

Defektmodelle für die Gelenkknorpelregeneration im Großtier

Die Bereitstellung und Zulassung von Konstrukten für die Defektheilung des Gelenkknorpels setzt vor der Anwendung im Menschen präklinische Tests voraus. Dabei stehen u. a. verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Wissenschaftliche Überlegungen, das Studiendesign, die Zielparameter, die verfügbare Infrastruktur, aber auch ökonomische Überlegungen sind Faktoren, welche die Entscheidung für ein Tiermodell beeinflussen. Großtiermodelle eignen sich besonders, wenn biomechanische Untersuchungen an den Regeneraten durchgeführt werden sollen. Dieser Ansatz wird in Zukunft häufiger erfolgen, nachdem die biomechanische Kompetenz von Regeneraten für den Gelenkknorpelersatz in den Fokus tritt, insbesondere wenn es sich dabei um zulassungsrelevante Größen handelt.

Für die Grundlagenforschung zu immunologischen, zellbiologischen oder molekularbiologischen Fragestellungen eignen sich besonders Nager, wie die Maus oder die Ratte, als Versuchstiere. Die Maus – noch mehr als die Ratte – weil sie als athymisch, transgen oder Knock-out-Typ zur Verfügung steht [16]. Beide Nagerspezies sind stark reproduktiv, kostengünstig in der Haltung und meist gut verfügbar. Deshalb stehen auch viele Daten zu den beiden Spezies zur Verfügung, wodurch sich eine breite Diskussionsbasis ergibt.

Ein großer Nachteil besteht in der Größe (Kleinheit) der Tiere, die Manipulationen am Gelenkknorpel erschwert. Relevant ist auch die Diskussion inwieweit die Ergebnisse aus dem Nagermodell auf die humane Situation übertragbar sind [16].

Häufig wird als größere Spezies das Kaninchen verwendet, welches auch günstig in der Haltung ist, eine Knorpeldicke bis zu 0,44 mm im Patellagleitlager bietet [71] und daher Manipulationen gut zulässt [13, 14]. Als grundsätzlicher Nachteil wird hier die hohe und schnelle Regenerationspotenz des Kaninchens gesehen [16, 43, 80], welche die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dieser Spezies in Frage stellt. Dennoch bietet das Kaninchen wegen seiner Größe die Möglichkeit, Defekte mit einem Durchmesser von mehreren Millimetern (3–4 mm) zu setzen [92, 93]. Bei Verwendung größerer Tiere können dann auch noch größere Defekte in einem Gelenk, meist dem Kniegelenk, gesetzt werden. Häufig verwendete Tierspezies sind das Schaf, das Schwein, die Ziege, der Hund und das Pferd.

Die zunächst in Studien eingesetzten Kleintiere können nur eingeschränkt einen Vergleich zur humanen Situation bieten. Meist ist auch nur ein Defekt pro Gelenkkompartiment möglich. Erst mit der Verwendung größerer Tiere kann die Anzahl und Größe der Defekte erhöht werden, was die aufwändigen Tiermodelle kostengünstiger werden lässt, aber auch die Verwendung mehrerer Kontrolldefek-

te ermöglicht, so dass eine Validierung innerhalb einer Studie möglich ist.

Die Einbeziehung beider Kniegelenke im Versuchsplan hat den Vorteil, dass zu einer hohen Wahrscheinlichkeit beide Gliedmaßen postoperativ gleich belastet werden. Bei dem Vorgehen muss aber die Belastung des Tieres im Sinne des Tiereschutzes berücksichtigt werden und steht bei der Entscheidung, ob dieses Vorgehen gewählt werden kann, klar im Vordergrund zur Entscheidungsfindung [1]. Sollte eine Immobilisation des operierten Kniegelenks z. B. in Form einer Gipsanlage [4, 9, 17] notwendig werden, ist die Versorgung des kontralateralen Gelenks erschwert. Zudem hat die Immobilisation möglicherweise Auswirkungen auf die Knorpelregeneration [84]. Eine Studie beschreibt eine beidseitige Operation mit anschließender Immobilisierung mit Gips über 7 Tage beim Schwein [4].

Eine schmerzhafte Beeinträchtigung des Befindens der Tiere sollte nicht mehr als wenige Tage postoperativ andauern, so dass die Länge der Beobachtungszeit bis zu mehreren Monaten möglich ist. Darüber hinaus richtet sich die Standzeit nach der Annahme, wie lange das Implantat im Gelenk braucht, bis es zum kompetenten Regenerat „herangereift“ ist.

Bei der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) bzw. der matrixassozierten ACT (MACT) beim Menschen wird definitionsgemäß autologes Gewebematerial verwendet, ein Vorgehen, wel-

ches in einem geeigneten Tiermodell analog realisierbar sein sollte. Bei der Mehrzahl der Großtiermodelle, die mit zellbesiedelten Konstrukten arbeiten, werden autologe Zellen eingesetzt [26, 28, 59, 75].

Bei der Erzeugung von Regeneraten für den Gelenkknorpelersatz und seiner Beurteilung müssen also verschiedene Parameter berücksichtigt werden, um reproduzierbare und valide Ergebnisse erwarten zu dürfen, insbesondere wenn es darum geht, ein zulassungsrelevantes Modell zu generieren.

Die Einbeziehung biomechanischer Tests zur Beurteilung von Knorpelregeneraten wird immer mehr gefordert und zunehmend bei der Zulassung von Konstrukten von Bedeutung sein [25]. Dazu sind Regenerate notwendig, die einen Durchmesser deutlich über der Submillimetergröße haben. Defekte bis 3–4 mm Durchmesser [92, 93] können im Kaninchen realisiert werden, bei größeren Defekten werden Großtiere benötigt.

