

Redaktion
V. Ewerbeck, Heidelberg

Originalien

T. Gotterbarm¹ · T. Reitzel¹ · U. Schneider² · H. J. Voß¹ · E. Stofft³ · S. J. Breusch¹

¹ Abteilung Orthopädie I, Stiftung Orthopädische Universitätsklinik Heidelberg

² Orthopädische Universitätsklinik, RWTH Aachen

³ Anatomisches Institut, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Einwachsverhalten von periostgedeckten Knochendübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen

Eine tierexperimentelle Untersuchung am Göttinger Minipig

Zusammenfassung

Die Transplantation osteochondraler Dübel hat den Nachteil neuer Hebedefekte in gesunden Gelenkregionen. In diesem Tierexperiment sollte überprüft werden, ob die Transplantation von autologen periostgedeckten Knochendübeln zu einer adäquaten Knochen- und Knorpelreparation führt und ob die Injektion autologer Knorpelzellen in das Periost eine zusätzliche Verbesserung darstellt.

22 Minipigs wurden 2-mal bilateral operiert. Eine 1. Operation diente der Knorpelbiopsie im Kniegelenk zur Chondrozytenkultivierung. In einer 2. Operation wurde ein osteochondraler Defekt in der medialen Trochlea gesetzt und mit einem kortikospongiösen Knochenzylinder aus der Tibia unterschiedlich therapiert. Gruppe A: Spontanheilung (Kontrolle), Gruppe B: Knochenzylinder, Gruppe C: Zylinder mit anhaftendem Periost, Gruppe D: Zylinder mit Periost und darin injizierte autologe Chondrozyten. Die Tiere wurden nach 6, 12, 26 und 52 Wochen getötet. Die Präparate wurden makroskopisch beurteilt, biomechanisch getestet (Langzeitpräparate; Indentationstest) und anhand eines histomorphologischen Scores verblindet begutachtet.

Periostgedeckte Knochendübel führten zu einer guten RepARATION des Knochen- und Knorpelgewebes. Die gebildeten Regenerate der Gruppe C und D bestanden überwiegend aus Faserknorpel, basal mit hyalinartigen Gewebeinseln und waren randständig in den UmgebungsKnorpel integriert. Die zusätzliche Knorpelzellinjektion erbrachte keine verbesserte Regeneratbildung. Der bio-

mechanisch Test zeigte eine deutliche Überlegenheit der Therapiegruppen C und D.

Aufgrund unserer Resultate stellt die alleinige Transplantation periostgedeckter Knochendübel eine echte Alternative zur primären Therapie chondraler und osteochondraler Defekte dar und bietet eine gute Möglichkeit zur Hebedefektfüllung. Der zusätzliche Einsatz autologer Chondrozyten scheint nicht gerechtfertigt.

Schlüsselwörter

Periost · Knochendübel · Osteochondraler Defekt · OATS · Autologe Knorpelzelltransplantation

Die Behandlung fokaler Knorpel- und kombinierter Knorpel-Knochen-Defekte an unterschiedlichen Gelenken stellt ein nur unbefriedigend gelöstes Problem dar. Gerade beim jungen, sportlich aktiven Patienten entstehen solche Gelenkschäden häufig aufgrund traumatischer Schädigungsmechanismen, seltener auf dem Boden einer Osteochondrosis dissecans (OCD).

Eine Vielzahl operativer Verfahren hat sich mittlerweile etabliert. Gelenklavage und Débridement sind mit einer hohen Beschwerderezidivrate verbunden [8]. Bei der Abrasionsarthroplastik [22], subchondralen Anbohrung [38], Mikrofrakturierung [44] und Spongia-

lisierung [12] soll durch Eröffnung der subchondralen Knochenplatte die Bildung von Faserknorpel induziert werden. Diese Verfahren führen klinisch zwar kurz bis mittelfristig zu einer Symptomreduktion, langfristig aber zu sehr variablen Ergebnissen [8] mit einem biomechanisch minderwertigen Regenerat [29].

Der Mangel an adäquaten Therapiemöglichkeiten hat in den vergangenen Jahrzehnten zu zahlreichen experimentellen Untersuchungen geführt, mit dem Bestreben, eine biologische Knorpelheilung mit hyalinem, zumindest hyalinartigem Gewebe zu erreichen.

Mit den Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT), [36] und der Transplantation autologer, osteochondraler Dübel (OCT, OATS), [4, 11, 13, 14] stehen seit kurzem 2 Methoden zur Verfügung, mit der sich laut Autoren gute bis sehr gute klinische Ergebnisse erzielen lassen. Von einer Reproduzierbarkeit kann jedoch nur teilweise gesprochen werden.

Die Transplantation autologer Knorpel-Knochen-Dübel bietet als einziges Verfahren den großen Vorteil echten hyalinen Gelenkknorpels bei gleich-

© Springer-Verlag 2003

Priv.-Doz. Dr. Steffen Breusch
Abteilung Orthopädie I,
Stiftung Orthopädische Universitätsklinik,
Schlierbacher Landstraße 200a,
69118 Heidelberg
E-Mail: steffen.breusch@ok.uni-heidelberg.de

T. Gotterbarm · T. Reitzel · U. Schneider
H. J. Voß · E. Stofft · S. J. Breusch

Integration of periosteum covered autogenous bone grafts with and without autologous chondrocytes. An animal experiment using the Göttinger minipig

Abstract

Autologous osteochondral transplantation has the major disadvantage of significant damage to a healthy joint surface at the donor site. The purpose of this study was to examine the effect of autogenous chondrocytes injected into the periosteum of autologous bone grafts in order to provide an alternative method for cartilage repair.

A total of 22 Göttinger minipigs were operated twice on both knees. The first operation served for cartilage biopsy for the chondrocyte culture. During the second operation an osteochondral defect was created in the medial facet of the trochlear groove. The defect was treated differently with an autologous cortico-cancellous bone cylinder, harvested from the proximal tibia. Group A: untreated defect (control); B: bone-graft; C: bone-graft covered with periosteum; D: bone-graft with periosteum and injected autologous chondrocytes. The animals were killed after 6, 12, 26 and 52 weeks. The regenerated areas were evaluated macroscopically, tested biomechanically (long-term specimens; indentation-test) and a histological, blind evaluation was carried out according to a semi-quantitative scoring system.

The periosteum covered bone cylinders in Groups C and D showed good repair of the bone and cartilage defect. The repaired tissue consisted predominantly of fibrocartilage with the partial formation of hyalin like tissue. The regenerated areas were integrated with the adjacent cartilage and were biomechanically superior when compared with the other groups. The additional injection of chondrocytes did not produce significantly better results.

