

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthrosecforschung  
Universität des Saarlandes  
Zentrum für Experimentelle Orthopädie  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Madry

**Kleine Ahlendurchmesser verbessern die  
Knorpelreparatur nach Mikrofrakturbehandlung *in vivo* –  
Eine Studie im Großtiermodell**

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

2024

vorgelegt von Julia Dominique Stölmár, geb. Duffner  
geboren am 31. Mai 1987 in Mannheim-Neckarau

Meinem Mann György sei diese Dissertation von ganzem Herzen gewidmet.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Markraumeröffnende Verfahren wie die arthroskopische Mikrofrakturierung mittels Ahlen sind klinisch etablierte Techniken zur Behandlung symptomatischer, kleinflächiger Knorpeldefekte. Interessanterweise ist die Frage nach der Auswirkung des Ahlendurchmessers auf die Knorpelreparatur weiterhin ungeklärt.

**Hypothese:** Die Anwendung kleiner Ahlendurchmesser verbessert im Vergleich zu großen Ahlendurchmessern die Reparatur von vollschichtigen Knorpeldefekten im translationalen Großtiermodell.

**Methoden:** In der Hauptbelastungszone medialer Femurkondylen von 16 adulten, weiblichen Merinoschafen wurden 24 standardisierte, vollschichtige, rechteckige Knorpeldefekte (4 x 8 mm) erzeugt. Alle Defekte wurden zunächst durch ein Débridement zur kompletten Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht behandelt. Insgesamt 16 Defekte wurden zusätzlich einer standardisierten Mikrofrakturierung (sechs Mikrofrakturlöcher pro Defekt; Tiefe 5,0 mm) mit Ahlen zwei verschiedener Durchmesser unterzogen. In Gruppe 1 (n = 8 Defekte) wurde eine Mikrofrakturierungsahe von 1,0 mm Durchmesser, in Gruppe 2 (n = 8 Defekte) eine Ahle von 1,2 mm Durchmesser verwendet. Gruppe 3 stellte die Kontrollgruppe mit ausschließlich débridierten Defekten (n = 8) dar. Nach sechs Monaten postoperativ unter Vollbelastung wurde die Knorpelreparatur anhand etablierter Bewertungssysteme makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch (Typ-I- und Typ-II-Kollagen) und biochemisch (DNS- und Proteoglykangehalt) analysiert. Die Mikrostruktur des subchondralen Knochens sowie die Bildung subchondraler Knochenzysten und intraläsionaler Osteophyten wurde durch hochauflösende Mikrofokus-Computertomographie (Mikro-CT) bestimmt. Ebenfalls erfolgte die Evaluation von degenerativen Veränderungen der an den Defekt angrenzenden perifokalen osteochondralen Einheit (makroskopisch, histologisch, biochemisch, Mikro-CT).

**Ergebnisse:** Beide Mikrofrakturgruppen wiesen gegenüber der Kontrollgruppe eine histologisch signifikant bessere Knorpelreparatur auf. Unterschiedliche Ahlendurchmesser hatten keinen Effekt auf makroskopische Knorpelreparatur, DNS- und Proteoglykangehalt, den Gehalt an Typ-I- und Typ-II-Kollagen sowie perifokale Degeneration. Die Verwendung des kleinen Ahlendurchmessers (1,0 mm) resultierte in einer signifikanten Verbesserung der semiquantitativ analysierten histologischen Gesamtqualität des Reparaturknorpels ( $7,0 \pm 0,7$  vs.  $9,0 \pm 0,7$ ;  $P = 0,008$ ) und seiner Oberflächenbeschaffenheit ( $1,0 \pm 0,3$  vs.  $2,1 \pm 0,2$ ;  $P = 0,01$ ) im

Gegensatz zu Ahlen größeren Durchmessers (1,2 mm). Innerhalb der subartikulären Spongiosa führte ein kleiner Ahlendurchmesser zu einer Verringerung des relativen Knochenvolumens (BV/TV;  $23,8\% \pm 3,4\%$  vs.  $30,6\% \pm 2,5\%$ ;  $P = 0,01$ ). Subchondrale Knochenzysten ( $P = 0,128$ ) und intraläsionale Osteophyten ( $P = 0,269$ ) fanden sich häufiger nach Mikrofrakturierung als nach Débridement.

**Schlussfolgerung:** Kleine Ahlendurchmesser verbessern signifikant die histologische Gesamtqualität des knorpeligen Reparaturgewebes im Vergleich zu Ahlen größeren Durchmessers in der Behandlung von vollschichtigen Knorpeldefekten nach sechs Monaten im translationalen Großtiermodell.

## Abstract

**Background:** Microfracture is the most applied arthroscopic marrow stimulation procedure to treat symptomatic, small chondral defects. Interestingly, the effect of the microfracture awl diameter on articular cartilage repair remains unknown.

**Hypothesis:** Articular cartilage repair is improved when the subchondral bone is perforated by small-diameter microfracture awls compared with larger awls.<sup>12</sup>

**Methods:** Standardized rectangular (4 x 8 mm) full-thickness chondral defects (n = 24) were created in the weightbearing area of the medial femoral condyle in 16 adult sheep and debrided down to the subchondral bone plate.<sup>12</sup> Three treatment groups (n = 8 defects each) were tested: six microfracture perforations using small-diameter awls (1,0 mm; group 1), large-diameter awls (1,2 mm; group 2), or without perforations (debridement control; group 3).<sup>12</sup> Osteochondral repair was assessed at six months *in vivo* using established histological, macroscopic, immunohistochemical (type-I and -II collagen), biochemical (DNA and proteoglycan content), and micro-computed tomography (Micro-CT) analyses.<sup>12</sup> Subchondral bone cysts, intralesional osteophytes and perifocal degenerative changes in the adjacent cartilage were also evaluated.

**Results:** Compared with control defects, histological cartilage repair was always improved following both microfracture techniques.<sup>12</sup> Different awl diameters did not result in significant differences in macroscopic cartilage repair, DNA and proteoglycan content, type-I and -II collagen content and perifocal degenerative changes. Application of 1,0-mm microfracture awls led to a significantly improved histological overall repair tissue quality ( $7,0 \pm 0,7$  vs.  $9,0 \pm 0,7$ ;  $P = 0,008$ ) and surface grading ( $1,0 \pm 0,3$  vs.  $2,1 \pm 0,2$ ;  $P = 0,01$ ) compared with larger awls. Within the subarticular spongiosa, small-diameter awls led to a reduction of the relative bone volume (bone volume/tissue volume ratio:  $23,8\% \pm 3,4\%$  vs  $30,6\% \pm 2,5\%$ ;  $P = 0,01$ ).<sup>12</sup> Subchondral bone cysts ( $P = 0,128$ ) and intralesional osteophytes ( $P = 0,269$ ) were found more frequently after microfracture treatment than after debridement.<sup>12</sup>

**Conclusion:** Small-diameter microfracture awls improve articular cartilage repair after six months in a translational sheep model more effectively than larger awls.<sup>12</sup>

---

# Inhaltsverzeichnis

|  | Seite |
|--|-------|
| Zusammenfassung  | 1     |
| Abstract   | 3     |
| Inhaltsverzeichnis   | 4     |
| Abkürzungsverzeichnis  | 7     |
| Tabellenverzeichnis  | 9     |
| Abbildungsverzeichnis  | 10    |
| 1. Einleitung  | 11    |
| 1.1. Problematik und Überblick   | 11    |
| 1.2. Biologische Grundlagen des hyalinen Gelenkknorpels                  | 12    |
| 1.3. Gelenkknorpelaufbau   | 13    |
| 1.4. Die osteochondrale Einheit  | 15    |
| 1.5. Einteilung von Knorpeldefekten                                      | 16    |
| 1.6. Operative Therapiestrategien bei fokalen Knorpeldefekten            | 17    |
| 1.7. Markraumeröffnende Verfahren  | 18    |
| 1.7.1. Subchondrale Anbohrung (Pridie-Bohrung)                           | 19    |
| 1.7.2. Abrasionsarthroplastik  | 19    |
| 1.7.3. Mikrofrakturbehandlung  | 20    |
| 1.8. Experimentelle und klinische Ergebnisse nach Mikrofrakturbehandlung | 21    |
| 1.9. Konzept der vorliegenden Arbeit                                     | 22    |
| 2. Hypothese   | 24    |
| 3. Studiendesign   | 25    |
| 4. Material  | 27    |
| 4.1. Lösungen, Puffer, Medien  | 27    |
| 4.2. Chemikalien   | 28    |
| 4.3. Antikörper  | 30    |
| 4.4. Enzyme  | 30    |
| 4.5. Tierstämme  | 30    |
| 4.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien                                    | 30    |
| 4.6.1. Geräte  | 30    |
| 4.6.2. Computerprogramme   | 32    |
| 4.6.3. Operationsinstrumente und –materialien                            | 32    |
| 4.6.4. Verbrauchsmaterialien   | 32    |

---

|   |    |
|---|----|
| 5. Methoden   | 33 |
| 5.1. Großtiermodell   | 33 |
| 5.2. Anästhesie und Operation   | 33 |
| 5.3. Postoperative Behandlung   | 36 |
| 5.4. Makroskopische Analyse   | 38 |
| 5.5. Tusche-Färbung   | 39 |
| 5.6. Mikro-Computertomographie  | 41 |
| 5.6.1. Mikro-CT-Darstellung   | 41 |
| 5.6.2. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten                              | 41 |
| 5.6.3. Standardisierte Definition der <i>volumes of interest</i>                              | 42 |
| 5.6.4. Mikro-CT-Parameter   | 43 |
| 5.7. Histologische Analysen   | 44 |
| 5.7.1. Lagerung und Entkalkung  | 44 |
| 5.7.2. Entwässerung und Einbetten   | 44 |
| 5.7.3. Schneiden  | 44 |
| 5.7.4. Safranin-O/Echtgrün-Färbung  | 44 |
| 5.7.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung  | 45 |
| 5.7.6. Evaluation   | 46 |
| 5.7.6.1. Semiquantitative Evaluation des Reparaturgewebes                                     | 46 |
| 5.7.6.2. Semiquantitative Evaluation degenerativer Veränderungen des<br>angrenzenden Knorpels | 47 |
| 5.7.6.3. Evaluation eines <i>post mortem</i> Débridement                                      | 49 |
| 5.8. Biochemische Analysen  | 50 |
| 5.8.1. Papain-Verdau  | 50 |
| 5.8.2. DNS-Bestimmung (Hoechst 33258-Test)  | 50 |
| 5.8.3. Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)  | 52 |
| 5.8.4. Proteingehalt-Bestimmung ( <i>bicinchoninic acid protein-test</i> ; BCA-Test)          | 53 |
| 5.9. Immunhistochemische Analyse  | 54 |
| 5.9.1. Typ-I- und Typ-II-Kollagen   | 54 |
| 5.9.2. Semiquantitative Analyse der Immunreaktion von Typ-I- und Typ-II-Kollagen              | 55 |
| 5.10. Statistische Analysen   | 57 |
| 6. Ergebnisse   | 58 |
| 6.1. Reparatur des Gelenkknorpels   | 58 |
| 6.1.1. Makroskopische Bewertung   | 58 |
| 6.1.2. Mikroskopische Bewertung   | 59 |
| 6.1.3. Bewertung des Débridement <i>post mortem</i>   | 59 |

---

|   |    |
|---|----|
| 6.1.4. Immunhistochemischer Nachweis von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe     | 60 |
| 6.1.5. Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe      | 61 |
| 6.1.6. Biochemische Analyse des Knorpelreparaturgewebes                         | 61 |
| 6.2. Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels                 | 63 |
| 6.2.1. Tuschefärbung  | 63 |
| 6.2.2. Mikroskopische Bewertung des angrenzenden Knorpels                       | 63 |
| 6.2.3. Biochemische Analyse des angrenzenden Knorpels                           | 64 |
| 6.3. Reparatur des subchondralen Knochens                                       | 65 |
| 6.3.1. Strukturelle Mikro-CT-Parameter  | 65 |
| 6.3.1.1. Subchondrale Knochenlamelle der Defektzone                             | 65 |
| 6.3.1.2. Angrenzende subchondrale Knochenlamelle                                | 65 |
| 6.3.1.3. Subartikuläre Spongiosa der Defektzone                                 | 65 |
| 6.3.1.4. Angrenzende subartikuläre Spongiosa                                    | 66 |
| 6.3.2. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten der Defektzone | 67 |
| 7. Diskussion   | 69 |
| 7.1. Einführung   | 69 |
| 7.2. Reparatur des Gelenkknorpels   | 70 |
| 7.3. Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels                 | 74 |
| 7.4. Reparatur des subchondralen Knochens                                       | 75 |
| 7.4.1. Subchondrale Knochenlamelle der Defektzone                               | 75 |
| 7.4.2. Angrenzende subchondrale Knochenlamelle                                  | 76 |
| 7.4.3. Subartikuläre Spongiosa der Defektzone                                   | 77 |
| 7.4.4. Angrenzende subartikuläre Spongiosa                                      | 79 |
| 7.4.5. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten                | 79 |
| 7.5. Limitierungen und Stärken der vorliegenden Arbeit                          | 81 |
| 7.6. Klinischer Ausblick  | 82 |
| 7.7. Schlussfolgerung   | 82 |
| Referenzen  | 84 |
| 8. Publikationen und Vorträge   | 95 |
| 8.1. Publikation  | 95 |
| 8.2. Posterpräsentation   | 95 |
| 8.3. Vorträge   | 95 |
| Danksagung  | 96 |
| Lebenslauf  | 97 |

---

## Abkürzungsverzeichnis

|               |  |
|---------------|--|
| 3D            | dreidimensional  |
| °C            | Grad Celsius   |
| ABC           | <i>avidin-biotin-peroxidase complex</i>                                      |
| ACT           | autologe Chondrozyten-Transplantation  |
| BCA           | <i>bicin-choninic acid</i>   |
| BMD           | Knochenmineraldichte ( <i>bone mineral density</i> )                         |
| BSA           | Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )                           |
| BS/BV         | Knochenoberfläche/Volumen ( <i>bone surface/volume</i> )                     |
| BS/TV         | Knochenoberflächendichte ( <i>bone surface density</i> )                     |
| BV/TV         | Knochenvolumenanteil ( <i>bone volume fraction</i> )                         |
| bzw.          | beziehungsweise  |
| Ct.Th         | kortikale Dicke ( <i>cortical thickness</i> )                                |
| DA            | Grad der Anisotropie   |
| DAB           | 3-3'-Diaminobenzidin   |
| DMMB          | 1,9-Dimethylmethylenblau   |
| DNS           | Desoxyribonukleinsäure   |
| <i>et al.</i> | <i>et alii/ et aliae</i>   |
| FD            | Fraktale Dimension ( <i>fractal dimension</i> )                              |
| g             | Gramm  |
| h             | Stunde   |
| ICRS          | <i>International Cartilage Regeneration &amp; Joint Preservation Society</i> |
| KG            | Körpergewicht  |
| kg            | Kilogramm  |
| mg            | Mikrogramm   |
| Min.          | Minute   |
| mM            | Millimol   |
| mm            | Millimeter   |
| µl            | Mikroliter   |
| ml            | Milliliter   |
| Mikro-CT      | Mikrofokus-Computertomographie   |
| MRT           | Magnetresonanztomographie  |
| n             | Anzahl   |
| n.a.          | nicht ausgewertet  |
| n.e.          | nicht evaluiert  |

---

|       |  |
|-------|--|
| NIH   | <i>National Institutes of Health</i>                                       |
| PBE   | <i>phospate-buffered EDTA</i>  |
| PBS   | Phosphat-gepufferte Salzlösung   |
| pg    | Pikogramm  |
| ROI   | Region von Interesse ( <i>region of interest</i> )                         |
| SKA   | angrenzende subchondrale Knochenlamelle                                    |
| SKD   | Knochenlamelle der Defektzone  |
| SMI   | <i>structure model index</i>   |
| SSA   | angrenzende subartikuläre Spongiosa  |
| SSD   | perforierte subartikuläre Spongiosa  |
| Tb.N  | Trabekelanzahl ( <i>trabecular number</i> )                                |
| Tb.Pf | trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor ( <i>trabecular pattern factor</i> ) |
| Tb.Sp | Trabekelabstand ( <i>trabecular separation</i> )                           |
| Tb.Th | Trabekeldicke ( <i>trabecular thickness</i> )                              |
| TNE   | Tris-Natrium EDTA  |
| VOI   | Volumen von Interesse ( <i>volume of interest</i> )                        |
| W     | Watt   |
| z.B.  | zum Beispiel   |

---

## Tabellenverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| Tabelle 1: Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen, Puffer und Medien.  | 27    |
| Tabelle 2: Chemikalien.   | 28    |
| Tabelle 3: Antikörper.  | 30    |
| Tabelle 4: Laborgeräte.   | 30    |
| Tabelle 5: Makroskopisches Bewertungssystem zur Beurteilung des Knorpelreparaturgewebes.  | 38    |
| Tabelle 6: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung des Knorpelreparaturgewebes.   | 47    |
| Tabelle 7: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung des angrenzenden Knorpelgewebes.   | 48    |
| Tabelle 8: Prinzip zur Herstellung der Standardreihe im Hoechst-Test.   | 51    |
| Tabelle 9: Prinzip zur Herstellung der Standardreihe im DMMB-Test.  | 53    |
| Tabelle 10: Prinzip zur Herstellung der Standardreihe im BCA-Test.  | 54    |
| Tabelle 11: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktion von Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Vergleich zur internen Positivkontrolle. | 56    |
| Tabelle 12: Ergebnisse der histologischen Bewertung des Knorpelreparaturgewebes.  | 59    |
| Tabelle 13: Ergebnisse der biochemischen Analyse von Reparatur- und angrenzendem Gelenkknorpel.   | 62    |
| Tabelle 14: Ergebnisse der mikroskopischen Begutachtung der degenerativen Veränderungen des angrenzenden Knorpels.                        | 64    |
| Tabelle 15: Ergebnisse der Mikro-CT-Parameter aus subchondraler Knochenlamelle und subartikulärer Spongiosa.                              | 66    |
| Tabelle 16: Vergleichende und deskriptive Darstellung der Analyse subchondraler Knochenzysten und intraläsionaler Osteophyten.            | 68    |

---

## Abbildungsverzeichnis

|  | Seite |
|--|-------|
| Abbildung 1: Klassifikation von Knorpeldefekten und Einteilung der Knorpelzonen.   | 13    |
| Abbildung 2: Schematische Zeichnung der osteochondralen Einheit.   | 16    |
| Abbildung 3: Maßstabgetreue Darstellung des Defektareals und der Mikrofrakturbehandlungen.   | 26    |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mini-Arthrotomie am rechten Kniegelenk.  | 34    |
| Abbildung 5: Intraoperative Fotodokumentation der Eröffnung eines Kniegelenkes und Durchführung der Mikrofrakturbehandlung im Schafmodell. | 35    |
| Abbildung 6: Übersicht der angewandten Methoden.   | 37    |
| Abbildung 7: Tusche-Färbung der angrenzenden Knorpeloberfläche.  | 40    |
| Abbildung 8: Subchondrale Knochenzyste und intraläsionaler Osteophyt.  | 42    |
| Abbildung 9: <i>Region of interest</i> einer medialen Femurkondyle.  | 43    |
| Abbildung 10: Histologische Färbungen des Defektbereiches einer medialen Femurkondyle.   | 46    |
| Abbildung 11: Safranin-O/Echtgrün-Färbung des angrenzenden Knorpelgewebes einer medialen Femurkondyle.                                     | 49    |
| Abbildung 12: Beispiel einer Kalibrierungsgerade des Hoechst-Tests.  | 52    |
| Abbildung 13: Makroskopische Begutachtung der Knorpelreparatur.  | 58    |
| Abbildung 14: Safranin-O/Echtgrün-Färbung des Defektbereiches einer juvenilen und einer adulten Schaf-Trochlea <i>post mortem</i> .        | 60    |
| Abbildung 15: Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe.   | 60    |
| Abbildung 16: Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe.  | 61    |
| Abbildung 17: Tuschefärbung der angrenzenden Knorpeloberfläche.  | 55    |

# 1. Einleitung

## 1.1. Problematik und Überblick

Hyaliner Knorpel ist für eine physiologische Gelenkfunktion unerlässlich<sup>1,2</sup> und besitzt nach Schädigung nur eine eingeschränkte Heilungsfähigkeit.<sup>3,4,5</sup> Gelenkknorpeldefekte entstehen infolge eines Traumas, einer primären Arthrose oder als Folge einer Erkrankung des subchondralen Knochens, wie zum Beispiel der Osteochondrosis dissecans oder der Osteonekrose.<sup>1,6,7</sup> Unbehandelt können diese Erkrankungen in eine sekundäre Arthrose münden.<sup>6,8,9</sup> In einer prospektiven Studie von Hjelle *et al.*<sup>9</sup> wurden in 1000 Kniegelenksarthroskopien 606 Knorpelschäden gefunden. Dies belegt die hohe Inzidenz von Erkrankungen des Gelenkknorpels. Arthrose ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung<sup>10</sup> und ungefähr eine Millionen Menschen sind jedes Jahr allein in den USA von Gelenkknorpeldefekten betroffen.<sup>11,12</sup> Bei Athleten treten sie im Vergleich zur Normalbevölkerung häufiger auf und führen zwölf Mal häufiger zu Arthrose.<sup>13</sup> Posttraumatische Läsionen sind häufig mit körperlichen Einschränkungen wie Gelenkschmerzen, -blockierungen und Bewegungseinschränkung assoziiert.<sup>4</sup> Ein ideales Therapieverfahren, welches ein dem hyalinen Knorpel identisches Regenerationsgewebe schafft und der biomechanischen Belastung auf Dauer standhalten kann, existiert jedoch bis heute nicht.<sup>14</sup> Die meisten Therapieoptionen resultieren in einem faserknorpeligen Reparaturgewebe, welches im Lauf der Zeit degeneriert.<sup>6</sup>

Die Mikrofrakturbehandlung gehört zu den markraumeröffnenden Verfahren<sup>6</sup> und ist eine etablierte rekonstruktiv-chirurgische Technik<sup>1</sup> zur Behandlung kleinflächiger und vollschichtiger Knorpeldefekte im Kniegelenk.<sup>15,16</sup> Hierbei wird der subchondrale Knochen mit einer Mikrofrakturahle<sup>17</sup> penetriert, bis Blutungen aus dem Knochenmarkraum austreten.<sup>6</sup> Im Defektareal entsteht ein Blutgerinnsel<sup>17</sup> und einwandernde pluripotente mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark bilden ein faserknorpeliges Reparaturgewebe, das reich an Typ-I-Kollagen<sup>6</sup> ist. Kurz- und mittelfristigen Nachbeobachtungsstudien an Patienten<sup>5,18,19,20,21</sup> belegen eine signifikante Verbesserung der Kniegelenksfunktion 1,5 bis zwei Jahre postoperativ nach Durchführung einer Mikrofrakturbehandlung im Kniegelenk.<sup>11,19,20,22,23,24,25,26</sup> In einer Langzeitstudie von Gobbi *et al.*<sup>23</sup> stellten sich junges Patientenalter und eine kleine Defektgröße (< 2-3 cm<sup>2</sup>)<sup>1,16,24</sup> als günstige klinische Prognosefaktoren heraus.

Die Frage nach der Auswirkung des Ahlendurchmessers auf die Knorpelreparatur ist bis heute ungeklärt. Allerdings ist bekannt, dass die Verwendung größerer Mikrofrakturierungs-Ahlen im

Kaninchenmodell zu einer erhöhten Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark führt.<sup>27</sup> Eine Studie im präklinischen Schafmodell belegte jedoch eine signifikant verbesserte Knorpelreparatur und subchondrale Mikroarchitektur von vollschichtigen Knorpeldefekten in der Femurotrochlea nach Anwendung kleinerer Bohrlochdurchmesser.<sup>28</sup> Um die Rolle des Ahlendurchmessers auf die Knorpelreparatur weiter zu klären, war der Vergleich von zwei unterschiedlichen Ahlengrößen in Femurkondylen adulter Merinoschafe Gegenstand der vorliegenden Studie.<sup>12</sup> Grundlage war die Hypothese, dass in der Behandlung kleinflächiger Knorpeldefekte die Anwendung kleinerer Ahlendurchmesser (1,0 mm) zu einer verbesserten Knorpelreparatur im Gegensatz zur Verwendung größerer Ahlendurchmesser (1,2 mm) führt. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen der Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zu alleinigem Defektdébridement analysiert.<sup>12</sup> Um einen möglichen Effekt der Behandlung auf die Entstehung einer beginnenden perifokalen Arthrose festzustellen, wurde die direkt an den Defekt angrenzende osteochondrale Einheit untersucht.

## 1.2. Biologische Grundlagen des hyalinen Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel entwickelt sich aus mesenchymalem Bindegewebe.<sup>29,30</sup> Der adulte Gelenkknorpel ist ein bradytrophes, gefäß-, nerven- und lymphgefäßfreies Gewebe.<sup>29,30</sup> Im Gegensatz zum hyalinen Knorpel des Nasenseptums und Knorpelspangen der Atemwege besitzt der Gelenkknorpel kein Perichondrium, welches für die Ernährung und Regeneration zuständig ist.<sup>30</sup> Gelenkknorpel muss daher über die Gelenkflüssigkeit (Synoviaflüssigkeit) ernährt werden und kann nicht spontan regenerieren.<sup>29</sup>

Chondroblasten und Chondrozyten sind die spezifischen Zellen des Knorpelgewebes und erhalten ihre Nährstoffe über Diffusion mit der Synoviaflüssigkeit<sup>29,30</sup> und durch Gefäße des subchondralen Knochens.<sup>31,32</sup> Im erwachsenen Gelenkknorpel stellen Knorpelzellen weniger als 10% des Totalvolumens.<sup>29</sup> Chondroblasten produzieren die sie umgebende extrazelluläre Matrix, wohingegen Chondrozyten für deren Umbau und Erhalt verantwortlich sind.<sup>30</sup>

Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels besteht zu 60-80% aus Wasser.<sup>29,30</sup> Die restlichen Hauptbestandteile werden durch Kollagenfasern des Typ-II (45%), Hyaluron und dem mit ihm verbundenen Proteoglykan Aggrecan (35%) und Glykosaminoglykanen (20%) gestellt.<sup>29,30</sup> Zusätzlich sind in der extrazellulären Matrix Kollagenfasern der Typen V, VI, IX<sup>30</sup>, X<sup>30</sup>, XI<sup>30</sup>, XIV und weitere Proteoglykane, wie Decorin und Fibromodulin, zu finden. Diese die-

nen der Stabilisierung und Organisation des Kollagen-II Fasernetzwerkes.<sup>2,33,34,35</sup> Typ-I-Kollagen stellt einen Indikator für fibrocartilaginär Reparaturknorpel dar.<sup>36</sup> Aufgrund der arkadenförmigen Anordnung von Kollagenfibrillen und dem hohen Wasseranteil in der extrazellulären Matrix<sup>30</sup> ergeben sich die besonderen Funktionen des Gelenkknorpels. Dazu zählen die gleichmäßige Verteilung der Scherkräfte über die Gelenkfläche und auf den subchondralen Knochen, die Stoßdämpfung sowie die Druckelastizität.<sup>29,30</sup>

### 1.3. Gelenkknorpelaufbau

Morphologisch wird der Gelenkknorpel in vier Zonen eingeteilt (Abbildung 1).<sup>29</sup> Die extrazelluläre Matrix der einzelnen Zonen unterscheidet sich in der Wasser-, Proteoglykan- und Kollagenkonzentration. Die Chondrozyten variieren sowohl in ihrer Morphologie und Ausrichtung zur Oberfläche, als auch in ihrer metabolischen Aktivität.<sup>2</sup>

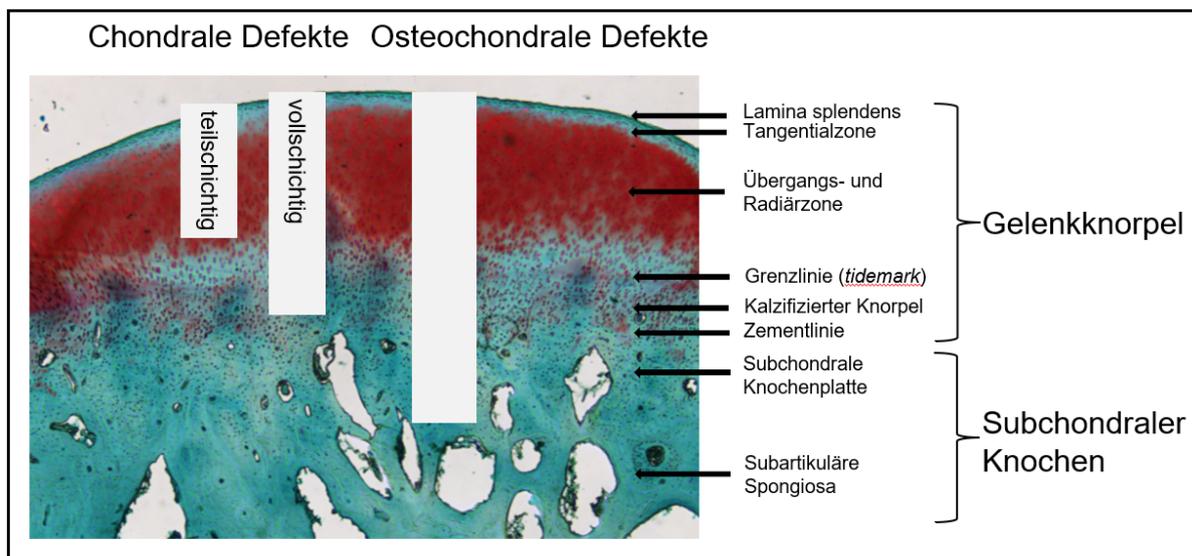


Abbildung 1: Klassifikation von Knorpeldefekten und Einteilung der Knorpelzonen. Histologischer Schnitt eines Safranin-O/Echtgrün gefärbten Präparates der medialen Femurkondyle eines Merinoschafes (20-fache Vergrößerung). Die Übergangs- und Radiärzone sind auf diesem Schnitt makroskopisch nicht voneinander abgrenzbar. Die Knorpelmatrix ist in Rot und der subchondrale Knochen in Grün dargestellt.