Ziel dieser Übersichtsarbeit ist es, bekannte Großtiermodelle darzustellen und aufzuzeigen, welche Möglichkeiten sie beschreiben, um Regenerate für den Gelenkknorpel *in vivo* zu erzeugen, die *in vitro* auch mit biomechanischen Tests charakterisiert werden können. Damit erwartet man eine anwendungsnahe Charakterisierung des gereiften Konstruktes.

Recherche

Mit einer ausgiebigen Literaturrecherche in PubMed sowie über das Internet (Google) konnten mit den Suchbegriffen „animal model“, „defect“, „cartilage“, „implant“, „ovine“, „minipig“, „goat“, „horse“, „canine“, „OATS“ sowie über die angegebenen Literaturverzeichnisse der einzelnen Aufsätze 105 Publikationen identifiziert werden. Es wurden Studien zusammengestellt, die anhand von Großtiermodellen mit Defektsetzungen im Knorpel eine Regeneration von Knorpel mittels ACT, MACT bzw. OATS („osteocondral autograft transfer system“) beschreiben und Informationen dazu liefern. Die Fragestellungen (Rationale) der einzelnen Untersuchungen standen nicht im Vordergrund. Allerdings wurden auch Doktorarbeiten einbezogen, die Informationen darüber enthielten, wie z. B. die Tie-

Hier steht eine Anzeige.



re das operative Vorgehen tolerierten. Die Beiträge stammen aus dem Zeitraum von 1991 bis 2012.

Tierspezies und -anzahl

Als Spezies wurden das Schaf (42%), das Schwein (25%), die Ziege (19%), das Pferd (8,5%) und der Hund (5,5%) als geeignet und zur humanen Situation vergleichbar beschrieben. Hunde treten in neueren Publikationen immer mehr in den Hintergrund (■ **Abb. 1**). Die Anzahl der in den Studien eingeschlossenen Tiere lag zwischen 5 [7] und 65 [17], wobei im Durchschnitt 17,4 Tiere (Median: 14 Tiere) in den Studien eingesetzt wurden.

Alter der Tiere

Häufig wird das Alter der Tiere mit dem Hinweis ergänzt, dass es sich um ausgewachsene Tiere handelt [46]. Studien sollten dann an ausgewachsenen Tieren vorgenommen werden, wenn die zu untersuchende Therapie für den erwachsenen Menschen gedacht ist, juvenile Tiere könnten aber z. B. für Pilotstudien („proof of concept“) verwendet werden [16, 43, 80]. Die Wahl von erwachsenen Tieren ist wichtig, wenn biologische Umbauprozesse untersucht werden, da sich juvenile Tiere bezüglich der Regenerationsfähigkeit anders verhalten. Zudem handelt es sich bei der humanen Zielgruppe meist um Erwachsene. Als skeletal ausgewachsen gilt ein Tier i. d. R. dann, wenn die Wachstumsfugen geschlossen sind [7].

Verwendetes Gelenk/ Gelenkbereich

In den meisten Studien wurden im femorotibialen Gelenk Defekte realisiert, meist an der medialen Femurkondyle (75,3% medial, 24,7% lateral). Wird die laterale Kondyle als Defektort gewählt, werden bis auf 2 Fälle [19, 83] immer auch Defekte an anderer Stelle gesetzt. Auch die Trochlea femoris wird in etwa 23% der Untersuchungen zum Ort der Defektsetzung ausgewählt [7, 36]. Ebenso kamen Kombinationen aus Defekten an den Kondylen und an der Trochlea vor (etwa 14%). In einer Studie wurde ein allogenes Transplantat am Tibiaplateau eingesetzt [44].

Orthopäde 2013 · 42:242–253 DOI 10.1007/s00132-012-2044-2
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

B. Schneider-Wald · A.K. von Thaden · M.L.R. Schwarz

Defektmodelle für die Gelenkknorpelregeneration im Großtier

Zusammenfassung

Hintergrund. Für präklinische Studien zu Knorpelreparaturmechanismen bestehen mehrere Großtiermodelle. Schaf, Schwein, Ziege, Hund und Pferd können aufgrund der Größenverhältnisse des Kniegelenks zu Studien der Knorpelregeneration herangezogen werden.

Material und Methoden. Hierbei können die gängigen Untersuchungsmethoden angewendet werden. Die subchondrale Lamelle wird berücksichtigt, um die Ergebnisse der Regeneration mit einer ACT oder MACT nicht durch eingewanderte Zellen aus dem Markraum zu verfälschen, obwohl die Rekrutierung von Zellen in der humanen Knorpelregeneration oft erwünscht ist. Die Defekte werden meist an den Kondylen sowie an der Trochlea, häufig bilateral, gesetzt. Dabei wird darauf geachtet, dass aufgrund der gewählten Defektgröße keine Spontanheilung auftreten kann. Die Zeiträume für eine Beurteilung der Effizienz der Knorpelregenera-

tion liegen zwischen 6 und 12 Monaten. Für Pilotstudien werden kürzere Standzeiten bis zu 12 Wochen beschrieben. Als Auswerteverfahren dienen verschiedene Scores, die eine Histologie, Immunhistologie und die biochemische Untersuchung des Reparaturgewebes einschließen. Biomechanische Tests des Gewebes stehen am Ende der Versuche, wobei mit dem Einsatz von Schnittbildverfahren, wie dem MRT, der Verlauf einer Regeneration zusätzlich *in vivo* beurteilt werden kann.

Schlussfolgerung. Schritte zur Standardisierung von Großtiermodellen für die Beurteilung von regenerativen Therapieansätzen existieren kaum, sind aber aus Sicht der Zulassung neuer Ansätze und v. a. aus der Sicht des Tierschutzes anzustreben.

Schlüsselwörter

Großtiermodelle · Präklinische Forschung · Translationale Forschung · Regenerative Therapie · Gelenkknorpel

Defect models for the regeneration of articular cartilage in large animals

Abstract

Background. Several animal models are available for the analysis of regeneration of articular cartilage in large animals, such as sheep, pigs, goats, dogs and horses. The subchondral bone lamella must be considered when ACT and MACT techniques are examined in order to protect the implant against migration of cells from the bone marrow, although recruitment of cells is often desirable in the regeneration of human cartilage.