Our findings suggest that the transplantation of periosteum-covered bone cylinders may provide an alternative method for treating chondral and osteochondral defects and can be recommended for filling large donor site defects in joint surgery. The additional transplantation of chondrocytes does not seem to be justified.

Keywords

Periosteum · Bone graft · Osteochondral defect · OATS · Autologous chondrocyte transplantation

Originalien

zeitiger Sanierung des subchondral geschädigten Knochens. Deshalb und nicht zuletzt wegen der relativ einfachen arthroskopischen Durchführbarkeit, verbunden mit einem geringen finanziellen Aufwand, wird dieses Verfahren von einigen Zentren favorisiert angewandt [17]. Der gravierende Nachteil dieser Methode besteht in der Schaffung neuer Knorpeldefekte in gesunden Gelenkregionen bei meist jungen Patienten.

In der Literatur werden unterschiedlich häufig Beschwerden beschrieben, die ursächlich mit diesen Hebedefekten in Verbindung gebracht werden können. So kommt es je nach verwendeter Entnahmestelle in bis zu 37% der Fälle postoperativ zur Ausbildung eines Hämarthros [25], in bis zu 22% zu einem vorübergehenden oder dauerhaften femoropatellaren Schmerzsyndrom [3] und in bis zu 40% der Fälle zu einem neu aufgetretenen vorderen Knieschmerz [35]. Außerdem stehen die zu transplantierenden Zylinder nur in einer sehr begrenzten Anzahl und Größe zur Verfügung, sodass nur Knorpeldefekte bis zu einer bestimmten Größe (2–3 cm²) behandelt werden können [4, 13].

In der hier dargestellten tierexperimentellen Untersuchung sollte überprüft werden, ob die Transplantation periostgedeckter Knochendübel aus dem Tibiakopf zu einer akzeptablen Knochen und Knorpelreparation führen kann. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die zusätzliche Injektion autologer Knorpelzellen in den Periostdeckel zu einer verbesserten Knorpelheilung führt.

Material und Methoden

Allgemeiner Versuchsaufbau

Nach einem Vorversuch mit 4 Tieren und einer postoperativen Laufzeit von 6 und 26 Wochen wurde die Laufzeit der 18 Tiere im Hauptversuch auf 6, 12 und 52 Wochen festgelegt. Alle Tiere wurden

in einem prospektiv, randomisierten Vergleich an beiden Kniegelenken simultan operiert. Eine 1. Operation diente dabei der Entnahme einer Knorpelbiopsie; 4–6 Wochen später wurde in einer 2. Operation die Biopsiestelle in der medialen Trochlea überfräst. Dieser Defekt wurde dann mit unterschiedlichen Methoden A, B, C und D therapiert (Abb. 1).

Versuchstiere und operatives Vorgehen

22 adulte Göttinger Minipigs, mit einem durchschnittlichen Alter von 1,9 (1,5–2,5) Jahren und einem mittleren Gewicht von 42 (32–55) kg wurden in Intubationsnarkose operiert. Hierzu wurden die Tiere mit Azaperon (Stresnil®, 4 mg/kg KG), Ketamin (Ketanest® 10%ige Lösung, 10 mg/kgKG) und Midazolam (Dormicum® 15/3 ml, 1 mg/kgKG) prämediziert. Nach Vertiefung der Narkose mit Propofol i.v. (Disoprivan®, 0,5–1 mg/kgKG) wurde die Anästhesie mit Isofluran (1–1,5 Vol%) in O₂:N₂O = 1:2 bei kontrollierter Beatmung (12 Atemzüge/min, 10–15 ml/kgKG) erhalten. Präoperativ wurde zur Infektionsprophylaxe Netilmicinsulfat (Certomycin® 5 mg/kgKG) einmalig appliziert. Zur analgetischen postoperativen Behandlung wurde Buprenorphin (Temgesic® 0,01 mg/kgKG) i.v. bzw. i.m. verabreicht.

Operation I: Knorpelbiopsie

Unter sterilen Kautelen erfolgte zunächst über transligamentäre Miniarthrotomie die Entnahme einer Knorpelbiopsie aus dem medialen Patellagleitlager. Das Knorpelbiopsat wurde in individuell zugeordnete, sterile und mit 5 ml Kulturmedium DMEM (1000 mg/l Glukose, Gibco BRL) gefüllte Transportgefäße überführt, gekühlt gelagert und innerhalb von 1 h in das hauseigene Zelllabor gebracht.

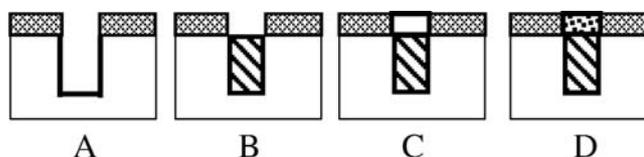


Abb. 1 ▲ Schematische Darstellung der Therapiegruppen: Gruppe A: Spontanheilung, osteochondraler Defekt (Kontrolle); Gruppe B: Knochenzylinder ohne Periost; Gruppe C: Knochenzylinder mit Periost; Gruppe D: Knochenzylinder mit Periost und darin injizierte autologe Chondrozyten

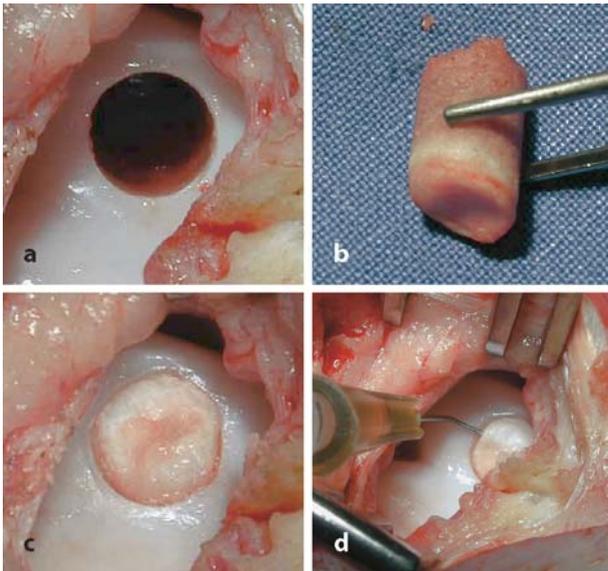


Abb. 2 ◀ **Operationstechnik.**
a Überfräste Biopsiestelle
der medialen Trochlea;
b kortikospongiöses Trans-
plantat mit Periostdeckel;
c press-fit eingebrachtes
Transplantat: Gruppe C;
d Injektion der Zellsuspension
in das Periost: Gruppe D

Zellpräparation und Kultivierung

Die Knorpelbiopsate wurden mit einem Skalpell in stecknadelkopfgröße Stückchen zerteilt, in eine Zellokulturflasche (50 ml) überführt und anschließend für ca. 16 h enzymatisch durch Kollagenase (0,05% Kollagenase, Sigma) und Hyaluronidase (0,1 mg/ml, Serva) in DMEM (1000 mg/l Glukose, Gibco) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, Penicillin (50 IU/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) in einem Inkubator (95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ bei 37°C) verdaut. Der Zellüberstand wurde abzentrifugiert und in 10%igem BCS-DMEM-Medium gewaschen, anschließend in 10 cm große Petrischalen eingesät und über mehrere Passagen weiter kultiviert.