Die oberflächliche Tangentialzone (Zone I) ist die dünnste Schicht des Gelenkknorpels (10-20%), bildet die Gelenkoberfläche und zeichnet sich durch den horizontalen Verlauf der Kollagenfibrillen aus.<sup>29</sup> Apikal wird sie durch die *Lamina splendens* begrenzt,<sup>2,37</sup> welche als selektive Begrenzung bezüglich der trophischen Versorgung der Chondrozyten dient und zellfrei ist.<sup>38,39</sup> Die Chondrozyten liegen hier als flache, spindelförmige Zellen vor,<sup>30,40,41,42</sup> deren lange Achse parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist.<sup>2</sup> Die Konzentration an Kollagenfibrillen und

Wasser ist hoch, die Konzentration an Proteoglykanen hingegen im Vergleich zu den anderen Zonen am niedrigsten.<sup>2,29,30,42</sup> Aufgrund der parallelen Ausrichtung der Kollagenfibrillen zeichnet sich die oberflächliche Zone durch Widerstandsfähigkeit und Festigkeit aus und kann Scherkräften während der Gelenkbewegung standhalten.<sup>2,43</sup>

Die Übergangzone (Zone II) stellt die Verbindung zur unmineralisierten Radiärzone des Gelenkknorpels dar.<sup>29</sup> Die Chondrozyten liegen hier als ellipsenförmige Zellen vor,<sup>2</sup> die einzeln oder in Paaren angeordnet sind<sup>30,41</sup> und eine höhere Konzentration an synthetisch aktiven Zellorganellen aufweisen.<sup>2</sup> Die Konzentration an Proteoglykanen ist dadurch höher als in der ersten Zone.<sup>29,42</sup> Der Anteil von Wasser und Kollagenfibrillen an der extrazellulären Matrix ist hingegen vermindert.<sup>2</sup> Der Durchmesser der Fibrillen ist dicker<sup>2</sup> und sie kreuzen sich in ihrem Verlauf.<sup>30,42</sup>

Die Radiärzone (Zone III) ist die breiteste Schicht des hyalinen Gelenkknorpels.<sup>44,45</sup> Die Chondrozyten bilden hier längliche, isogene Zellgruppen<sup>30</sup> von fünf bis acht Zellen<sup>41</sup> und verlaufen wie die Kollagenfibrillen senkrecht zur Oberfläche.<sup>2,29,30,41</sup> Diese Zone enthält die geringste Konzentration an Wasser und den höchsten Gehalt an Proteoglykanen.<sup>2,29</sup> Die Kollagenfibrillen weisen hier den größten Durchmesser auf, ziehen bis in die Grenzlinie (*tidemark*) hinein<sup>2</sup> und sorgen für eine stabile Verbindung zwischen Radiär- und Mineralisationszone (kalzifizierter Knorpel).<sup>46</sup> Die *tidemark* trennt die unmineralisierte Radiärzone von der Mineralisationszone. Sie besteht aus einem hohen Anteil an Calcium, ist ca. 2-5 µm breit,<sup>30</sup> als basophile Linie<sup>44</sup> erkenntlich und ihre Funktion ist noch nicht gänzlich geklärt.<sup>30,44</sup>

In der Mineralisationszone (Zone IV) sind die Kollagenfibrillen verankert.<sup>45</sup> Die Chondrozyten erscheinen hypertroph,<sup>29</sup> besitzen weniger Organellen und haben die geringste metabolische Aktivität.<sup>2</sup> Die umgebende Matrix enthält Calciumphosphatkristalle.<sup>44</sup> Die Zementlinie (*cement line*) trennt die subchondrale Knochenlamelle von der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels.<sup>46</sup> Sie stellt eine Verzahnung zwischen Mineralisationszone und dem subchondralen Knochen sicher.<sup>45</sup> Kollagenfibrillen durchdringen nicht die Zementlinie,<sup>45</sup> kleine Kapillaren und Nerven ragen jedoch aus dem subchondralen Knochen in die kalzifizierte Knorpelschicht hinein.<sup>4,32,45</sup>

## 1.4. Die osteochondrale Einheit

Der hyaline Gelenkknorpel bildet mit dem subchondralen Knochen die osteochondrale Einheit (Abbildung 2).<sup>45,47,48</sup> Der subchondrale Knochen besteht aus der subchondralen Knochenlamelle und der darunter liegenden subartikulären Spongiosa.<sup>46</sup> Die subchondrale Knochenlamelle wird durch die Zementlinie von der kalzifizierten Knorpelschicht getrennt.<sup>46</sup> Kortikale Lamellen, bestehend aus Typ-I-Kollagen, bauen die dünne, aber dichte subchondrale Knochenlamelle auf.<sup>46,47</sup> Die subartikuläre Spongiosa in der Tiefe besteht aus überwiegend senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Trabekeln.<sup>46,47</sup> Ein sägezahnartiger Verlauf charakterisiert den Übergang von Knorpel zu subchondralem Knochen.<sup>49</sup> Dies ist von größter Bedeutung für die Übertragung und Verteilung von Druck-, Zug- und Scherkräften auf den subchondralen Knochen.<sup>46,49,50,51</sup> Dabei übernimmt der subchondrale Knochen 30% der Last und 1-3% werden durch den Gelenkknorpel übernommen.<sup>49</sup> Den restlichen Anteil übernehmen Knochen und Muskulatur.<sup>49,52</sup> Die subchondrale Knochenlamelle hat eine unterstützende Funktion für den Gelenkknorpel, besitzt jedoch die niedrigste Elastizität in der osteochondralen Einheit.<sup>45,49,53</sup>

Um Knorpelreparatur-Therapien sinnvoll zu planen, bedarf es einer gemeinsamen Betrachtung der morphologischen und funktionellen Bestandteile der osteochondralen Einheit.<sup>45</sup> Nur so kann die Physiologie und Pathophysiologie hinter Gelenkerkrankungen besser verstanden werden.<sup>45</sup> Durch Ausbildung von Osteophyten und Zysten, Verdickung und Migration der subchondralen Knochenlamelle nach Mikrofrakturbehandlung, kann es durch Abnahme der relativen Knorpeldicke zu einem Versagen des Knorpelreparaturgewebes kommen.<sup>45,46,54</sup> Durch die enge Verzahnung der osteochondralen Einheit ist die Sklerosierung des subchondralen Knochens eine maßgebliche Ursache für die Ausbildung von Arthrose.<sup>49,53,55</sup>

Innerhalb eines, aber auch zwischen verschiedenen Gelenken variiert die Dicke der subchondralen Knochenlamelle sowie des Gelenkknorpels aufgrund von unterschiedlichen Belastungsverhältnissen.<sup>45,46,56</sup> In konvexen Gelenkanteilen (z.B. Femurkondylen) ist die subchondrale Knochenlamelle dünner als in konkaven Anteilen (z.B. Tibiaplateau), wo eine höhere lokale Druckbeanspruchung vorliegt.<sup>56</sup> Zudem ist die subchondrale Knochenlamelle in zentralen und medialen Gelenkkompartimenten dicker und dichter als in peripheren und lateralen Arealen.<sup>31,46,56,57,58</sup> Entsprechend der oben beschriebenen Belastungsverhältnisse sind unterschiedliche Regionen definierbar, die das Eindringen von Gefäßen aus dem subchondralen Knochen in die knorpelige Mineralisationszone ermöglichen.<sup>31,45,46,49,59</sup> Verzweigte, kanalartige Gefäßverläufe treten an zentralen, stark belasteten Gelenkpartien auf. In peripheren Gelenk-

partien mit dünner subchondraler Mineralisierungszone sind lochartige, ampullenähnlichen Lückenbildungen zu finden.<sup>31,59,60</sup> Die Gefäße dienen der nutritiven Versorgung der subchondralen Knochenlamelle und der tiefen Anteile des Gelenkknorpels.<sup>31</sup> Nach Imhof *et al.*<sup>49</sup> stammen mindestens 50% der benötigten Menge an Glucose, Sauerstoff und Wasser aus den Gefäßen der Subchondralregion.

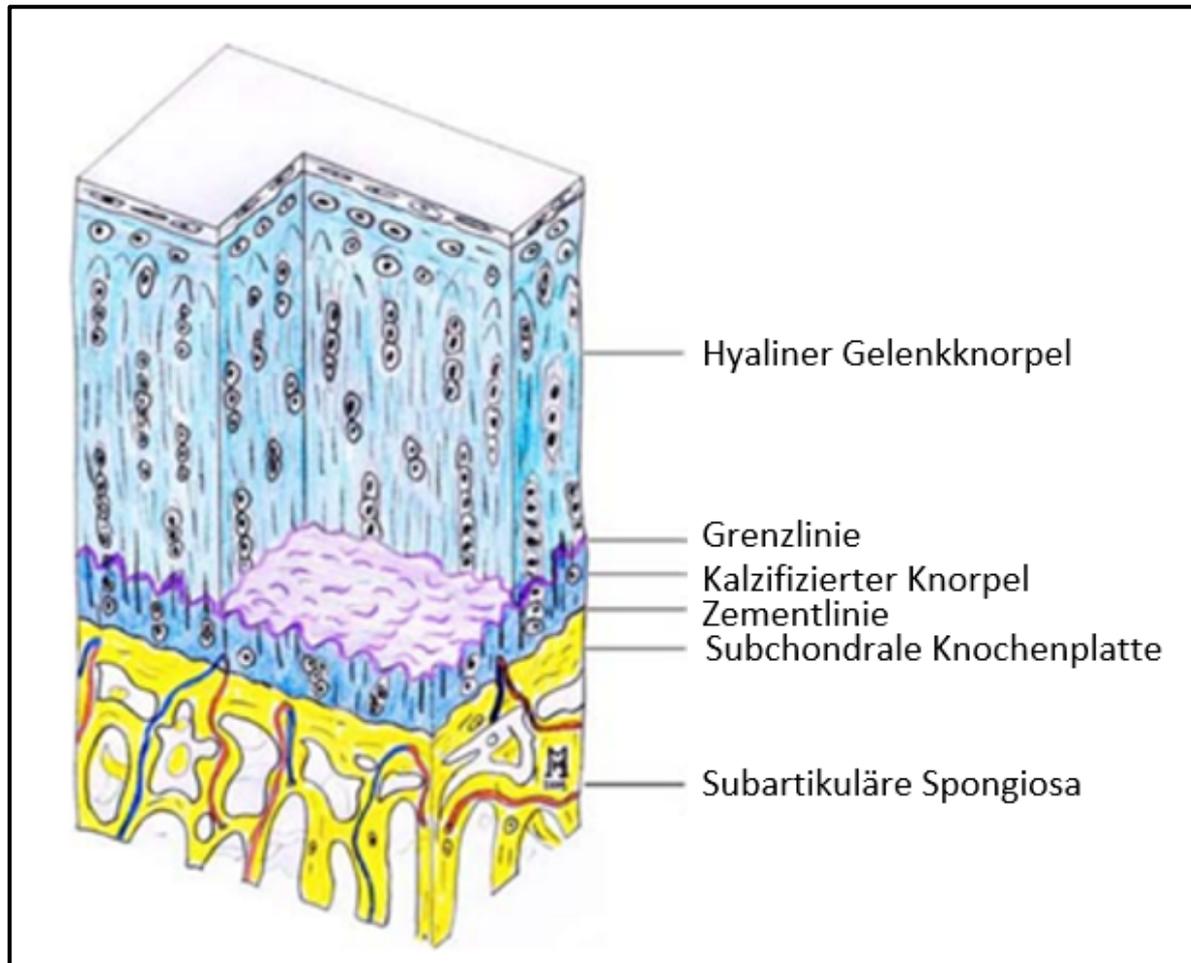


Abbildung 2: Schematische Zeichnung der osteochondralen Einheit. Bildquelle: Madry, H. *et al.*, 2010.

## 1.5. Einteilung von Knorpeldefekten

Knorpeldefekte werden in chondrale und osteochondrale Defekte unterschieden (Abbildung 1).<sup>6,48</sup> Sie können durch Trauma, Osteochondrosis dissecans oder andere lokale und systemische Erkrankungen entstehen<sup>6</sup> und in eine sekundäre Arthrose übergehen.<sup>61</sup> Ein chondraler Defekt ist in seiner Ausdehnungstiefe auf den Gelenkknorpel beschränkt.<sup>6</sup> Man unterscheidet

teil- und vollschichtige Defekte, je nachdem ob die Läsion nur oberflächlich lokalisiert ist oder bis in den kalzifizierten Knorpel reicht (Abbildung 1).<sup>6,48,62</sup>

Diese Einteilung hat klinische Relevanz und ist in den arthroskopischen Klassifikationen nach Noyes und Stabler<sup>63</sup> sowie der *International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society* (ICRS)<sup>64</sup> wiederzufinden. Diese Klassifikationen unterscheiden sich im Vergleich zu jener von Outerbridge<sup>65</sup> durch eine detailliertere Beschreibung der Defekttiefe.

Chondrale Defekte haben keinen Kontakt zum Knochenmark und sind auf mesenchymale Zellen der Synovialmembran (Synoviozyten) angewiesen, die einwandern und den Defekt füllen.<sup>62</sup> Nach Hunziker *et al.*<sup>4</sup> tragen randständige Chondrozyten und Fettgewebstammzellen aus dem Hoffa-Fettgewebkörper teilweise auch zur Defektfüllung bei. In osteochondralen Defekten ist auch der subchondrale Knochen verletzt.<sup>1,6,46,63,66</sup> Durch die daraus resultierende Verbindung zum Knochenmark bildet sich ein Blutgerinnsel im Defekt<sup>4,67,68</sup> und die Knorpelreparatur wird initiiert.<sup>69</sup> Pluripotente, undifferenzierte mesenchymale Zellen wandern durch die eröffneten Blutgefäße in den Defekt ein<sup>69</sup> und produzieren Proteoglykane und Kollagene.<sup>6,70</sup> Nach ein bis zwei Monaten liegt ein faserknorpeliges Reparaturgewebe vor, das reich an Typ-I-Kollagen und arm an Typ-II-Kollagen ist.<sup>6</sup> Durch eine Verzahnung des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden Knorpelgewebe wird eine Vergrößerung des Defektareals verhindert.<sup>6,67</sup> Eine Knorpelregeneration, welche die Wiederherstellung eines von normalem hyalinen Gelenkknorpel nicht zu unterscheidenden Gewebes charakterisiert (*restitutio ad integrum*), ist sowohl in chondralen, als auch in osteochondralen Defekten nicht zu erreichen.<sup>6,48</sup> In beiden Fällen kann lediglich ein Knorpelreparaturgewebe entstehen, welches in Form und Struktur dem hyalinen Gelenkknorpel ähnelt, aber nicht mit diesem identisch ist.<sup>6</sup>

## 1.6. Operative Therapiestrategien bei fokalen Knorpeldefekten

Die Indikation zur operativ-chirurgischen Intervention ist gegeben, wenn Schmerz nicht mehr durch konservative Maßnahmen zu kontrollieren ist.<sup>6</sup> Man unterscheidet in der Knorpelersatztherapie gewebe- und zellbasierte Verfahren.<sup>6</sup> Diese kommen abhängig von Patientenalter,<sup>6</sup> Defektgröße,<sup>16</sup> -tiefe<sup>6,48</sup> und -lokalisation<sup>16</sup> zum Einsatz. Zu den gewebebasierten Verfahren zählen die Chondroplastik (Débridement<sup>71</sup> von ablösegefährdeten Knorpelbereichen) und die autologen sowie allogenen osteochondralen Transplantate.<sup>72,73</sup> Die zellbasierten Verfahren beinhalten die Mikrofrakturbehandlung,<sup>6,17</sup> die Pridie-Bohrung<sup>6,74</sup> und die subchondrale Abra-

sionsarthroplastik.<sup>6,71</sup> All diesen zellbasierten Verfahren gemein ist die Eröffnung des Markraumes, was zur Immigration von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in den Defekt und zur Ausbildung eines Reparaturgewebes führt.<sup>6</sup> Die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT)<sup>75</sup> stellt ein weiteres zellbasiertes Verfahren dar, welches ohne die Eröffnung des Markraumes auskommt.<sup>8</sup>

## 1.7. Markraumeröffnende Verfahren

Durch markraumeröffnende Verfahren soll der Knochenmarkraum eröffnet werden, sodass spontan in den Knorpeldefekt einwachsende mesenchymale Zellen das Reparaturgewebe bilden können.<sup>6</sup> Indikationen zur Verfahrensanwendung stellen posttraumatisch<sup>6,15</sup> oder degenerativ entstandene, umschriebene Knorpeldefekte (ab Schweregrad Noyes II b) beim jungen, aktiven Patienten ( $\leq 45$  Jahre) dar.<sup>6</sup> Die Fläche des Knorpeldefektes ist das entscheidende Kriterium für die Wahl der Markraumstimulation und ihrer Abgrenzung zur ACT, welche für großflächigere Defekte ( $> 2,5\text{-}3,0\text{ cm}^2$ ) verwendet wird. Die Mikrofrakturbehandlung ist insbesondere indiziert bei einer Defektgröße  $< 2,0\text{-}2,5\text{ cm}^2$ ,<sup>15,76,77</sup> kurzer Symptombdauer ( $< 12$  Monate),<sup>15</sup> instabilen Knorpelanteilen,<sup>17</sup> Knorpeldefekten in den Belastungszonen des Femorotibial- oder Femoropatellargelenkes<sup>15,17</sup> und degenerativen Veränderungen bei geraden Beinachsen.<sup>17</sup> Beinachsenfehlstellung ( $> 5^\circ$  femorotibial), generalisierte Arthrose, Tumoren, Infektionen, systemische Gelenkerkrankungen, Gelenkinstabilität und mangelnde Patientencompliance hinsichtlich der Nachbehandlung sind absolute Kontraindikationen für markraumeröffnende Verfahren.<sup>6,15,17</sup> Eine relative Kontraindikation ist ein Patientenalter über 60 Jahre,<sup>6,15,17</sup> ein Körpermasseindex  $> 30\text{ kg/m}^2$  und begleitende Meniskusdefizienz von mehr als einem Drittel des Meniskusvolumens im betreffenden Kompartiment.<sup>15,76</sup>

Zur Vorbereitung des jeweiligen markraumeröffnenden Verfahrens wird eine Glättung der Knorpeloberfläche, das sogenannte Débridement durchgeführt.<sup>6,15,17,28,78,79</sup> Dabei werden instabile Knorpelfragmente entfernt und der Defektrandwall stabilisiert.<sup>17,78</sup> In Abgrenzung zur Abrasion darf die Eindringtiefe maximal die Knorpel-Knochen-Grenze erreichen<sup>78</sup>. Die subchondrale Knochenlamelle sollte bei der Entfernung des kalzifizierten Knorpels unverletzt bleiben.<sup>17,78</sup>

Sobald der Markraum eröffnet ist, steigt Blut auf und füllt den Defekt mit einem Gerinnsel (in der angelsächsischen Literatur auch als *super clot*<sup>17</sup> bezeichnet).<sup>6,17</sup> Dieser beinhaltet mesen-

chymale Zellen, die sich zu Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren und osteochondrales Reparaturgewebe bilden können.<sup>6,17,48</sup> Nach Monaten überwiegt ein faserknorpeliges Reparaturgewebe, das reich an Typ-I-Kollagen und arm an Typ-II-Kollagen ist.<sup>6,37,48</sup> Das Reparaturgewebe degeneriert im Laufe der Belastung, da es nicht dieselben, optimalen biomechanischen Eigenschaften wie hyaliner Gelenkknorpel aufweist.<sup>6,79,80</sup> Der Defekt weitet sich in den angrenzenden Knorpel aus,<sup>48</sup> subchondraler Knochen kollabiert und wird resorbiert.<sup>6</sup>

### 1.7.1. Subchondrale Anbohrung (Pridie-Bohrung)

Die Technik der subchondralen Anbohrung wurde 1957 durch Ian Scott Smillie<sup>81</sup> zur Behandlung der Osteochondrosis dissecans und 1959 durch Kenneth Hampden Pridie<sup>74</sup> zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten beschrieben.<sup>6,82</sup> Nach dem Débridement des Defektes wird durch Bohrlöcher mithilfe von Kirschner-Drähten oder eines motorisierten Bohrers der subchondrale Knochen bis in die subartikuläre Spongiosa angebohrt.<sup>6,28</sup> Die Bohrlöcher müssen senkrecht zur Gelenkoberfläche im Abstand von 3-4 mm platziert werden und dürfen nicht ineinander einbrechen.<sup>16</sup> Eine Hitzenekrose durch den motorisierten Bohrer wurde bislang nicht beobachtet, möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass markraumstimulierende Verfahren zumeist arthroskopisch durchgeführt werden und damit die rotierenden Instrumente von Spülflüssigkeit umgeben sind.<sup>82,83</sup> Wie bei allen markraumeröffnenden Verfahren wird durch die Perforationen des subchondralen Knochens das Einwandern von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in die Bohrkanäle ermöglicht.<sup>69,82</sup> Faserknorpeliges Reparaturgewebe füllt bei diesem Verfahren pilzförmig die Bohrkanäle aus.<sup>6</sup> Eine konsequente postoperative Nachbehandlung in Form von sechs Wochen Entlastung und passiver Bewegung durch eine Motorschiene ist einzuhalten.<sup>6</sup>

### 1.7.2. Abrasionsarthroplastik

Das Prinzip der Abrasionsarthroplastik nach Lanny Johnson<sup>71</sup> besteht in der Abtragung des geschädigten Gelenkknorpels und des darunter liegenden sklerosierten subchondralen Knochens bis Blutungen aus den subchondralen Sinusoiden sichtbar werden.<sup>6</sup> Mit einer motorisierten Kugelfräse werden lose Knorpelstücke beseitigt und der sklerosierte subchondrale Knochen wird bis zu einer maximalen Eindringtiefe von 1-2 mm abgetragen.<sup>71</sup> Eine zu starke Ausdünnung des subchondralen Knochens soll dabei aus Stabilitätsgründen vermieden werden.<sup>6,71</sup> Mögliche Komplikationen sind ein Hämarthros und Frakturen.<sup>6</sup> Postoperativ sollte das operierte Gelenk ebenfalls für sechs Wochen entlastet und passiv durch eine Motorschiene bewegt werden.<sup>6,79</sup>

### 1.7.3. Mikrofrakturbehandlung

Die Mikrofrakturbehandlung wurde 1983 durch Richard Steadman eingeführt.<sup>12,17,84</sup> Sie dient als primäre Therapieoption für vollschichtige Knorpeldefekte mit einer Defektgröße von bis zu 3 cm<sup>2</sup>.<sup>15,16</sup> Auch die Mikrofrakturbehandlung wird unter arthroskopischer Sicht durchgeführt.<sup>6</sup> Zunächst werden die Zugangswege zum Kniegelenk geschaffen und es folgt eine ausführliche Inspektion.<sup>15,17,84</sup> Etwaige intraartikuläre Behandlungsmaßnahmen sollten vor der Mikrofrakturbehandlung durchgeführt werden.<sup>15,17,84</sup>

Um einen gesunden und stabilen Knorpelwall um den Defekt zu erzeugen, werden lose Knorpelstücke entfernt und der kalzifizierte Defektgrund wird mit einer Kürette von kalzifizierten Knorpelresten befreit.<sup>6,15,17,77</sup> Dieses Débridement dient zur Vorbereitung des Knorpeldefektes vor Markraumstimulation und muss sorgfältig durchgeführt werden, um eine zu starke Ausdünnung des subchondralen Knochens und somit *per definitionem* eine Abrasionsarthroplastik zu vermeiden.<sup>15,17</sup> Mit einer arthroskopischen Ahle wird die subchondrale Knochenlamelle senkrecht zur Oberfläche penetriert.<sup>6,17,77</sup> Die Mikrofrakturlöcher sollen in einem Mindestabstand von 3-4 mm eingebracht werden, um ein Ineinanderbrechen dieser und ausgedehnte subchondrale Frakturen zu vermeiden.<sup>6,15,17,85</sup> Die optimale Eindringtiefe von ca. 4 mm ist erreicht, sobald Fettaugen und Blutfäden aus dem Knochenmark austreten.<sup>6,17,85</sup> Die Mikrofrakturbehandlung bewirkt eine raue Oberfläche der subchondralen Knochenlamelle, die eine optimale Anheftungsstelle für das Blutgerinnsel aus dem Knochenmark darstellt.<sup>17</sup> Da die Ahlen in verschiedenen Winkeln (z.B. 0°, 30°, 45°, 90°) erhältlich sind, wird die Anwendung unter arthroskopischer Sicht deutlich vereinfacht.<sup>17,15</sup> So ist es Operateuren möglich, auch schwer zu erreichende Lokalisationen wie die retropatellare Gelenkfläche senkrecht zur Oberfläche zu bearbeiten.<sup>15,17,86</sup>

Direkt im Anschluss an die Arthroskopie erhalten Patienten Kälteanwendungen zur Reduzierung von Schwellung, Schmerz- und Reizzuständen.<sup>15,17</sup> Bei Defekten in der Belastungszone der Femurkondylen soll eine Belastung mit Sohlenkontakt an Unterarmgehstützen für sechs Wochen eingehalten werden.<sup>6,17</sup> Direkt postoperativ wird schmerzadaptiert das Knie in einer Motorschiene bewegt, die geführte passive Bewegungen durchführt.<sup>6,17</sup> Die Motorschiene sollte täglich je acht Stunden für sechs Wochen benutzt werden.<sup>6,17</sup> Nach Robert B. Salter<sup>199</sup> unterstützt die kontinuierliche passive Bewegung im Kniegelenk die Knorpelernährung und die Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen. Eine Ausnahme stellen Defekte des Femoropatellargelenkes dar. In diesen Fällen darf eine Belastung direkt postoperativ nur in Extension durchgeführt werden.<sup>87</sup> Nach Steadman *et al.*<sup>17</sup> sind Komplikationen wie

Schmerz, Krepitationen, Gelenkblockaden und Ergussbildung im postoperativen Verlauf selten.

## 1.8. Experimentelle und klinische Ergebnisse nach Mikrofrakturbehandlung

Bislang gab es viele experimentelle Arbeiten,<sup>27,82,88,89,90-91</sup> die sich mit dem markraumeröffnenden Verfahren der Mikrofrakturbehandlung beschäftigten. In einem Großtierexperiment mit Ziegen nach Kok *et al.*<sup>92</sup> blieb das Knorpelreparaturgewebe am Talus von Mikrofrakturbehandlungen mit unterschiedlichen Durchmessern und Tiefen unbeeinflusst. Im Kaninchenmodell konnten Min *et al.*<sup>27</sup> eine höhere Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen an die Knorpeloberfläche nach Knochenmarkseröffnung mittels größerer Ahlendurchmesser (0,8 mm vs. 1,5 mm) feststellen. Der Einfluss des Ahlendurchmessers auf die osteochondrale Knorpelreparatur in medialen Femurkondylen blieb bisher jedoch unbeachtet.

Zudem untersuchten einige prospektive klinische Studien<sup>5,19,20,21,22,23,25,93-94</sup> die Mikrofrakturbehandlung. Darunter waren in absteigender Reihenfolge lang-,<sup>19,22,23,25,95,96,97,98,99,100,101,102</sup> kurz-<sup>20,23,93,103,104,105,106,107-108</sup> und mittelfristig<sup>5,19,109,110,111,112,113,94</sup> angelegte Studien zu finden. Viele Autoren<sup>5,18,20,23,25,93,96,97,111,104,112,101,114,115</sup> sind sich über den kurzfristigen positiven Effekt der Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zum präoperativen Zustand einig. Keine weitere Verbesserung des Behandlungsergebnisses, gemessen an klinischen Bewertungssystemen, Magnetresonanztomographie (MRT) und histologischen Auswertungen durch eine Re-Arthroskopie wurde nach Ablauf von ca. zwei Jahren beschrieben.<sup>20,23,96,112,116</sup>

In Vergleichsstudien der Mikrofrakturbehandlung versus der ACT fiel ein signifikant besseres klinisches Behandlungsergebnis nach ACT auf.<sup>5,21,98,117,118</sup> Knutsen *et al.*<sup>104</sup> plädierten jedoch für weiterführende Langzeitstudien, da sie sowohl für die Mikrofrakturbehandlung, als auch für die ACT nach zwei und fünf Jahren eine Verbesserung zum präoperativen Status feststellen konnten. Im Jahr 2016 veröffentlichte die Gruppe um Knutsen *et al.*<sup>25</sup> eine Langzeitstudie mit einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 15 Jahren. Weiterhin beschrieben die Autoren eine klinische Verbesserung zum präoperativen Status sowohl nach der Anwendung von ACT als auch nach Mikrofrakturbehandlung.<sup>25</sup> Entgegen fehlender signifikanter Unterschiede zwischen den zwei Behandlungsgruppen wurden weniger Kniegelenkersatzoperationen und eine Verzögerung der sekundären Arthrose nach der Anwendung von Mikrofrakturbehandlungen (48% versus 57%, nicht signifikant) identifiziert.<sup>25</sup>

Auch nach zehn Jahren stellten Ulstein *et al.*<sup>101</sup> keine signifikanten Unterschiede in der Anwendung von autologen osteochondralen Transplantaten und der Mikrofrakturbehandlung am Patienten fest. Die Behandlungsergebnisse wurden mithilfe von klinischen Bewertungssystemen, anterior-posterioren Röntgenaufnahmen des Kniegelenks und Muskelfunktionstest beurteilt.<sup>101</sup> Patienten mit hohem Aktivitätsniveau und (semi-)professionelle Athleten zeigten bessere Behandlungsergebnisse nach Anwendung von ACT und autologen osteochondralen Transplantaten als nach Mikrofrakturbehandlung in einem Behandlungszeitraum von 6 bis 37 Monaten.<sup>98,111,119</sup> Der Zeitpunkt der sportlichen Wiederkehr gestaltete sich für Athleten nach Mikrofrakturbehandlung, ACT und autologen osteochondralen Transplantaten ähnlich.<sup>5,98,111</sup> Als günstige Prognosefaktoren für ein gutes Behandlungsergebnis nach Mikrofrakturbehandlung gelten eine kleine Defektgröße ( $< 3 \text{ cm}^2$ )<sup>1,16,18,23,83,87,110,104,119,100</sup> und ein junges Patientenalter ( $\leq 45$  Jahre).<sup>1,18,20,22,23,120,83,110,97,111,104,114,119</sup> Weitere günstige Einflussfaktoren sind ein hohes Aktivitätsniveau,<sup>1,18,104,119,121,122</sup> ein normaler BMI ( $< 25 \text{ kg/m}^2$ ),<sup>1,93,110,122</sup> ein früher Behandlungszeitpunkt (Symptombdauer  $< 12$  Monate)<sup>93,121</sup> und eine Defektlokalisierung an der Femurkondyle.<sup>16,20,120,83,123,94</sup> Im Ergebnis sind fokale Knorpeldefekte<sup>83</sup> der Femurkondyle mit einer Größe unter  $3 \text{ cm}^2$  somit eine gute Indikation zum markraumeröffnenden Verfahren.<sup>1,16,85</sup> Welches Verfahren angewandt wird, ist in der Gesamtschau von Einflussfaktoren, Symptomen und technischer Vertrautheit mit dem jeweiligen OP-Verfahren durch den Operateur<sup>16</sup> entsprechend der aktuellen nationalen und internationalen Leitlinien zu entscheiden.<sup>124</sup>

## 1.9. Konzept der vorliegenden Arbeit

In dieser translationalen Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Ahlendurchmesser auf die Knorpeldefektreparatur nach Mikrofrakturbehandlung untersucht. Im präklinischen Schafmodell ( $n = 16$  weibliche Merinoschafe) wurde in der Belastungszone medialer Femurkondylen ein vollschichtiger Knorpeldefekt ( $4 \times 8 \text{ mm}$ ) erzeugt. Alle Defekte wurden zunächst durch ein Débridement zur Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht behandelt. Insgesamt 16 Defekte wurden zudem einer standardisierten Mikrofrakturbehandlung (sechs Mikrofrakturlöcher pro Defekt, Tiefe  $5,0 \text{ mm}$ ) unterzogen. Der Ahlendurchmesser betrug entweder  $1,0 \text{ mm}$  oder  $1,2 \text{ mm}$ . Rein débriderte Defekte stellten die Kontrollgruppe dar ( $n = 8$ ). Nach sechs Monaten *in vivo* unter Vollbelastung wurde die Knorpelreparatur anhand etablierter Bewertungssysteme makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch und biochemisch beurteilt. Degenerative Veränderungen des angrenzenden Knorpels wurden ebenfalls makroskopisch und histolo-

---

gisch analysiert. Der subchondrale Knochen wurde mittels Mikro-CT untersucht. Die Quantifizierung subchondraler Knochenzysten und intraläsionaler Osteophyten erfolgte ebenfalls durch die Mikro-CT.

## 2. Hypothese

- (1) Im translationalen Großtiermodell führt die Anwendung kleinerer Ahlendurchmesser (1,0 mm) im Vergleich zu größeren Durchmessern (1,2 mm) in der Mikrofrakturbehandlung kleinflächiger Knorpeldefekte zu einer verbesserten Knorpelreparatur.
- (2) Jedwede Form von Mikrofrakturbehandlung verbessert die Knorpelreparatur im Vergleich zur alleinigen Durchführung eines Débridements.

### 3. Studiendesign

In der Belastungszone medialer Femurkondylen ausgewachsener Merinoschafe (n = 16) wurden 24 rechtwinklige, vollschichtige Knorpeldefekte mit einer standardisierten Stanze (4 x 8 mm) erzeugt. Dabei wurde der Knorpel bis zum subchondralen Knochen abgetragen (Débridement). Acht Defekte wurden mit einer Mikrofrakturierungs-Ahle kleinen Durchmessers (1,0 mm, Gruppe eins) und weitere acht Defekte mit einer Ahle großen Durchmessers (1,2 mm, Gruppe zwei) behandelt. Es wurden jeweils sechs Mikrofrakturlöcher pro Defekt erzeugt. Als Kontrollgruppe dienten acht débridierte Defekte (Gruppe drei) (Abbildung 3).

Nach sechs Monaten unter Vollbelastung wurde die Reparatur des Gelenkknorpels durch histologische, makroskopische, immunhistochemische und biochemische Bewertungssysteme quantifiziert. Die mikrostrukturellen Veränderungen des subchondralen Knochens wurden mittels Mikro-CT ausgewertet.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Identifizierung früh arthrotischer Veränderungen im direkt an den Defekt angrenzenden hyalinen Gelenkknorpel.