Material and methods. The defects are mainly positioned at the condyles and the trochlea often bilaterally and spontaneous healing should be excluded. The follow-up period for assessment of the effectiveness of cartilage regeneration is 6–12 months. Shorter observation times up to 12 weeks can be used for pilot studies. Scores based on histological, immunohistological and biochemi-

cal staining are mostly used for assessing the regenerated tissue. Biomechanical tests with destructive features need isolated specimens from the animal but modern slice imaging techniques can reflect the progression of the healing processes over the time span of the study *in vivo*.

Conclusion. Approaches to standardize the evaluation of the regeneration of articular cartilage have been sporadically described whereas they are required from the point of view of the approval of new concepts for therapy and the protection of animals.

Keywords

Large animal models · Preclinical research · Translational research · Regenerative repair · Cartilage

Eine Studie am Schaf wird am Schultergelenk durchgeführt [35], zwei weitere am Sprunggelenk [6, 60]. Die Defekte werden bis auf wenige Ausnahmen [66] in den Belastungszonen der entsprechenden Kompartimente gesetzt, was u. a. der humanen Situation entspricht, weil es dort

zu klinisch relevanten Läsionen kommt. Das Implantat unterliegt dann auch einem mechanischen Stimulus, was die Regeneration unterstützen kann. Zumindest im Schafmodell wird kein Unterschied bei der Regeneration des Defektes mittels Röntgen oder histologischen Me-

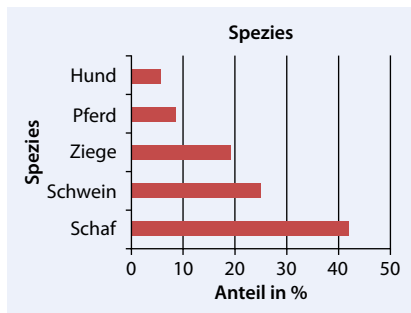


Abb. 1 ▲ Prozentuale Anteile der Tierspezies in den untersuchten Großtiermodellen

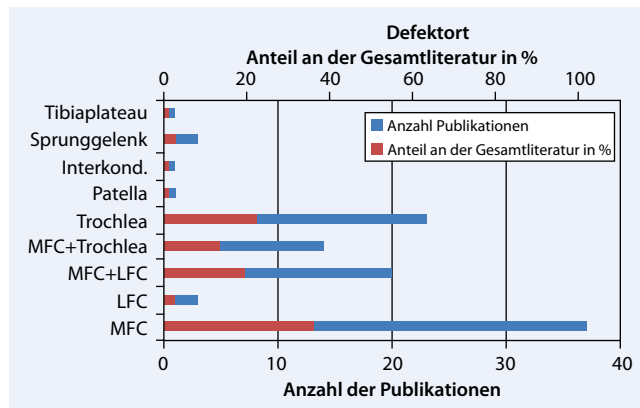


Abb. 2 ◀ Auswahl und Verteilung der Defektorte. MFC medialer Femurkondylus, LFC lateraler Femurkondylus

thoden zwischen der medialen oder lateralen Kondyle gesehen [54, 55]. Ebenso sei kein Unterschied in der Regeneration im Vergleich zwischen osteochondralen Defekten an der Trochlea oder der medialen Kondyle beim Schwein festzustellen [50].

Die Verteilung der gesetzten Defekte ist in **Abb. 2** dargestellt. Die Lokalisationen entsprechen den Bereichen der Lastübertragung. Bei der Wahl des Defektortes spielen Aspekte wie die Anzahl und chirurgische Zugänglichkeit der Defekte eine wesentliche Rolle.

Defektgröße und -anzahl

Die passende Größe eines Defektes orientiert sich an verschiedenen Kriterien. Die sog. „critical size“ ist für die verschiedenen Spezies unterschiedlich beschrieben. So wird sie bei der Ziege mit 6 mm (4–7 mm) Durchmesser [45] und beim Schaf mit 7 mm (4,5–8 mm) Durchmesser [3] angegeben. Dieser Vergleich spiegelt die etwas kleineren Größenverhältnisse bei der Ziege wider. Es gibt jedoch auch Arbeitsgruppen, die im Schafmodell selbst bei einem Defektdurchmesser von 4,5 mm keine Spontanregeneration sehen konnten [77]. Wann die „critical size“ erreicht wird, ergibt sich aus der Tatsache, dass innerhalb des Untersuchungszeitraums keine Spontanheilung auftritt [34, 40].

Für die „critical size“ wird meist ein Durchmesser in Millimetern angegeben. Dabei wird von der Annahme ausgegangen, dass Zellen vom Rand des erhaltenen Knorpelgewebes in den Kontrolldefekt (leer oder das zellfreie Konstrukt) mig-

rieren, um ihn mit neuer extrazellulärer Matrix zu füllen. Die Berücksichtigung der Tiefe macht das Problem komplexer, weil der rein chondrale Defekt idealerweise die subchondrale Lamelle respektieren sollte, sie also unbeschädigt lässt. Im Fall der Defektsetzung ohne Eröffnung der subchondralen Lamelle sollte im Leerdefekt also keine Spontanheilung beobachtet werden [30, 39, 72].

Als weiteres Kriterium zur Festlegung der Defektgröße kann die Vergleichbarkeit mit der menschlichen Situation sein. Dabei wird für die Situation im Menschen ein Defektvolumen bis zu 1 cm³ angegeben [40].

