susanne Fuchs
Klinik und Poliklinik
für Allgemeine Orthopädie der
Westf. Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Straße 33

48129 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum **30. 04. 2002.**

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

10 Schafe.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

gez.

Dr. Piontkowski