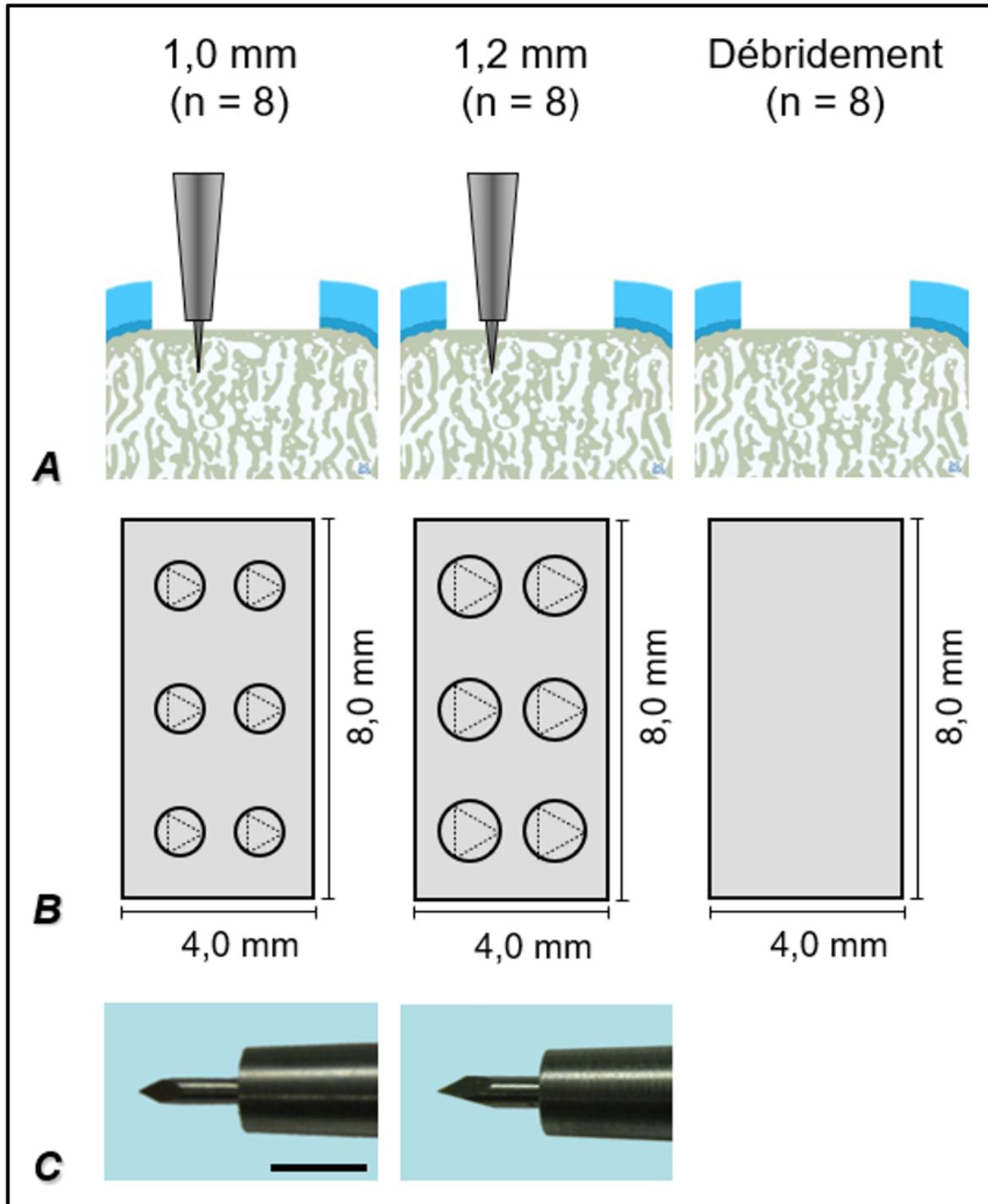


Abbildung 3: Maßstabgetreue Darstellung des Defektareals und der Mikrofrakturbehandlungen. Bildquelle: Orth *et al.*, 2016. Débridement des hyalinen (hellblau) und kalifizierten (dunkelblau) Knorpels und standardisierte Mikrofrakturbehandlung mit kleinen (1,0 mm) und großen (1,2 mm) Durchmessern (A). Die Kontrollgruppe bestand aus Defekten mit alleinigem Débridement (B). Die Spitzen der beiden maßgefertigten Mikrofrakturahlen und der spezielle Perforationsstopp zur Standardisierung der Eindringtiefe auf 5,0 mm sind in (C) dargestellt. Maßstabbalken: 4,0 mm (C).<sup>12</sup>

## 4. Material

### 4.1. Lösungen, Puffer, Medien

Alle Lösungen wurden mit aqua bidestillata angesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen, Puffer und Medien.

| <i>Lösung, Puffer</i>            | <i>Inhaltsstoffe</i>  | <i>Konzentration, Menge, Volumen</i>                             |
|----------------------------------|---|--|
| TNE-Puffer                       | NaCl<br>Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O<br>Tris/(HCl) (pH 7,4)<br>H <sub>2</sub> O                           | 5,8 g (100 mM)<br>372 mg (1 mM)<br>1322 mg (10 mM)<br>ad 1000 ml |
| Blockierungspuffer               | BSA<br>PBS (Zusammensetzung siehe nachstehend)  | 6 ml<br>200 ml   |
| DAB-Lösung                       | H <sub>2</sub> O<br>Puffer (pH = 7,5)<br>DAB-Substratreagenz<br>Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 5 ml<br>2 Tropfen<br>4 Tropfen<br>2 Tropfen                      |
| DMMB-Lösung A                    | D-Cysteinhydrochlorid-monohydrat<br>PBE (Zusammensetzung siehe unten)   | 0,05 g<br>30 ml  |
| DMMB-Lösung B                    | Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz<br>Lösung A  | 0,053 g<br>1 ml  |
| DMMB-Lösung C                    | Lösung A<br>Lösung B  | 24,95 ml<br>0,05 ml  |
| DMMB-Färbelösung (pH 3,5)        | 1,9-Dimethylmethylenblau<br>Natriumhydroxid (1M)<br>Ethanol (95%)<br>Ameisensäure (90%)<br>H <sub>2</sub> O         | 16 mg<br>25,6 ml<br>5 ml<br>3 ml<br>ad 1000 ml                   |
| Echtgrün-Lösung                  | Echtgrün<br>H <sub>2</sub> O  | 200 mg<br>ad 1000 ml   |
| Entkalkungslösung                | Natrium-Citrat<br>Ameisensäure (90%)<br>H <sub>2</sub> O  | 100 g<br>250 ml<br>ad 750 ml                                     |
| Eosin-Lösung                     | Eosin G<br>H <sub>2</sub> O   | 10 g<br>ad 2000 ml   |
| Formalin-Lösung (pH 7,4)         | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Formalin-Stammlösung<br>H <sub>2</sub> O     | 9,07 g<br>11,86 g<br>140 ml<br>ad 1000 ml                        |
| Hämatoxylin-Lösung (nach Harris) | Hämatoxylin<br>Ethanol (100%)   | 10 g<br>120 ml   |

| <i>Lösung, Puffer</i>                | <i>Inhaltsstoffe</i>  | <i>Konzentration, Menge, Volumen</i> |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
|                                      | Natrium-Jodat<br>Aluminiumkaliumsulfat<br>H <sub>2</sub> O  | 10 g<br>200 g<br>ad 2000 ml          |
| HCl-Lösung                           | HCl (40%)<br>H <sub>2</sub> O   | 5,4 ml<br>ad 200 ml                  |
| Papain-Lösung                        | Papain<br>H <sub>2</sub> O<br>PBS   | 5 mg<br>200 µl<br>ad 40 ml           |
| PBE                                  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>EDTA<br>H <sub>2</sub> O  | 7,1 g<br>1,86 g<br>500 ml            |
| PBS                                  | Kaliumchlorid (pH 7,2)<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>NaCl<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 2,7 mM<br>1,7 mM<br>136 mM<br>10 mM  |
| Safranin-O-Färbung                   | Safranin-O<br>H <sub>2</sub> O  | 1 g<br>ad 1000 ml                    |
| Trypsin-Lösung (0,1%)                | Trypsin-Stammlösung (25%)<br>PBS  | 800 µl<br>ad 200 ml                  |
| Trypsin-Stammlösung                  | Trypsin<br>PBS  | 25% (V/V)<br>75% (V/V)               |
| Wasserstoff-Peroxid-Lösung<br>(0,3%) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>H <sub>2</sub> O   | 0,6 ml<br>200 ml                     |

## 4.2. Chemikalien

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

Tabelle 2: Chemikalien.

| <i>Produkt</i>                                 | <i>Hersteller</i>                        |
|--|--|
| ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz) | Vector (Burlingame, CA, USA)             |
| Albumin-Standard                               | Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)    |
| Bisbenzimid Hoechst 33258                      | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| BCA Protein Assay Reagent A                    | Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)    |
| BCA Protein Assay Reagent B                    | Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)    |

---

| <i>Produkt</i>                     | <i>Hersteller</i>                        |
|------------------------------------|--|
| BSA                                | PerBio (Bonn, Deutschland)               |
| Chondroitin-6-sulfat-Natriumsalz   | Fluka (Buchs, Schweiz)                   |
| D-Cysteinhydrochloridmonohydrat    | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| DAB-Reagenz                        | Vector (Burlingame, CA, USA)             |
| Echtgrün (FCF)                     | ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)  |
| Eosin G                            | Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| Essigsäure (1%)                    | Merck (Darmstadt, Deutschland)           |
| Ethanol                            | Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| Formalin-Stammlösung (37%)         | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| HRP-Verdünnungsmittel              | MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)     |
| Hämatoxylin                        | Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| Papain                             | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| Paraffin-Granulat 'Roti-Plast'     | Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| Pierce-BCA-Protein-Assay-Reagent-A | Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)    |
| Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)  | Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| Safranin-O                         | Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| Salzsäure (1%)                     | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| Standard-DNS-Lösung                | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| Tusche, schwarz                    | Pelikan (Hannover, Deutschland)          |
| Typ-I-Kollagen Standard            | MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)     |
| Typ-II-Kollagen Standard           | MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)     |
| Wasserstoff-Peroxid                | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) |
| Xylol                              | Fischar (Saarbrücken, Deutschland)       |

---

### 4.3. Antikörper

Folgende monoklonalen Antikörper wurden für die immunhistochemische Darstellung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Knorpelreparaturgewebe verwendet:

Tabelle 3: Antikörper.

| <i>Bezeichnung</i>         | <i>Spezies</i> | <i>Hersteller</i>                             |
|----------------------------|----------------|---|
| Anti-Typ-I-Kollagen        | Maus           | Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich) |
| Anti-Typ-II-Kollagen       | Maus           | Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)  |
| Anti-Maus-IgG (biotiniert) | Ziege          | Vector (Burlingame, CA, USA)                  |

### 4.4. Enzyme

Knorpelmaterial wurde mithilfe von Papain (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verdaut. Bei immunhistochemischen Untersuchungen wurde Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) genutzt.

### 4.5. Tierstämme

Die ausgewachsenen, weiblichen Merinoschafe ( $n = 16$ , durchschnittliches Alter  $34 \pm 8$  Monate, durchschnittliches Gewicht  $77,1 \pm 4,4$  kg) wurden vom Landesschafzuchtverband Sachsen-Anhalt e.V. (Halle/Saale, Deutschland) bezogen.

### 4.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 4.6.1. Geräte

Neben den allgemeinen Laborgeräten fanden noch folgende Geräte Anwendung:

Tabelle 4: Laborgeräte.

| <i>Gerät</i>     | <i>Hersteller</i>                       |
|------------------|---|
| Autoklav AMA-240 | Astell (Sidcup, Vereinigtes Königreich) |

---

| <i>Gerät</i>                                    | <i>Hersteller</i>                                 |
|---|---|
| Canon Powershot A480                            | Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)                 |
| Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)       | Soft Imaging System (Münster, Deutschland)        |
| Einbettmaschine EG 1140-C                       | Leica (Nussloch, Deutschland)                     |
| Gefrierschrank -20 °C                           | Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)       |
| Gefrierschrank -74 °C Platinum 550              | Angelantoni Industrie (Massa Martana PG, Italien) |
| GENios microplate reader, Seriennr. 12900400824 | TECAN (Crailsheim, Deutschland)                   |
| Inkubator CB 150 (37 °C)                        | Binder (Tuttlingen, Deutschland)                  |
| Magnetrührer RH basic 2                         | IKA (Staufen, Deutschland)                        |
| Mikrofokus-Computertomographie-Scanner          | Skyscan (Kontich, Belgien)                        |
| Mikrofokus-Computertomographie-Röntgenröhre     | Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)                 |
| Mikroskop BX-45                                 | Olympus (Hamburg, Deutschland)                    |
| Mikroskop CK-2                                  | Olympus (Hamburg, Deutschland)                    |
| Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen            | Roth (Karlsruhe, Deutschland)                     |
| Plattenabdeckung                                | MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)              |
| Rotationsmikrotom RM 2135                       | Leica (Nussloch, Deutschland)                     |
| Plattenschüttler LabNet Orbit LS                | Labnet (Woodbridge, NJ, USA)                      |
| Tischzentrifuge Qualitron Mikrozentrifuge       | Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)            |
| Typ-I-Kollagen Mikroplatte                      | MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)              |
| Typ-II-Kollagen Mikroplatte                     | MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)              |
| Vortex Reagenzglas mischer 7-2020               | neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)            |
| Waage EW-600-2M                                 | Kern (Balingen, Deutschland)                      |
| Wärmeplatte HI 1220                             | Leica (Nussloch, Deutschland)                     |
| Wärmeschrank 62 °C                              | Binder (Tuttlingen, Deutschland)                  |
| Wärmeschrank 37 °C                              | Memmert (Schwabach, Deutschland)                  |
| Wasserbad HI 1210 (für histologische Schnitte)  | Leica (Nussloch, Deutschland)                     |

---

#### 4.6.2. Computerprogramme

Das Programm analySIS (Soft Imaging System, Münster, Deutschland) diente der Auswertung digitaler Bilder. Bilder des Mikro-CT wurden mit der Software NRecon (SkyScan, Kontich, Belgien) rekonstruiert, mit dem DataViewer (SkyScan) betrachtet und mit dem CT-Analyser (SkyScan) ausgewertet. Für statistische Analysen kamen die SPSS-Software (Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) zum Einsatz.

#### 4.6.3. Operationsinstrumente und –materialien

Zur Herstellung der Knorpeldefekte diente eine individuell hergestellte Stanze (Größe 4 x 8 mm, rechtwinkelig). Eine Kürette zur vollschichtigen Abtragung des Knorpelgewebes und die Mikrofrakturierungs-Ahlen (Durchmesser: 1,0 mm; 1,2 mm) stellten die Firma Aesculap (Tuttlingen, Deutschland) her. Zum Verschluss von Gelenkkapsel wurde nicht-resorbierbares Nahtmaterial (Ethibond, Größe 6; Ethicon, Norderstedt, Deutschland) genutzt. Subkutanes Gewebe und Haut wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl Stärke 2-0/Vicryl Stärke 0; Ethicon, Norderstedt, Deutschland) adaptiert. Spritzen und Nadeln wurden von der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) bezogen. Weiteres Instrumentarium und Nahtmaterial stammte von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz).

#### 4.6.4. Verbrauchsmaterialien

Objektträger und Deckgläser für die histologische Auswertung, sowie Metallkassetten und Plastikabdeckungen für die Paraffineinbettung stammten von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland). Von der Firma Leica (Nussloch, Deutschland) stammten die Klingen für das Rotationsmikrotom. Jegliche Plastikartikel und Glasbehälter wurden von den Firmen Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland) geliefert.

## 5. Methoden

### 5.1. Großtiermodell

Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte in Einklang mit dem nationalen Tierschutzgesetz und gültigen Richtlinien für den Umgang und Gebrauch mit Versuchstieren (*Guidelines for the Use and Care of Laboratory Animals*, NIH-Veröffentlichung 85-23, Rev. 1985). Die saarländische Tierschutzkommission bewilligte die Experimente. Für die Versuche wurden ausgewachsene, weibliche Merino Schafe (n = 16; durchschnittliches Alter:  $34 \pm 8$  Monate; durchschnittliches Körpergewicht (KG)  $77,1 \pm 4,4$  kg) genutzt. Sie erhielten Wasser *ad libitum* und eine standardisierte Kost. Alle Tiere wurden kontinuierlich von einem Veterinärmediziner überwacht. Eine Kniegelenksarthrose wurde präoperativ röntgenologisch ausgeschlossen.

### 5.2. Anästhesie und Operation

Nach zwölf Stunden Nüchternzeit wurden die Schafe mit 1%igem Xylazin (Bayer, Leverkusen, Deutschland) (0,05 mg/kg KG) sediert und nach der intravenösen Gabe von 30 ml 1%igem Propofol (Astrazeneca, Wedel, Deutschland) endotracheal intubiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose inhalierten die Schafe 1,5%iges Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) und erhielten Propofol intravenös (6-20 mg/kg KG/h). Die Operation führten Prof. Dr. med. H. Madry und Prof. Dr. med. P. Orth durch. Die Tiere wurden auf dem Rücken gelagert, die Hinterbeine nicht fixiert, die Knie rasiert und mit Braunol (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Es folgte die sterile Abdeckung des Kniegelenks zu allen Seiten. In Knie- und Hüftextension wurde der Hautschnitt von ca. 4-5 cm Länge durchgeführt, das subkutane Gewebe entlang der Hautinzision mit einem Elektrokauter eröffnet und der mediale Anteil der Patellasehne dargestellt. Kniegelenkskapsel und benachbarte Synovialmembran wurden inzidiert und das Kniegelenk somit vollständig arthrotomiert<sup>125</sup> (Abbildung 4). Ein kleiner Hohmann-Hebel hielt die Patella zwischen dem proximalen Anteil der Patellasehne und der proximalateralen Femurkondyle nach proximal. Eine Luxation der Patella wurde vermieden. Axialer Druck auf die Hinterläufe und endgradige Extension in Hüft- und Kniegelenken legten die distalen  $\frac{2}{3}$ -Anteile der lateralen und medialen Femurkondylen frei.

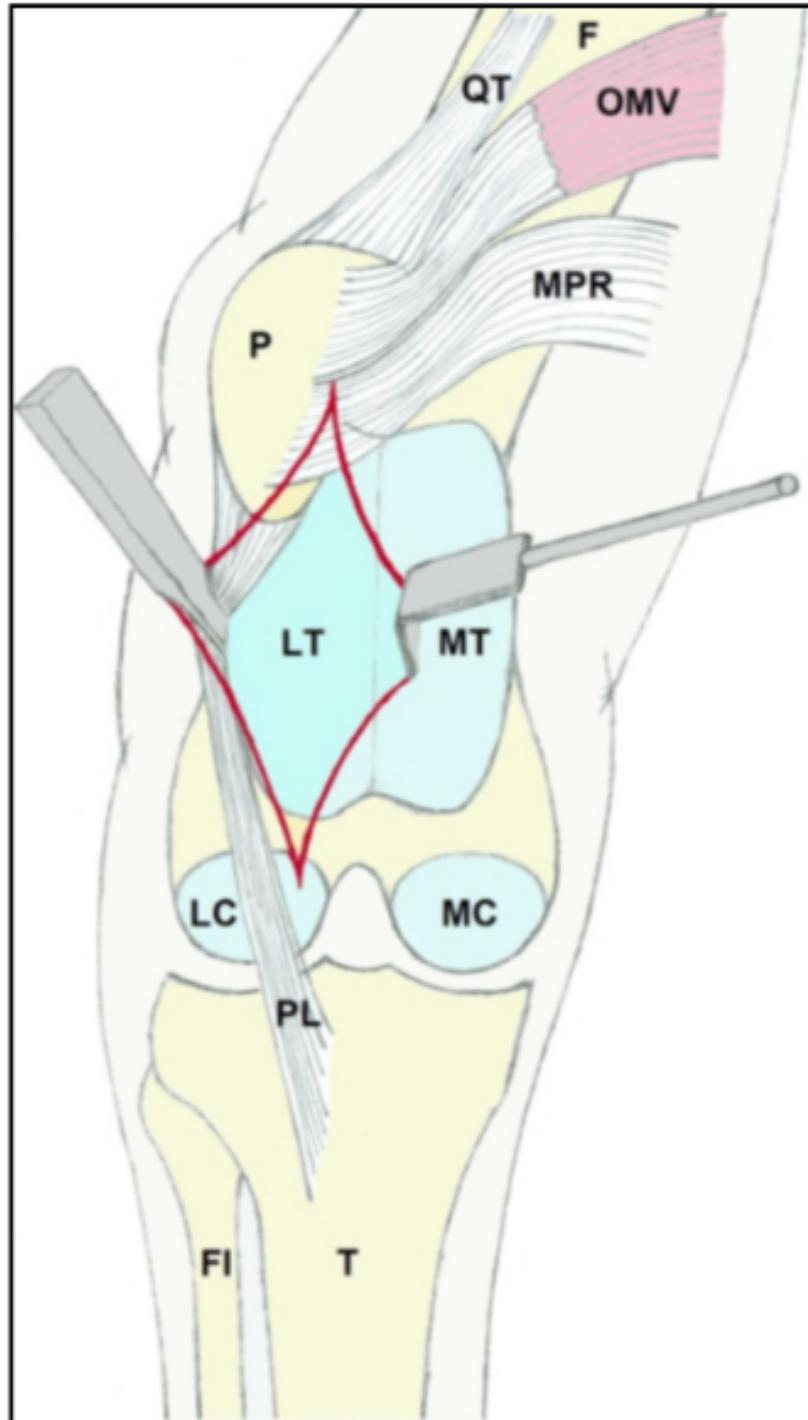


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mini-Arthrotomie am rechten Kniegelenk. Bildquelle: Orth, P. und Madry, H., 2013. Die Hautinzision ist in dunkelrot dargestellt. F: Femur; QT: Quadricepssehne; OMV: Musculus vastus medialis oblique; MPR: Retinaculum patellae mediale; P: Patella; LT: laterale Trochlea; MT: mediale Trochlea; LC: laterale Femurkondyle; MC: mediale Femurkondyle; PL: Patellarsehne; T: Tibia; FI: Fibula. (Orth, P. und Madry, H., 2013)

In der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondylen wurde ein vollschichtiger, chondraler Defekt von 4 x 8 mm Größe (32 mm<sup>2</sup>) durch eine rechtwinkelige Kürette erzeugt. Der gesamte kalzifizierte Knorpel wurde bis zur subchondralen Knochenlamelle mittels Kürette entfernt. Eine Blutung aus dem subchondralen Knochen war vor Anwendung der Mikrofrakturierungs-Ahlen nicht zu beobachten. Sechs einheitliche Mikrofrakturlöcher (Durchmesser 1,0 oder 1,2 mm; Tiefe 5,0 mm) wurden standardisiert (jeweils zwei Reihen mit drei Löchern) in die Defekte eingebracht. Die individuell hergestellten Mikrofrakturierungs-Ahlen (Aesculap) besaßen eine dreiseitig-angeschliffene Spitze und einen Penetrationsstopp für die genormte Eindringtiefe auf 5,0 mm (Abbildung 3). Eine senkrechte Aufbringung der Ahlen auf die subchondralen Knochenlamellen war stets gewährleistet. Nach Einbringen der Mikrofrakturbehandlungen war an allen Löchern eine Blutung aus dem subchondralen Knochen zu beobachten (Abbildung 5).

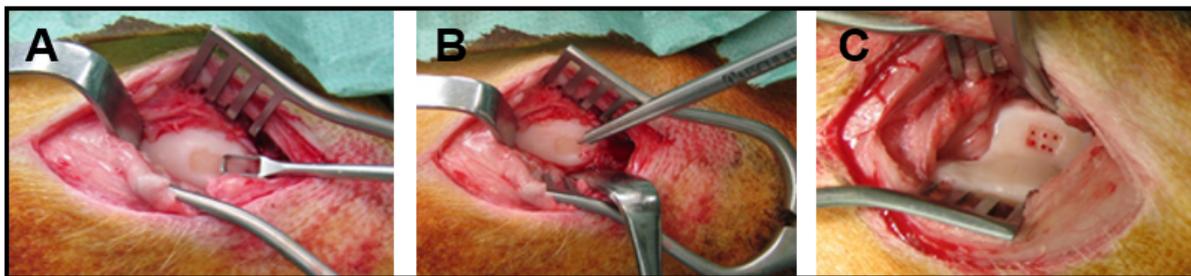


Abbildung 5: Intraoperative Fotodokumentation der Arthrotomie eines Kniegelenkes und Durchführung der Mikrofrakturbehandlung im Schafmodell. In (A) wird die Erzeugung eines vollschichtigen, chondralen Defektes mit einer individuell hergestellten rechtwinkligen Kürette dargestellt. Im nächsten Schritt (B) wurden standardisiert Muster die Mikrofrakturlöcher angebracht, bis Blutungen aus den Positionen des subchondralen Knochens zu beobachten waren (C).

Insgesamt 16 Defekte wurden einer standardisierten Mikrofrakturbehandlung mit Ahlen unterschiedlicher Größe unterzogen. In Gruppe 1 (n = 8 Defekte) wurde eine Mikrofrakturahle von 1,0 mm Durchmesser verwendet, in Gruppe 2 (n = 8 Defekte) eine Ahle von 1,2 mm Durchmesser. Die Defekte wurden bilateral angelegt, rechts und links alternierend zwischen Gruppe 1 und 2. Gruppe 3 stellte die Kontrollgruppe mit ausschließlich débridierten Defekten dar (n = 8). Diese entstanden unilateral und die kontralateralen Gelenke dienten der Untersuchung osteochondraler Defekte im Rahmen einer unabhängigen Studie. Anschließend wurden die Gelenke gründlich gespült und schichtweise verschlossen. Die Kapsel wurde mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Ethibond, Größe 6, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland), das Subkutangewebe und die Haut mit absorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl, Größen 2 und 2/0; Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) zugenäht. Am Ende wurde Aluminium-Spray als aseptischer Sprühverband aufgetragen.

### 5.3. Postoperative Behandlung

Postoperativ wurde den Tieren einmalig 3 ml Fenpipramid/Levomethadon 0,25% (MSD Animal Health Innovation GmbH, Schwabenheim an der Selz, Deutschland), Streptomycin/Benzylpenicillin (12/7 mg/kg KG) (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) und für weitere zwei Wochen Carprofen (1,4 mg/kg KG) (Pfizer, Deutschland) subcutan verabreicht. Die Tiere belasteten von Anfang an ihre Kniegelenke mit vollem Körpergewicht. Ein Tier der Kontrollgruppe erlitt eine Patellaluxation, die operativ revidiert wurde. Das Tier wurde aus der Studie ausgeschlossen. Weitere Komplikationen traten nicht auf.

Sechs Monate postoperativ wurden die Tiere in Vollnarkose euthanasiert, die Kniegelenke reseziert und die Oberflächen der medialen Kondylen durch eine Kamera mit Makrolinse (Canon Power Shot A480; Canon, Neu-Isenburg, Deutschland) unter standardisierten Bedingungen<sup>126</sup> (40 W Glühlampe; Osram, München, Deutschland; Abstand von 50 cm zwischen Kamera und Knorpeloberfläche) fotodokumentiert. Der proximale Defektanteil und dessen angrenzender Knorpel wurde bis zur biochemischen Auswertung bei -80 °C gelagert. Der distale Defektanteil wurde 48 h in 4%igem Formalin fixiert und bis zur Mikro-CT Auswertung in 70%igem Ethanol asserviert. Ebenso dienten distale Defektanteile und dessen angrenzender Knorpel als Grundlage für die histologischen, biochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen (Abbildung 6).

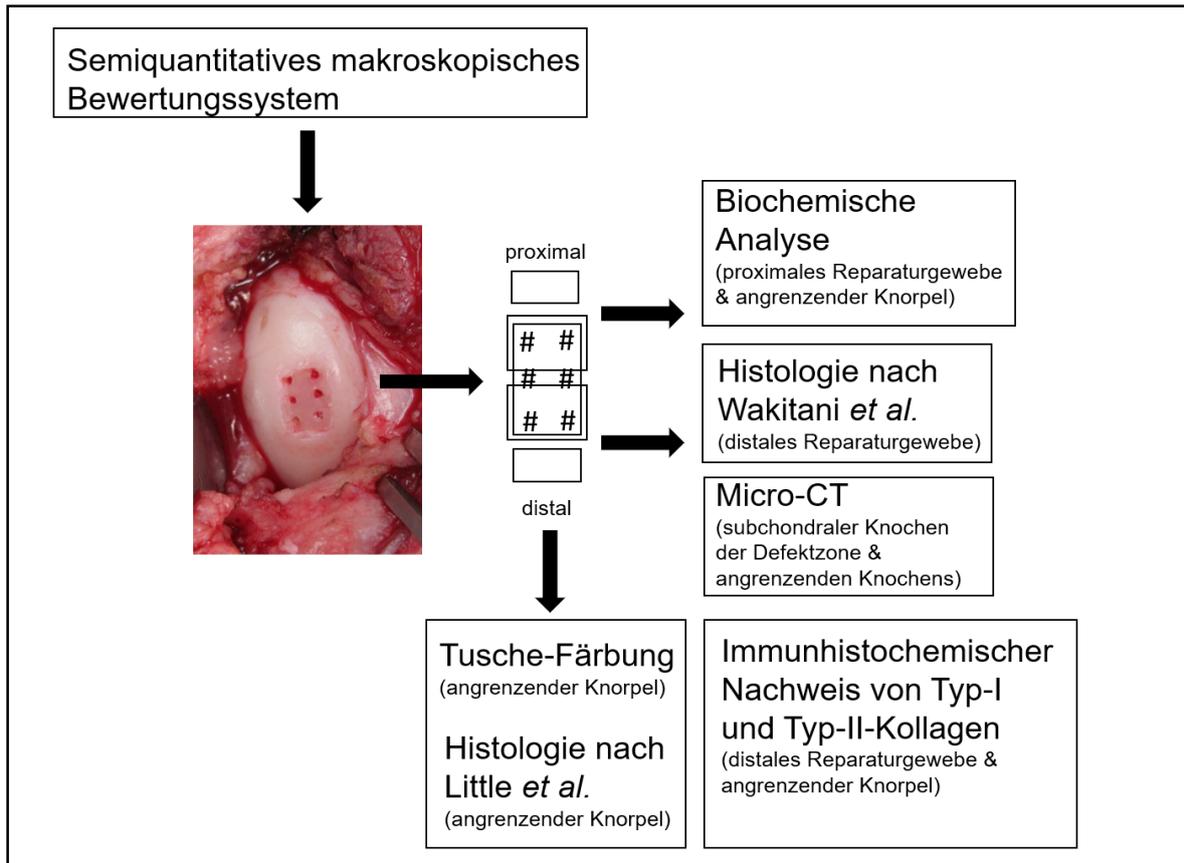


Abbildung 6: Übersicht der angewandten Methoden. #: Lage der Mikrofrakturierung im Defekt.

## 5.4. Makroskopische Analyse

Nach Sektion der Schafe wurden unter standardisierten Bedingungen (Kapitel 5.2) Fotografien der 24 Femurkondylen angefertigt. Anhand der Fotodokumentation erfolgte die Beurteilung des Reparaturgewebes verblindet (durch zwei unabhängige Untersucher) mittels des makroskopischen Bewertungssystems von Goebel *et al.*<sup>126</sup> (maximal 20 Punkte = keine Knorpelreparatur, 0 Punkte = vollständige Knorpelreparatur).