Herstellung der Zellsuspension für die Transplantation

4–6 Wochen nach der zweidimensionalen Multiplikation in Petri-Schalen wurden die Zellen ca. 1 h vor Operationsbeginn durch eine Trypsin-/EDTA-Behandlung von dem Plattenboden abgelöst, in Normalmedium gewaschen und in einer Dichte von 10⁷ Zellen/ml Medium in einer sterilen Insulinspritze (1 ml/40 IU, Plastipack®, Becton Dickinson) aufgenommen und mit aufgesetzter Kanüle (Microlance 3, 26G5/8; 0,45 ↔ 16; Becton Dickinson) steril verpackt. Die Vitalität der Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation wurde mittels Trypanblaufärbung ermittelt und lag bei durchschnittlich 93 (85–96)%.

Operation II: Überbohren der Biopsiestelle und Therapie

Über den ursprünglichen Hautschnitt wurde nach Darstellung des medialen Tibiakopfes ein kortikospongiöser Zylinder mit einem Diamanthohl-schleifen-system [11] ausgefräst (Diamanthohl-schleife TL05; Ø 7,3/6,4 mm), entnommen und je nach vorgesehener Therapiemethode (s. Abb. 1), entweder das anhaftende Periost abpräpariert (Gruppe B) oder belassen (Gruppe C und D). Anschließend wurde nach erneuter Darstellung des medialen femoralen Patellagleitlagers die Biopsatentnahmestelle senkrecht zur Gelenkfläche, 10 mm tief, überfräst (Diamanthohl-schleife TL04: → 6,3/5,5 mm), der Zylinder extrahiert und die Dübellänge angeglichen (Abb. 2a,b).

In Gruppe B, C und D erfolgte die Implantation des Tibiatransplantats in

Press-fit-Technik in den geschaffenen osteochondralen Defekt (s. Abb. 2c). Dabei wurde der Zylinder so eingebracht, dass der kortikale Deckel im Niveau der subchondralen Knochenplatte zu liegen kam. Das Periost wurde nicht weiter fixiert. Der leer belassene Defekt in Gruppe A diente als Kontrolle. Im Falle einer autologen Chondrozytentransplantation wurde in Gruppe D durch mehrmalige Injektion ca. 125 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer feinen, passend zurecht gebogenen Insulinnadel (Microlance 3, 26G5/8; 0,45 × 16, Becton Dickinson) ins Periost appliziert (s. Abb. 2d). Auch hier wurde auf eine zusätzliche Fixierung des Periosts verzichtet. Die Tiere konnten sofort nach Abklingen der Narkose schmerzabhängig belasten.

Mechanische Testung des Regenerats

Die Versuchstiere wurden nach entsprechender Laufzeit, durch eine Überdosis Barbiturat (Eunarcon®, Pharmacia&Upjohn) getötet, die Präparate entnommen, makroskopisch beurteilt, schockgefroren und bei -80°C konserviert. Die Präparate der Langzeittiere (26 und 52 Wochen) wurden nach dem Auftauen mittels Indentationstestung (Indentator Ø 3 mm) auf ihre biomechanischen Eigenschaften hin untersucht. Hierzu wurde die Eindringtiefe der Testsonde im Regenerat nach einer Vorlast von 2 s zum Zeitpunkt 5 und 30 s bestimmt.

Für eine zerstörungsfreie Messung war in einem Vorversuch die Druckkraft von 1,8 N ermittelt worden. Als Kontrolle diente der gesunde ipsilaterale Umgebungsknorpel. Die Dicke des getesteten Gewebes wurde histologisch an einem Binokularmikroskop (Olympus®, Vanox-T), ausgestattet mit digitaler Bildver-

Tabelle 1
Verteilung der 43 ausgewerteten Hinterläufe auf die Therapiegruppen A–D (n=43)

	Wochen	A	B	C	D
Kurz	4		1		1
	6	3	3	3	2
Mittel	12	4	3	4	5
	26	1	1	1	1
Lang	52	1	2	3	4
	Summe		9	10	11

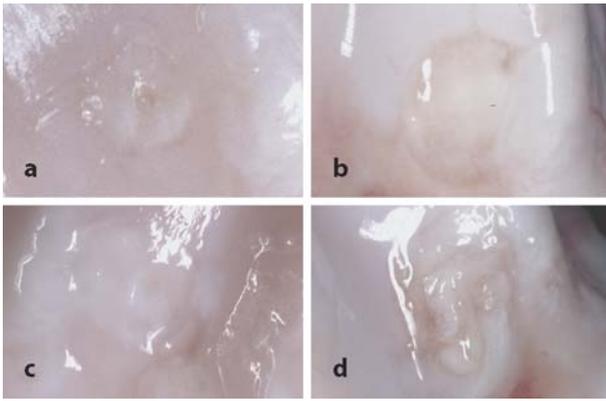


Abb. 3 ◀ **Makroskopische Ergebnisse nach 52 Wochen:** a Gruppe A; b Gruppe B; c Gruppe C; d Gruppe D

arbeitung (Sony® Digitalkamera 3CCD, SIS Analysis® Software) bei 40facher Vergrößerung ausgemessen. Entsprechend des Hookschen-Gesetzes wurde das Elastizitätsmodul des getesteten Gewebes berechnet.

Histologische Aufarbeitung der Präparate

Nach grobem Zuschnitt wurden die Regenerate anschließend in zentral-sagittaler Schnittführung zerteilt und für mindestens 6 Tage in Formalin (4%, gepuffert) fixiert; 10 der 44 Präparate wurden in Metacrylatkunststoff eingebettet und dann histologisch aufgearbeitet. Die anderen 34 Proben wurden in EDTA-pH 7,4 entkalkt, in Paraffin eingebettet und 4–5 µm dicke Dünnschnitte angefertigt. Als Standardfärbemethoden wurde Toluidinblau, PAS-Alcian, Trichrom nach Masson-Goldner und an ausgewählten Schnitten immunhistochemische Kollagen-II-Färbungen durchgeführt.