Die Dicke des Knorpels ist dabei zu bedenken, welche in den verschiedenen Spezies sehr differieren kann. So sind z. B. die Knorpelhöhen je nach Lokalisation beim Hund mit etwa 0,5–0,7 mm, beim Schaf mit 0,5–0,7 mm, bei der Ziege mit 0,7–1,5 mm, beim Pferd mit 1,7–2 mm [29] und beim Minipig mit 0,7–0,9 mm angegeben [41], wobei beim Menschen mit einer Knorpeldicke von etwa 2 mm gerechnet werden kann [29].

Die Anzahl der Defekte, die je Seite in einem Gelenk gesetzt wird, variiert von 1 (49%) bis zu 6 Defekten [7, 36]. Dabei bietet die Trochlea gut Platz für mehrere Defekte [7, 36], was aus unserer Erfahrung neben dem anatomischen Situs mit der operativen Zugänglichkeit zu erklären ist. In rund 30% der Fälle werden Defekte beidseitig gesetzt, so dass deren Anzahl mit dem Vorgehen verdoppelt werden kann. Die Anzahl der gesetzten Defekte reicht je nach Spezies und Lokalisation von 1 [4] bis max. 3 Defekten [76]

auf dem Kondyl und von 1 [21] bis zu 6 Defekten [7] auf der Trochlea.

Eröffnung der subchondralen Lamelle

Ein Diskussionspunkt ist, ob die subchondrale Lamelle geschont werden soll. Im Fall ihrer Eröffnung muss mit dem Einwandern von Stammzellen aus dem Knochenmark in das Konstrukt gerechnet werden, was eine zusätzliche Quelle für die Rekrutierung einer höher potenten Zellpopulation zur Regeneratentwicklung darstellen würde. Das Vorgehen ist eher bei der *In-situ-Regeneration* anzusiedeln [30, 73] als in der typischen ACT bzw. MACT, oder in der Versorgung mit zellfreien Konstrukten, wenn eine Rekrutierung der Zellen aus den angrenzenden Bereichen des Defektes beabsichtigt ist [30, 73]. Dennoch ähnelt dieses Vorgehen eher der klinischen Situation, in der möglichst ein Effekt, also die Regeneratentwicklung erreicht werden sollte. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass durch die Eröffnung der subchondralen Lamelle der Weg in den Markraum eröffnet wird, und so das Konstrukt oder Teile davon immunologische Reaktionen eher hervorrufen könnten.

In etwa 20% der analysierten Arbeiten, abgesehen von den Untersuchungen mit Knorpel-Knochen-Dübeln, wurde eine Eröffnung der subchondralen Lamelle beschrieben. In einigen Studien wird berichtet, dass es zu keinen Blutungen kam [50], andere wiederum beschreiben vereinzelt punktförmige Blutungen nach Defektsetzung [79]. Bei der anschließenden Analyse der Ergebnisse wurde dieses Phä-

nomen als Kriterium offensichtlich nicht weiter beachtet.

Defektstandardisierung

Der sog. *Full-thickness-Defekt* passiert die Zone des kalzifizierten Knorpels und durchdringt die subchondrale Lamelle, *Partial-thickness-Defekte* ähneln Spalten und Fissuren die bei einer Osteoarthrose beobachtet werden [72]. Diese Defekte unterliegen normalerweise keiner Spontanheilung, da sie keinen Zugang zu Vorläuferzellen des Knochenmarks haben, der Partial-thickness-Defekt lässt die subchondrale Lamelle intakt [72].

Werkzeuge zur Tiefenbegrenzung sind technisch möglich, werden auch kaum beschrieben bzw. angewandt. Wenige Autoren beschreiben spezielle Instrumentarien zur reproduzierbaren Ausarbeitung des Defektes. So verwendet z. B. eine Gruppe ein Messerchen, das in einer bestimmten Richtung über den Knorpel gezogen wird und so die oberste Knorpelschicht abhebt [41].

Einige Autoren beschreiben ein Vorgehen, bei dem mit einer Art Locheisen die Positionierung des Defektes angegeben und der Knorpel bis zu einer gewissen Tiefe geschnitten wird, so dass eine ringförmige Markierung entsteht [21, 30]. Dann benutzt der Operateur häufig eine Kürette, mit welcher der Knorpel so abgeschabt werden kann, dass die subchondrale Lamelle erhalten bleibt [30, 31]. Allerdings birgt dieses Vorgehen den Nachteil, dass es vom Operateur abhängt, wie gut der Defekt ausgearbeitet wird. Das betrifft die Tiefe des Defektes, weniger die Ausprägung der Flanken und der äußeren geometrischen Form eines runden oder gar rechteckigen Defektes. Beide können aus geometrischen Überlegungen des so verwendeten Werkzeugs kaum erreicht werden. Die Verwendung der Kürette, manchmal auch in Kombination mit einem scharfen Löffel zum Ausarbeiten eines chondralen Defektes, wird in mehreren Arbeiten beschrieben [30, 77]. Zum Teil wird auf die Technik nicht detailliert eingegangen.

Kontrolldefekt

Mit der Anlage von Kontrolldefekten wird das verwendete Modell validiert. Zunächst sollen jedoch die Ergebnisse der geprüften Konstrukte mit den Ergebnissen aus den Kontrollgruppen quantifiziert und statistisch getestet werden, so dass ein Therapieeffekt – soweit vorhanden – mit den Methoden der Statistik als solcher identifiziert werden kann. Dazu können unbehandelte Defekte dienen, die als Leerdefekte gestaltet werden können [4, 7, 10, 18, 20, 26, 59, 74]. Es können auch Defekte mit Konstrukten ohne Zellen verwendet werden, solange die Implantate in der Verumgruppe mit Zellen beladen sind [64, 79]. Auch nativer Knorpel kann zum Vergleich herangezogen werden [69].