Tabelle 5: Makroskopisches Bewertungssystem zur Beurteilung des Knorpelreparaturgewebes. (in Anlehnung an Goebel *et al.*, 2012)

| <i>Kategorie</i>                                 | <i>Parameter</i>                                   | <i>Punkte</i> |
|--|--|---------------|
| Farbe des Reparaturgewebes                       | Hyalin oder weiß                                   | 0             |
|  | Vorherrschend weiß                                 | 1             |
|  | Vorherrschend durchsichtig                         | 2             |
|  | Durchsichtig                                       | 3             |
|  | Kein Reparaturgewebe                               | 4             |
| Vorhandensein von Blutgefäßen im Reparaturgewebe | Keine  | 0             |
|  | <25% des Reparaturgewebes                          | 1             |
|  | 25-50% des Reparaturgewebes                        | 2             |
|  | 50-75% des Reparaturgewebes                        | 3             |
|  | >75% des Reparaturgewebes                          | 4             |
| Oberflächenbeschaffenheit des Reparaturgewebes   | eben, gleichmäßig                                  | 0             |
|  | eben, unregelmäßig                                 | 1             |
|  | Fibrillationen                                     | 2             |
|  | Inkomplettes neues Reparaturgewebe                 | 3             |
|  | Kein Reparaturgewebe                               | 4             |
| Füllung des Defektes mit Reparaturgewebe         | In Niveau des angrenzenden Knorpels                | 0             |
|  | >50% der Defekttiefe oder Hypertrophie             | 1             |
|  | <50% der Defekttiefe                               | 2             |
|  | 0% der Defekttiefe                                 | 3             |
|  | Beschädigung der subchondralen Knochenlamelle      | 4             |
| Degeneration des angrenzenden Gelenkknorpels     | Ohne Veränderungen                                 | 0             |
|  | Risse und/oder Fibrillationen der Integrationszone | 1             |

---

| <i>Kategorie</i>   | <i>Parameter</i>  | <i>Punkte</i> |
|--------------------|---|---------------|
|                    | Diffuse arthrotische Veränderungen                            | 2             |
|                    | Ausweitung des Defektareals in den angrenzenden Gelenkknorpel | 3             |
|                    | Beschädigung der subchondralen Knochenlamelle                 | 4             |
| Maximale Punktzahl |   | 20            |

---

## 5.5. Tusche-Färbung

Die Tusche-Färbung verdeutlicht degenerative Veränderungen der Knorpeloberfläche in schwarzer Farbe (Abbildung 7).<sup>28,127</sup> Im ersten Schritt fand die Reinigung der Kondylen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) statt. Der an die distalen Defektanteile angrenzende Knorpel wurde dann mit unverdünnter Tusche (Pelikan, Hannover, Deutschland) gefärbt. Mit einem feuchten Linsentuch wurde der Überschuss an Tusche entfernt. Die gefärbten Femurkondylen wurden unter standardisierten Bedingungen<sup>126</sup> fotografiert und die Auswertung der digitalisierten Lichtbilder erfolgte durch das Programm *analySIS 5.0* (Olympus Soft Imaging). Um die distale Defektfläche kam ein standardisierter, virtueller Rahmen von 4 mm Breite (70 mm<sup>2</sup>) zum Einsatz. Innerhalb dieser Fläche wurden die degenerativen Defektareale manuell vermessen und die Gesamt-Defektfläche (mm<sup>2</sup>) bestimmt.

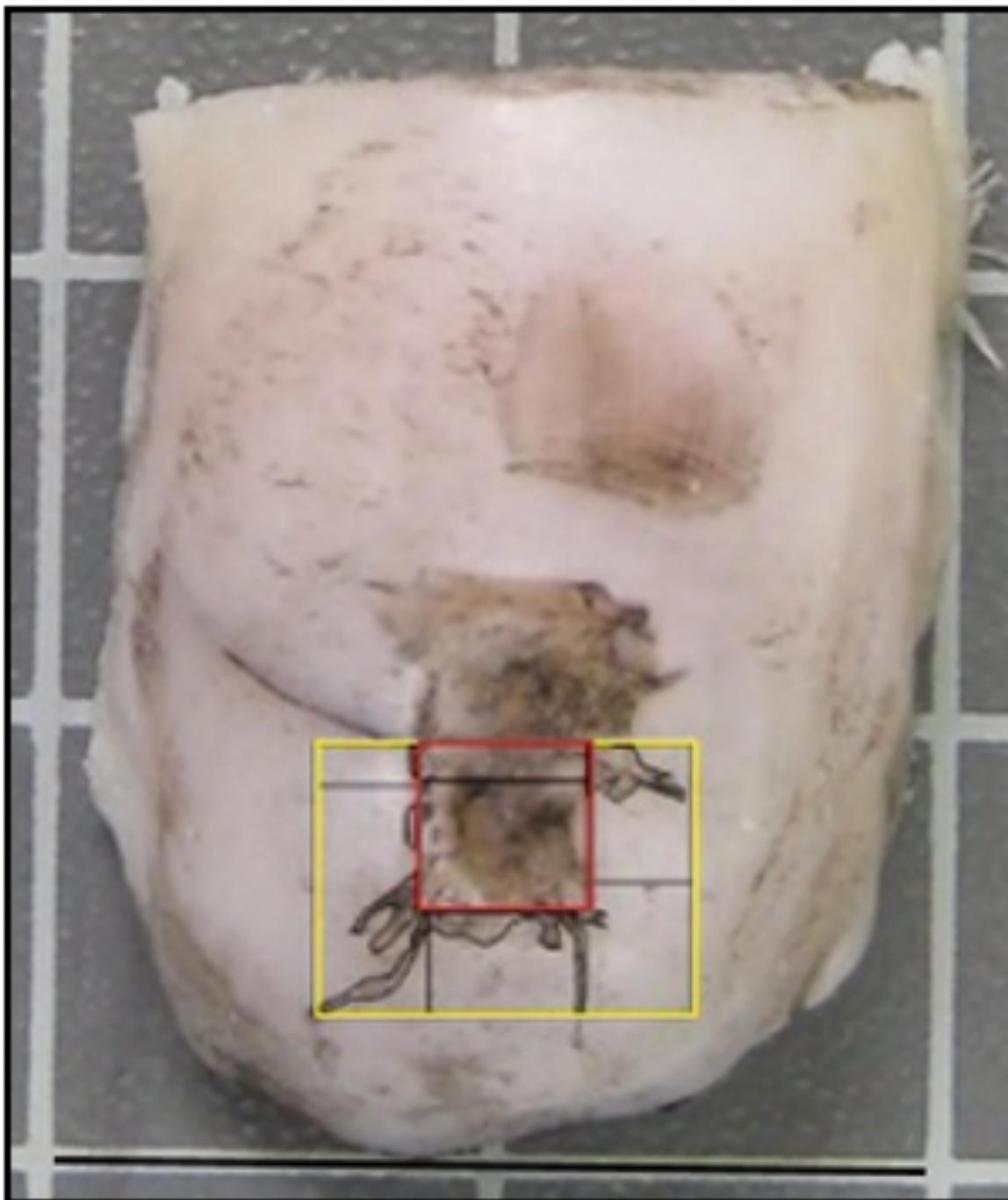


Abbildung 7: Tusche-Färbung der angrenzenden Knorpeloberfläche. Dargestellt ist der distale Defektanteil in Rot (4 x 4 mm) innerhalb des standardisierten Rahmens (gelb, 70 mm<sup>2</sup>). Maßstabbalken: 2,0 cm.

## 5.6. Mikro-Computertomographie

### 5.6.1. Mikro-CT-Darstellung

Die proximalen Defektanteile der 24 medialen Femurkondylen wurden im Mikro-CT Scanner (Skyscan 1172; Bruker) analysiert. Das Mikro-CT besteht aus einer drehbaren Abtastbühne, einer beweglichen 10 Megapixel-Kamera und einer Mikrofokus-Röntgenröhre (Ortsauflösung maximal 0,8  $\mu\text{m}$ , Hamamatsu, Hamatsu City, Japan). 1000-1100 16-Bit Röntgenbilder wurden bei einer Röhrenspannung von 70 kV und einer Stromstärke von 140  $\mu\text{A}$  von jeder Probe erstellt. Alle Proben wurden in 70%igen Ethanol mit einer räumlichen Auflösung von 13  $\mu\text{m}$  untersucht. Die Kamera rotierte pro Röntgenbild in  $0,4^\circ$  Intervallschritten bei einer Belichtungszeit von 1770 ms um die Probe. Es wurde ein kombinierter 0,5 mm Aluminium/Kupfer-Filter zwischen Röntgenstrahlungsquelle und Detektor eingebracht. Die Parameter *ring artefact correction*, *random movement*, *frame average* wurden entsprechender Vorversuche nach Orth *et al.*<sup>128</sup> auf 4, 15 und 3 (alle Parameter ohne Einheiten) eingestellt. Die Rekonstruktion der Bilder erfolgte über einen modifizierten Feldkamp *cone-beam* Algorithmus (NRecon, SkyScan).<sup>129</sup> Für die optimale Erstellung binärer Bilder wurden Graustufengrenzwerte zwischen 89-255 empirisch ermittelt. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*; BMD) wurde anhand der ermittelten Graustufen (Abschwächungskoeffizienten) errechnet. Zwei Calcium-Hydroxyapatit-Phantome mit bekannten BMD-Werten (250 und 750 mg CaHa/cm<sup>3</sup>) dienten der Eichung.

### 5.6.2. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten

Anhand der rekonstruierten Mikro-CT Bilder wurden das Vorhandensein und der Durchmesser subchondraler Knochenzysten sowie intraläsionaler Osteophyten (DataViewer, SkyScan) bestimmt (Abbildung 8). Zur Unterscheidung zwischen Mikrofrakturbehandlung und subchondralen Knochenzysten definierten Orth *et al.*<sup>128</sup> für eine Zyste einen horizontalen Mindestdurchmesser des dreifachen Ahlendurchmessers (1,0 mm-Gruppe: > 3 mm horizontaler Durchmesser; 1,2 mm-Gruppe: > 3,6 mm). Die Zysten wurden mithilfe eines modifizierten<sup>128</sup> Bewertungssystem nach Hoemann *et al.*<sup>130</sup> anhand ihres horizontalen Durchmessers klassifiziert (Punktwert 1 = horizontaler Zystendurchmesser < 4 mm; 2 = < 5 mm; 3 = < 6 mm; 4 =  $\geq$  6 mm). In der vorliegenden Studie wurde neben dem horizontalen Durchmesser auch der maximale vertikale Durchmesser und die resultierende Gesamtfläche (mm<sup>2</sup>) ermittelt und um eine deskriptive Beschreibung der Zystenformen ergänzt (CTAnalyser, SkyScan).

Intraläsionale Osteophyten sind als Knochenneubildungen apikal der ursprünglichen Zementlinie definiert, die über das knorpelige Reparaturgewebe hinausragen.<sup>47</sup> Bei Auftreten wurde die zentrale (zwischen Mikrofrakturlöchern gelegen) oder periphere (zwischen Mikrofrakturloch und Defektgrenze gelegen) Lage und Höhe sowie maximale Breite (beides in mm) der Osteophyten unterschieden.

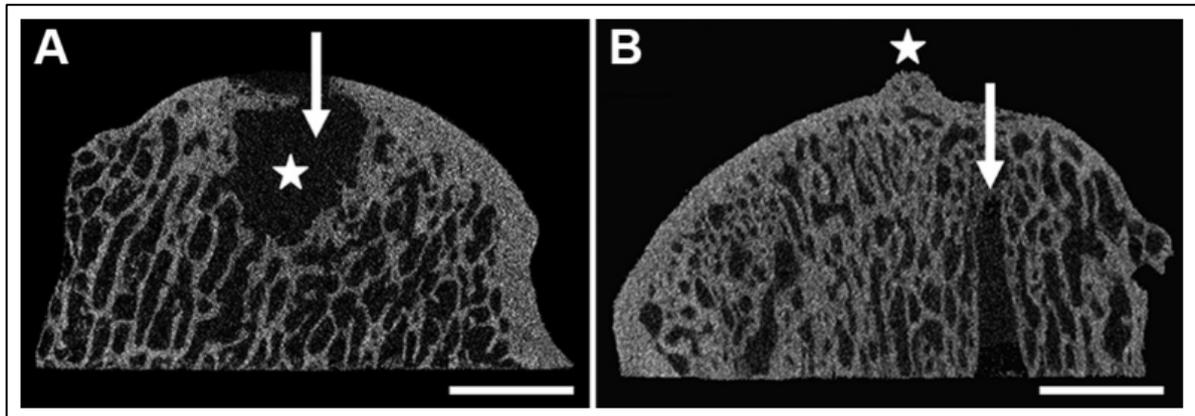


Abbildung 8: Subchondrale Knochenzyste und intraläsionaler Osteophyt. Bildquelle: Orth *et al.*, 2016. Mikro-CT Darstellung einer subchondralen Knochenzyste (Stern) in (A) und eines intraläsionalen Osteophyten (Stern) in (B). Die Pfeile zeigen in die Richtung der ursprünglichen Mikrofrakturlöcher. Maßstabbalken: 4,0 mm.

### 5.6.3. Standardisierte Definition der *volumes of interest*

Um die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens zu untersuchen, wurden sechs standardisierte *regions of interest* (ROI) definiert und nach der 3D-Untersuchung durch das Mikro-CT in sechs *volumes of interest* (VOI) umgesetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CTAnalyzer (Skyscan) (Abbildung 9). Für die subchondrale Knochenlamelle wurde folgende VOI entwickelt: Subchondrale Knochenlamelle-Defekt (SKD), Subchondrale Knochenlamelle-medial angrenzend (SKM) und subchondrale Knochenlamelle-lateral angrenzend (SKL). Das VOI SKD umfasste ausschließlich den Bereich des Defektes innerhalb der subchondralen Knochenlamelle. SKM und SKL grenzten jeweils medial und lateral an SKD; die Daten wurden in der Auswertung als Subchondrale Knochenlamelle-angrenzend (SKA) zusammengefasst.

Die VOI des subartikulären Knochens orientierten sich nach apikal an der Zementlinie und nach basal entsprechend der Mikrofrakturbehandlungs-Eindringtiefe (5,0 mm). Analog zur subchondralen Knochenlamelle wurden auch die VOI für die subartikuläre Spongiosa definiert. Subartikulärer Spongiosa-Defekt (SSD) war ausschließlich auf die Defektzone des trabekulären Knochens beschränkt. Subartikulärer Spongiosa-medial (SSM) und -lateral (SSL) wurden zu Subartikulärer Spongiosa-angrenzend (SSA) zusammengefasst. Beim Einzeichnen wurde

ein Überlappen der VOI vermieden. Die Randzonen der VOI verliefen parallel zueinander (Abbildung 9).

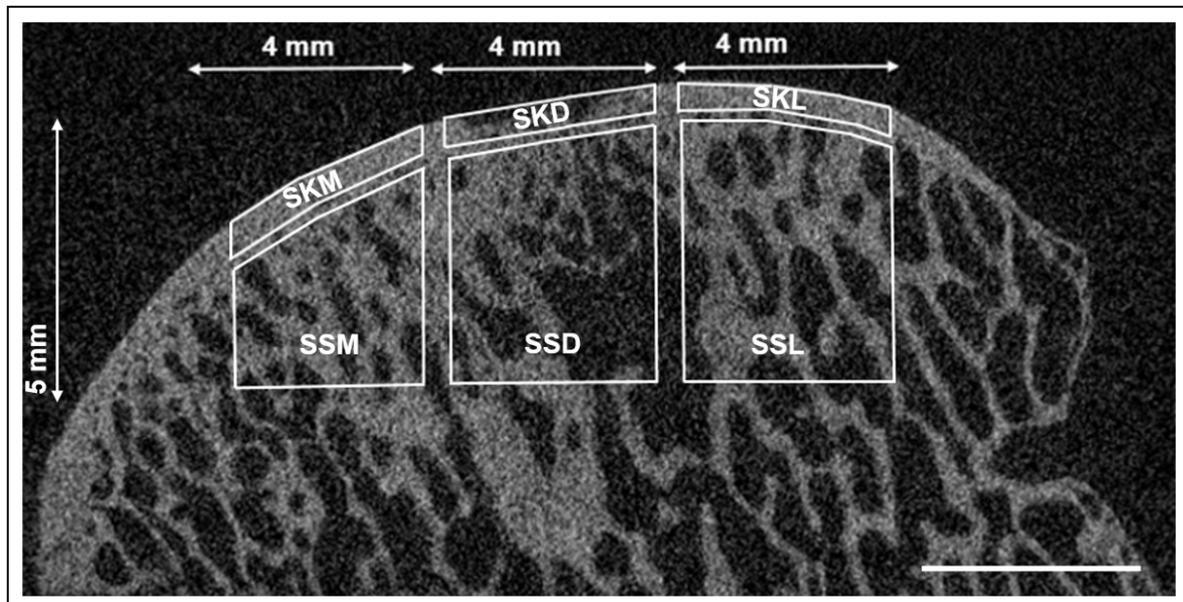


Abbildung 9: *Region of interest* einer medialen Femurkondyle. Die Definition standardisierter ROI diente der Auswertung von subchondralen Knochenveränderungen mittels Mikro-CT nach Mikrofrakturbehandlung oder alleinigem Débridement. In dieser Abbildung ist eine mediale Femurkondyle nach Mikrofrakturbehandlungen dargestellt. ROI: *Region of interest*; SKM: Subchondrale Knochenlamelle-medial; SSM: Subartikuläre Spongiosa-medial; SKD: Subchondrale Knochenlamelle-Defekt; SSD: Subartikuläre Spongiosa-Defekt; SKL: Subchondrale Knochenlamelle-lateral; SSL: Subartikuläre Spongiosa-lateral. Maßstab: 4,0 mm.

#### 5.6.4. Mikro-CT-Parameter

Alle Mikro-CT-Parameter wurden mit dem Computerprogramm CTAnalyzer (Skyscan) berechnet. Folgende Parameter wurden für alle VOI ermittelt: Knochenmineraldichte (BMD), Knochenvolumenanteil (BV/TV), Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis (BS/BV) und Knochenoberflächendichte (BS/TV). Die kortikale Dicke (Ct. Th) wurde nur innerhalb der subchondralen Knochenlamelle (SKD, SKA) analysiert. Die Trabekeldicke (Tb. Th), der Trabekelabstand (Tb. Sp), der trabekuläre Knochen-Anordnungsfaktor (Tb. Pf), die Trabekelanzahl (Tb. N), der Struktur-Model-Index (SMI), der Grad der Anisotropie (DA) und die fraktale Dimension (FD) wurden nur innerhalb der subartikulären Spongiosa (SSD, SSA) kalkuliert.

## 5.7. Histologische Analysen

### 5.7.1. Lagerung und Entkalkung

Nach Fixierung der Kondylen in Formaldehyd für 24 h erfolgte ein Transfer in Entkalker-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 1; 25-30 ml/*falcon tube*). Die Dauer der Entkalkung betrug insgesamt vier Wochen, wobei wöchentlich die Entkalkerlösung gewechselt wurde. Sukzessive konnten die Kondylen mit einem Skalpell unter Schonung der Defektregionen verkleinert werden. Nach vier Wochen und palpatorisch ausreichender Entkalkung wurden die Kondylen in 70%iges Ethanol überführt.

### 5.7.2. Entwässerung und Einbetten

Die Kondylen wurden über Nacht in *aqua bidestillata* gelegt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 2 x 95%, 100%, jeweils 1 h) entwässert, über Nacht in Ethanol (100%) gelagert und am nächsten Tag für je zweimal 1 h in Xylol (100%) überführt. Anschließend wurden die Proben mit einem Paraffin-Xylol-Gemisch (1:1) für je zweimal 1 h bedeckt und über Nacht in reinem Paraffin (62 °C) inkubiert. Die Einbettung der Kondylen erfolgte zentral in Paraffin-gefüllte Metallkassetten.

### 5.7.3. Schneiden

Nach Aushärtung der Proben über Nacht wurden mittels eines Rotationsmikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Es wurden 10-20 Schnitte pro Defekt angefertigt. Die Schnitte wurden dann in ein Wasserbad (24 °C) gelegt, auf einen Lysin-beschichteten Objektträger überführt und ruhten für 20 Min. auf einer Wärmeplatte (42 °C) bis sie schließlich im Wärmeschrank (62 °C) über Nacht aushärteten.

### 5.7.4. Safranin-O/Echtgrün-Färbung

Die Safranin-O/Echtgrün-Färbung war die Grundlage der histologischen Evaluation der Präparate durch die Bewertungssysteme nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> und Little *et al.*<sup>132</sup> Durch kationische Farbstoffmoleküle der Safranin-O/Echtgrün-Färbung lassen sich Proteoglykane (anionische Seitenketten) der Knorpelmatrix orange-rot darstellen. Zell-Nukleoli werden schwarz und Zytoplasma grau-grün angefärbt. Die Farbintensität verhält sich in normalem Knorpelgewebe proportional zum Proteoglykan- und Glykosaminoglykan-Gehalt.<sup>133</sup>

Die folgenden Schritte wurden alle in 200 ml Glasbehältnissen durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Entparaffinisierung durch Xylol (2 x 5 Min.) und eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 95%, 1 x 80%, jeweils 2,5 Min.). Vor und nach der Färbung mit Hämatoxylin nach Harris (10 Min.) wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült, dann in Salzsäure (1%) 2-3 Sekunden differenziert und in vorgewärmtem Leitungswasser (62 °C) gebläut. Die Färbung wurde anhand eines standardisierten Protokolls nach Schmitz *et al.*<sup>134</sup> durchgeführt. Vor und nach der Färbung mit Hämatoxylin (10 Min.) wurden die Präparate in Leitungswasser eingetaucht. Sie wurden mit Echtgrün (0,02%; 4 Min.) gefärbt und dreimal in Essigsäure (1%) differenziert. Anschließend wurden die Schnitte mit Safranin-O (1%, 5 Min.) angefärbt und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1 x 80%, 2 x 95%, 2 x 100%, jeweils 2,5 Min.) und Xylol (2 x 5 Min.) dehydriert. Die Schnitte wurden eingedeckt (Roti-Histokitt II, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und verblieben zum Austrocknen über Nacht im Wärmeschrank (62 °C).

#### 5.7.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der basophile Farbstoff Hämatoxylin färbt Zell-Nukleoli blau-lila, der azidophile Farbstoff Eosin färbt die Knorpelmatrix rosa und Gewebeanteile mit hohem Proteoglykangehalt blau.<sup>134</sup> Im ersten Schritt erfolgten die Entparaffinisierung und Hydrierung wie unter 5.6.4 beschrieben. Dann wurden die Schnitte mit Eosin (2-3 Tropfen in 3% Essigsäure) für 3-5 Min. koloriert und wie unter 5.6.4 beschrieben, dehydriert, eingedeckt und ausgehärtet. Die durch Hämatoxylin und Eosin angefärbten Schnitte wurden zur genaueren Beurteilung der Zellmorphologie hinzugezogen.

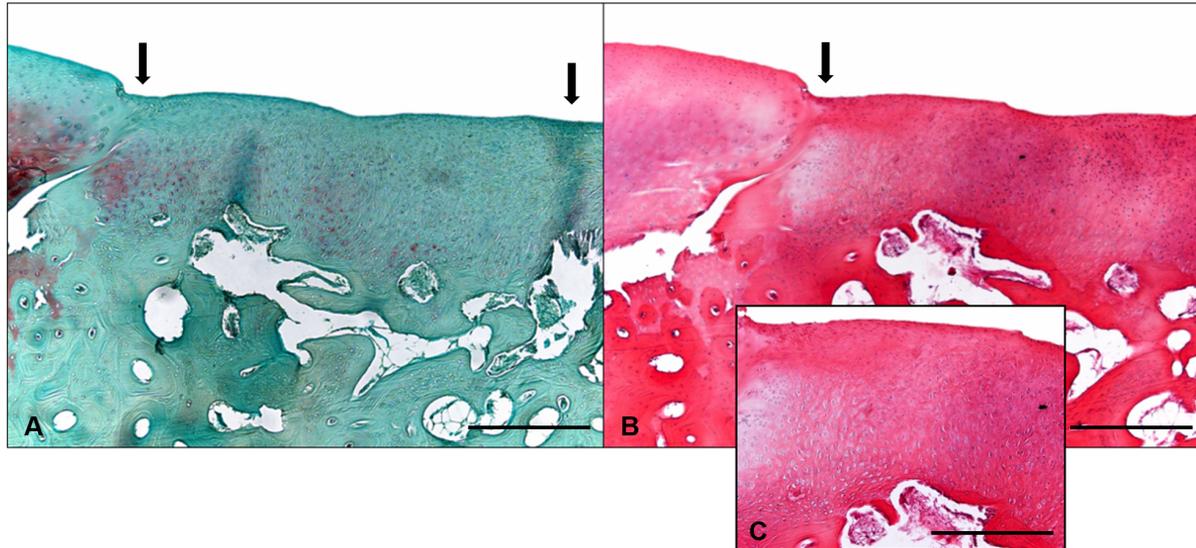


Abbildung 10: Histologische Färbungen des Defektbereiches einer medialen Femurkondyle. (A) Safranin - O/Echtgrün-Färbung des Defektbereiches einer medialen Femurkondyle in 40-facher Vergrößerung. (B) Hämatoxylin-Eosin-Färbung desselben Präparates in 40-facher und 10-facher Vergrößerung (C). Maßstabbalken: 1,0 mm (40 x). Die Pfeile zeigen die Defektgrenzen.

## 5.7.6. Evaluation

### 5.7.6.1. Semiquantitative Evaluation des Reparaturgewebes

Die histologische Beurteilung des Reparaturgewebes erfolgte mithilfe des inversen Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> (maximal 14 Punkte = keine Knorpelreparatur, 0 Punkte = vollständige Knorpelreparatur). Dabei wurden 24 Defektregionen mit insgesamt 158 Safranin-O gefärbten Schnitten (6-7 Schnitte pro Defekt) durch zwei unabhängige Untersucher bei 20- und 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop BX-45 (Olympus, Hamburg, Deutschland) verblindet beurteilt.

Tabelle 6: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung des Knorpelreparaturgewebes. (in Anlehnung an Wakitani *et al.*, 1994)

| Kategorie   | Parameter                                 | Punkte |
|---|---|--------|
| Zellmorphologie (im Vergleich zum angrenzenden Knorpelgewebe)                                     | Hyaliner Knorpel                          | 0      |
|   | Vorwiegend hyaliner Knorpel               | 1      |
|   | Vorwiegend Faserknorpel                   | 2      |
|   | Vorwiegend-Nicht-Knorpelgewebe            | 3      |
|   | Keinerlei Knorpelgewebe                   | 4      |
| Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O (im Vergleich zum angrenzenden Knorpelgewebe)                  | Normal                                    | 0      |
|   | Leicht vermindert                         | 1      |
|   | Deutlich vermindert                       | 2      |
|   | Keine Färbung                             | 3      |
| Oberflächenbeschaffenheit (Anteil der glatten Oberfläche im Vergleich zum gesamten Defektbereich) | Glatt ( $> \frac{3}{4}$ )                 | 0      |
|   | Moderat ( $> \frac{1}{2} - \frac{3}{4}$ ) | 1      |
|   | Irregulär ( $\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$ ) | 2      |
|   | Massiv irregulär ( $< \frac{1}{4}$ )      | 3      |
| Knorpeldicke des Reparaturgewebes (im Vergleich zum angrenzenden Knorpelgewebe)                   | $> \frac{2}{3}$                           | 0      |
|   | $\frac{1}{3} - \frac{2}{3}$               | 1      |
|   | $< \frac{1}{3}$                           | 2      |
| Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden Knorpel                                     | Beide Seiten integriert                   | 0      |
|   | Eine Seite integriert                     | 1      |
|   | Keine Seite integriert                    | 2      |
| Maximale Punktzahl  |   | 14     |

### 5.7.6.2. Semiquantitative Evaluation degenerativer Veränderungen des angrenzenden Knorpels

Die mikroskopische Beurteilung degenerativer Veränderungen des angrenzenden Knorpels erfolgte mithilfe des inversen Bewertungssystem nach Little *et al.*<sup>132</sup> (maximal 25 Punkte = schwerwiegende Degeneration, 0 Punkte = normaler Knorpel). Es wurden jeweils drei histologische Schnitte aus den Defektzentren aller 24 Kondylen mit Safranin-O gefärbt. Der medial angrenzende Knorpel wurde 3 mm ab Defektgrenze durch zwei unabhängige Untersucher bei

20- und 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop BX-45 (Olympus, Hamburg, Deutschland) verblindet beurteilt.

Tabelle 7: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung des angrenzenden Knorpelgewebes. (Little *et al.*, 2010)

| <i>Kategorie</i>   | <i>Parameter</i>  | <i>Punkte</i> |
|--|---|---------------|
| Struktur (Beurteilung des schlechtesten Bereiches im Sichtfenster)                             | Normal  | 0             |
|  | Leichte Oberflächenunregelmäßigkeiten   | 1             |
|  | Mäßige Oberflächenunregelmäßigkeiten  | 2             |
|  | Schwere Oberflächenunregelmäßigkeiten (Fissuren/Fibrillationen < 10% der Tiefe) | 3             |
|  | Fissuren bis in Übergangszone ( $\frac{1}{3}$ der Tiefe)                        | 4             |
|  | Fissuren bis in Radiärzone ( $\frac{2}{3}$ der Tiefe)                           | 5             |
|  | Fissuren bis in Mineralisationszone (volle Tiefe)                               | 6             |
|  | Erosionen oder schwere Fibrillationen bis $\frac{1}{3}$ der Tiefe               | 7             |
|  | Erosionen oder schwere Fibrillationen bis $\frac{2}{3}$ der Tiefe               | 8             |
|  | Erosionen oder schwere Fibrillationen bis in Mineralisationszone                | 9             |
| Chondrozytenzahl (in nicht-kalzifizierten Knorpel)   | Normal  | 0             |
|  | Leichte Abnahme   | 1             |
|  | Mäßige Abnahme  | 2             |
|  | Schwere Abnahme   | 3             |
|  | Keine Zellen  | 4             |
| Zellklonierungen   | Normal  | 0             |
|  | Einige Duplets  | 1             |
|  | Viele Duplets   | 2             |
|  | Duplets und Triplets  | 3             |
|  | Viele Zellnester oder keine Zellen (im Sichtfeld)                               | 4             |
| Interterritoriale Safranin-O-Färbung (Beurteilung des schlechtesten Bereiches im Sichtfenster) | Normal  | 0             |
|  | Verringerte Anfärbbarkeit bis $\frac{1}{3}$ der Tiefe                           | 1             |
|  | Verringerte Anfärbbarkeit bis $\frac{2}{3}$ der Tiefe                           | 2             |
|  | Verringerte Anfärbbarkeit bis in Mineralisationszone                            | 3             |

| Kategorie  | Parameter   | Punkte |
|--|---|--------|
|  | Keine Anfärbarkeit  | 4      |
| Grenzlinie/Mineralisationszone/Subchondraler Knochen | Intakte subchondrale Knochenlamelle und einfache Grenzlinie                             | 0      |
|  | Intakte subchondrale Knochenlamelle und doppelte Grenzlinie                             | 1      |
|  | Vordringen von Blutgefäßen durch subchondrale Knochenlamelle bis in Mineralisationszone | 2      |
|  | Vordringen von Blutgefäßen bis zur Grenzlinie   | 3      |
| Maximale Punktzahl                                   |   | 25     |

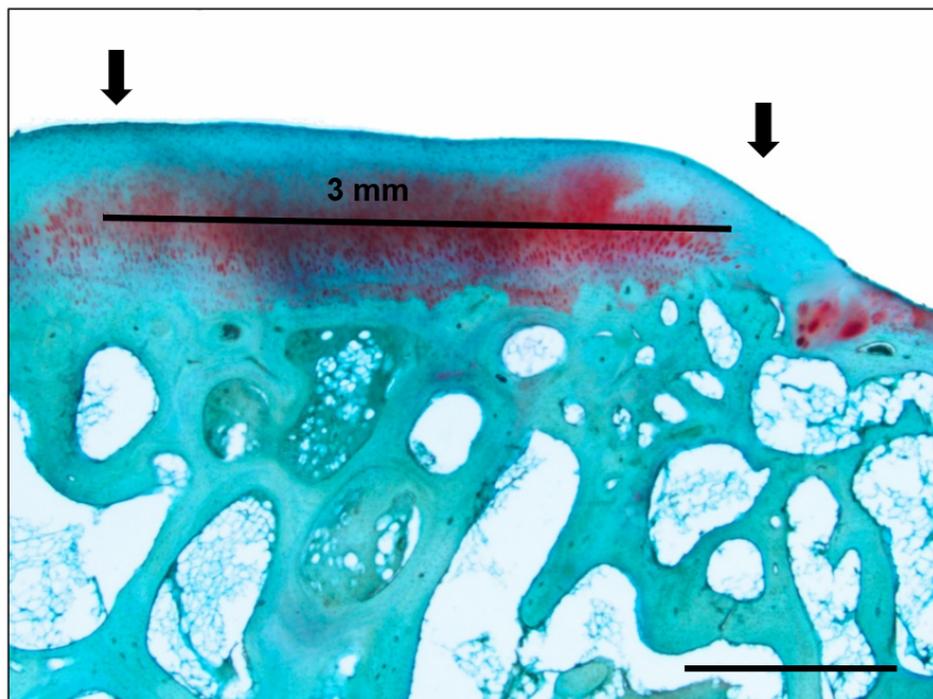


Abbildung 11: Safranin-O/Echtgrün-Färbung des angrenzenden Knorpelgewebes einer medialen Femurkondyle. Safranin-O/Echtgrün-Färbung des angrenzenden Knorpelgewebes einer medialen Femurkondyle in 40-facher Vergrößerung. Zwei Pfeile markieren ab der Integrationszone des Reparaturknorpels (rechter Pfeil; Reparaturknorpel rechts davon) den zu untersuchenden, angrenzenden Knorpel (3 mm). Maßstabballen: 1,0 mm.