Lichtmikroskopie

Die Knorpelreparation wurde Anhand des semiquantitativen histomorphologischen Scores nach Wakitani et al. [45] ermittelt. Dieses Scoresystem ist umgekehrt proportional eingeteilt, d. h. ein gutes morphologisches Ergebnis erbrachte eine niedrige, ein schlechtes Ergebnis eine hohe Gesamtpunktzahl. Die morphologische Einschätzung jedes histologischen Präparats erfolgte durch einen unabhängigen Untersucher in verblindeter Form.

Statistik

Aufgrund der relativ geringen Fallzahl innerhalb der einzelnen Therapiegrup-

pen und wegen der nicht linearen Indexskalierung des Scoresystems wurde auf eine statistische Analyse verzichtet und die Ergebnisse rein deskriptiv aufgearbeitet.

Ergebnisse

Komplikationen

Bei einem Tier kam es postoperativ zu einer tiefen Wundinfektion, die eine vorzeitige Tötung erforderlich machte. Diese Präparate wurden als 4-Wochen-Stadium ausgewertet. Ein Präparat (Gruppe D, 6 Wochen) kam durch einen defekten Kühlschrank zu Schaden und wurde ganz von der Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt standen entsprechend Tabelle 1, 43 Femora zur Auswertung zur Verfügung.

Makroskopische Beobachtungen

Die Abb. 3 gibt einen Überblick über die makroskopischen Befunde der Therapiegruppen nach 1 Jahr. Der unbehandelte Defekt (Gruppe A) war erst nach 52 Wochen voll aufgefüllt. Die Regeneratoberfläche war aufgefasert und gut abgrenzbar vom gesunden hyalinen Gelenkknorpel. Die transplantierten kortikospongiösen Zylinder ohne Periost (Gruppe B) zeigten zunächst eine gute Defektfüllung mit glatter Oberfläche. Mit zunehmender Laufzeit nahm die Regenratdicke aber wieder deutlich ab. Die mit anhaftendem Periost transplantierten (Gruppe C) und die mit Chondrozyteninjektion behandelten Tibiazylinder (Gruppe D) präsentierten sich makroskopisch sehr einheitlich. In beiden Gruppen waren die Defekte ganz, teilweise über Niveau, mit Gewebe aufgefüllt. Die Oberfläche war glatt, leicht wel-

lig ohne sichtbare Spaltbildung zum angrenzenden Knorpel. Am Defektgrund erkannte man knorpelähnliche, weißlich-flockige Strukturen.

Ein mit autologen Chondrozyten transplantiertes Tibiazylinder zeigte nach 26 Wochen extreme Regenrathypertrophie mit blumenkohlartigen Auswüchsen (Abb.4).

Biomechanische Eigenschaften

Die Ergebnisse der biomechanischen Testung mit Bestimmung des E-Moduls sind in Abb. 5 dargestellt. Gruppen C und D zeigte eine ähnliche Reaktionsweise wie der gesunde, umgebende Knorpel der gleichen Trochleafacette (Kontrolle). Die Präparate der Gruppe A konnten aufgrund einer unzureichenden Defektfüllung mit zu weichem Gewebe keiner mechanischen Testung unterzogen werden. Die mit Tibiazylinder ohne Periost behandelten Defekte in Gruppe B erbrachten ein weiches, leicht deformierbares Gewebe.

Mikroskopische Beobachtungen

Die feingewebliche Untersuchung wurde an den Toluidinblau und PAS-Alcian gefärbten Schnitten durchgeführt. In der Masson-Goldner-Färbung zeigte sich, dass alle transplantierten Tibiazylinder knöchern in das Empfängerbett eingeeilt waren. Der kortikale Deckel war gut sichtbar und bereits 6 Wochen nach der Operation war der knöcherne Defekt wieder vollständig aufgefüllt. Das Knochenmark war normal konfiguriert, eine Markfibrose oder ein fettiger degenerativer Umbau im subkortikalen Markraum war nicht zu erkennen.



Abb. 4 ▲ „Worst case szenario“: Tibiazylinder mit Periost und autologen Chondrozyten, nach 26 Wochen mit massiver Regenrathypertrophie

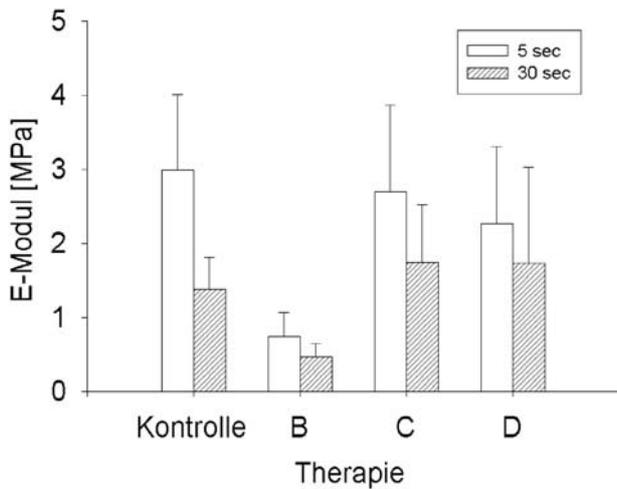


Abb. 5 ▲ Arithmetisches Mittel und einfache Standardabweichung für das E-Modul nach 5 und 30 s; Langzeitpräparate (26+52 Wochen): Gruppe A war nicht messbar. Als Kontrolle ($n=12$) diente der ipsilaterale, gesunde Gelenkknorpel. Nach 5 s fand sich in Gruppe B ($n=3$) ein gegenüber der Kontrolle (2,99 MPa) leicht zu deformierendes Gewebe mit unzureichender Stabilität (0,74 MPa). Gruppe C ($n=4$) und D ($n=5$) zeigten zu diesem Zeitpunkt ein ähnliches Verhalten, jedoch weicher als gesunder Knorpel (2,7 bzw. 2,3 MPa). Nach 30 s Belastung zeigten alle Gewebe eine weiter fortgeschrittene Deformation. Gruppe B bestätigte seine unzureichende Festigkeit (0,46 MPa); C und D boten fast identische Werte (1,74 bzw. 1,73 MPa) und eine ähnliche Reaktionsweise wie gesunder hyaliner Knorpel

Gruppe A

Nach 6 Wochen war der unbehandelt belassene osteochondrale Defekt lediglich zu 10–20%, nach 12 Wochen zu 30–50% und nach 26 bzw. 52 Wochen zu 75% mit knöchernen Trabekeln durchbaut. Die verbleibende Kavität war mit Bindegewebe gefüllt. Ein knorpeliges Regenerat bildete sich über die gesamte Zeitspanne nicht aus. Nur vereinzelt fanden sich basal Knorpelzellinseln mit deutlich angefarbter extrazellulärer Matrix (Abb. 6a).