Häufig wird die Mikrofrakturierung der subchondralen Lamelle als Standardtherapieverfahren zur Kontrolle diskutiert und auch angewendet [9, 30]. Allerdings ergibt sich aus diesem Vorgehen dieselbe Problematik wie sie bei der Eröffnung der subchondralen Lamelle beschrieben ist. So scheint auch die technische Ausarbeitung einer Mikrofrakturierung einen Einfluss auf die Regeneratbildung haben zu können [56]. Darüber hinaus haben Follow-up-Studien gezeigt, dass mit Mikrofrakturierung behandelte Knorpelläsionen in 25–49% der Fälle mit Knochenwucherungen verbunden sind. Solche Knochenwucherungen beeinträchtigen nicht nur die Integrität des Reparaturgewebes und den angrenzenden Knorpel, sondern auch die gegenüberliegende Seite des Gelenks [11]. Kombinationen, also die Anwendung verschiedener Kontrolldefektarten, sind möglich [10, 64].

Defekte mit einer Ausdehnung von knapp unter 20% des lasttragenden Bereichs (durchschnittlich 7 mm) können auf der Kondyle des Schafes in den umgebenden Bereichen osteoarthrotische Veränderungen bewirken, die bereits nach 6 Wochen histologisch nachgewiesen werden können [77]. Bei größeren Defekten (durchschnittlich 14 mm) kann es zur Beeinträchtigung des korrespondierenden Tibiaplateaus kommen [77]. In anderen Untersuchungen wurde dieser Effekt jedoch nicht beschrieben [30]. Spezielle Studien zu der Fragestellung bei anderen Tierspezies wurden nach unserem Wis-

sen nicht durchgeführt. Allerdings finden sich in anderen Untersuchungen, z. B. bei der Ziege, Hinweise, dass bei osteochondralen Defekten mit einem Durchmesser von 6 mm weitreichende Veränderungen, sowohl im darunterliegenden Knochen als auch im defektangrenzenden Knorpel auftreten können [45].

Fixierung des Konstruktes

Die Konstrukte benötigen eine ausreichende Primärstabilität, um sich im Defektlager zum Regenerat entwickeln zu können [23]. Ein aus dem Defekt luxiertes Konstrukt lässt ihn leer zurück, so dass eine Regeneratentwicklung lediglich als Spontanheilung zu bewerten wäre. Ob ein Regenerat, das frei im Gelenk liegt, zum Regenerat werden kann, ist bisher nicht bekannt. Theoretisch könnte sich daraus jedoch ein freier Gelenkkörper entwickeln. Allerdings unterliegt das freie Konstrukt keiner direkten mechanischen Belastung, so dass eine chondrale Differenzierung aus diesem Grund eher unwahrscheinlich erscheint.

Verschiedene Fixationsmaßnahmen werden angegeben. Sehr häufig wird mit resorbierbarem Material genäht. In 19 Studien wurde dieses Vorgehen gewählt [9, 37]. In 8 Arbeiten erfolgte eine Naht der Konstrukte mit dem Knorpel [49, 57], in 11 Studien wurde eine Deckung mit einer Membran durchgeführt, welche wiederum mit dem Knorpelgewebe vernäht war [8, 10]. Hier kann es sich sowohl z. B. um eine Kollagenmembran als auch um einen Periostlappen handeln. Das Annähen des Periostlappens kann eine negative Auswirkung auf den defektumgebenden Knorpel haben [81]. Im Bereich der Nähte kann schon nach kurzer Zeit eine Abnahme der Zelldichte und damit verbunden ein Abbau der Extrazellulärmatrix erfolgen [42]. Das Nähen verursacht im Knorpel fortschreitende Schädigungen, die an die Entstehung der frühen Osteoarthrose erinnern [42].

Oft werden die Konstrukte mit Fibrinkleber fixiert [7, 15, 19, 26, 28, 30]. Selten wird mit einem Pin fixiert [81, 90] oder es erfolgt eine Aushärtung mit UV-Licht [67]. Die Fixation mit Fibrinkleber und die Press-fit-Methode sind zwar Alternativen zur Naht, werden z. T. als weni-

ger erfolgreich angesehen [8]. Press-fit als einzige Fixationstechnik wird hauptsächlich bei Studien zu OATS angewandt [32, 33, 51]. Bei einer Untersuchung handelte es sich um eine chondrale Deckung, bei der Fibrin zusätzlich als Dichtmittel benutzt wurde [47].

Immobilisation

Um die Primärstabilität zu sichern, immobilisieren manche Autoren die operierten Gliedmaßen des Tieres mit einer äußeren Schienung, meist in Form eines Gipsverbands [30]. Hierbei bieten Kunststoffe den Vorteil eines geringeren Gewichts [77]. Dieses Vorgehen soll die Belastung des Implantats sichern, ohne dass es Scherbelastungen ausgesetzt wird. So wird ein Herausschieben des Konstruktes aus seinem Lager bei Bewegung unwahrscheinlich. Das Vorgehen findet sich bei weniger als 10% der zusammengestellten Literatur.

Die Dauer der Immobilisation betrug zwischen 5 und 7 Tagen. Eine Gruppe immobilisierte für 10 Tage durch Anbringen eines externen Fixateurs [67].

Beidseitiges Vorgehen unter Beachtung der Belastung

In 32 der eingesehenen Untersuchungen wurde ein beidseitiges Vorgehen angewandt. Das heißt, dass die Kniegelenke, an denen i. d. R. die Verfahren getestet wurden, auf beiden Seiten behandelt

wurden. Der Vorteil dieses Vorgehens ist darin zu sehen, dass durch die beidseitige und gleichzeitige Behandlung der Gelenke die Symmetrie gewährleistet bleibt. Besonders die mechanische Beanspruchung bliebe gleich. Im anderen Fall muss damit gerechnet werden, dass die operierte Gliedmaße geschont wird, was die Regeneratentwicklung beeinflussen könnte, weil sie nicht in dem Maße belastet wird, wie es physiologisch erwartet werden kann. Zudem könnte sich eine Mehrbelastung der kontralateralen, also der unbehandelten, Extremität negativ auf die Integrität dieses Gelenks auswirken, was in der Folge zu einem frühzeitigen Verschleiß, also einer Osteoarthrose, führen könnte. Das würde umso mehr gefürchtet, wenn dieses Gelenk als Kontrolle dienen sollte. Des Weiteren muss man bedenken, dass bei einem beidseitigen Vorgehen weniger Tiere gebraucht werden.