### 5.7.6.3. Evaluation eines *post mortem* Débridement

Eine adulte und eine juvenile Schaf-Trochlea (Herkunft: Globus Frischemarkt, Homburg-Einöd) dienten der genauen histologischen Analyse des Débridements. Das Débridement wurde, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, durch Herrn Prof. P. Orth durchgeführt. Danach wurden die Kondylen entwässert und eingebettet (Kapitel 5.6.1), im Rotationsmikrotom geschnitten (Kapitel 5.6.3) und anschließend einer Safranin-O/Echtgrün-Färbung unterzogen (Kapitel

5.6.5). Zwei unabhängige Untersucher beurteilten bei 20- und 40-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop BX-45 (Olympus, Hamburg, Deutschland) die Eindringtiefe des Débridements und Veränderungen des subchondralen Knochens durch die Kürette.

## 5.8. Biochemische Analysen

Zur biochemischen Auswertung diente einerseits Reparaturgewebe der proximalen Defekthälften und andererseits das proximal an das Defektareal angrenzende Knorpelgewebe (4 mm nach proximal). Jeder Kondyle wurden nach der Sektion der Tiere zwei Proben entnommen. In den insgesamt 48 Proben wurden der DNS-Gehalt/Zellzahl (DNS-Test, Hoechst 33258-Test), der Proteoglykan-Gehalt [Dimethylmethylenblau (DMMB)-Test] und der Protein-Anteil [*bicinchoninic acid* (BCA)-Test] bestimmt. Nach Entnahme lyophilisierten die Knorpelproben zunächst in Eppendorfröhrchen. Zur biochemischen Auswertung wurden die Proben bei 4 °C aufgetaut, einzeln durch eine Vortex-Maschine vermengt und anschließend dem Papain-Verdau zugeführt.

### 5.8.1. Papain-Verdau

Dabei handelt es sich um den enzymatischen Verdau von Knorpelgewebe. Glykosaminoglykane werden aus der extrazellulären Knorpelmatrix herausgelöst und so der photometrischen Bestimmung zugänglich gemacht.<sup>135,136</sup> 1 ml Papain-Lösung (25 mg/ml) wurde mit PBE verdünnt und jeweils 150 µl dieser Lösung (500 µg/ml) auf die Knorpelproben (n = 48) gegeben. Nachfolgend lagen die Proben für 24 h bei 65 °C im Wärmeschrank ein.<sup>137</sup>

### 5.8.2. DNS-Bestimmung (Hoechst 33258-Test)

Zu Beginn wurde eine Standardreihe A-D in Doppelbestimmung in einer schwarzen Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen angelegt. Die Volumina und Mengenangaben sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 8: Prinzip zur Herstellung der Standardreihe im Hoechst-Test.

| <i>Standard</i> | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | <i>D</i> |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| DNS-Standard    | 0 µl     | 5 µl     | 10 µl    | 20 µl    |
| TNE             | 100 µl   | 95 µl    | 90 µl    | 80 µl    |
| DNS-Gehalt      | 0 ng     | 50 ng    | 100 ng   | 200 ng   |

Die Standard DNS-Reihe (Kalb-Thymus-Typ-1, hochpolymerisiert, Sigma No. D-1501, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde jeweils mit TNE-Pufferlösung auf eine Gesamtmenge von 100 µl aufgefüllt. Pro Vertiefung kamen 50 µl des in Papain verdauten Reparaturgewebes bzw. Proben des angrenzenden Knorpels hinzugefügt und um jeweils 80 µl TNE-Puffer ergänzt. Im nächsten Schritt wurde der Hoechst-Farbstoff (Hoechst 33258, pentahydrate (bis-benzimide) FluoroPure grade, Invitrogen, Paisley, Vereinigtes Königreich) mit TNE-Puffer (lichtgeschützt) im Verhältnis 1:500 verdünnt. Jede Vertiefung erhielt 100 µl des verdünnten Hoechst-Farbstoffes.

Die Bestimmung des DNS-Gehaltes erfolgte durch Interkalation der Proben zwischen dem Hoechst-Farbstoff (Bisbenzimid) und den Basenpaaren Adenin/Thymin (Invitrogen L. *Hoechst Stains*; Thermo Fisher Scientific, Germany) Ein Photometer (GENios Microplate Reader, TECAN, Crailsheim, Deutschland) detektierte bei einer Exzitations-Wellenlänge von 360 nm die Emissionen der Wellenlänge 465 nm. Bei bekanntem DNS-Gehalt der Standards (Tabelle 8) wurden die Kalibrierungsgerade sowie die dazu gehörige Geradenformel ermittelt, um den DNS-Gehalt der einzelnen Proben berechnen zu können (Abbildung 12). Bei einem durchschnittlichen DNS-Gehalt von  $7,7 \pm 0,5$  pg DNS pro Chondrozyt<sup>138</sup> konnte schließlich auf die Zellzahl im Knorpelgewebe des Reparaturgewebes und des angrenzenden Knorpels extrapoliert werden.

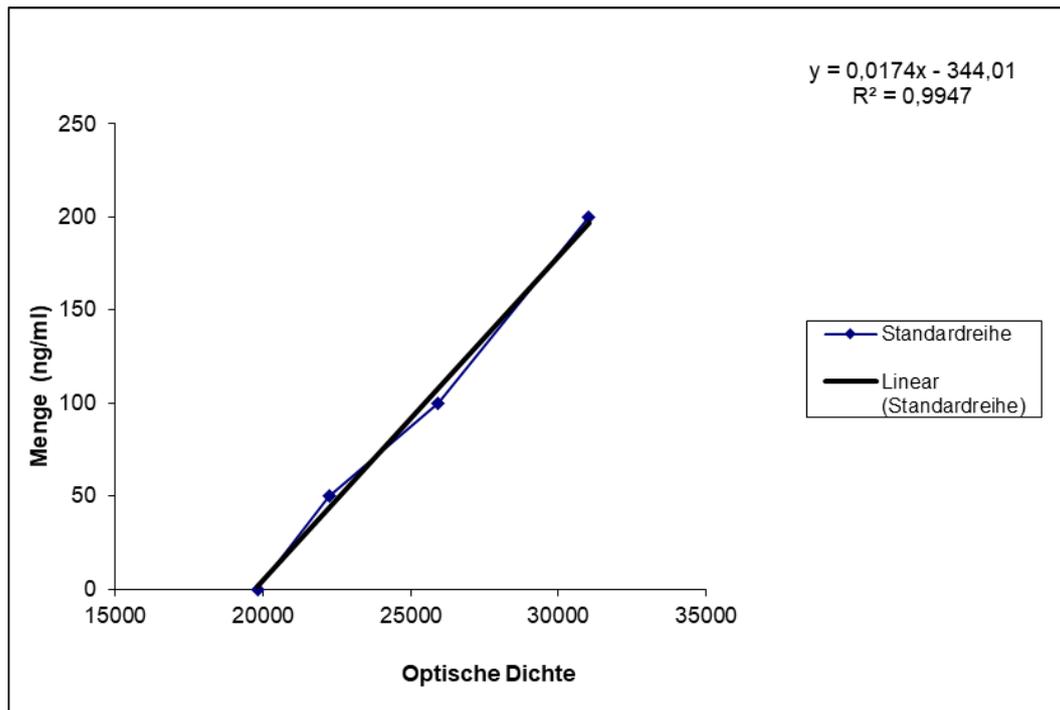


Abbildung 12: Beispiel einer Kalibrierungsgerade des Hoechst-Tests.

### 5.8.3. Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)

Der Dimethylmethylenblau (DMMB)-Test ermittelt spezifisch die quantitative Ausfällung von Proteoglykanen mithilfe ihrer sulfatierten Glykosamino-Seitenketten durch spektrophotometrischen DMMB-Verbrauch (Blaufärbung) bei einer Absorption von 530 nm.<sup>136</sup> Die photometrische Detektion von Chondroitinsulfat und Proteoglykanen ist dabei vergleichbar.<sup>139</sup> 16 mg DMMB kamen in 5 ml 95%-iges Ethanol unter Hinzugabe von 3 ml Ameisensäure und 25,6 ml Natriumhydroxid. Die Lösung wurde mit *aqua bidestillata* zu einem Gesamtvolumen von 1,0 l aufgefüllt (pH 3,5; lichtgeschützt). Die Herstellung der Standardreihe erfolgte unter Ansetzung von drei Lösungen: Lösung A bestand aus 0,05 g D-Cysteinhydrochloridmonohydrat und 30 ml PBE, Lösung B aus 0,053 g Chondroitin-6-sulfat-natriumsalz und 1 ml aus Lösung A, Lösung C setzte sich aus 24,95 ml der Lösung A und 0,05 ml der Lösung B zusammen.

In einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen erfolgte die Anlegung einer doppelten Standardreihe von A-F (jeweils 40 µl Standard/Vertiefung) (Tabelle 9). Jede Vertiefung erhielt jeweils 250 µl DMMB. 10 µl jeder Papain-verdauter Knorpelprobe wurde mit jeweils 30 µl der Lösung A und 250 µl DMMB in die weiteren Vertiefungen gefüllt. Der Photometer (GENios Microplate Reader, TECAN) maß die Absorption der Blaufärbung bei 530 nm.<sup>136</sup> Mithilfe

der Standardwerte wurde eine Kalibrierungsgerade ermittelt. Anhand der Steigungsformel konnte die Proteoglykan-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

Tabelle 9: Prinzip zur Herstellung der Standardreihe im DMMB-Test.

| <i>Standard</i> | <i>Lösung A</i> | <i>Lösung C</i> | <i>Chondroitin-Konzentration</i> |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| A               | 0 µl            | 40 µl           | 100 µg/ml                        |
| B               | 8 µl            | 32 µl           | 80 µg/ml                         |
| C               | 16 µl           | 24 µl           | 60 µg/ml                         |
| D               | 24 µl           | 16 µl           | 40 µg/ml                         |
| E               | 32 µl           | 8 µl            | 20 µg/ml                         |
| F               | 40 µl           | 0 µl            | 0 µg/ml                          |

#### 5.8.4. Proteingehalt-Bestimmung (*bicinchoninic acid protein-test*; BCA-Test)

Der BCA-Test dient der photometrischen Bestimmung und Quantifizierung des Gesamt-Proteingehaltes im Vergleich zu einem Proteinstandard. Hierbei wird zweiwertiges Kupfer mithilfe der Proteine in der Papain verdauten Knorpel-Lösung in alkalischer Lösung zu einwertigem Kupfer reduziert. Diese ergeben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm photometrisch nachgewiesen werden kann.<sup>140</sup>

Das Pierce BCA-Protein-Protokoll (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) war die Richtlinie für den BCA-Test. In einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde zunächst eine doppelte Standardreihe A-I angelegt (Tabelle 10). Als Stammprotein diente Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) in einer Konzentration von 2 mg/ml. Mit jeweils 25 µl der Standardlösungen A-I wurde eine Doppelstandardreihe erstellt.

Tabelle 10: Prinzip zur Herstellung der Standardreihe im BCA-Test.

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

In die Vertiefungen wurden jeweils 5 µl der durch Papain verdauten Knorpellösung gegeben und diese sowie die Standardreihe um 200 µl Arbeitsreagenz ergänzt. Die Vorbereitung der Arbeitsreagenzien BCA Reagenz A (500 ml beinhaltenen Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natronlauge) und BCA Reagenz B (25 ml, 4% Kupfersulfat) erfolgten in einem Mischungsverhältnis von 50:1 (196 µl BCA Reagenz A und 4 µl BCA Reagenz B). Die Mikrotiterplatte wurde für 30 Sekunden auf eine Schüttelplatte gestellt, bei 37 °C im Wärmeschrank für 30 Min. inkubiert und danach bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Absorption des violetten Farbstoffes maß der Photometer (GENios Microplate Reader, TECAN) bei einer Wellenlänge von 530 nm. Anhand der Absorptionswerte konnte eine Kalibrierungsgerade errechnet und mit deren Steigungsformel der Proteingehalt der Knorpelproben bestimmt werden.

## 5.9. Immunhistochemische Analyse

### 5.9.1. Typ-I- und Typ-II-Kollagen

Die histologischen Schnitte (n = 24) wurden entparaffinisiert (2 x 5 Min. in Xylol) und in absteigenden Alkoholreihen dehydriert (2 x 100%, 2 x 95%, 2 x 80% Ethanol, jeweils 1 Min.). Hier-nach wurden diese zweimal 1 Min. in Leitungswasser gewaschen und in 0,3%ige Wasserstoff-peroxid-Lösung (200 ml Leitungswasser; 0,6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) überführt. Danach lagen die Schnitte 30 Min. bei Raumtemperatur ein, zweimal 5 Min. mit PBS-Lösung gespült, mit 0,1%iger Trypsin-Lösung (200 ml Leitungswasser; 200 µl Trypsin) bei 37 °C im Inkubator angedaut,

zweimal 5 Min. mit PBS-Lösung gespült und dann in Blockierungspuffer (200 ml PBS, 6 ml BSA, Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Min.) eingetaucht. Anschließend wurden die Präparate in eine Nasskammer gelegt und bei 1 h Raumtemperatur mit primärem monoklonalen Anti-Typ-I-Kollagen-Antikörpern (Abcam plc, Cambridge, Vereinigtes Königreich; Verdünnung 1:200 in Blockierungspuffer) bzw. Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörpern (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland; Verdünnung 1:200 in Blockierungspuffer) inkubiert. Die Präparate wurden im Anschluss zweimal 5 Min. mit PBS-Lösung gespült und mit einem sekundären Antikörper (biotinylierter Anti-Mouse IgG-Antikörper, Vector, Burlingame, CA, USA; Verdünnung 1:200 in PBS-Lösung) für 1 h bei Raumtemperatur in der Nasskammer bedeckt, inkubiert und der Überschuss danach durch Spülung in PBS-Lösung (dreimal 5 Min.) entfernt. Nach 45 Min. Einwirkzeit des zweiten biotinylierten Antikörpers wurde nach Angaben des Herstellers das ABC-Reagenz vorbereitet. Nach Spülung der Schnitte mit PBS-Lösung (dreimal 5 Min.) wurden jeweils 200 µl des ABC-Reagenz auf die Schnitte in der Nasskammer gegeben und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde eine erneute Spülung mit PBS-Lösung (dreimal 5 Min.) durchgeführt, die Präparate 7 Min. in der Nasskammer, mit der nach Herstellerangaben zubereiteten DAB-Lösung (je 200 µl) inkubiert und nochmals in PBS-Lösung (dreimal 5 Min.) gespült. Zuletzt folgte eine Entwässerung im Wasserbad mit Leitungswasser (1 Min.) und die Eindeckung der Präparate (siehe 5.7.4.). Das Anheften der Peroxidase des ABC-Reagenz an den sekundären Antikörper bewirkte eine Braunfärbung der nachzuweisenden Kollagene. Die Intensität der Farbreaktion war proportional zu der Konzentration des jeweiligen Kollagen-Typs.

### 5.9.2. Semiquantitative Analyse der Immunreaktion von Typ-I- und Typ-II-Kollagen

Zur Beurteilung der Immunreaktion gegen Typ-I- und Typ-II-Kollagen wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem<sup>141</sup> genutzt. Für beide Kollagen-Typen wurde das folgende Bewertungssystem genutzt: 0 = keine Immunreaktion, 1 = erheblich schwächere Immunreaktion, 2 = mäßig schwächere Immunreaktion, 3 = gleiche Immunreaktion, 4 = stärkere Immunreaktion im Vergleich zur internen Positivkontrolle (Tabelle 11). Die Farbreaktion vom Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe des Defektes wurde mit der Reaktion des angrenzenden subchondralen Knochens (Positivkontrolle) verglichen. Als Negativkontrolle trat hier der angrenzende Gelenkknorpel auf. Die Reaktion vom Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe des Defektes wurde mit der Reaktion des angrenzenden Gelenkknorpels (Positivkontrolle) verglichen. Hier diente der angrenzende subchondrale Knochen als Negativkontrolle. Pro Tier wurde ein histologischer Schnitt bei 20-facher und 40-facher Vergrößerung durch zwei verblindete Untersucher ausgewertet.

Tabelle 11: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktion von Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Vergleich zur internen Positivkontrolle. (Orth *et al.*, 2011)

| <i>Intensität der Immunreaktion</i> | <i>Punkte</i> |
|-------------------------------------|---------------|
| Keine Immunreaktion                 | 0             |
| Erheblich schwächere Immunreaktion  | 1             |
| Mäßig schwächere Immunreaktion      | 2             |
| Gleiche Immunreaktion               | 3             |
| Stärkere Immunreaktion              | 4             |

## 5.10. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D. Zurakowski, Ph.D., Department of Biostatistics, Children's Hospital, Harvard University (Boston, MA, USA) mithilfe der SPSS-Software (Version 21.0). P-Werte  $< 0,05$  (5%) galten in der vorliegenden Studie als statistisch signifikant. Die histologischen Ergebnisse nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> und Little *et al.*<sup>132</sup> zeigten bei der Durchführung des Kolmogorow-Smirnow-Tests keine Normalverteilung. In diesen Fällen wurden die Ergebnisse als Median und Interquartilbereich angegeben. Die restlichen Datensätze folgten einer Normalverteilung und wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Für normalverteilte Daten wurden Mittelwertvergleiche mit einem linearen gemischten Regressionsmodell (*mixed model*) (MIXED *procedure*; SPSS-Version 21.0, SPSS Inc.) durchgeführt. Dies ermöglichte die Korrelation innerhalb eines Tieres sowie der alternierenden Behandlung von linker und rechter Seite. Die Abschätzung der Modellparameter wurde mit der eingeschränkten *maximum-likelihood*-Methode durchgeführt. Mithilfe der Satterthwaite-Approximationsmethode konnten die Nennwerte der Freiheitsgrade in MIXED *procedure* geschätzt werden. Für Vergleichsanalysen zwischen den drei Gruppen wurden übergreifende F-Tests durchgeführt. Paarweise Vergleiche zwischen einzelnen Gruppen konnten nur realisiert werden, wenn die Gesamttests basierend auf dem Ansatz der *Fisher's Least Significant Difference* auf der Ebene des zweiseitigen P-Wertes signifikant ( $< 0,05$ ) waren.

Datensätze ohne Normalverteilung (die Ergebnisse der histologischen Begutachtung durch Wakitani *et al.*<sup>131</sup> und Little *et al.*<sup>132</sup>) wurden durch den Kruskal-Wallis-H-Test analysiert, um beide Behandlungsgruppen und die Gruppe des alleinigen Débridements insgesamt sowie für jeden Parameter einzeln zu vergleichen. Der Mann-Whitney-U-Test wurde herangezogen, um individuelle Unterschiede zwischen den Gruppen zu prüfen. Bezüglich der Inzidenz von Zysten- und Osteophytenbildung wurden die Gruppen mithilfe des Chi-Quadrat-Tests verglichen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Reparatur des Gelenkknorpels

#### 6.1.1. Makroskopische Bewertung

Sechs Monate postoperativ wurden die drei Vergleichsgruppen (jeweils 8 Kondylen) anhand des makroskopischen Bewertungssystems nach Goebel *et al.*<sup>126</sup> ausgewertet (Abbildung 13). Die Farbe des Reparaturgewebes variierte von hyalin/weiß bis zu nicht vorhandenem Reparaturgewebe. Durchsichtiges Reparaturgewebe (Punktzahl 3) war in keinem Fall zu finden. Blutgefäße waren selten sichtbar, Oberflächenbeschaffenheit und Defektfüllung variierten zwischen den Defekten. Eine Schädigung der angrenzenden subchondralen Einheit konnte in keinem Tier makroskopisch nachgewiesen werden. Die Gesamtpunktzahlen und die Punktwerte der Einzelkategorien wiesen zwischen beiden Gruppen der Mikrofrakturbehandlung und der Débridement-Gruppe keine signifikanten Unterschiede auf (1,0 mm-Ahlen:  $8,88 \pm 1,49$ ; 1,2 mm-Ahlen:  $9,25 \pm 0,84$ ; Débridement:  $9,25 \pm 1,01$ ;  $P = 0,704$ ) (Abbildung 13).

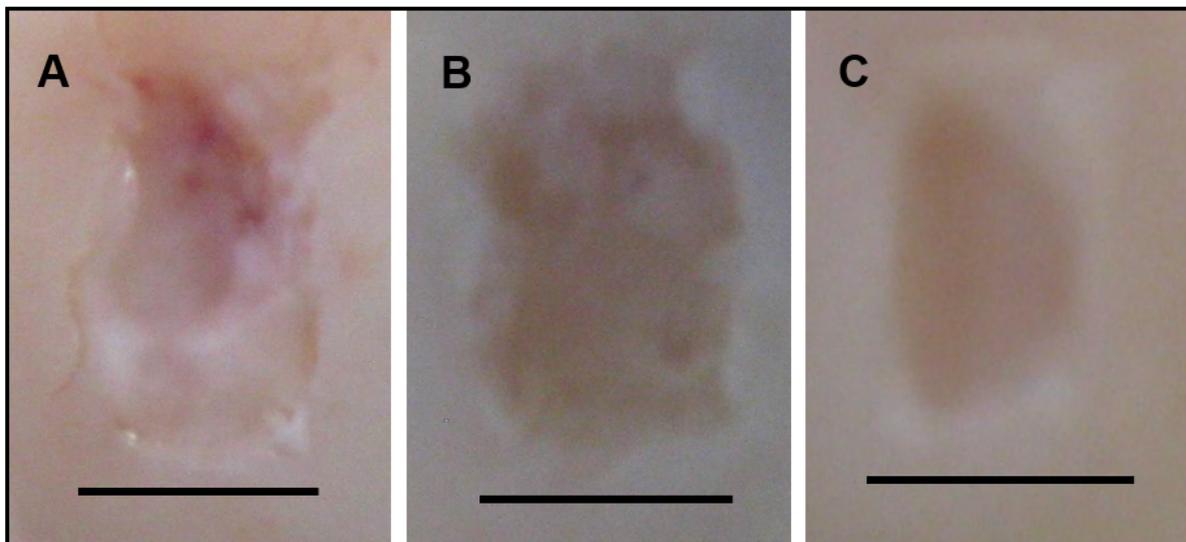


Abbildung 13: Ergebnisse der makroskopischen Bewertung. Verwendet wurde das Bewertungssystem nach Goebel *et al.*<sup>126</sup>. In (A) Darstellung einer linken Kondyle der 1,0 mm Mikrofrakturbehandlung-Gruppe, in (B) eine rechte Kondyle der 1,2 mm Mikrofrakturbehandlung-Gruppe und in (C) eine linke Kondyle der Kontroll-Gruppe. Die Bilder wurden anhand der jeweiligen Gruppen-Mittelwerte ausgewählt. Maßstabbalken: 5,0 mm.

### 6.1.2. Mikroskopische Bewertung

Die histologische Bewertung des Knorpelreparaturgewebes nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> zeigte im Vergleich beider Mikrofraktur-Gruppen gegenüber dem Débridement in der Kategorie Gesamtpunktwert eine signifikant bessere Gesamt-Knorpelreparatur nach Mikrofrakturbehandlung (Tabelle 12;  $P < 0,01$ ). Die Mikrofrakturierungs-Ahlen des kleineren Durchmessers (1,0 mm), wie auch die Ahlen größeren Durchmessers (1,2 mm) waren in allen Einzelkategorien dem Débridement überlegen (Tabelle 12). Im Vergleich zwischen beiden Mikrofraktur-Gruppen zeigte sich nach Anwendung des kleinen Ahlendurchmessers (1,0 mm) ein signifikant besserer Gesamtpunktwert ( $P = 0,007$ ). Dies ist zurückzuführen auf eine tendenziell verbesserte Matrixanfärbbarkeit ( $P = 0,325$ ) und Integration des Reparaturgewebes ( $P = 0,256$ ) in der 1,0 mm Gruppe sowie eine signifikant verbesserte Oberflächenbeschaffenheit ( $P = 0,001$ ) nach Anwendung der kleineren Ahlen.

Tabelle 12: Ergebnisse der histologischen Bewertung des Knorpelreparaturgewebes.

| Kategorie                            | Gruppe<br>1,0 mm | Gruppe<br>1,2 mm | Gruppe<br>Débridement | P-Wert<br>gesamt | P-Wert<br>spezifisch |
|--------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|
| Zellmorphologie                      | 2,0 (2,0-2,3)    | 2,0 (2,0-3,0)    | 4,0 (2,0-4,0)         | < 0,001          | # §                  |
| Matrixanfärbbarkeit                  | 2,5 (2,0-3,0)    | 2,7 (2,0-3,0)    | 3,0 (3,0-3,0)         | < 0,001          | # §                  |
| Oberfläche                           | 1,0 (0,3-1,7)    | 2,0 (1,9-2,5)    | 2,5 (1,0-3,0)         | < 0,001          | * #                  |
| Knorpeldicke                         | 1,0 (0,7-2,0)    | 1,0 (1,0-2,0)    | 2,0 (1,0-2,0)         | < 0,001          | # §                  |
| Integration mit angrenzendem Knorpel | 0,0 (0,0-1,0)    | 1,0 (0,0-1,0)    | 2,0 (0,3-2,0)         | < 0,001          | # §                  |
| Gesamtpunktwert                      | 7,5 (5,5-8,6)    | 8,7 (7,7-10,0)   | 13,5 (8,0-14,0)       | < 0,001          | * # §                |

Ergebnisse sind als Median (Interquartilabstand) angegeben. 0 Punkte = vollständige Knorpelreparatur; 14 Punkte = keine Knorpelreparatur. \*:  $P < 0,05$  für 1,0 mm versus 1,2 mm Ahle; #:  $P < 0,05$  für 1,0 mm Ahle versus Débridement; §:  $P < 0,05$  für 1,2 mm Ahle versus Débridement.

### 6.1.3. Bewertung des Débridement *post mortem*

In der histologischen Betrachtung der juvenilen Schaf-Trochlea wurde eine Eröffnung kleiner Kapillaren aus dem subchondralen Knochen sichtbar. Hier fiel das Débridement zu tief aus. In der adulten Schaf-Trochlea blieb nach einer zu oberflächlichen Präparation die kalzifizierte Knorpelschicht teilweise bestehen (Abbildung 14).

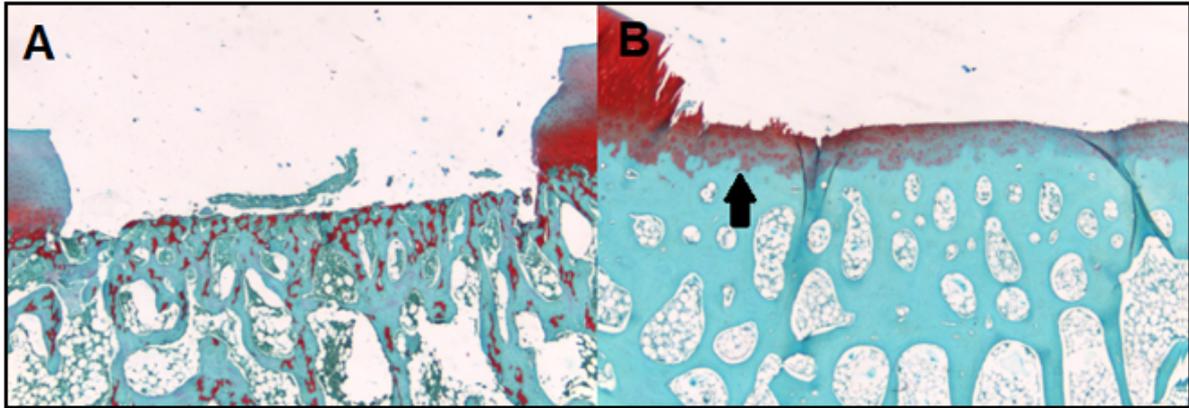


Abbildung 14: Safranin-O/Echtgrün-Färbung des Defektbereiches einer juvenilen und einer adulten Schaf-Trochlea *post mortem*. Débridement einer juvenilen (A) und einer adulten (B) Schaf-Trochlea *post mortem* zur weiterführenden Untersuchung eines korrekt durchgeführten Débridements. Der Pfeil in (B) kennzeichnet die kalzifizierte Knorpelschicht. Die Größe des Débridement betraf jeweils 32 mm<sup>2</sup>.

#### 6.1.4. Immunhistochemischer Nachweis von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe

Die Immunreaktivität auf Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe des Defektes im Vergleich mit der internen Positivkontrolle des angrenzenden Gelenkknorpels zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mikrofraktur-Behandlungsgruppen und dem alleinigen Débridement (1,0 mm-Ahlen:  $1,75 \pm 0,59$ ; 1,2 mm-Ahlen:  $2,13 \pm 0,64$ ; Débridement:  $0,75 \pm 0,53$ ;  $P$  (gesamt) = 0,167) (Abbildung 15).

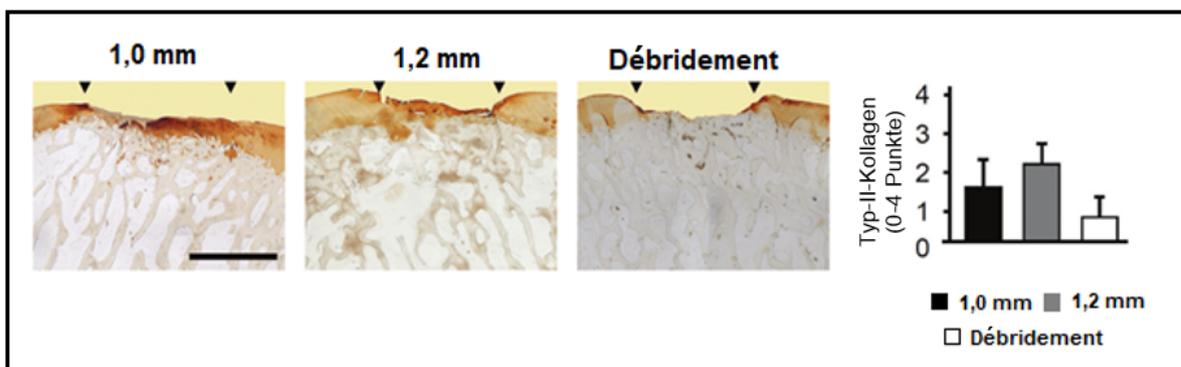


Abbildung 15: Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe. Bildquelle: in Anlehnung an Orth *et al.*, 2016. 0 Punkte = keine Immunreaktion; 4 Punkte = stärkere Immunreaktion im Vergleich zu internen Positivkontrollen. Die Immunreaktivität des Typ-II-Kollagens fiel zwischen den Mikrofrakturbehandlungs-Gruppen und der Gruppe des Débridements ähnlich aus. Pfeile: Defektgrenze. Maßstabballen: 2,0 mm.

### 6.1.5. Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe

Die Immunreaktivität auf Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe des Defektes im Vergleich mit der internalen Positivkontrolle der subchondralen Knochenlamelle zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der 1,0 mm- ( $0,25 \pm 0,16$ ), der 1,2 mm-Gruppe ( $0,88 \pm 0,44$ ) und dem Débridement ( $0,13 \pm 0,14$ ;  $P$  (gesamt) = 0,061) (Abbildung 16).

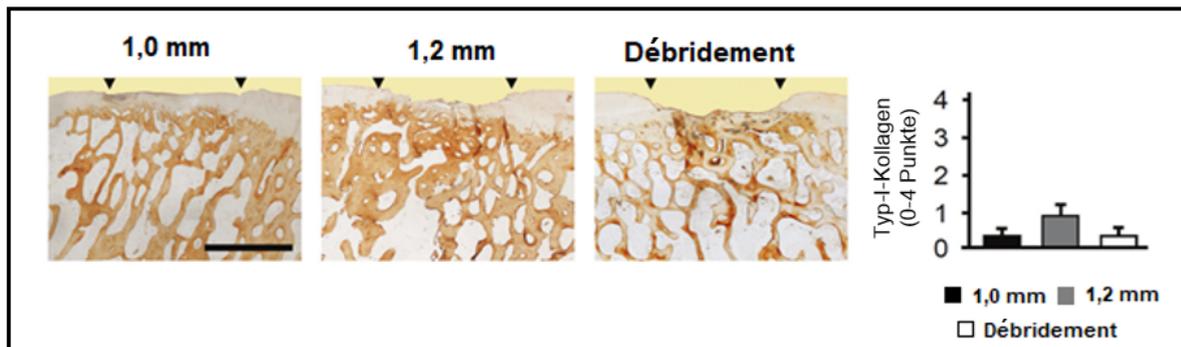


Abbildung 16: Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe. Bildquelle: in Anlehnung an Orth *et al.*, 2016. 0 Punkte= keine Immunreaktion; 4 Punkte = stärkere Immunreaktion im Vergleich zu internen Positivkontrollen. Die Immunreaktivität auf Typ-I-Kollagen im subchondralen Knochen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mikrofrakturgruppen und dem Débridement. Pfeile: Defektgrenze. Maßstabballen: 2,0 mm.