Gruppe B

Auf Knorpelniveau bildete sich zunächst ein straff-faseriges, bindegewebiges Regenerat aus, dessen Dicke nach 52 Wochen auf maximal 1/10 des angrenzenden Knorpels abnahm. Die Integration zum Gesunden verlief über eine kurze Strecke mit zellarmem Knorpelgewebe und zahlreichen Zellclustern. Die Oberfläche war glatt und mit einer zweilagigen Zellschicht bedeckt. (s. Abb. 6b).

Gruppe C

Auf Knorpel Ebene zeigten sich nach 6 Wochen bereits zahlreiche hyaline

Zellnester. Nach 12 Wochen bildete sich im Regenerat eine dreizonale Gliederung aus: Apikal fast ausschließlich faseriges, zellarmes, vakuolär durchsetztes Bindegewebe, darunter Faserknorpel und bei 75% aller Schnitte basal Knorpel-

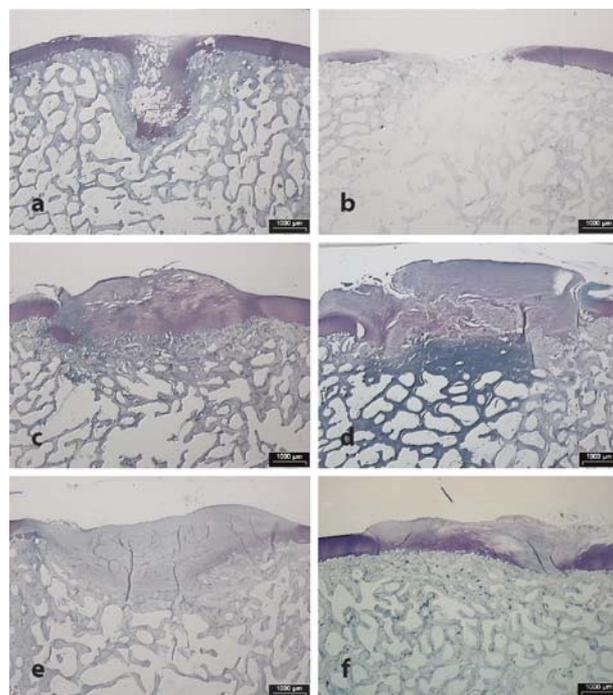


Abb. 6 ◀ Repräsentative Histoschnitte und die erreichten Wakitani-Punkte (P); Paraffinschnitt 5 μ m, Toluidinblau, Vergr. 1:10. a Gruppe A nach 52 Wochen: 12 P; b Gruppe B nach 52 Wochen: 13 P; c Gruppe C nach 12 Wochen: 8 P; d Gruppe D nach 12 Wochen: 11 P; e Gruppe C nach 52 Wochen: 5 P; f Gruppe D nach 52 Wochen: 6 P

pelzellinseln mit deutliche metachromatisch angefarbter Matrix (s. Abb. 6c).

Der Übergang von Regenerat zu normalem Knorpel war meist fließend und das knorpelige Regenerat war über bindegewebige Züge fest mit dem subchondralen Knochen verwachsen. Die Oberfläche war überwiegend glatt, teilweise aufgefasert. Nach 52 Wochen nahm die metachromatische Anfärbbarkeit der Schnitte deutlich ab (s. Abb. 6e), trotzdem fanden sich in 50% der Fälle basal noch hyalinartige Strukturen, die deutlich positiv auf Kollagen II angefarbt werden konnten (Abb. 7a). Bei 33% der 6 Wochen und bei 75% der 12 bzw. 52 Wochen Tiere, war ein hypertrophes Wachstum der Defektzone erkennbar; 4 von 11 Transplantaten waren zu tief oder schräg eingebracht.

Gruppe D

Ähnlich der Gruppe C, war 6 Wochen nach der Operation der Defekt bei intakter Knorpel-Knochen-Grenze komplett mit Regenerat aufgefüllt. Neben kollagenem Bindegewebe fanden sich Gewebelücken aus Faserknorpel, teilweise hyalinartig konfiguriert. Nach 12 Wochen zeigte sich auch hier wie in Gruppe C eine horizontale, zonale Gliederung (s. Abb. 6d). Die Oberfläche war meist glatt, stellenweise unruhig faserig. Nach 26 bzw. 52 Wochen zeigten alle Präpara-

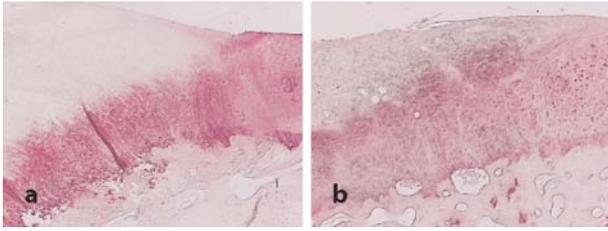


Abb. 7 ◀ Immunhistologischer Kollagen-II-Nachweis nach 52 Wochen; Paraffinschnitt 5 µm, Vergr. 1:100. a Gruppe C; b Gruppe D

te basal noch reichlich hyaline Knorpelzellen (s. Abb. 6f), die metachromatisch und immunhistologisch auf Kollagen II angefärbt werden konnten (s. Abb. 7b).

Der Übergang zum gesunden umliegenden Knorpel erfolgte meist fließend. In dieser Gruppe zeigte sich das beste histologische Resultat (Abb. 8), trotzdem war bei 20% der 12 Wochen und 66% der 52 Wochen Tieren eine Gewebhypertrophie erkennbar; 7 der 13 Dübel waren zu tief oder schräg implantiert worden.

Histologisches Scoring

Eine Übersicht über die Scoreresultate gibt Tabelle 2. Therapiegruppe A und B zeigten im Studienverlauf zunehmend schlechtere Ergebnisse. Therapiegruppe C und D führten dagegen zu deutlich besseren Resultaten, wobei Gruppe C vor D lag. Auffallend war die gute Integration der Knorpelregenerate in Gruppe C und D (s. Tabelle 2). Im Boxplot-Diagramm sind die Therapiegruppen im zeitlichen Verlauf gepoolt dargestellt (Abb. 9).