Aus tierschutzrechtlicher Sicht ist aber dieses Vorgehen kritisch zu betrachten (BGBI. I S. 1206, 1313), da das Tier u. U. kein deutliches Schmerzvermeidungsverhalten zeigen kann. Deshalb muss in Betracht gezogen werden, in welchem Maße die operative Versorgung das Tier belastet und wie lange bzw. wie stark mit einer Beeinträchtigung zu rechnen ist. Gleichzeitig ist zu prüfen und bei Antragstellung – insbesondere bei der Durchführung des Versuches – darauf zu achten, dass eine ausreichende Schmerzmedikation zur Verfügung steht und die Tiere

gut überwacht und auf evtl. Schmerzreaktionen untersucht werden.

In diesem Zusammenhang muss auch berücksichtigt werden, dass Leerdefekte, die als Kontrolldefekte dienen, zu arthrotischen Veränderungen im Gelenk führen können. Dies ist abhängig von der geplanten Versuchsdauer. Immerhin wird nur ein Defekt in entsprechender Größe („critical size defect“) als Kontrolle dienen können. Allerdings stellt ein Defekt in dieser Dimension in jedem Fall zumindest eine fakultative präarthrotische Veränderung dar. Für die Führung des Tieres über den Versuchszeitraum bedeutet dies regelmäßige Kontrollen und Gabe von Schmerzmitteln, die geeignet sind, akuten postoperativen Schmerz sowie evtl. auftretenden Arthroseschmerz wirksam zu lindern. Wie im humanen Bereich bieten sich deshalb u. a. für die Veterinärmedizin zugelassene NSAR an.

Standzeit

Zeiträume von 6 bis 12 Monaten sind üblicherweise empfohlen [38, 43], um den Erfolg der Reparatur oder Regeneration von Gelenkknorpel basierend auf histologischen und biochemischen Untersuchungen beurteilen zu können. Das beinhaltet auch den Übergang zum angrenzenden Knorpel und zum subchondralen Knochen [5]. Standzeiten von mindestens einem Jahr werden z. B. von der FDA empfohlen, um eine ausreichende Einheilung gewährleisten zu

Hier steht eine Anzeige.

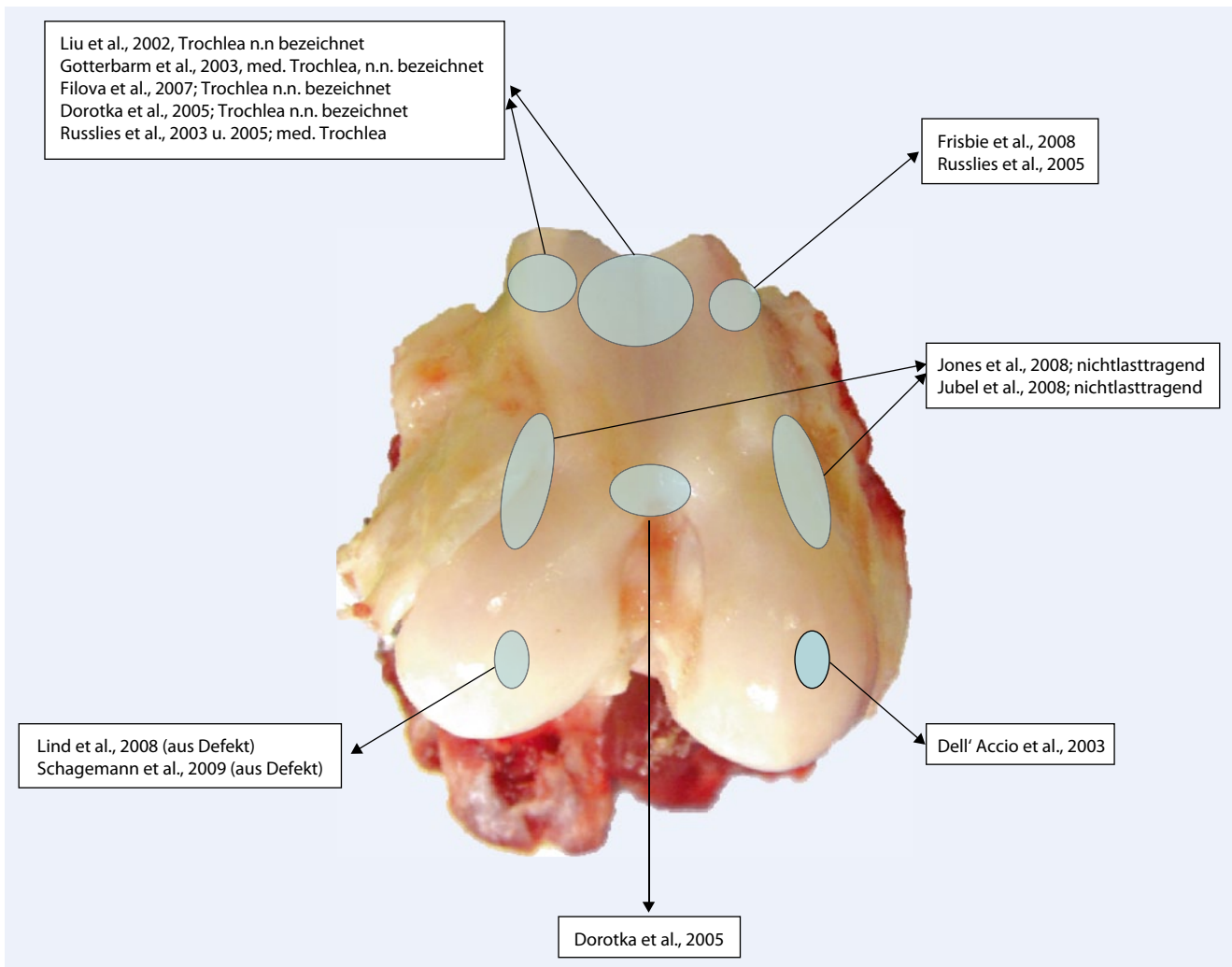


Abb. 3 ▲ Exemplarisch beschriebene Entnahmestellen von Knorpelgewebe am Knie zur späteren ACT bzw. MACT