### 6.1.6. Biochemische Analyse des Knorpelreparaturgewebes

Die biochemischen Daten aus Hoechst-, DMMB- und BCA-Test wurden zur Standardisierung in Relation zu probeneigenen Protein- oder DNS-Gehalt gesetzt. Im Vergleich der Gruppen bezüglich des Reparaturgewebes untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede des Proteoglykangehaltes (Proteoglykan/Protein), der Zellzahl (DNS/Protein) und des Verhältnisses Proteoglykan/DNS (Tabelle 13) festgestellt werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der biochemischen Analyse von Reparatur- und angrenzendem Gelenkknorpel.

| <i>Parameter</i>                                  | <i>Gruppe<br/>1,0 mm</i> | <i>Gruppe<br/>1,2 mm</i> | <i>Gruppe<br/>Débridement</i> | <i>Angrenzen-<br/>der Knorpel</i> | <i>P-Wert<br/>gesamt</i> | <i>P-Wert<br/>spezifisch</i> |
|---|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| DNS ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )                   | 3,22 $\pm$ 0,37          | 4,32 $\pm$ 0,39*         | 3,35 $\pm$ 0,06               | 3,33 $\pm$ 0,26                   | 0,070                    | n.e.                         |
| Proteoglykan ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )          | 66,04 $\pm$ 11,04        | 65,86 $\pm$ 9,84         | 70,46 $\pm$ 15,66             | 61,42 $\pm$ 5,84                  | 0,668                    | n.e.                         |
| Proteoglykan/DNS<br>( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) | 21,43 $\pm$ 3,40         | 17,14 $\pm$ 2,86         | 20,01 $\pm$ 5,77              | 17,68 $\pm$ 2,24                  | 0,373                    | n.e.                         |

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. \*: Im Reparaturgewebe der 1,2 mm-Ahlen fand sich ein signifikant höherer DNA-Gehalt als im angrenzenden Knorpel. DNS: Desoxyribonukleinsäure; N.e.: nicht ermittelt.

## 6.2. Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels

### 6.2.1. Tuschefärbung

Durch Tuschefärbung makroskopisch nachweisbare degenerative Veränderungen des angrenzenden Knorpels fanden sich in allen Präparaten. Signifikante Unterschiede der flächigen Ausdehnung der arthrotischen Veränderungen bestanden jedoch nicht zwischen der 1,0 mm- ( $4,38 \pm 0,87 \text{ mm}^2$ ), der 1,2 mm- ( $4,53 \pm 1,23 \text{ mm}^2$ ) Gruppe und dem Débridement ( $2,87 \pm 0,47 \text{ mm}^2$ ) ( $P = 0,731$ ) (Abbildung 17).

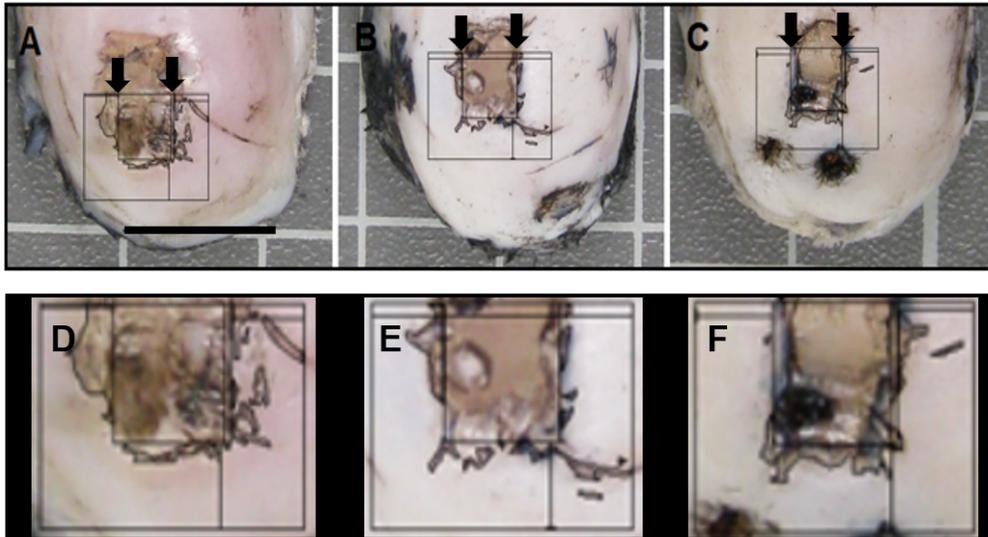


Abbildung 17: Tuschefärbung der angrenzenden Knorpeloberfläche. Es waren keine signifikanten Unterschiede der durch Tusche angefärbten arthrotischen Areale des angrenzenden Knorpels zwischen der 1,0 mm- (**A**), der 1,2 mm-Gruppe (**B**) und dem Débridement (**C**) erkennbar. Die Bilder wurden anhand der jeweiligen Gruppen-Mittelwerte ausgewählt. Die Pfeile markieren den Defekt. (**D**) stellt die Vergrößerung von (**A**), (**E**) von (**B**) und (**F**) von (**C**) dar. Maßstab: 1,0 cm.

### 6.2.2. Mikroskopische Bewertung des angrenzenden Knorpels

Die histologische Bewertung der degenerativen Veränderungen des angrenzenden Knorpels erbrachte eine erhöhte Chondrozytenzahl in der Débridement-Gruppe verglichen mit der 1,0 mm- ( $P = 0,010$ ) und der 1,2 mm-Gruppe ( $P = 0,015$ ) sowie eine besser rekonstruierte Mineralisationszone in der 1,2 mm- gegenüber der 1,0 mm Gruppe ( $P = 0,004$ ). Im Gesamtpunktwert waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen feststellbar.

Tabelle 14: Ergebnisse der mikroskopischen Begutachtung der degenerativen Veränderungen des angrenzenden Knorpels.

| Kategorie   | Gruppe<br>1,0 mm | Gruppe<br>1,2 mm | Gruppe<br>Débridement | P-Wert<br>gesamt | P-Wert<br>spezifisch |
|---|------------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|
| Struktur  | 0,0 (0,0-0,9)    | 0,5 (0,0-0,9)    | 0,5 (0,0-1,4)         | 0,162            | n.e.                 |
| Chondrozytenzahl                                      | 0,5 (0,0-1,0)    | 0,5 (0,0-1,0)    | 0,0 (0,0-0,4)         | 0,014            | # §                  |
| Zellklonierungen                                      | 1,0 (0,5-2,4)    | 1,5 (0,5-1,9)    | 1,0 (0,5-2,5)         | 0,922            | n.e.                 |
| Interterritoriale Safranin-O-Färbung                  | 2,5 (1,0-4,0)    | 3,0 (2,1-4,0)    | 2,5 (2,0-4,0)         | 0,463            | n.e.                 |
| Grenzlinie/Mineralisationszone/Sub-chondraler Knochen | 3,0 (1,1-3,0)    | 1,5 (0,0-2,9)    | 2,5 (1,0-3,0)         | 0,027            | *                    |
| Gesamtpunktwert                                       | 6,0 (4,1-9,4)    | 6,0 (5,1-9,4)    | 7,8 (5,6-9,0)         | 0,471            | n.e.                 |

Die Ergebnisse sind als Median (Interquartilabstand) angegeben. 25 Punkte = schwerwiegende Degeneration; 0 Punkte = normaler Knorpel. \*:  $P < 0,05$  für 1,0 mm versus 1,2 mm Ahle; #:  $P < 0,05$  für 1,0 mm Ahle versus Débridement; §:  $P < 0,05$  für 1,2 mm Ahle versus Débridement. n.e.: nicht ermittelt.

### 6.2.3. Biochemische Analyse des angrenzenden Knorpels

Im Vergleich der biochemischen Parameter zwischen Reparaturknorpel und dem distal an das Defektareal angrenzenden Knorpelgewebe konnten bis auf eine signifikant erhöhte Zellzahl im Reparaturgewebe der 1,2 mm-Gruppe ( $P = 0,043$ ) keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 14 unter 6.2.2.) gefunden werden.

## 6.3. Reparatur des subchondralen Knochens

### 6.3.1. Strukturelle Mikro-CT-Parameter

Die subchondrale Knochenlamelle und subartikuläre Spongiosa wurden in jeweils drei VOI unterteilt (Kapitel 5.3.3) und separat analysiert.

#### 6.3.1.1. Subchondrale Knochenlamelle der Defektzone

Die subchondrale Knochenlamelle der 1,0 mm-Gruppe wies ein signifikant erhöhtes Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis (BS/BV) im Vergleich zur 1,2 mm- und Débridement-Gruppe auf (beide  $P = 0,007$ ). Daneben war die Knochenoberflächendichte (BS/TV) in der 1,0 mm-Gruppe ( $14,67 \pm 2,00 \text{ mm}^{-1}$ ) im Vergleich zum Débridement ( $16,87 \pm 0,98 \text{ mm}^{-1}$ ) signifikant verringert ( $P = 0,018$ ) (Tabelle 15).

#### 6.3.1.2. Angrenzende subchondrale Knochenlamelle

Im Vergleich zwischen Knochenlamelle der Defektzone und angrenzender subchondraler Knochenlamelle waren die Knochenmineraldichte (BMD) und der Knochenvolumenanteil (BV/TV) durch Anwendung von 1,0 mm- (BMD:  $P = 0,014$ ; BV/TV:  $P = 0,008$ ), 1,2 mm-Ahlen (BMD und BV/TV:  $P = 0,017$ ) und Débridement (BMD:  $P = 0,035$ ; BV/TV:  $P = 0,028$ ) signifikant verringert. Das Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis (BS/BV) wurde durch Mikrofrakturbehandlung gegenüber der angrenzenden Knochenlamelle gesteigert (1,0 mm Gruppe:  $P = 0,027$ ; 1,2 mm Gruppe:  $P = 0,049$ ).

#### 6.3.1.3. Subartikuläre Spongiosa der Defektzone

Der relative Knochenvolumenanteil (BV/TV) der subartikulären Spongiosa der Defektzone war in der 1,0 mm-Gruppe gegenüber der 1,2 mm-Gruppe ( $P = 0,011$ ) und der Débridement-Gruppe ( $P = 0,038$ ) signifikant reduziert. Alle weiteren Mikrofrakturparameter blieben von der Mikrofrakturbehandlung unbeeinflusst (Tabelle 15).

## 6.3.1.4. Angrenzende subartikuläre Spongiosa

Im Vergleich zwischen perforierter und angrenzender subartikulärer Spongiosa waren die Knochenmineraldichte (BMD) durch die 1,0 mm-Ahlen ( $P = 0,046$ ) und die Trabekeldicke (Tb.Th) durch die 1,2 mm-Ahlen ( $P = 0,011$ ) signifikant reduziert. Das Knochenoberflächen-/Volumen-Verhältnis (BS/BV) und der Trabekelabstand (Tb.Sp) waren durch die 1,2 mm- ( $P = 0,015$ ) und die 1,0 mm-Ahlen ( $P = 0,021$ ) signifikant gesteigert.

Tabelle15: Ergebnisse der Mikro-CT-Parameter aus subchondraler Knochenlamelle und subartikulärer Spongiosa.

| Parameter                          | Einheit            | Gruppe<br>1,0 mm  | Gruppe<br>1,2 mm  | Gruppe<br>Débridement | Angrenzender<br>Knochen              | P-Wert<br>gesamt | P-Wert<br>spezifisch |
|------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------|
| <i>Subchondrale Knochenlamelle</i> |                    |                   |                   |                       |                                      |                  |                      |
| BMD                                | mg/cm <sup>3</sup> | 558,81 ±<br>62,72 | 595,48 ±<br>46,62 | 698,64 ±<br>33,06     | 752,56 ±<br>13,01 <sup>A, B, C</sup> | 0,192            | n.e.                 |
| BV/TV                              | %                  | 47,90 ±<br>8,24   | 57,42 ±<br>7,81   | 69,89 ±<br>3,98       | 79,05 ±<br>2,84 <sup>A, B, C</sup>   | 0,077            | n.e.                 |
| BS/BV                              | mm <sup>-1</sup>   | 36,06 ±<br>5,62   | 30,64 ±<br>4,20   | 24,91 ±<br>2,40       | 23,50 ±<br>2,43 <sup>A, B</sup>      | 0,007            | * #                  |
| BS/TV                              | mm <sup>-1</sup>   | 14,67 ±<br>2,00   | 15,42 ±<br>0,70   | 16,87 ±<br>0,98       | 18,03 ±<br>1,03                      | 0,043            | #                    |
| Ct.Th                              | mm                 | 0,49 ±<br>0,04    | 0,57 ±<br>0,05    | 0,62 ±<br>0,06        | 0,70 ±<br>0,05                       | 0,070            | n.e.                 |
| <i>Subartikuläre Spongiosa</i>     |                    |                   |                   |                       |                                      |                  |                      |
| BMD                                | mg/cm <sup>3</sup> | 398,93 ±<br>21,72 | 417,70 ±<br>15,95 | 425,03 ±<br>19,09     | 438,18 ±<br>18,44 <sup>A</sup>       | 0,192            | n.e.                 |
| BV/TV                              | %                  | 23,81 ±<br>3,37   | 30,58 ±<br>2,46   | 31,63 ±<br>1,83       | 32,48 ±<br>1,86 <sup>B</sup>         | 0,019            | * #                  |
| BS/BV                              | mm <sup>-1</sup>   | 44,68 ±<br>6,23   | 47,10 ±<br>4,28   | 37,38 ±<br>3,05       | 40,45 ±<br>3,41                      | 0,453            | n.e.                 |
| BS/TV                              | mm <sup>-1</sup>   | 10,66 ±<br>1,04   | 13,79 ±<br>0,85   | 11,74 ±<br>1,07       | 12,98 ±<br>1,11 <sup>B</sup>         | 0,137            | n.e.                 |
| Tb.Th                              | mm                 | 0,09 ±<br>0,01    | 0,08 ±<br>0,00    | 0,09 ±<br>0,01        | 0,09 ±<br>0,01                       | 0,075            | n.e.                 |
| Tb.Sp                              | mm                 | 0,31 ±<br>0,02    | 0,24 ±<br>0,01    | 0,31 ±<br>0,04        | 0,26 ±<br>0,02                       | 0,118            | n.e.                 |
| Tb.Pf                              | mm <sup>-1</sup>   | -2,52 ±<br>5,49   | -9,91 ±<br>3,17   | -17,41 ±<br>1,89      | -12,08 ±<br>2,41                     | 0,062            | n.e.                 |
| Tb.N                               | mm <sup>-1</sup>   | 2,78 ±<br>0,37    | 3,76 ±<br>0,23    | 3,52 ±<br>0,26        | 3,47 ±<br>0,26                       | 0,091            | n.e.                 |
| SMI                                | -/-                | 0,81 ±<br>0,52    | 0,25 ±<br>0,43    | -0,69 ±<br>0,28       | -0,07 ±<br>0,31                      | 0,063            | n.e.                 |

| Parameter | Einheit | Gruppe<br>1,0 mm | Gruppe<br>1,2 mm | Gruppe<br>Débridement | Angrenzender<br>Knochen | P-Wert<br>gesamt | P-Wert<br>spezifisch |
|-----------|---------|------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|----------------------|
| DA        | -/-     | 0,41 ±<br>0,02   | 0,39 ±<br>0,04   | 0,42 ±<br>0,03        | 0,38 ±<br>0,03          | 0,693            | n.e.                 |
| FD        | -/-     | 2,35 ±<br>0,05   | 2,46 ±<br>0,02   | 2,47 ±<br>0,02        | 2,45 ±<br>0,03          | 0,265            | n.e.                 |

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. n.e.: nicht ermittelt.  $P_{(\text{gesamt})}$  wurde zwischen den 1,0 mm-, den 1,2 mm-Ahlen und dem Débridement erhoben. Für weiterführende Vergleiche zwischen den jeweiligen Gruppen gilt  $P_{(\text{spezifisch})}$  wie folgt: \*:  $P < 0,05$  1,0 mm versus 1,2 mm Ahle; #:  $P < 0,05$  1,0 mm Ahle versus Débridement; §:  $P < 0,05$  1,2 mm Ahle versus Débridement. Für Vergleiche zwischen den drei Gruppen und dem angrenzenden Knochen gilt: A:  $P < 0,05$  versus 1,0 mm-Ahlen; B:  $P < 0,05$  versus 1,2 mm-Ahlen; C:  $P < 0,05$  versus Débridement). BMD: Knochenmineraldichte; BV/TV: Knochenvolumenanteil; BS/BV: Knochenoberfläche/Volumen-Verhältnis; BS/TV: Knochenoberflächendichte; Ct.Th: kortikale Dicke; Tb.Th: Trabekeldicke; Tb.Sp: Trabekelabstand; Tb.Pf: trabekuläre Knochen-Anordnungsfaktor; Tb.N: Trabekelanzahl; SMI: Struktur-Model-Index; DA: Grad der Anisotropie; FD: fraktale Dimension; n.e.: nicht ermittelt.

### 6.3.2. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten der Defektzone

Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten traten tendenziell häufiger nach Mikrofrakturbehandlung als nach alleinigem Débridement auf, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Chi-Quadrat-Test: Zysten:  $\chi^2 = 4,11$ ;  $P = 0,128$ ; Osteophyten:  $\chi^2 = 3,63$ ;  $P = 0,269$ ). Auch die einzelnen in Tabelle 16 aufgelisteten Parameter waren zwischen den drei Gruppen nicht signifikant verschieden (alle P-Werte  $> 0,05$ ).

Tabelle 162: Vergleichende und deskriptive Darstellung der Analyse subchondraler Knochenzysten und intraläsionaler Osteophyten.

| <i>Parameter</i>         | <i>Einheit</i>  | <i>Gruppe<br/>1,0 mm</i> | <i>Gruppe<br/>1,2 mm</i> | <i>Gruppe<br/>Débridement</i> | <i>P-Wert<br/>gesamt</i> |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <i>Knochenzysten</i>     |                 |                          |                          |                               |                          |
| Anzahl                   | -/-             | 6                        | 7                        | 1                             | n.a.                     |
| Häufigkeit               | %               | 50                       | 38                       | 13                            | 0,128                    |
| Form                     | -/-             | oval                     | oval                     | oval                          | n.a.                     |
| Vertikaler Durchmesser   | mm              | 5,15 ± 1,02              | 5,84 ± 3,46              | 11,43                         | 0,361                    |
| Horizontaler Durchmesser | mm              | 2,85 ± 1,26              | 3,06 ± 1,01              | 5,56                          | 0,457                    |
| Durchschnittl. Fläche    | mm <sup>2</sup> | 11,37 ± 5,61             | 14,41 ± 11,53            | 55,46                         | 0,254                    |
| Gesamtfläche             | mm <sup>2</sup> | 68,19                    | 100,89                   | 55,46                         | n.a.                     |
| Gesamtpunktzahl          | -/-             | 1,33 ± 0,52              | 1,14 ± 0,38              | 3,00                          | 0,423                    |
| <i>Osteophyten</i>       |                 |                          |                          |                               |                          |
| Anzahl                   | -/-             | 8                        | 7                        | 2                             | n.a.                     |
| Häufigkeit               | %               | 75                       | 50                       | 25                            | 0,269                    |
| Lage (peripher/zentral)  | -/-             | 5/3                      | 3/4                      | 1/1                           | n.a.                     |
| Höhe                     | mm              | 0,27 ± 0,09              | 0,27 ± 0,11              | 0,21 ± 0,08                   | 0,485                    |
| Basis                    | mm              | 1,02 ± 0,66              | 1,09 ± 0,75              | 0,88 ± 0,28                   | 0,576                    |

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. n.a.: nicht anwendbar.

## 7. Diskussion

### 7.1. Einführung

Die vorliegende Studie überprüfte, ob die Anwendung kleinerer Ahlendurchmesser (1,0 mm) im Vergleich zu größeren Durchmessern (1,2 mm) in der Mikrofrakturbehandlung kleinflächiger Knorpeldefekte zu einer verbesserten Knorpelreparatur führt und ob jedwede Form von Mikrofrakturbehandlung die Knorpelreparatur im Vergleich zur alleinigen Durchführung eines Débridements verbessert. Die Daten dieser Studie zeigten erstens, dass Mikrofrakturbehandlungen unter Verwendung eines kleinen Ahlendurchmessers (1,0 mm) zu einem signifikant verbesserten Knorpelreparaturgewebe im Vergleich zu Ahlen größeren Durchmessers (1,2 mm) führten. Zweitens verbesserten beide Mikrofrakturbehandlungs-Gruppen die histologische Gesamtqualität des Reparaturgewebes im Vergleich zum alleinigen Débridement. Drittens hatte die Anwendung kleiner Ahlendurchmesser keinen positiven Einfluss auf die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens. Viertens zeigte sich kein Unterschied im Hinblick auf die frühe perifokale Arthrose zwischen den Gruppen. Fünftens sind häufiger subchondrale Knochenzysten sowie intraläsionale Osteophyten nach Mikrofrakturierung als nach alleinigem Débridement zu finden.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung von Auswirkungen unterschiedlicher Ahlengrößen auf das Knorpelreparaturgewebe bei der Behandlung kleinflächiger Knorpeldefekte in medialen Femurkondylen im translationalen Schafmodell. Die bisherige Studienlage beschreibt lediglich die Effekte unterschiedlicher Bohrlochdurchmesser auf die Knorpelreparatur.<sup>28,142,143</sup> Die Frage nach der Auswirkung des Durchmessers von Mikrofrakturierungs-Ahlen auf die Knorpelreparatur ist bis dato ungeklärt. Marchand *et al.*<sup>142</sup> stellten fest, dass unterschiedliche Bohrlochdurchmesser (0,5 mm versus 0,9 mm) in Knorpeldefekten von Kaninchen-Trochleas im Kniegelenk sechs Monate postoperativ nicht zu signifikanten Veränderungen des Knorpelreparaturgewebes führten. Im Gegenzug beschrieben Eldracher *et al.*<sup>28</sup> einen positiven Effekt kleinerer Bohrlochdurchmesser (1,0 mm) gegenüber größeren Bohrlochdurchmessern (1,8 mm) auf das Reparaturgewebe in Knorpeldefekten der Trochlea im Kniegelenk von Schafen sechs Monate postoperativ. Bezüglich der Mikrofrakturbehandlung wiesen Min *et al.*<sup>27</sup> eine erhöhte Zellmigration aus dem Knochenmark im Falle größerer Ahlendurchmesser (1,5 mm) gegenüber kleineren Ahlendurchmessern (0,8 mm) nach. Kok *et al.*<sup>92</sup> konnten allerdings keinen Einfluss unterschiedlicher Tiefe (2,0 mm versus 4,0 mm bei einem Durchmesser von

0,45 mm) und Anzahl (sechs versus drei) von Mikrofrakturlöchern auf das Knorpelreparaturgewebe in osteochondralen Defekten am Talus von Ziegen feststellen. Gao *et al.*<sup>144</sup> untersuchten an der Trochlea von Minischweinen die Auswirkungen von alleinigem Débridement, Débridement und Mikrofrakturbehandlung, sowie Mikrofrakturbehandlung und zusätzlichen Knochenmarkaspiraten an vollschichtigen Knorpeldefekten vier Wochen postoperativ. Sie stellten eine frühe Ausdünnung des subchondralen Knochens, insbesondere einen Verlust der trabekulären Strukturen der subchondralen Knochenplatte durch die Mikrofrakturbehandlung fest. Nur das zusätzliche Knochenmarkaspirat wies einen protektiven Effekt am subchondralen Knochen auf.<sup>144</sup>

In allen Studien blieb der Einfluss des Ahlendurchmessers auf das Knorpelreparaturgewebe und den subchondralen Knochen jedoch unbeachtet. Bei einer Prävalenz von knapp einer Million US-Amerikanern mit Knorpelschäden pro Jahr<sup>18,145</sup> stellt das Knie das am häufigsten betroffene Gelenk dar.<sup>13</sup> Des Weiteren ist die frühzeitige Anwendung solch markraumeröffnender Verfahren in Knorpeldefekten mit einem positiven histologischen und klinischen Behandlungsergebnis sowie einer frühzeitigeren Wiederaufnahme von sportlicher Betätigung assoziiert.<sup>13</sup> Anlässlich dieser Studienlage und klinischer Relevanz wurden in der vorliegenden Studie die Auswirkungen unterschiedlicher Ahlendurchmesser auf die Knorpelreparatur in Knorpeldefekten im Kniegelenk im translationalen Schafmodell untersucht.

## 7.2. Reparatur des Gelenkknorpels

In dieser Studie verbesserten Mikrofrakturierungs-Ahlen kleineren Durchmessers gegenüber großen Ahlen signifikant die histologische Gesamtqualität des Reparaturgewebes gemäß dem Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> Bereits von Eldracher *et al.*<sup>28</sup> wurde beschrieben, dass kleinere Bohrlochdurchmesser bei der subchondralen Anbohrung nach Pridie zu einem signifikant verbesserten histologischen Gesamtpunktwert der Knorpelreparatur führen. Die Autoren führten die histologische Auswertung anhand des Bewertungssystem nach Sellers *et al.*<sup>146</sup> durch, welcher neben den Parametern des Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> noch zusätzlich die subchondrale Knochenlamelle und das Vorhandensein einer Grenzlinie evaluiert. Eldracher *et al.*<sup>28</sup> verglichen Bohrlochdurchmesser von 1,0 mm mit 1,8 mm in der Trochlea von jeweils sieben Schafen sechs Monate postoperativ. Vor Anwendung der Pridie-Bohrung wurde der physiologische Trabekelabstand der subartikulären Spongiosa an der Trochlea des Schafes mit  $0,9 \pm 0,13$  mm bestimmt. Marchand *et al.*<sup>142</sup> konnte hingegen keinen

signifikanten Unterschied in der histologischen Auswertung durch das modifizierte Bewertungssystem nach O'Driscoll *et al.*<sup>147</sup> als auch in der Gesamtauswertung zwischen unterschiedlichen Bohrlochgrößen (0,5 mm Bohrlochdurchmesser an der proximalen Trochlea versus 0,9 mm Bohrlochdurchmesser an der distalen Trochlea) im Kaninchenmodell sechs Monate postoperativ nachweisen, obwohl die kleineren Bohrlochdurchmesser eher dem physiologischen Trabekel-Abstand im Kaninchen (0,41 mm)<sup>143</sup> entsprachen. Als Erklärung für den ausbleibenden Unterschied der Bohrlochdurchmesser nannten die Autoren unterschiedliche Defekt-Lokalisation und die damit einhergehenden unterschiedlichen Eigenschaften des Gelenkknorpels.<sup>20, 56,148,149,150</sup>

Kreuz *et al.*<sup>20</sup> stellten eine signifikante Verbesserung im Bewertungssystem ICRS<sup>151</sup> 36 Monate postoperativ nach Mikrofrakturbehandlung in Knorpeldefekten der medialen Femurkondylen gegenüber Trochlea, Tibiaplateau und Patella dar. Es ist bekannt, dass innerhalb des medialen Gelenkkompartiment das Tibiaplateau im Vergleich zur Femurkondyle eine dickere Gelenkknorpelschicht und subchondrale Knochenlamelle sowie eine geringere Zelldichte aufweist, wobei diese Unterscheide auch im Rahmen meniskusbedeckter und meniskusunbedeckter Areale des jeweiligen Kompartimentes zu finden sind.<sup>56,152</sup> Zuletzt beschrieben McCarthy *et al.*<sup>153</sup> für osteochondrale Defekte in Femur-Trochleas im Großtiermodell ein besser spontan entstandenes Reparaturgewebe als in Femur-Kondylen. Osteochondrale Defekte hätten ein besseres Reparatur-Potenzial als chondrale Defekte durch die Eröffnung des subchondralen Knochens und der damit verbundenen Immigration von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark.<sup>153</sup> Dies erhärtet den Verdacht, dass unabhängig von markraumeröffnenden Verfahren unterschiedliche Defektlokalisationen im gleichen Kniegelenk Auswirkungen auf das Knorpelreparaturgewebe haben. Selbst Studien mit identischen markraumeröffnenden Verfahren ließen bei Anwendung an unterschiedlichen intraartikulären Lokalisationen einen direkten Vergleich nicht zu. In der vorliegenden Studie wurde der Trabekelabstand der subartikulären Spongiosa der Defektlokalisation an den medialen Femurkondylen nicht bestimmt. In Folgestudien sollte daher der jeweilige Trabekelabstand analysiert werden, um zu prüfen, ob Ahlendurchmesser entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand auch in anderen Tiermodellen oder Defektlokalisationen zu einem verbesserten Reparaturgewebe führen würden.

Der signifikant verbesserte Gesamtaspekt des Reparaturgewebes bei Verwendung der 1,0 mm-Ahlen basierte vor allem auf der signifikant verbesserten Oberflächenbeschaffenheit. In den übrigen Parametern des Bewertungssystems nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> war kein signifikanter

Unterschied zwischen beiden Mikrofrakturbehandlungs-Gruppen zu erkennen. Die Oberflächenbeschaffenheit spielt in der postoperativen Kontrolle und Dokumentation des Behandlungsverlaufes durch die MRT eine wichtige Rolle. Durch einen überlegenen Weichteilkontrast gegenüber anderen bildgebenden Verfahren können Knorpeloberflächen, subchondraler Knochen, Defektfüllung und Integration mit dem angrenzenden Knorpel mittels MRT sehr gut dargestellt werden.<sup>154,155,156</sup> Nach Blackman *et al.*<sup>154</sup> stehen die MRT-Auswertungen des Reparaturgewebes und die klinische Symptomatik nach markraumeröffnenden Verfahren sechs bis 36 Monate postoperativ in signifikant positiver Korrelation. Auch in makroskopischen Bewertungssystemen, sowohl für die präklinische als auch klinische Beurteilung von Knorpelreparaturgewebe, wird die Oberflächenbeschaffenheit immer als wichtiger Parameter angeführt.<sup>126,151,157,158,159,160</sup> Goebel *et al.*<sup>126,161</sup> unterstrichen die Relevanz von makroskopischen Bewertungssystemen bei der Auswertung präklinischer Tiermodelle, da sowohl positive Korrelationen für die Parameter der Defektfüllung und Gesamtpunktzahl mit dem kernspintomographischen Bewertungssystem MOCART<sup>162,163</sup> als auch mit dem histologischen Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> bestehen. Für den Parameter der Oberflächenbeschaffenheit wurde keine Korrelation zwischen makroskopischer und histologischer Auswertung<sup>161</sup> gefunden. Die makroskopische Oberflächenbeurteilung ist ineffektiv, solange mikroskopische Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit nicht makroskopisch sichtbar werden.<sup>161</sup> Obwohl die Oberflächenbeschaffenheit in der vorliegenden Arbeit makroskopisch keine Unterschiede zwischen den Gruppen zeigte, war diese auf histologischer Ebene nach Anwendung der kleineren Ahlendurchmesser signifikant verbessert. Diese Daten unterstützen die Verwendung einer mikrostrukturellen Begutachtung des Knorpelreparaturgewebes als den Goldstandard zur objektiven Bewertung.<sup>12,164</sup> In der mikroskopischen Auswertung konnte außerdem nachgewiesen werden, dass beide Gruppen der Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe nach sechs Monaten eine histologisch verbesserte Gesamtqualität des Reparaturgewebes aufwiesen. Insbesondere die Anwendung von kleinen Ahlen war dabei dem Débridement in allen Kategorien überlegen. Dies bestätigte die zweite Hypothese dieser Studie.