Diskussion

Tiefgreifende Schäden der Gelenkoberflächen können neben einer symptomatischen Bewegungseinschränkung zu einer osteoarthrotischen Zerstörung des Gelenks führen [27]. Deshalb wurde in den vergangenen Jahren intensiv nach neuen Möglichkeiten zur Therapie chondraler und osteochondraler Defekte gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass autolog transplantierte Chondrozyten zur Bildung von neuem Knorpelgewebe fähig sind [6, 36]. Zusätzlich konnten O'Driscoll et al. [31, 34] den Nachweis erbringen, dass die periostale Kambiumschicht potentiell hyalinen Knorpel bilden kann. Dabei führten Periost umwickelte, autologe Knochentransplantate unter zusätzlicher mechanischer Stimulation zu einem hyalinartigen Regenerat.

Das in unserem Tierexperiment untersuchte neue Verfahren der Injektion autologer Knorpelzellen in das anhaftende Periost autolog transplantiierter kortikospongiöser Knochenzylinder versucht durch Kombination beider therapeutischen Ansätze eine verbesserte Ausheilung tiefgreifender Knorpel und Knorpel-Knochen-Defekte zu erreichen.

Mikroskopische und makroskopische Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen die Beobachtung, dass leer belassene osteochondrale Defekte (Gruppe A) nur ungenügend ausheilen [9, 21]. Unser tierexperimentelles Modell kann die Erfahrungen aus der Literatur bestätigen, dass press-fit verankerte kortikospongiöse Dübel vollständig knöchern integriert werden [11, 14, 25, 31]. Die Transplantate ohne Periost (Gruppe B) bildeten auf Knorpelniveau allerdings nur ein dünnes Regenerat, welches keinerlei chondrogene Eigenschaften besitzt. Der dichte Abschluss des subchondralen Markraums gegenüber der Defekthöhle durch den kortikalen Transplantatdeckel verhindert möglicherweise die Entwicklung eines Fibrinpfropfes und das Einwandern mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmarkraum. Damit fehlt die Grundlage zur Bildung eines knorpelartigen Ersatzgewebes [41].

Die Transplantation periostgedeckter Knochenzylinder mit oder ohne autolog Chondrozyteninjektion (Gruppe D

bzw. C) führte zu einer ausreichenden Auffüllung mit Knorpelersatzgewebe, welches gut in den Umgebungsknorpel integriert war. Histologisch fand sich ein überwiegend faseriges Regenerat, nur basal mit hyalinartigen Gewebeeinseln und typischen Chondrozyten. Die Anfärbbarkeit im immunhistochemischen Kollagen-II-Nachweis bestätigte den typischen Synthescharakter hyaliner Knorpelzellen, sodass die Bildung von hyalinartigem Knorpelgewebe in beiden Therapiegruppen bestätigt wurde. Die Fähigkeit des Periosts neues Knorpelgewebe zu bilden [31], spielt bei diesen Verfahren mit Sicherheit eine große Rolle. Ob die im Regenerat in Gruppe D gefundenen Chondrozyten mit der injizierten Zellsuspension in Verbindung stehen oder der chondrogenen Potenz des Periosts entspringen bleibt unklar.

Ein Indiz für einen positiven Effekt der Zellinjektion könnte die teilweise sehr guten histologischen Resultate in dieser Gruppe sein. Die in beiden Therapiegruppen im histologischen Schnitt beobachtete horizontale Gliederung des Regeneratgewebes wurde in ähnlicher Weise bereits beschrieben [17, 30]. Die basal gehäuft auftretenden hyalinen Zellnester können aus den im Kambium lokalisierten periostalen Vorläuferzellen [31] und das apikale gefundene Bindegewebe aus dem periostalen Stratum fibrosum entstanden sein. Je nach Lokalisation fanden sich im Defekt unterschiedliche Mengen an Bindegewebe, Faser- oder hyalinartigem Knorpel – deshalb kann die zur Evaluation inzwischen klinisch häufig durchgeführte Gewebibiopsie kein repräsentatives histologisches Bild liefern. Die Dicke des Periostdeckels war aufgrund individueller Schwankungen der einzelnen Tiere schwierig zu standardisieren. Zusammen mit bindegewebigen Resten, die auf dem Transplantat verbliebenen waren,

Abb. 8 ▶ Bestes Ergebnis; Toluidinblau 10fach; Gruppe D, 12 Wochen: 2 Punkte im Wakitani-Score

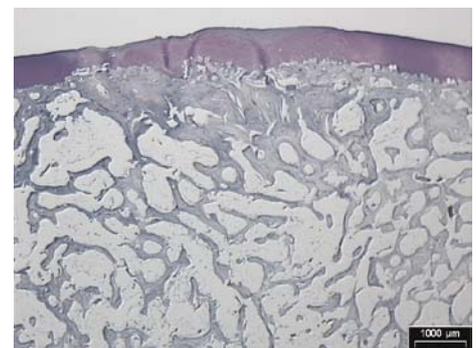


Tabelle 2

Histomorphologische Ergebnisse nach Wakitani et al. [45]. Dargestellt sind die Mittelwerte pro Gruppe und Laufzeit. Die zeitlichen Stadien wurden zusammengefasst in: kurz (4+6 Wochen), mittel (12 Wochen) und lang (26+52 Wochen)

Gruppe	Laufzeit	n	Cell morphology (0-4)	Matrix staining (0-3)	Surface (0-3)	Thickness (0-2)	Integration (0-2)	Σ
A	Kurz	3	4,00	3,00	0,00	2,00	1,67	10,67
	Mittel	4	3,75	3,00	1,00	1,50	1,75	11,00
	Lang	2	4,00	3,00	2,50	1,00	2,00	12,50
B	Kurz	4	2,25	2,50	0,00	0,50	1,25	6,50
	Mittel	3	4,00	3,00	0,67	0,67	1,67	10,00
	Lang	3	4,00	3,00	0,67	2,00	2,00	11,67
C	Kurz	3	2,67	2,67	0,00	0,33	1,33	7,00
	Mittel	4	1,75	1,75	1,75	0,00	0,75	6,00
	Lang	4	2,00	2,50	0,25	0,00	0,50	5,25
D	Kurz	3	3,00	2,67	0,00	1,33	1,67	8,67
	Mittel	5	2,20	2,00	1,00	0,00	0,80	6,00
	Lang	5	2,20	1,80	1,20	0,00	0,80	6,00

kann dieser Umstand für die unterschiedlich stark hypertrophierten Regenerate verantwortlich gemacht werden. Dieses Phänomen wird im klinischen Einsatz ebenfalls beobachtet [17, 36].