können [2]. Diese Zeit sollte ausreichen, um eine Bewertung über einen beständigen therapeutischen Nutzen machen zu können, wobei bei humanen Studien normalerweise wesentlich längere Laufzeiten von bis zu 5 Jahren empfohlen werden [63].

Die Länge der Einheilungsphase der Konstrukte umfasst in der untersuchten Literatur einen Zeitraum von 2 Wochen [35] bis zu 24 Monaten [60, 91]. In der Immunhistologie ist bereits 6 Wochen nach Implantation eines Kollagenimplantats im Schwein eine schwache Kollagen-II-Färbung detektierbar, die im Verlauf des Versuchs bis zu 1 Jahr kontinuierlich ansteigt [79]. In einer anderen Untersuchung wird bei Full-thickness-Defekten nach 8 Wochen ebenfalls im Schwein Kollagen II und Proteoglykan in Teilen des Defektes nachgewiesen [85].

Bei der Wahl der Standzeiten muss man sich bewusst sein, dass der Prozess der Knorpel- und Knochenregeneration vermutlich länger andauert als 6 Monate. Zu diesem Zeitpunkt ist sie jedoch schon deutlich in Gang und signifikante Veränderungen können detektiert werden [5]. Nach einem Jahr sollten die Umbauprozesse soweit abgeschlossen sein, dass man signifikante Unterschiede, sowohl in der Histologie als auch in der Biomechanik, nachweisen kann. Eine zu kurze Standzeit kann zu dem Problem führen, dass das Regenerationsgewebe zu weich ist, um biomechanischen Tests standzuhalten [78].

Diese Kenntnisse spiegeln sich auch in den in der Literatur gewählten Standzeiten der Tiere wider. So werden Standzeiten über einem Jahr nur in 4 Fällen untersucht [6, 28, 60, 91]. Standzeiten von

einem Jahr werden über 30-mal, 6 Monate sogar 40-mal gewählt. In vielen Studien wurden mehrere Standzeiten gewählt, um die Veränderungen im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können [48, 49, 57, 87]. Die häufigsten Standzeiten sind 3, 6 und 12 Monate. Hierbei sollte bedacht werden, dass lange Standzeiten mit einem hohen Aufwand verbunden sind.

Autologe oder homologe Besiedelung

Es gibt unterschiedliche Lokalisationen, um die zur zellhaltigen Besiedlung benötigten Chondrozyten zu gewinnen. Meist wird Knorpelmaterial aus den nichtlasttragenden Bereichen des kontralateralen Knies entnommen und prozessiert [26, 61]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Knorpelmaterial aus den zu füllenden

Infobox 1

Relevante Publikationen zu biomechanischen Untersuchungen

Ando et al. [4]; Chang et al. 2006; Chiang et al. [15]; Dattena et al. 2009; Gavenis et al. 2011; Gelse et al. 2008; Gelse et al. 2010; Gille et al. [30]; Goodrich et al. [31]; Gotterbarm et al. [32]; Gotterbarm et al. [33]; Ho et al. [37]; Igarashi et al. 2011; Im Gun-Il et al. 2009; Ivkovic et al. 2010; Jiang et al. [46]; Jones et al. [47]; Kleemann [53]; Kon et al. 2006; Lane et al. [56]; Li et al. [57]; Lind et al. [58]; Liu et al. [61]; Milano et al. 2010; Niederauer et al. 2000; Piliar et al. 2007; Ranawat et al. 2008; Russlies et al. [75]; Schell et al. 2007; Schlichting et al. [78]; Schneider et al. [79]; Seedholm et al. 2007; Siebert et al. [83]; Strauss et al. 2005; Welch et al. [91].

Defekten zu verwenden [19, 58]. Das hat den Vorteil, keine anderen Bereiche des gesunden Knorpels zu schädigen, aber den Nachteil, dass die Isolierung einer ausreichenden Anzahl steriler Chondrozyten sichergestellt sein muss. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens wird darin gesehen, dass – wie im klinischen Fall auch – im Defektbereich mit entzündlichen Reaktionen zu rechnen ist, in den die Konstrukte im Rahmen eines zweizeitigen Vorgehens eingebracht werden. Natürlich besteht auch die Möglichkeit den Knorpel aus anderen Bereichen, wie z. B. aus den Rippen [7] oder vom Humeruskopf, [35] zu gewinnen. Dies ist allerdings mit dem Nachteil verbunden, dort Hebedefekte zu setzen.

Die Gewinnung homologer Zellen zur Besiedelung des Scaffolds bzw. des Defektes hat den Vorteil, auf einen operativen Eingriff beim Tier verzichten zu können und sicherzustellen, dass rechtzeitig eine ausreichende Anzahl an Zellen in gewünschter Qualität zur Verfügung steht. Die zeitliche Studienplanung ist deutlich vereinfacht, da auch die Kryokonservierung der Zellen möglich ist [22]. In den Publikationen, die in den beschriebenen Tiermodellen homologe Zellen einsetzen, werden keine Probleme bezüglich der Verträglichkeit beschrieben. Wenn auch dieses Vorgehen in der Durchführung einfacher erscheint, so ist es doch mit dem Vorgehen bei humanen Eingriffen im Sinne einer ACT weniger vergleichbar,

da hier üblicherweise autologe Zellen eingesetzt werden. Allerdings kann mit dem Vorgehen eine Standardisierung auf Seiten des Zellmaterials erfolgen, welche aus wissenschaftlicher Sicht gewünscht und wichtig sein kann.