Durch die Experimente von Min *et al.*<sup>27</sup> zeigte sich bereits, dass eine Eröffnung des Markraumes durch größere Ahlen gegenüber kleineren Ahlen und alleinigem Débridement zu einer erhöhten Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen führt, was die Grundlage zur Ausbildung eines Knorpelreparaturgewebes darstellt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich der Austritt von Stammzellen aus dem Knochenmark in Form von Blutungen aus dem Knochenmark nur nach Durchführung der Mikrofrakturbehandlung. Bei alleinigem Débridement wurde nur die kalzifizierte Knorpelschicht entfernt, die Markräume wurden nicht eröffnet. Frisbie *et al.*<sup>165</sup> beschrieben bereits die Relevanz dieser kompletten Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht

im Rahmen des Débridements, um optimale Voraussetzungen für markraumeröffnende Verfahren zu schaffen. In einer *post mortem* Untersuchung von juvenilen und adulten Schafen im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht der Trochlea in adulten Tieren deutlich erschwert ist. Drobic *et al.*<sup>166</sup> hingegen bemerkten, dass ein Débridement bei jungen Schafen aufgrund der noch nicht kontinuierlich ausgeformten kalzifizierten Knorpelschicht leicht zu tief ausfallen kann. Vor diesem Hintergrund wäre als technische Hilfestellung eine Kürette mit Penetrationsstopp wünschenswert, um die Eindringtiefe in den subchondralen Knochen im Rahmen des Débridement zu limitieren.<sup>166,167</sup> Diese Beobachtung wurde in der *post mortem* Untersuchung (siehe 5.7.6.3.) bestätigt.

Mittels des histologischen Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*<sup>131</sup> wurde unter anderem eine signifikant verbesserte Matrixanfärbbarkeit durch Mikrofrakturbehandlung gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. Die daraus resultierende Annahme eines höheren Proteoglykangehalt im Reparaturgewebe nach Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zum Originalknorpel bestätigte sich jedoch nicht im DMMB-Test. Die biochemischen Analysen des Proteoglykangehalts erbrachten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Eldracher *et al.*<sup>28</sup> beschrieben sowohl eine verbesserte Matrixanfärbbarkeit, als auch einen erhöhten Proteoglykangehalt nach Pridie-Bohrungen mit kleinem Durchmesser. Histologische Bewertungssysteme stellen aufgrund von höherer Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit den Goldstandard in der objektiven Beurteilung von Knorpelreparaturgewebe dar.<sup>164</sup> Diese Tatsache unterstreicht die Relevanz der vorliegenden histologischen Ergebnisse, weist jedoch auch auf Limitationen der vorliegenden Studie hin, da sich idealerweise biochemische und histologische Analysen bei der Beurteilung der Knorpelreparatur komplementär ergänzen.<sup>164</sup> In der vorliegenden Studie waren die signifikant verbesserte Matrixanfärbbarkeit durch Mikrofrakturbehandlung gegenüber dem alleinigen Débridement nicht in den biochemischen Analysen reflektiert. Obwohl aus technischen Gründen die histologischen Schnitte grundsätzlich nicht aus der gleichen Region wie die invasiv gewonnenen Proben für die biochemischen Analysen stammen können, kann die Diskrepanz zwischen der histologischen Matrixanfärbbarkeit und den biochemischen Parametern durch eine geringere Aussagekraft der Safranin-O-Färbung im Vergleich zu den kontinuierlichen Daten aus der biochemischen Analyse erklärt werden.

Abschließend wurde auch in der vorliegenden Studie durch Mikrofrakturbehandlung keine Knorpelregeneration,<sup>47</sup> sondern Knorpelreparatur in einem kurzfristigen Beobachtungszeitraum erzielt. Bisher führten nur Bae *et al.*,<sup>100</sup> Gobbi *et al.*,<sup>23</sup> Knutsen *et al.*,<sup>25</sup> Miller *et al.*,<sup>97</sup> Solheim *et al.*,<sup>109,96,99,102</sup> Steadman *et al.*<sup>22</sup> und Ulstein *et al.*<sup>101</sup> prospektive klinische Studien zu

Auswirkungen von Mikrofrakturbehandlung in vollschichtigen Knorpeldefekten mit einem längerfristigen Beobachtungszeitraum durch. Alle Autoren stellten fest, dass Schmerz und Funktionalität, gemessen anhand der klinischen Bewertungssysteme nach Lysholm *et al.*<sup>168</sup> und Tegner *et al.*,<sup>169</sup> innerhalb eines kurz- bis mittelfristigen Beobachtungszeitraums (zwei Jahre) im Vergleich zum präoperativen Zustand Besserung zeigten. In den folgenden Beobachtungsjahren (maximal 17 Jahre postoperativ<sup>22</sup>) variierten die Ergebnisse von einer Stagnation<sup>22,26,96,97</sup> bis hin zu einer Verschlechterung<sup>23</sup> des post- gegenüber dem präoperativen Zustand.

Im Jahr 2018 analysierten Kraeutler *et al.*<sup>170</sup> in einer systematischen Auswertung die Ergebnisse von mittel- bis langfristig angelegten Studien der Evidenzklassen I-III hinsichtlich des Erfolgs von Mikrofrakturbehandlung und ACT in 400 chondralen Defekten an 399 Patientenknie. Die Autoren stellten nach einem Minimum von fünf Jahren eine klinische Verbesserung nach Mikrofrakturbehandlung und ACT fest, signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsverfahren bestanden nicht.<sup>170</sup> Diese wichtigen Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit langfristiger klinischer Studien.

### 7.3. Arthrotische Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels

Anhand der Quantifizierung der mit Tusche gefärbten makroskopisch arthrotischen Areale<sup>127</sup> und der semi-quantitativen strukturellen histologischen Analyse nach Little *et al.*<sup>132</sup> wurden degenerativ-arthrotische Veränderungen des angrenzenden Knorpels nachgewiesen. Interessanterweise konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Dies ist offensichtlich auf den frühen Zeitpunkt der Nachuntersuchung zurückzuführen. Die signifikant erhöhte Chondrozytenzahl in der Gruppe des Débridements im Vergleich zu beiden Mikrofrakturbehandlungs-Gruppen und die verminderte Safranin-O-Anfärbbarkeit in allen drei Gruppen sind nach Madry *et al.*<sup>171</sup> als Zeichen einer Früharthrose zu verstehen. Ebenfalls waren degenerative Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels nach subchondraler Anbohrung sichtbar.<sup>28</sup> Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass eine Beeinflussung des angrenzenden Gelenkknorpels mit Degeneration einerseits durch Knorpeldefekte selbst, andererseits auch durch die therapeutische Anwendung von markraumeröffnenden Verfahren, regelhaft aufzutreten scheint.

Burr *et al.*<sup>172</sup> stellten die These auf, dass bei der Arthrose spontane Mikrofrakturen des subchondralen Knochens zu Gefäßinvasion in den kalzifizierten Knorpel führen und durch eine

Reaktivierung der Grenzlinie und der enchondralen Ossifikation zur Degeneration des Gelenkknorpels beitragen. Sekundär führt dies zu einer Ausdünnung des Gelenkknorpels.<sup>172</sup> Diese Ergebnisse lassen für die vorliegende Studie schlussfolgern, dass kleinere Ahlendurchmesser (1,0 mm) zu weniger ausgeprägten Mikrofrakturen des subchondralen Knochens und somit zu geringfügigeren Auswirkungen auf die subchondrale Mikroarchitektur und deren Folgeerscheinungen führten, woraus ein besseres histologisches Gesamtergebnis des Reparaturgewebes resultieren kann.

## 7.4. Reparatur des subchondralen Knochens

### 7.4.1. Subchondrale Knochenlamelle der Defektzone

Für die Knochenlamelle der Defektzone wurde eine signifikante Zunahme des Knochenoberfläche-/Volumenverhältnis (BS/BV) in der 1,0 mm- gegenüber der 1,2 mm-Gruppe und der Gruppe des Débridements festgestellt. Zugleich war das BS/BV durch Anwendung von Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zur angrenzenden subchondralen Knochenlamelle signifikant gesteigert. Mikrofrakturbehandlungen führen zur Schwächung der subchondralen Mikroarchitektur. Die Zunahme des BS/BV ist Ausdruck der Knochenreparatur nach der Anwendung von markraumeröffnenden Verfahren.<sup>28,128</sup> Wei *et al.*<sup>173</sup> untersuchten die Auswirkungen der chronischen FGF-21 Expositionen im Knochen von adipösen Mäusen und stellten fest, dass ein Verlust von trabekulären Knochenstrukturen mit einer signifikanten Zunahme der knöchernen Oberfläche (BS/BV) einherging. Borah *et al.*<sup>174</sup> zeigten, dass eine Behandlung mit Risedronat von Frauen mit Osteoporose den Knochenabbau und Zerfall der trabekulären Architektur verhindert. Eine Zunahme der BS/BV konnte bei Frauen mit unbehandelter Osteoporose beobachtet werden.<sup>174</sup> Okazaki *et al.*<sup>175</sup> stellten an elf Femurköpfen weiblicher Patientinnen mit Osteoporose ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Anzahl des Mikrokallus und der BS/BV fest. Durch den initialen Verlust trabekulärer Strukturen ist somit eine sekundäre Zunahme des BS/BV im Rahmen von Umbau- und Reparaturprozessen festzustellen. Diese Beobachtungen wurden auch bereits durch Autoren der Arbeitsgruppe dieser Studie gemacht: Orth *et al.*<sup>128</sup> zeigten 2012, dass Pridie-Bohrungen im Schafmodell an der medialen Femurkondyle zu einer Zunahme der Knochenoberflächendichte (BS/TV) führen. Auch Eldracher *et al.*<sup>28</sup> beobachteten die gleichen Phänomene an der Trochlea von Schafskniegelenken. Die genannten Studien dieser Arbeitsgruppe unterschieden sich zwar in Lokalisation (Trochlea versus Femurkondyle) und Art des markraumeröffnenden Verfahrens (Pridie-Bohrungen versus

Mikrofrakturbehandlung), dennoch untermauern diese Beobachtungen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Es sei die Annahme, dass sowohl kleine als auch große Bohrlöcher und Ahlendurchmesser zu signifikanten sowie ausgedehnten Störungen der knöchernen Mikroarchitektur führen könnten und diese nach sechs Monaten postoperativ noch nicht wieder hergestellt wären.<sup>128</sup>

Zudem konnte in der subchondralen Knochenlamelle nach Mikrofrakturbehandlung mit 1,0 mm-Ahlen eine signifikant verringerte BS/TV im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Anwendung der Mikrofrakturbehandlungen an sich, im speziellen der kleineren Ahlen (1,0 mm) führt zu einem gröberen Reparaturgewebe des trabekulären Knochens, dass durch Zysten und größere Abstände zwischen den Trabekeln gekennzeichnet ist. Chen *et al.*<sup>176</sup> stellten fest, dass eine Zunahme der BS/TV mit einem höher vernetzten trabekulären Knochenreparaturgewebe nach Anwendung von markraumeröffnenden Verfahren einhergeht. Sie beschrieben eine signifikante Zunahme der Knochenoberflächendichte nach der Anwendung von Pridie-Bohrungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die Mikrofrakturbehandlungs-Gruppe wies jedoch eine niedrigere BS/TV auf.<sup>176</sup> In Übereinstimmung mit Chen *et al.*<sup>176</sup> zeigte auch die vorliegende Studie, dass insbesondere die Mikrofrakturbehandlung mit kleinem Durchmesser zu einer verringerten BS/TV im Vergleich zum Débridement führt. Dies unterstreicht den potenziell nachteiligen Einfluss markraumeröffnender Verfahren auf die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens. Die bisherige Studienlage reicht aber nicht aus, um die Relevanz der radiologisch geschwächten subchondralen Mikroarchitektur durch Mikrofrakturbehandlung ausreichend zu klären. Die hier referenzierten Studien unterscheiden sich zu sehr in ihrem Aufbau (Lokalisation des Knorpeldefektes, unterschiedliche Tiermodelle, unterschiedliche markraumeröffnende Verfahren, Alter der Tiere), um direkte Vergleiche zu ermöglichen. Insbesondere fehlende biomechanische Untersuchungen des subchondralen Knochens nach Mikrofrakturbehandlung erschweren die Interpretation und Korrelation die Studienergebnisse. Die Phase eingeschränkter postoperativer Belastung ist wichtig, um Knorpelreparatur und Knochenrekonstitution zu unterstützen.<sup>128</sup> Auch wenn eine Teilbelastung mit Sohlenkontakt wie am Patienten im Tiermodell nur schwer umsetzbar ist, sollte dieser Einfluss in zukünftigen Arbeiten weiter geprüft werden.<sup>128</sup>

#### 7.4.2. Angrenzende subchondrale Knochenlamelle

Im Vergleich zwischen perforierter subchondraler Knochenlamelle und der angrenzenden subchondralen Knochenlamelle fielen signifikant reduzierte Knochenmineraldichte (BMD) und

Knochenvolumenanteil (BV/TV) innerhalb der Defekte aller drei Gruppen auf. Diese Ergebnisse untermauern die Beobachtung, dass markraumeröffnende Verfahren zu einer Schwächung des subchondralen Knochens innerhalb der Defektzone führen. In der Literatur sind übereinstimmende Berichte zu finden: Orth *et al.*<sup>128</sup> beschrieben diese Beobachtungen ebenfalls für Defekte nach Pride-Bohrungen und im Vergleich zur angrenzenden subchondralen Knochenlamelle. Auch Eldracher *et al.*<sup>28</sup> beobachteten einen signifikant erniedrigten BMD-Wert nach Pridie-Bohrungen im Vergleich zur intakten angrenzenden Knochenlamelle. Für den BV/TV wurden von Eldracher und Kollegen keine signifikanten Veränderungen gegenüber der angrenzenden subchondralen Knochenlamelle festgestellt.

Chen *et al.*<sup>176</sup> beschrieben ähnliche Werte wie in der vorliegenden Arbeit für den BV/TV in allen chondralen Defektgruppen (Pridie-Bohrungen: 2,0 mm und 6,0 mm; Mikrofrakturierung: Ahlengröße 2 mm) von 16 Kaninchen-Trochleas drei Monate postoperativ, als auch im Vergleich zur intakten Kontrollgruppe. Einen Vergleich zur angrenzenden subchondralen Knochenlamelle und die Bestimmung des BMD-Wertes führten die Autoren jedoch nicht durch.<sup>176</sup> Gao *et al.*<sup>144</sup> fanden auch eine signifikant herabgesetzten BMD-Wert und BV/TV im Vergleich der subchondralen Knochenlamelle der Defektzone mit der angrenzenden subchondralen Knochenlamelle nach Mikrofrakturbehandlung chondraler Defekte im Minischwein. Interessanterweise waren sowohl bei Gao *et al.*<sup>144</sup> als auch in der vorliegenden Studie auch die Kontrollgruppen (alleiniges Débridement) von herabgesetzter BMD und BV/TV betroffen. Es ist fraglich, ob die Entfernung der kalzifizierten Knorpelschicht beim Débridement zu tief ausfiel und folglich eine Schwächung des subchondralen Knochens induzierte. Diese Vermutung wird gestärkt durch die Erkenntnis, dass in der vorliegenden Studie und jener von Gao *et al.*<sup>144</sup> ein Verlust trabekulärer Strukturen auch nach alleinigem Débridement zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse müssten in Langzeitbeobachtungen weiter evaluiert werden.

#### 7.4.3. Subartikuläre Spongiosa der Defektzone

Innerhalb der subartikulären Spongiosa der Defektzone fiel ein signifikant reduzierter BV/TV für Gruppe der 1,0 mm-Ahlen gegenüber den 1,2 mm-Ahlen und der Gruppe des Débridements auf. Auch Gao *et al.*<sup>144</sup> beschrieben nach Mikrofrakturbehandlungen einen reduzierten BV/TV in der subartikulären Spongiosa der Defektzone. Dieses Ergebnis steht ferner in Einklang mit den Beobachtungen von Chen *et al.*<sup>82</sup>. Diese beschrieben eine Knochenverdichtung und -frakturierung der subartikulären Spongiosa um die Löcher nach Mikrofrakturbehandlungen mit einer Ahle von 1,0 mm Durchmesser. Offenbar wird durch das Einbringen einer Mikrofrakturahle in den subchondralen Knochen die subartikuläre Spongiosa in der Umgebung

der Defekte verdichtet, während innerhalb der Defekte Substanzdefekte resultieren, die eine Reduktion von BV/TV bewirken. Hingegen wird bei Anwendung von Pridie-Bohrungen mit einem Spiralbohrinstrument das überschüssige Knochenmehl durch die Spannung des Bohrers abtransportiert und nicht, wie bei der Mikrofrakturierung mit Ahlen oder der Verwendung von rotierenden Kirschner-Drähten zum Bohren, zur Seite verdrängt. Dies stellt einen relevanten Unterschied zwischen Anbohrung und Mikrofrakturbehandlung dar, der sich auch in diesen Mikro-CT-Resultaten widerspiegelt.

Zudem wurden in der vorliegenden Studie eine 3D-konfigurierte (dreiseitig angeschliffen, gerade) Ahlenspitze verwendet. Dies ermöglichte eine zur subchondralen Knochenlamelle rechtwinklige Anbringung der Mikrofrakturierungs-Ahlen. Ob jedoch eine 3D-konfigurierte Ahlenspitze ausgedehnte Knochenfrakturierungen oder eine kegelförmige Ahlenspitze die Impaktierung des subchondralen Knochens bedingt, muss weiter geprüft werden. Benthien *et al.*<sup>177</sup> machten mit einer kegelförmigen Spitze am Patienten gute Erfahrungen. Die kegelförmige Konfiguration ermöglichte ein tieferes Eindringen in den subchondralen Knochen und das Reparaturgewebe war von Typ-II-Kollagenfasern geprägt.

Ungeklärt bleibt, weshalb kleine Ahlendurchmesser im Vergleich zu großen Ahlendurchmessern zu einer stärkeren Reduktion des Knochenvolumenanteils innerhalb der subartikulären Spongiosa der medialen Femurkondyle im Schafmodell führen. Eldracher *et al.*<sup>28</sup> gingen davon aus, dass im Rahmen der subchondralen Anbohrung ein dünnerer Bohrer, welcher dem physiologischen Trabekelabstand der Trochlea des Schafmodells entsprach, weniger Knochengewebe verdrängt und daraus ein physiologischer Knochenvolumen BV/TV verblieb. In der vorliegenden Studie wurde der physiologische Trabekelabstand der Schafs-Kondyle nicht bestimmt, da der Schwerpunkt in der Wahl der Ahlendimensionen lag. Diese war der makroskopischen Ratio des Gelenkes/ Knorpeldicke des Patienten angelehnt.

Dieses Ergebnis unterstreicht die Feststellungen der vorangehenden Abschnitte in folgendem Punkt: Die subartikuläre Spongiosa ist durch den Einsatz der Mikrofrakturbehandlung geschwächt. Beide Ahlengrößen und auch das Débridement führen zur Störung der subchondralen Mikroarchitektur nach vier Wochen<sup>144</sup> und sechs Monaten. Zusätzlich setzten sich die Auswirkungen der kleinen Ahlengrößen auch in die subartikuläre Spongiosa in Form von Substanzdefekten im Bereich der Mikrofrakturbehandlung und Knochenverdichtung in deren Umgebung fort.

#### 7.4.4. Angrenzende subartikuläre Spongiosa

Diese Schlussfolgerungen spiegeln sich auch in den vergleichenden Ergebnissen zwischen subartikulärer Spongiosa der Defektzone und dem angrenzenden Knochen wieder. Beide Mikrofrakturbehandlungs-Gruppen erhöhten das BS/BV und den Trabekelabstand (Tb.Sp) in der subartikulären Spongiosa der Defektzone im Vergleich zur unbehandelten angrenzenden subartikulären Spongiosa. Zusätzlich sind BMD und Trabekeldicke (Tb.Th) durch die Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zur angrenzenden subartikulären Spongiosa reduziert. Wie in 7.4.1 bereits erläutert, ist mit der Zunahme des BS/BV ein Verlust an trabekulären Strukturen assoziiert.<sup>173</sup> Die Zunahme des Tb.Sp und die Abnahme von BMD und Tb.Th unterstreichen den Verlust an subchondraler spongiöser Knochensubstanz. Auch Gao *et al.*<sup>144</sup> stellten eine frühe Ausdünnung des subchondralen Knochens durch alleinige Mikrofrakturbehandlung fest, die sich durch eine reduzierte BS/TV und Trabekelanzahl (Tb.N) sowie einen zunehmenden Tb.Sp präsentierte. Nur das zusätzliche Knochenmarksapirat der Gruppe drei konnte einen protektiven Effekt auf den subchondralen Knochen zeigen.<sup>144</sup> Eine derartige ergänzende Maßnahme sollte in zukünftigen translationalen Großtierstudien vertiefend untersucht werden.

#### 7.4.5. Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten

In der vorliegenden Studie wurden subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten häufiger nach Mikrofrakturbehandlung als nach alleinigem Débridement festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit vorausgegangenen Untersuchungen, die ebenfalls häufig subchondrale Zysten (63%) und intraläsionale Osteophyten (26%) nach Anwendung der Pridie-Bohrung in Femurkondylen von Schafen fanden.<sup>128</sup> Eldracher *et al.* stellten hingegen nach Anwendung von Pridie-Bohrung in Schaf-Trochleas sechs Monate postoperativ keine subchondrale Zysten und nur in 21% intraläsionale Osteophyten fest. Gao *et al.* fanden weder subchondrale Zysten, noch intraläsionale Osteophyten vier Wochen postoperativ nach Mikrofrakturbehandlung mit und ohne Knochenmarksapirat an Trochleas des Minischweins<sup>144</sup>. Stachel *et al.* fanden sechs Monate postoperativ die höchsten intraläsionalen Osteophyten in der Gruppe des alleinigen Débridement im Vergleich zu den mit Pridie-Bohrungen (6 Löcher vs. 2 Löcher von 1 mm Breite und 10 mm Tiefe) behandelten Schaf-Trochleas.<sup>178</sup>

Im Allgemeinen stellen intraläsionale Osteophyten radiologische Hauptmerkmale der Arthrose dar<sup>49,179</sup> und können ursächlich für Schmerz und Funktionsverlust des jeweilig betroffenen Gelenkes sein.<sup>179</sup> In Gelenken starker biomechanischer Beanspruchung dringt fibrovaskuläres Gewebe vor. Es kommt zur endochondralen Knochenneubildung.<sup>49</sup> Die gelenknahe Seite des

Osteophyten ist dabei meist mit Knorpel der ursprünglichen Knorpeloberfläche des Gelenks bedeckt.<sup>179</sup> Cole *et al.*<sup>180</sup> fanden Osteophyten am Patienten in 54-70% nach Mikrofrakturbehandlung<sup>128</sup> und in 8-25% nach ACT.<sup>128,181</sup>

Subchondrale Zysten hingegen entstehen im Kontext der reparativen Knorpelchirurgie wahrscheinlich durch den Einstrom von Gelenkflüssigkeit in den partiell durch markraumöffnende Verfahren eröffneten subchondralen Knochen.<sup>182</sup> Je kleiner der Defektdurchmesser, desto größer ist der Einstrom-Druck der Gelenkflüssigkeit.<sup>49,128,183</sup> Aufgrund eines Ventilmechanismus kann Gelenkflüssigkeit in den subchondralen Knochen zwar ein-, aber nicht austreten, der Knochen wird ausgespült. Daraus resultieren unter anderem Schmerzen unter Belastung.<sup>183</sup> In Tiermodellen traten subchondrale Zysten in unbehandelten chondralen Defekten<sup>184,185</sup> sowie nach Mikrofrakturbehandlung in bis zu 50% der Defekte auf.<sup>165,184</sup> Bei Patienten ist das Auftreten von Zysten nach Anwendung von Mikrofrakturbehandlung deutlich reduziert.<sup>11</sup> In der Behandlung durch ACT am Patienten wurden diese bis in 25<sup>21,67</sup>-39%<sup>181</sup> der Defekte gefunden. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit,<sup>186,187</sup> die unterschiedliche Dicke der subchondralen Knochenlamelle, das Vorhandensein von vorbestehender Mikroverletzungen der subchondralen Knochenlamelle,<sup>172</sup> eine erhöhte Körpertemperatur der Schafe (38-40 °C)<sup>188,189</sup> und die Unterschiede der postoperativen Belastung zwischen Patient und im Schafmodell<sup>125,190,191</sup> können Erklärungen für das häufigere Auftreten von subchondralen Zysten in unserem Tiermodell sein.<sup>47,128</sup>

Zusammenfassend scheint das Auftreten von subchondralen Zysten und Osteophyten lage-, spezies- und belastungsabhängig zu sein. Gerade die Beobachtungen der Arbeitsgruppe<sup>12,28,128,144</sup> dieser Studie bestätigen die Annahme, dass die Lokalisation der Defekte im Kniegelenk die Strukturmuster und biochemische Zusammensetzung von Knorpelreparaturgewebe vorgeben<sup>28,137</sup> und im Tiermodell häufiger zu defektassoziierten Veränderungen des subchondralen Knochens<sup>48</sup> in der medialen Femurkondyle als in der Trochlea führen. Des Weiteren fällt auf, dass weder Zysten noch Osteophyten nach einem kurzem Behandlungszeitraum (vier Wochen)<sup>47</sup> und unter additiver Anwendung von Knochenmarksaspiraten auftreten.<sup>144</sup> Das lässt schlussfolgern, dass gerade in Tiermodellen eine längere Belastungsphase unter Vollbelastung zu ausgeprägten Sekundärveränderungen des subchondralen Knochens<sup>48</sup> führt. Eine postoperative Phase des reinen Sohlenkontaktes über mindestens sechs Wochen muss am Patienten in Rehabilitationsprotokollen nach Mikrofrakturbehandlung angestrebt werden.<sup>180</sup> Insbesondere im Hinblick auf die restriktiven Vorgaben des Tierschutzes ist es fast unmöglich eine korrekte Umsetzung der einschränkenden postoperativen Belastung im Vierfüßtiermodell realistisch zu erzielen.<sup>128</sup> Zudem unterstreicht die Studie von Gao *et al.*<sup>144</sup>

die Bedeutsamkeit des Einsatzes von Biomaterialien (z. B. Knochenmarksaspiraten oder Trägersubstanzen). Sie füllen und unterstützen die Defektzone und können den Verlust an subchondraler Knochensubstanz vermindern.<sup>12,144,185,192,193</sup> Das Ergebnis der vorliegenden Studie lässt darüber hinaus schlussfolgern, dass eine Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle *per se* zu subchondralen Veränderungen führt. Denn nach Mikrofrakturbehandlung traten häufiger Zysten und Osteophyten als nach alleinigem Débridement auf. Es bedarf somit offenbar einer Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle, um Sekundärveränderungen des subchondralen Knochens wie Osteophyten und subchondrale Knochenzysten zu induzieren.<sup>194</sup>

## 7.5. Limitierungen und Stärken der vorliegenden Arbeit

Die Anwendung mehrerer Analysemethoden mit Probeentnahmen an verschiedenen Defektregionen im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse stellt eine Limitierung dieser Studie dar, denn hier wurde eine unterschiedlich ausgeprägte Reparatur und Auffüllung innerhalb eines Defektes beobachtet. Limitierend in dieser Studie war zudem sowohl der nur einmalige Evaluationszeitpunkt nach sechs Monaten als auch der fehlende Langzeitbeobachtungspunkt nach ein bis zwei Jahren postoperativ. Zudem führten wir keine biomechanische Testung des Reparaturgewebes durch. Dies wäre von besonderem Interesse, da die Läsionen im Tiermodell durch die sofortige Vollbelastung postoperativ stärkeren biomechanischen Belastungen unterliegen als sie am Patienten im klinischen Alltag auftreten.<sup>195,128</sup> Die unausweichliche postoperative Belastungsphase unter Vollbelastung mit uneingeschränktem Bewegungsausmaß im Tiermodell führt zu ausgeprägten Sekundärveränderungen des subchondralen Knochens und stellt dementsprechend eine weitere Limitierung dar.<sup>48</sup> Es ist bekannt, dass Schafe im Vergleich zu Minischweinen eine höhere Neigung zu subchondralen Zysten aufweisen.<sup>144</sup> Bei dieser Studie wurde bewusst das Schafmodell gewählt, da die Größenverhältnisse und die Anatomie des Beines im Kontrast zum Minischwein mehr dem Patienten entsprechen.

Zusammenfassend weist das in der vorliegenden Arbeit angewandte Studiendesign einige signifikante Stärken auf: Erstens, acht Schafe wurden bilateral mit einer Mikrofrakturbehandlung des kleinen oder großen Ahlendurchmessers versorgt. Dadurch bestanden keine substanziellen Unterschiede in der postoperativen Belastung zwischen den Gruppen der Mikrofrakturbehandlung. Zweitens wurden unsere Ahlengrößen auf der Basis vorausgegangener Studien<sup>27,28,92,128,177</sup> festgelegt. Diese variierten zwar nur geringfügig, führten aber dennoch zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen. Drittens korrespondierten die getesteten Ahlendurchmesser gut mit den klinisch am Patienten eingesetzten Instrumenten (1,6 mm bis

2,0 mm Durchmesser),<sup>196</sup> da die humane mediale Femurkondyle 1,6-mal größer ist als eine Schafs-Kondyle.<sup>197</sup> Letztens sind die Anwendung etablierter, validierter, standardisierter und robuster Analysemethoden [makroskopische (mithilfe semiquantitativer Bewertungssysteme), histologische, immunhistochemische, biochemische und die strukturelle Analyse des subchondralen Knochens im hochauflösenden Mikro-CT],<sup>18,24,114,177</sup> die klinische Relevanz<sup>9,18</sup> und die Übertragbarkeit der Resultate auf Patienten als weitere Stärken dieser Arbeit zu nennen.<sup>12</sup>

## 7.6. Klinischer Ausblick

Markraumeröffnende Verfahren wie die Mikrofrakturbehandlung stellen eine etablierte Therapie der Wahl zur Behandlung von symptomatischen, kleinflächigen Knorpeldefekten dar.<sup>15,16</sup> Bisher gab es allerdings keine fundierten Empfehlungen hinsichtlich zu verwendender Ahlendurchmesser. An diesem Punkt setzt die vorliegende Studie an und liefert valide Daten mit Empfehlungen zur Verwendung eines kleineren Ahlendurchmessers aufgrund des vorteilhaften Effektes auf die Knorpelreparatur. In zukünftigen Experimenten an Großtieren müssten nun Möglichkeiten gefunden werden, um die postoperative Belastung zu reduzieren.<sup>128</sup> Gleichwohl ist davon auszugehen, dass bei Übertragung des vorliegenden Studiendesigns auf den Patienten die klinischen Resultate, insbesondere die subchondrale Mikroarchitektur betreffend, besser ausfallen werden, wie auch die guten klinischen Ergebnisse dieser chirurgischen Technik kurz- und mittelfristig erwarten lassen.<sup>5,16,20,22,24,25,93,198,120</sup> Unter diesen Voraussetzungen und in der Gesamtschau der Studienergebnisse sowie der Literaturrecherche bleibt mit dieser Studie die Auffassung, dass eine längerfristig angelegte klinische Untersuchung gerechtfertigt wäre, in welcher der Effekt der Ahlendurchmesser auf die osteochondrale Reparatur langfristig und unter klinischen Bedingungen weiter untersucht werden sollte.

## 7.7. Schlussfolgerung

Kleine Ahlendurchmesser verbessern gegenüber größeren Ahlendurchmessern signifikant die histologische Gesamtqualität des Reparaturknorpels im translationalen Großtiermodell sechs Monate postoperativ. Hinsichtlich der Rekonstruktion des subchondralen Knochens zeigten kleine Ahlen gegenüber großen Ahlen keine Vorteile. Beide Ahlengrößen führten zu einer Störung der subchondralen Mikroarchitektur.

---

Subchondrale Knochenzysten und intraläsionale Osteophyten sind häufiger nach Mikrofrakturbehandlungen als nach alleinigem Débridement. Ihr Auftreten ist lage-, spezies- und belastungsabhängig. Zur Klärung ihrer Ätiopathogenese und Inzidenz sind weitere Untersuchungen im Tiermodell sowie am Patienten erforderlich.

Die vorliegende Studie macht somit deutlich, dass die Auswirkungen der Mikrofrakturierung auf die Reparatur von Gelenknorpel und subchondralen Knochen divergieren. Die histologische Qualität des Reparaturknorpels wird durch Mikrofrakturbehandlung im Vergleich zum Débridement verbessert, die subchondrale Mikroarchitektur des Knochens jedoch geschwächt. Auswirkungen der geometrischen Konfiguration der Ahlenspitzen auf den subchondralen Knochen sollten in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Perifokale Arthrose der angrenzenden osteochondralen Einheit entwickelte sich ohne signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen. In der Gesamtschau erscheinen in der Zukunft längerfristig angelegte Studien sinnvoll, um die osteochondrale Reparatur nach Mikrofrakturierung bei Großtieren mit quadrupeder Gangart und Patienten beurteilen zu können.