Histologisches Scoring

Ein histomorphologischer Score kann unterschiedliche Gewebearten semi-quantitativ, valide und reproduzierbar erfassen [33]; detaillierte histologische Informationen gehen aber verloren. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Scores entwickelt [32, 37, 39, 40, 45]. Der von uns verwendete Score nach Wakitani et al. [45] lässt sich einfach und sicher anwenden und ein verblindeter Gutachter garantiert eine objektive Auswertung. Als Schwachpunkte zeigte dieser Score die fehlende Erfassung histologischer Veränderungen im angrenzenden gesunden Knorpel und die mangelhafte Beurteilung der Knorpel-Knochen-Grenze und des subchondralen Knochens. Auffallend war die gute Anbindung des Reparaturgewebe in den Gruppen C und D in den Umgebungsknorpel. Die Qualität dieser Integration ist von großer Bedeutung für ein dauerhaftes Verbleiben des Regenerats im Defekt. Dies konnte u. a. durch die Einjahresergebnisse bestätigt werden.

Die in unserem Experiment gewonnenen Daten können aufgrund geringer Fallzahlen nur vorsichtig interpretiert

werden. Da reine periostgedeckte Dübel bessere Ergebnisse bei einer geringen Streubreite erzielen, scheint der Einsatz autologer Zellen mit den damit verbundenen Kosten nicht gerechtfertigt zu sein.

Biomechanik

Eine rein histologische Auswertung kann die biomechanischen Eigenschaften

des Regenerats nicht erfassen. Deshalb besitzt ein Großteil der tierexperimentellen Arbeiten, die nur histologische Daten liefern, eine sehr begrenzte Aussagekraft. Der Indentationstest ist ein validiertes Testverfahren bei biomechanischen Untersuchungen von Knorpelpräparaten [2, 15, 28]. Dabei hängt das Deformationsverhalten entscheidend von Art und Form des verwendeten Indentators ab [15]. Bis heute

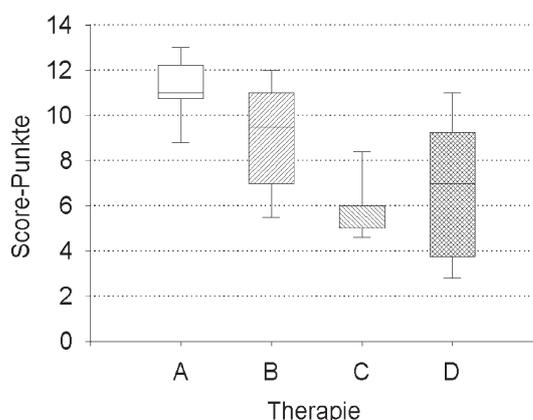


Abb. 9 ▲ Ergebnisse im Wakitani-Score, Zeitstadien gepoolt; schwarze Linie Median. Gruppe C (n=11) zeigte mit 6 Punkten im Median das beste Resultat bei sehr geringer Streubreite (4–9 Punkte). In Gruppe D (n=13) wurden durch den Einsatz autologer Chondrozyten im Einzelfall bessere Ergebnisse erzielt, jedoch lag der Median in dieser Gruppe bei 7 und die Streubreite war hier am höchsten (2–11 Punkten). Gruppe A (n=9) und B (n=10) lieferten nur unbefriedigende Ergebnisse von 11 bzw. 9,5 Punkten im Median und großer Streubreite

gibt es kein allgemein anerkanntes Testverfahren zur Beurteilung von Knorpel und insbesondere Knorpelreparationsgewebe. Die mit unserer Testanordnung bestimmten E-Module können somit nur modellhaft die biomechanischen Eigenschaften der gemessenen Gewebe widerspiegeln. Sie reichen u. E. aber aus, um Vergleiche zwischen den einzelnen Therapiegruppen vorzunehmen. Nur durch Transplantation periostgedeckter Knochendübel konnte die Ausbildung eines mechanisch stabilen Regenerats erzielt werden. Die zusätzliche Injektion autologer Chondrozyten stellte keine Verbesserung dar.

Tiermodell

Eine große Zahl tierexperimenteller Untersuchungen zur Knorpelregeneration wird an Kleintiermodellen durchgeführt. Kleintiere zeigen mit ihrer hohen Stoffwechselrate eine große intrinsische Fähigkeit zur Selbstheilung. Nach unserer Meinung kann aber nur ein adäquates Großtiermodell, eine mit dem Menschen vergleichbare, kritische Beurteilung von Heilungsprozessen an Knorpel- und Knochendefekten ermöglichen. Mit dem Minipig steht ein solches Tiermodell zur Verfügung und wurde schon in zahlreichen Studien eingesetzt [10, 16, 18, 19, 26, 46]. Zwar stehen detaillierte Studien über den Knorpelstoffwechsel dieser Spezies noch aus, elektronenmikroskopische Studien bestätigten dem Schwein aber bereits die größte mikroanatomische Ähnlichkeit mit humanem artikulären Knorpel gegenüber anderen Tierspezies [23].

Hebedefekt bei der OCT/OATS

Bei der Transplantation autologer Knorpel-Knochen-Dübel sind größere Defekte aufgrund der limitierten Transplantatgröße und Verfügbarkeit nur schwierig zu therapieren [4]. Zusätzlich müssen bei diesem Verfahren sekundäre Hebedefekte in Kauf genommen werden, die postoperativ zu vorübergehenden oder dauerhaften Beschwerden führen können [3, 13, 20, 35].

Besonders kritisch müssen Eingriffe an 2 Gelenken sog. „two joints procedures“ betrachtet werden, da hier die Transplantate aus einem völlig gesunden Gelenk entnommen werden, um ein anderes Gelenk zu therapieren [20]. Ob die

bevorzugt verwendeten Entnahmestellen tatsächlich an der mechanischen Gelenkfunktion teilnehmen, wird heute kontrovers diskutiert [1, 43]. Zusätzlich nimmt die Druckbelastung am Rand solcher osteochondraler Defekte deutlich zu [7]. Inwieweit leer belassene Hebedefekte der Entstehung degenerativer Gelenkerkrankungen Vorschub leisten, bleibt jedoch unklar.