---

## Referenzen

1. Madry H, Grün U, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(40):669-677.
2. Buckwalter J, Mankin H, Grodzinsky A. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465-480.
3. O'Driscoll S. Current concepts review - the healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Jt Surg.* 1998;80(12):1795-1812.
4. Hunziker E. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(6):432-463.
5. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med.* 2009;37(1):33-41.
6. Madry H. Operative und rekonstruktive Behandlung. In: Kohn D, Hrsg. Orthopädie und Orthopädische Chirurgie - Knie. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2004: 367-379.
7. Goebel L, Kohn D, Madry H. Biological reconstruction of the osteochondral unit after failed focal resurfacing of a chondral defect in the knee. *Am J Sports Med.* 2016;44(11):2911-2916.
8. Madry H, Pape D. Autologe Chondrozytentransplantation. *Orthopäde.* 2008;37(8):756-763.
9. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 2002;18(7):730-734.
10. Zhang Y, Jordan J. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010;26(3):355-369.
11. Mithoefer K, McAdams T, Williams R, Kreuz P, Mandelbaum B. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med.* 2009;37(10):2053-2063.
12. Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiari M, Madry H. Small-diameter awls improve articular cartilage repair after microfracture treatment in a translational animal model. *Am J Sports Med.* 2016;44(1):209-219.
13. Flanigan D, Harris J, Trinh T, Siston R, Brophy R. Prevalence of chondral defects in athletes' knees: a systematic review. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(10):1795-1801.
14. Buckwalter J, Mankin H. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum.* 1998;41(8):1331-1342.
15. Mithoefer K, Williams R, Warren R, et al. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Jt Surg.* 2006;88(1):294-304.
16. Gomoll A, Farr J, Gillogly S, Kercher J, Minas T. Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Jt Surg.* 2010;92(14):2469-2490.
17. Steadman J, Rodkey W, Briggs K, Rodrigo J. Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde.* 1999;28:26-32.
18. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum B. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee. *Am J Sports Med.* 2009;37(10):2053-2063.
19. Knutsen G, Drogset J, Engebretsen L, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Jt Surg.* 2007;89(10):2105-2112.
20. Kreuz P, Steinwachs M, Erggelet C, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(11):1119-1125.

21. Saris D, Vanlauwe J, Victor J, *et al.* Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am J Sports Med.* 2009;37(Suppl 1):10-19.
22. Steadman J, Briggs K, Rodrigo J, Kocher M, Gill T, Rodkey W. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* 2003;19(5):477-484.
23. Gobbi A, Karnatzikos G, Kumar A. Long-term results after microfracture treatment for full-thickness knee chondral lesions in athletes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014;22(9):1986-1996.
24. Mithoefer K, Williams R, Warren R, Wickiewicz T, Marx R. High-impact athletics after knee articular cartilage repair: a prospective evaluation of the microfracture technique. *Am J Sports Med.* 2006;34(9):1413-1418.
25. Knutsen G, Drogset J, Engebretsen L, *et al.* A randomized multicenter trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture: long-term follow-up at 14 to 15 years. *J Bone Jt Surg.* 2016;98(16):1332-1339.
26. Orth P, Gao L, Madry H. Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020;28(3):670-706.
27. Min BH, Choi W, Lee Y, Park S, *et al.* Effect of different bone marrow stimulation techniques (BSTs) on MSCs mobilization. *J Orthop Res.* 2013;31(11):1814-1819.
28. Eldracher M, Orth P, Cucchiari M, Pape D, Madry H. Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. *Am J Sports Med.* 2014;42(11):2741-2750.
29. Peretti G, Mangiavini L, Deponi D. Basic science of articular cartilage. In: Brittberg M, Imhoff A, Madry H, Mandelbaum B, Hrsgg. *Cartilage repair: current concepts*, 1. Auflage. London: DJO Publications; 2010: 3-11.
30. Welsch U, Kummer W. Gewebe. In: Welsch U, Kummer W, Deller T., Hrsgg. *Histologie - Lehrbuch und Atlas*, 6. Auflage. München: Urban & Fischer/Elsevier; 2022: 118-152.
31. Milz S, Putz R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat.* 1994;185(Pt 1): 103-110.
32. Greenwald A, Haynes D. A pathway for nutrients from the medullary cavity to the articular cartilage of the human femoral head. *J Bone Jt Surg.* 1969;51(4):747-753.
33. Hedbom E, Heinegard D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem.* 1993;268(36):27307-27312.
34. Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Heinegard D, Reinholt F, Svensson O. Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol.* 1994;14(3):227-232.
35. Roughley P, Lee E. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech.* 1994;28(5):385-397.
36. Gao L, Orth P, Cucchiari M, Goebel L, Madry H. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Dis Model Mech.* 2018;11(6):1-12.
37. Alford J, Cole B. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med.* 2005;33(2):295-306.
38. Weiss C, Rosenberg L, Helfet A. An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J Bone Jt Surg.* 1968;50(4):663-674.
39. MacConaill M. The movements of bones and joints; the mechanical structure of articulating cartilage. *J Bone Jt Surg.* 1951;33(2):251-257.
40. Ulrich-Vinther M, Maloney M, Schwarz E, Rosier R, O'Keefe R. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003;11(6):421-430.
41. Hunziker E, Quinn T, Häuselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(7):564-572.

42. Aydelotte M, Kuettner K. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res.* 1988;18(3):205-222.
43. Roth V, Mow V. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Jt Surg.* 1980;62(7):1102-1117.
44. Rudert M, Wirth C. Knorpelregeneration und Knorpelersatz. *Orthopäde.* 2000;27:309-321.
45. Goebel L, Madry H. Anatomie und Biomechanik des Gelenkknorpels. In: Niemeyer P, Fritz J, Albrecht D, Hrsgg. *Knorpeltherapie: Praxisleitfaden der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU.* Berlin: Walter de Gruyter; 2016: 1-8.
46. Madry H, van Dijk C, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):419-433.
47. Orth P, Cucchiari M, Kohn D, Madry H. Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair-translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater.* 2013;25:299-316.
48. Orth P, Madry H. Knorpeldefekte. Natürlicher Verlauf und autologes Reparaturpotenzial. *Arthroscopie.* 2016;29(2):68-74.
49. Imhof H. Arthrose (degenerative Gelenkerkrankungen). In: Freyschmidt J, Stäbler A, Hrsgg. *Handbuch Diagnostische Radiologie. Muskuloskelettales System 3,* Berlin: Springer, 2005: 314-321.
50. Radin E, Paul I, Rose R. Role of mechanical factors in pathogenesis of primary osteoarthritis. *Lancet.* 1972;1(7749):519-522.
51. Imhof H, Breitenseher M, Kainberger F, Rand T, Trattnig S. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging.* 1999;10(3):180-192.
52. Brown T, Vrahas M. The apparent elastic modulus of the juxtarticular subchondral bone of the femoral head. *J Orthop Res.* 1984;2(1):32-38.
53. Goldring S, Goldring M. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016; 12(11):632-644.
54. Niemeyer P, Koestler W, Südkamp N. Probleme und Komplikationen chirurgischer Verfahren zur Behandlung vollschichtiger Knorpeldefekte am Kniegelenk. *Z Orthop Unfall.* 2011;149(1):45-51.
55. Pugh J, Radin E, Rose R. Quantitative studies of human subchondral cancellous bone. Its relationship to the state of its overlying cartilage. *J Bone Jt Surg.* 1974;56(2):313-321.
56. Armstrong S, Read R, Price R. Topographical variation within the articular cartilage and subchondral bone of the normal ovine knee joint: a histological approach. *Osteoarthr Cartil.* 1995;3(1):25-33.
57. Clark J, Huber J. The structure of the human subchondral plate. *J Bone Jt Surg.* 1990;72(5):866-873.
58. Simkin P, Graney D, Fiechtner J. Roman arches, human joints, and disease: differences between convex and concave sides of joints. *Arthritis Rheum.* 1980;23(11):1308-1311.
59. Holmdahl D, Ingelmark B. The contact between the articular cartilage and the medullary cavities of the bone. *Acta Orthop Scand.* 1950;20(2):156-165.
60. Ahmed A, Burke D. In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints - part I: tibial surface of the knee. *J Biomech Eng.* 1983;105(3):216-225.
61. Vince K, Insall J. Long-term results of cemented total knee arthroplasty. *Orthop Clin North Am.* 1988;19(3):575-580.
62. Hunziker E, Rosenberg L. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Jt Surg.* 1996;78(5):721-733.
63. Noyes F, Stabler C. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med.* 1989;17(4):505-513.

64. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *Osteologie*. 2000;9(1):17-25.
65. Outerbridge R. Further studies on the etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Jt Surg*. 1964;46:179-190.
66. Kiss A, Cucchiari M, Menger M, Kohn D, Hannig M, Madry H. Enamel matrix derivative inhibits proteoglycan production and articular cartilage repair, delays the restoration of the subchondral bone and induces changes of the synovial membrane in a lapine osteochondral defect model in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;8(1):524-531.
67. Jackson D, Lalor P, Aberman H, Simon T. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Jt Surg Am*. 2001;83(1):53-64.
68. Furukawa T, Eyre D, Koide S, Glimcher M. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Jt Surg*. 1980;62(1):79-89.
69. Shapiro F, Koide S, Glimcher M. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg*. 1993;75(4):532-553.
70. Shepard N, Nelson M. The localization of articular cartilage proteoglycan by electron microscopy. *Anat Rec*. 1977;187(4):463-476.
71. Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy*. 1986;2(1):54-69.
72. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Udvarhelyi I, Sziget I, Bély M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*. 1998;21(7):751-756.
73. Braun S, Vogt S, Imhoff A. Stadiengerechte operative Knorpeltherapie. *Orthopäde*. 2007;36(6):589-600.
74. Pride K. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. Proceedings of the British Orthopaedic Association. *J Bone Jt Surg*. 1959;41:618-619.
75. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlssons C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-895.
76. Anders S, Grifka J. Surgical treatment of focal cartilage defects in the knee: indications, techniques, modifications and results. *Orthopäde*. 2022;51(2):151-164.
77. Madry H. Surgical therapy in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2022;30(8):1019-1034.
78. Gelse K, Angele P, Behrens P, et al. Stellenwert des Débridements bei der Behandlung fokaler (Grad II – III) Knorpelschäden des Kniegelenks. Systematische Literaturübersicht und Empfehlungen der AG Geweberegeneration (DGO). *Z Orthop Unfall*. 2018;156(4):423-435.
79. Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391Suppl):306-317.
80. Bert J, Maschka K. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy*. 1989;5(1):25-32.
81. Smillie S. Treatment of osteochondritis dissecans. *J Bone Jt Surg*. 1957;39-B(2):248-260.
82. Chen H, Sun J, Hoemann C, et al. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res*. 2009;27(11):1432-1438.
83. Farr J, Cole B, Dhawan A, Kercher J, Sherman S. Clinical cartilage restoration: evolution and overview. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(10):2696-2705.
84. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391Suppl):362-369.
85. Rauch A, Rembeck E, Kohn L. Operative Therapie von Knorpelschäden. *Orthopäde*. 2018;47(11):961-973.

86. Kroell A, Marks P, Chahal J, *et al.* Microfracture for chondral defects: assessment of the variability of surgical technique in cadavers. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(7):2374-2379.
87. Orth P, Gao L, Madry H. Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020;28(3):670-706.
88. Kok A, den Dunnen S, Lambers K, Kerkhoffs G, Tuijthof G. Feasibility study to determine if microfracture surgery using water jet drilling is potentially safe for talar chondral defects in a caprine model. *Cartilage.* 2021;13(2):1627S-1636S.
89. Spakova T, Amrichova J, Plsikova J, *et al.* A Preliminary study comparing microfracture and local adherent transplantation of autologous adipose-derived stem cells Followed by intraarticular injection of platelet-rich plasma for the treatment of chondral defects in rabbits. *Cartilage.* 2018;9(4):410-416.
90. Gill T, McCulloch P, Glasson S, Blanchet T, Morris E. Chondral defect repair after the microfracture procedure: a nonhuman primate model. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):680-685.
91. Chen H, Chevrier A, Hoemann C, Sun J, Picard G, Buschmann M. Bone marrow stimulation of the medial femoral condyle produces inferior cartilage and bone repair compared to the trochlea in a rabbit surgical model. *J Orthop Res.* 2013;31(11):1757-1764.
92. Kok A, Tuijthof G, den Dunnen S, *et al.* No effect of hole geometry in microfracture for talar osteochondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2013;471(11):3653-3662.
93. Mithoefer K, Williams R, Warren R, *et al.* The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Jt Surg.* 2005;87(9):1911-1920.
94. Mithoefer K, Venugopal V, Manaqibwala M. Incidence, degree, and clinical effect of subchondral bone overgrowth after microfracture in the knee. *Am J Sports Med.* 2016;44(8):2057-2063.
95. Steadman J, Rodkey W, Singleton S, Briggs K. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. *Oper Tech Orthop.* 1997;7(4):300-304.
96. Solheim E, Hegna J, Inderhaug E, Øyen J, Harlem T, Strand T. Results at 10-14 years after microfracture treatment of articular cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(5):1587-1593.
97. Miller B, Briggs K, Downie B, Steadman J. Clinical Outcomes following the microfracture procedure for chondral defects of the knee: a longitudinal data analysis. *Cartilage.* 2010;1(2):108-112.
98. Kon E, Filardo G, Berruto M, *et al.* Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture. *Am J Sports Med.* 2011;39(12):2549-2557.
99. Solheim E, Hegna J, Strand T, Harlem T, Inderhaug E. Randomized study of long-term (15-17 years) outcome after microfracture versus mosaicplasty in knee articular cartilage defects. *Am J Sports Med.* 2018;46(4):826-831.
100. Bae D, Song S, Yoon K, Heo D, Kim T. Survival analysis of microfracture in the osteoarthritic knee - Minimum 10-year follow-up. *Arthroscopy.* 2013;29(2):244-250.
101. Ulstein S, Årøen A, Røtterud J, Løken S, Engebretsen L, Heir S. Microfracture technique versus osteochondral autologous transplantation mosaicplasty in patients with articular chondral lesions of the knee: a prospective randomized trial with long-term follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014;22(6):1207-1215.
102. Solheim E, Hegna J, Inderhaug E. Long-term clinical follow-up of microfracture versus mosaicplasty in articular cartilage defects of medial femoral condyle. *Knee.* 2017;24(6):1402-1407.

103. Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ, Tak DH. Adipose-derived mesenchymal stem cells with microfracture versus microfracture alone: 2-year follow-up of a prospective randomized trial. *Arthroscopy*. 2016;32(1):97-109.
104. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen T, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Jt Surg*. 2004;86-A(3):455-464.
105. Dasar U, GURSOY S, Akkaya M, Algin O, Isik C, Bozkurt M. Microfracture technique versus carbon fibre rod implantation for treatment of knee articular cartilage lesions. *J Orthop Surg*. 2016;24(2):188-193.
106. Stanish W, McCormack R, Forriol F, et al. Novel scaffold-based BST-CarGel treatment results in superior cartilage repair compared with microfracture in a randomized controlled trial. *J Bone Jt Surg*. 2013;95(18):1640-1650.
107. Shive M, Restrepo A, Totterman S, et al. Quantitative 3D MRI reveals limited intralesional bony overgrowth at 1 year after microfracture-based cartilage repair. *Osteoarthr Cartil*. 2014;22(6):800-804.
108. Salzmänn G, Sah B, Südkamp N, Niemeyer P. Reoperative characteristics after microfracture of knee cartilage lesions in 454 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(2):365-371.
109. Solheim E, Øyen J, Hegna J, Austgulen O, Harlem T, Strand T. Microfracture treatment of single or multiple articular cartilage defects of the knee: a 5-year median follow-up of 110 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):504-508.
110. Asik M, Ciftci F, Sen C, Erdil M, Atalar A. The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee: midterm results. *Arthroscopy*. 2008;24(11):1214-1220.
111. Gudas R, Kalesinskas R, Kimtys V, et al. A prospective randomized clinical study of mosaic A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy*. 2005;21(9):1066-1075.
112. Volz M, Schaumburger J, Frick H, Grifka J, Anders S. A randomized controlled trial demonstrating sustained benefit of autologous matrix-induced chondrogenesis over microfracture at five years. *Int Orthop*. 2017;41(4):797-804.
113. Brittberg M, Recker D, Ilgenfritz J, Saris D. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: five-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med*. 2018;46(6):1343-1351.
114. Goyal D, Keyhani S, Lee E, Hui J. Evidence-based status of microfracture technique: a systematic review of Level I and II studies. *Arthroscopy*. 2013;29(9):1579-1588.
115. Salzmänn G, Sah B, Südkamp N, Niemeyer P. Clinical outcome following the first-line, single lesion microfracture at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2013;133(3):303-310.
116. Saris D, Price A, Widuchowski W, et al. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: two-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med*. 2014;42(6):1384-1394.
117. Schrock J, Kraeutler M, Houck D, McQueen M, McCarty E. A cost-effectiveness analysis of surgical treatment modalities for chondral lesions of the knee: microfracture, osteochondral autograft transplantation, and autologous chondrocyte implantation. *Orthop J Sport Med*. 2017;5(5):1-8.
118. Dhillon J, Decilveo A, Kraeutler M, Belk J, McCulloch P, Scillia A. Third-generation autologous chondrocyte implantation (cells cultured within collagen membrane) versus microfracture for focal chondral defects of the knee joint: a systematic review of randomized controlled trials at minimum two-year follow-up. *Arthroscopy*. 2022;38(8):2579-2586.
119. Bekkers J, Inklaar M, Saris D. Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review. *Am J Sports Med*. 2009;37(Suppl 1):148-155.

120. Kreuz P, Erggelet C, Steinwachs M, *et al.* Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy*. 2006;22(11):1180-1186.
121. Mithoefer K, Hambly K, Della Villa S, Silvers H, Mandelbaum B. Return to sports participation after articular cartilage repair in the knee: scientific evidence. *Am J Sports Med*. 2009;37(Suppl 1):167S-176S.
122. Keefe T, Minnig M, Arbeeve L, *et al.* Patterns of variation among baseline femoral and tibial cartilage thickness and clinical features: data from the osteoarthritis initiative. *Osteoarthr Cartil Open*. 2023;5(1):1-10.
123. Lungwitz S, Niemeyer P, Maurer J, *et al.* Degenerative cartilage lesions of the medial knee compartment. Associated factors, operative options, and preliminary results from the CartilageRegistry DGOU. *Z Orthop Unfall*. 2019;157(5):515-523.
124. Niemeyer P, Albrecht D, Aurich M, *et al.* Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration zur Behandlung von Knorpelschäden am Kniegelenk. *Z Orthop Unfall*. 2023;161(01):57-64.
125. Orth P, Madry H. A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013;14(5):1-8.
126. Goebel L, Orth P, Müller A, *et al.* Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T - comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthr Cartil*. 2012;20(9):1046-1055.
127. Meachim G. Light microscopy of Indian ink preparations of fibrillated cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1972;31(6):457-464.
128. Orth P, Goebel L, Wolfram U, *et al.* Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone. *Am J Sports Med*. 2012;40(4):828-836.
129. Feldkamp L, Goldstein S, Parfitt M, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989;4(1):3-11.
130. Hoemann C, Hurtig M, Rossomacha E, *et al.* Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Jt Surg*. 2005;87(12):2671-2686.
131. Wakitani S, Goto T, Pineda S, *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg*. 1994;76(4):579-592.
132. Little C, Smith M, Cake M, Read R, Murphy M, Barry F. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthr Cartil*. 2010;18(3):80-92.
133. Camplejohn K, Allard S. Limitations of safranin "O" staining in proteoglycan - depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 1988;89(2):185-188.
134. Schmitz N, Laverty S, Kraus V, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthr Cartil*. 2010;18(3):113-116.
135. Farndale R, Sayers C, Barrett A. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res*. 1982;9(4):247-248.
136. Farndale R, Buttle D, Barrett A. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 1986;4(883):173-177.
137. Orth P, Meyer HL, Goebel L, *et al.* Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. *J Orthop Res*. 2013;31(11):1772-1779.
138. Kim Y, Sah R, Doong J, Grodzinsky A. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem*. 1988;174(1):168-176.
139. Müller G, Hanschke M. Quantitative and qualitative analyses of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue. *Connect Tissue Res*. 1996;33(4):243-248.

140. Smith P, Krohn R, Hermanson G, *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
141. Orth P, Kaul G, Cucchiari M, *et al.* Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(12):2119-2130.
142. Marchand C, Chen G, Tran-Khanh N, *et al.* Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):508-519.
143. Orth P, Cucchiari M, Zurakowski D, Menger M, Kohn D, Madry H. Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthr Cartil.* 2013;21(4):614-624.
144. Gao L, Orth P, Müller-Brandt K, Goebel L, Cucchiari M, Madry H. Early loss of subchondral bone following microfracture is counteracted by bone marrow aspirate in a translational model of osteochondral repair. *Sci Rep.* 2017;7:1-16.
145. Maurer J, Grotejohann B, Jenkner C, *et al.* A registry for evaluation of efficiency and safety of surgical treatment of cartilage defects: the German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGO). *JMIR Res Protoc.* 2016;5(2):e122.
146. Sellers R, Peluso D, Morris E. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg.* 1997;79(10):1452-1463.
147. Chen G, Sun J, Lascau-Coman V, Chevrier A, Marchand C, Hoemann C. Acute osteoclast activity following subchondral drilling is promoted by chitosan and associated with improved cartilage repair tissue integration. *Cartilage.* 2011;2(2):173-185.
148. Appleyard R, Burkhardt D, Ghosh P, *et al.* Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11(1):65-77.
149. Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan J, Madry H, Cucchiari M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning Adv Appl.* 2014;(7):1-17.
150. Oláh T, Cai X, Michaelis J, Madry H. Comparative anatomy and morphology of the knee in translational models for articular cartilage disorders. Part I: large animals. *Ann Anat.* 2021;235:1-18.
151. Brittberg M, Winalski C. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Jt Surg.* 2003;85-A(2):58-69.
152. Madry H, Ziegler R, Pape D, Cucchiari M. Strukturelle Veränderungen im lateralen femorotibialen Kompartiment nach Tibiakopfosteotomie. *Orthopäde.* 2014;43(11):958-965.
153. McCarthy H, Tins B, Gallacher P, *et al.* Histological and radiological assessment of endogenously generated repair tissue in vivo following a chondral harvest. *Cartilage.* 2023;14:(1)48-58.
154. Blackman A, Smith M, Flanigan D, Matava M, Wright R, Brophy R. Correlation between magnetic resonance imaging and clinical outcomes after cartilage repair surgery in the knee: a systematic review and meta-analysis. *Am J Sports Med.* 2013;41(6):1426-1434.
155. Recht M, Bobic V, Burstein D, *et al.* Magnetic resonance imaging of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391):379-396.
156. Strickland C, Ho C, Merkle A, Vidal A. MR imaging of knee cartilage injury and repair surgeries. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2022;30(2):227-239.
157. Jung M, Tuischer JS, Sergi C, *et al.* Local application of a collagen type I/hyaluronate matrix and growth and differentiation factor 5 influences the closure of osteochondral defects in a minipig model by enchondral ossification. *Growth Factors.* 2006;24(4):225-232.

158. Smith G, Taylor J, Almqvist K, *et al.* Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy*. 2005;21(12):1462-1467.
159. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;374:212-234.
160. O'Driscoll S, Keeley F, Salter R. 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 Jt Surg*. 1988;70(4):595-606.
161. Goebel L, Orth P, Cucchiaroni M, Pape D, Madry H. Macroscopic cartilage repair scoring of defect fill, integration and total points correlate with corresponding items in histological scoring systems - a study in adult sheep. *Osteoarthr Cartil*. 2017;25(4):581-588.
162. Marlovits S, Striessnig G, Resinger C, *et al.* Definition of pertinent parameters for the evaluation of articular cartilage repair tissue with high-resolution magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol*. 2004;52(3):310-319.
163. Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, Trattnig S. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol*. 2006;57(1):16-23.
164. Orth P, Zurakowski D, Wincheringer D, Madry H. Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(5):329-339.
165. Frisbie D, Morisset S, Ho C, Rodkey W, Steadman J, McIlwraith C. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med*. 2006;34(11):1824-1831.
166. Drobic M, Radosavljevic D, Cor A, Brittberg M, Strazar K. Debridement of cartilage lesions before autologous chondrocyte implantation by open or transarthroscopic techniques. *J Bone Jt Surg*. 2010;92(4):602-608.
167. Hunziker E. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;(367):135-146.
168. Gillquist J, Lysholm J. Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale. *Am J Sports Med*. 1982;10(3):150-154.
169. Tegner Y, Lysholm J. Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries. *Clin Orthop Relat Res*. 1985;(198):43-49.
170. Kraeutler M, Belk J, Purcell J, McCarty E. Microfracture versus autologous chondrocyte implantation for articular cartilage lesions in the knee: a systematic review of 5-year outcomes. *Am J Sports Med*. 2018;46(4):995-999.
171. Madry H, Luyten F, Facchini A. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(3):407-422.
172. Burr D, Radin E. Microfractures and microcracks in subchondral bone: Are they relevant to osteoarthrosis? *Rheum Dis Clin North Am*. 2003;29(4):675-685.
173. Wei W, Dutchak P, Wang X, *et al.* Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(8):3143-3148.
174. Borah B, Dufresne T, Chmielewski P, Johnson T, Chines A, Manhart M. Risedronate preserves bone architecture in postmenopausal women with osteoporosis as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Bone*. 2004;34(4):736-746.
175. Okazaki N, Chiba K, Taguchi K, *et al.* Trabecular microfractures in the femoral head with osteoporosis: analysis of microcallus formations by synchrotron radiation micro CT. *Bone*. 2014;64:82-87.
176. Chen H, Chevrier A, Hoemann C, Sun J, Ouyang W, Buschmann M. Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its relationship to articular cartilage resurfacing. *Am J Sports Med*. 2011;39(8):1731-1740.

177. Benthien J, Behrens P. Reviewing subchondral cartilage surgery: considerations for standardised and outcome predictable cartilage remodelling. *Int Orthop*. 2013;37(11):2139-2145.
178. Stachel N, Orth P, Zurakowski D, et al. Subchondral drilling independent of drill hole number improves articular cartilage repair and reduces subchondral bone alterations compared with debridement in adult sheep. *Am J Sports Med*. 2022;50(10):2669-2679.
179. van der Kraan P, van den Berg W. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthr Cartil*. 2007;15(3):237-244.
180. Cole B, Farr J, Winalski C, et al. Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2011;39(6):1170-1179.
181. Vasiliadis H, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging technique. *Am J Sports Med*. 2010;38(5):943-949.
182. Gao L, Cucchiari M, Madry H. Cyst formation in the subchondral bone following cartilage repair. *Clin Transl Med*. 2020;10(8):e248.
183. van Dijk C, Reilingh M, Zengerink M, van Bergen C. Osteochondral defects in the ankle: why painful? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(5):570-580.
184. Demange M, Minas T, von Keudell A, Sodha S, Bryant T, Gomoll A. Intralesional osteophyte regrowth following autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation technique. *Cartilage*. 2017;8(2):131-138.
185. Schlichting K, Schell H, Kleemann R, et al. Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing. *Am J Sports Med*. 2008;36(12):2379-2391.
186. Benazzo F, Cadossi M, Cavani F, et al. Cartilage repair with osteochondral autografts in sheep: effect of biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res*. 2008;26(5):631-642.
187. Miyamoto K, Ishimaru JI, Kurita K, Goss A. Synovial matrix metalloproteinase-2 in different stages of sheep temporomandibular joint osteoarthritis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60(1):67-72.
188. Recabarren S, Vergara M, Llanos A, Serón-Ferré M. Circadian variation of rectal temperature in newborn sheep. *J Dev Physiol*. 1987;9(5):399-408.
189. Igono M, Molokwu E, Aliu Y. Seasonal variations in rectal temperature of Yankasa sheep. *Vet Res Commun*. 1983;6(3):223-226.
190. Brandt K. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arthritis Rheum*. 2003;49(2):267-271.
191. Pape D, Madry H. The preclinical sheep model of high tibial osteotomy relating basic science to the clinics: standards, techniques and pitfalls. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(1):228-236.
192. Gao L, Orth P, Cucchiari M, Madry H. Autologous matrix-induced chondrogenesis: a systematic review of the clinical evidence. *Am J Sports Med*. 2019;47(1):222-231.
193. Pipino G, Risitano S, Alviano F, et al. Microfractures and hydrogel scaffolds in the treatment of osteochondral knee defects: a clinical and histological evaluation. *J Clin Orthop Trauma*. 2019;10(1):67-75.
194. Orth P, Cucchiari M, Wagenpfeil S, Menger M, Madry H. PTH [1-34]-induced alterations of the subchondral bone provoke early osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2014;22(6):813-821.
195. Eldracher M. *Subchondrale Bohrlochdurchmesser entsprechend dem physiologischen Trabekelabstand führen zur verbesserten Knorpeldefektreparatur: Analysen im translationalen Schafmodell* (Dissertation). Homburg/Saar: Universität des Saarlandes, Medizinische Fakultät; 2014.
196. Hoemann C, Gosselin Y, Chen H, et al. Characterization of initial microfracture defects in human condyles. *J Knee Surg*. 2013;26(5):347-355.

- 
197. Osterhoff G, Löffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P. Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee*. 2011;18(2):98-103.
  198. Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Jt Surg*. 2003;85-A Suppl 2:25-32.
  199. Salter, R. The biologic concept of continuous passive motion of synovial joints. The first 18 years of basic research and its clinical application. *Clinl Orthop Relat Res*. 1989(242):12–25.

---

## 8. Publikationen und Vorträge

### 8.1. Publikation

Orth, P., **Duffner, J.**, Zurakowski, D., Cucchiarini, M., Madry, H. Small-diameter awls improve articular cartilage repair after microfracture treatment in a translational animal model.

*American Journal of Sports Medicine* 2016, 44(1): 209-19. Impact-Faktor: 5,673 (2016)

### 8.2. Posterpräsentation

**Julia Duffner**, Patrick Orth, David Zurakowski, Dieter Kohn, Michael Menger, Magali Cucchiarini, Henning Madry. Kleine Ahlendurchmesser verbessern die Knorpelreparatur nach Mikrofrakturbehandlung *in vivo*.

*Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie* (Berlin), 100. Tagung, 10/2015.

### 8.3. Vorträge

Orth, P., **Duffner, J.**, Zurakowski, D., Kohn, D., Cucchiarini, M., Madry, H. Small microfracture awls improve articular cartilage repair in a translational animal model.

*European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy* (Barcelona, Spanien), 17<sup>th</sup> Congress, 05/2016

Orth, P., **Duffner, J.**, Zurakowski, D., Kohn, D., Menger, M.D., Cucchiarini, M., Madry, H. Small microfracture awls improve marrow stimulation of articular cartilage defects.

*Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie* (Dresden), 32. Jahreskongress, 09/2015

---

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Madry danke ich für seine geduldige und wissenschaftliche Betreuung. Auch bedanke ich mich für seine kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. P. Orth gilt mein herzlicher Dank für seine hervorragende Betreuung und stetige Bereitschaft Fragen und Probleme zu klären.

Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Cucchiarini danke ich für Ihre Anleitung und Hilfsbereitschaft bei komplizierten Versuchsdurchführungen. Ihre unterstützenden und aufmunternden Worte habe ich immer sehr geschätzt.

Herrn Prof. Dr. D. Zurakowski, Ph.D. danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung. Den Herren Prof. Dr. med. D. Kohn (†), Prof. Dr. med. M. Menger und Prof. Dr. med. M. Laschke danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe des Instituts für Experimentelle Orthopädie, insbesondere Gertrud Schmitt, Dr. rer. nat. J. Venkatesan, Niklas Stachel, Dr. med. Yannik Morscheid und Dr. med. Cliff Lange danke ich für die unterstützende Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Der Firma Aesculap danke ich für die individuelle Herstellung der Mikrofrakturierungs-Ahlen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, die über all die Jahre immer an mich geglaubt, mich unterstützt und weiter motiviert haben.

## Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 03. Februar 2025  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig  
Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Madry  
Prof. Dr. med. M. Laschke