Die Gefahr der sekundären Gelenkschäden wurde bereits von einigen Operateuren erkannt und durch Impaktierung von spöngigem Knochen aus der Empfängerregion wurde versucht, die neu geschaffenen Defekte zumindest teilweise wieder aufzufüllen. Aufgrund mangelnder mechanischer Fixierung kam es jedoch zu freien Gelenkkörpern [24] und bei unzureichender Füllung zu Wandbrüchen zwischen benachbarten Entnahmestellen [5].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Implantation periostgedeckter Knochendübel einen adäquaten knöchernen und knorpeligen Gewebeersatz liefern kann. Damit stellt dieses Verfahren eine günstige Alternative zur Hebedefektfüllung dar.

Bei der hier vorgestellten Technik kommt es zu einer guten Integration des Knorpelregenerats in den Umgebungsknorpel. Dies steht im Gegensatz zu der unzureichenden knorpeligen Integration der Transplantate bei der OATS-Technik [42]. Ob transplantiertes hyalines Gewebe, mit einer unzureichenden Integration in den Umgebungsknorpel, einem in den umgebenden Knorpel weitestgehend integrierten, faserknorpeligen Regenerat langfristig überlegen ist, muss in weiterführenden Studie geklärt werden.

Fazit für die Praxis

Das in unserer Studie untersuchte Verfahren der alleinigen Transplantation autologer periostgedeckter Knochendübel stellt eine echte Alternative zur primären Therapie chondraler und osteochondraler Defekte dar und bietet eine gute Möglichkeit zur Hebedefektfüllung. Damit könnten die bis dato leer belassenen oder nur knöchern aufgefüllten Entnahmedefekte besser ausheilen und die postoperative Morbiditätsrate gesenkt werden. Zukünftige klinische Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit diese Technik zur Primärvorsorgung osteochondraler

Defekte geeignet ist. Die Kombination periostgedeckter Knochendübel mit injizierten autologen Knorpelzellen scheint in Relation zu dem damit verbundenen technischen Aufwand nicht gerechtfertigt zu sein.

Danksagung. Wir danken Prof. Dr. P. Glodek vom Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen, der die benutzten „Göttinger Minischweine“ zur Verfügung stellte.

Literatur

1. Ahmad CS, Cohen ZA, Levine WN, Ateshian GA, Mow VC (2001) Biomechanical and topographic considerations for autologous osteochondral grafting in the knee. *Am J Sports Med* 29: 201–206
2. Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC (1991) Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 9: 330–340
3. Attmanspacher W, Dittrich V, Stedfeld HW (2000) Erfahrungen in der arthroskopischen Therapie von chondralen und osteochondralen Defekten am Kniegelenk mit dem OATS. *Zentralbl Chir* 125: 494–499
4. Bobic V (1999) Autologous osteochondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopäde* 28: 19–25
5. Boes L, Ellermann A, aus dem Spring ES (2000) Ergebnisse und Komplikationen mit dem OATS-Instrumentarium. *Arthroskopie* 13: 99–102
6. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895
7. Brown TD, Pope DF, Hale JE, Buckwalter JA, Brand RA (1991) Effects of osteochondral defect size on cartilage contact stress. *J Orthop Res* 9: 559–567
8. Buckwalter JA, Lohmander S (1994) Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development. *J Bone Joint Surg Am* 76: 1405–1418
9. Convery FR, Akeson WH, Keown GH (1972) The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop* 82: 253–262
10. Dallek M, Meenen N M, Jungbluth K H (1995) Zum Verhalten künstlich erzeugter Epiphysenfugendefekte, Teil 3: Transplantation von autologem und homologem Rippenknorpel beim Göttinger Miniaturschwein. Befunde nach einem Zeitraum von 16 Wochen. *Unfallchirurgie* 21: 219–226
11. Draenert K, Draenert Y (1988) A new procedure for bone biopsies and cartilage and bone transplantation. *Sandorama III-IV*: 33–40

12. Ficat RP, Ficat C, Gedeon P, Toussaint JB (1979) Spongialization: a new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop* 144: 74–83
13. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G (2001) Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop* 391 [Suppl]: 328–336
14. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Eberhardt R (1997) Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaicplasty technique—a preliminary report. *Foot Ankle Int* 18: 628–634
15. Hayes W C, Keer L M, Herrmann G, Mockros L F (1972) A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage. *J Biomech* 5: 541–551
16. Hembry RM, Dyce J, Driesang I, Hunziker EB, Fosang AJ, Tyler JA, Murphy G (2001) Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 83: 826–838
17. Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T (2000) Knorpelknochen transplantation versus autogene Chondrocytentransplantation. *Chirurg* 71: 1090–1097
18. Hunziker EB (2001) Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 22–32
19. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78: 721–733
20. Imhoff AB, Öttl GM, Burkart A, Traub S (1999) Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde* 28: 33–44
21. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM (2001) Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 83: 53–64
22. Johnson LL (2001) Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop* 391 [Suppl]: 306–317
23. Kaab M J, Gwynn I A, Notzli H P (1998) Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat* 193: 23–34
24. Kim SJ, Shin SJ (2000) Loose bodies after arthroscopic osteochondral autograft in osteochondritis dissecans of the knee. *Arthroscopy* 16: 16
25. Laprell H, Petersen W (2001) Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS): 6–12 years' follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 121: 248–253
26. Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saeger C, Jakob R P (2001) Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 6–15
27. Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64: 460–466
28. Mow VC, Gibbs MC, Lai WM, Zhu WB, Athanasiou KA (1989) Biphasic indentation of articular cartilage—II. A numerical algorithm and an experimental study. *J Biomech* 22: 853–861
29. Müller B, Kohn D (1999) Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Orthopäde* 28: 4–10
30. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A et al. (1998) Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 19: 2313–2328
31. O'Driscoll S W, Fitzsimmons J S (2001) The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop* 391 [Suppl]: 190–207
32. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1988) Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 70: 595–606
33. O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Galloway SH, Fitzsimmons JS (2001) Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng* 7: 313–320
34. O'Driscoll SW, Salter RB (1986) The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 208: 131–140
35. Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE (1995) The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 77: 65–72
36. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A (2000) Two-to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 374: 212–234
37. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat* 143: 335–340
38. Pridie K (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br* 41: 618–621
39. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R (1998) Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 50–65
40. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79: 1452–1463
41. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75: 532–553
42. Siebert C H, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C (2001) Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten – Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Schafmodell. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 139: 382–386
43. Simonian PT, Sussmann PS, Wickiewicz TL, Paletta GA, Warren RF (1998) Contact pressures at osteochondral donor sites in the knee. *Am J Sports Med* 26: 491–494
44. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 391 [Suppl]: 362–369
45. Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI (1998) Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 4: 429–444
46. Wang CJ, Chen CY, Tsung SM, Chen WJ, Huang HY (2000) Cartilage repair by free periosteal grafts in the knees of pigs: a histologic study. *J Formos Med Assoc* 99: 324–329