In **Abb. 3** blickt man auf die distalen Gelenkflächen des linken Femurs eines ausgewachsenen Minipigs mit den beschriebenen und markierten Entnahmestellen zur Gewebeentnahme bei ACT bzw. MACT. Meist werden Stellen außerhalb der lasttragenden Bereiche ausgewählt. Elegant erscheint das Vorgehen, Gewebe aus den später zu besetzenden Defekten zu entnehmen.

Auswertung

Welche Methode zur Bestimmung des Behandlungszieles angewandt wird, beeinflusst das Studiendesign wesentlich. Dabei ist zunächst zu unterscheiden, ob es sich um eine Anwendung am lebenden Tier handelt oder ob Präparate dazu *ex vivo* notwendig sind.

Sehr nahe an der klinischen Situation ist die Verwendung von konventionellen Röntgenaufnahmen oder Schnittbildverfahren, wie das Magnetresonanztomogramm (MRT; [6, 12, 26]) oder das Computertomogramm (CT; [45]). Dadurch kann auch ggf. die Anzahl der Tötungen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten reduziert werden. Bodenreaktionskraftmessungen werden ebenfalls durchgeführt [53]. Der hohe Aufwand für solche Vorgehensweisen ist jedoch zu bedenken. Dagegen steht der Vorteil der Wiederholbarkeit der Analyse über den Beobachtungszeitraum [69].

Einen besonderen Stellenwert nimmt die Beurteilung des Therapieerfolgs mit dem MRT ein, nachdem es in klinischen Studien am Menschen ein etabliertes Verfahren ist [24] und wiederholt am selben Individuum angewandt werden kann [65]. Auch im Großtierversuch wird es eingesetzt [6, 26, 45, 52, 69, 84, 86, 89]. Das MRT setzt jedoch eine entsprechende logistische Ausstattung voraus. Ob es nur am lebenden Tier aussagekräftig ist, oder ob auch Präparate *post mortem* verwendet werden können, wird in der Literatur nicht diskutiert. Einige Autoren beschreiben Follow-up-Studien, wobei einige Aufnahmen *in vivo* und einige *ex vivo* aufge-

nommen und verglichen werden [6, 26, 69]. Die MRT-Untersuchung nach dem Töten des Tieres würde dem Versuchstier eine weitere Vollnarkose ersparen und eine zu erwartende gute Bildqualität gewährleisten. Eine vergleichende Untersuchung mit *In-vivo*- und *Ex-vivo*-Aufnahmen unter gleichen Bedingungen wurde jedoch nach unserem Kenntnisstand bisher nicht durchgeführt.

In den meisten Studien (94%) wird eine histologische Beurteilung der Präparate vorgenommen. Zusammen mit den biochemischen Analysen lassen sich etablierte Scores wie der O'Driscoll-, Wakitani-, Pineda- und ICRS-Score [62, 68, 70, 88] anwenden. Des Weiteren werden in 9% der Fälle molekularbiologische Analysen angewendet (PCR etwa 6%, DNA-Analyse etwa 3%; [4, 7, 27, 50]).

Um die biomechanische Kompetenz von Regeneraten für den Gelenkknorpel zu beurteilen, werden mechanische Testverfahren eingesetzt (etwa 33%). Relevante Publikationen zu biomechanischen Untersuchungen sind in der **Infobox 1** zu finden.

Diese Studien vermögen aus unserer Sicht sowohl Regenerate als auch Konstrukte für die regenerative Therapie grundsätzlich anwendungsnah zu beurteilen. Sie haben aber auch Vor- und Nachteile (s. Hurschler und Abedian „Möglichkeiten der biomechanischen Charakterisierung von Knorpelgewebe – eine Standortbestimmung“ in diesem Heft), zumal der Gelenkknorpel neben mehreren Stabilitätskriterien auch über hochwertige tribologische Kompetenzen verfügt [82].

Inwieweit histologisch-biochemische oder molekularbiologische Verfahren mit der biomechanischen Kompetenz von Knorpelregeneraten korrelieren und *vice versa* ist uns nicht bekannt. Daraus ergibt sich die Situation, dass wohl mehrere Analysemethoden zur Anwendung kommen sollten, um die Qualität regenerierten Knorpelgewebes tatsächlich abbilden zu können. Dies hat einen wesentlichen Einfluss auf das Studiendesign eines Großtierversuchs, da mechanisch getestete Präparate i. d. R. nicht zusätzlich mit anderen Methoden (z. B. Immunhistologie) analysiert werden können, weil sie meist zerstörenden Charakter haben (**Abb. 4**).

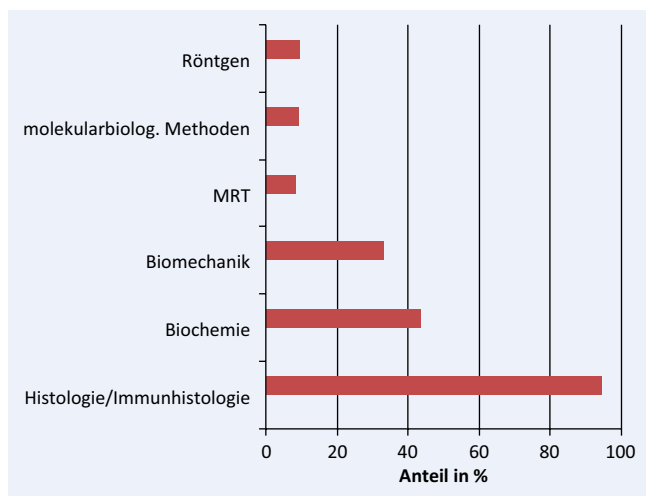


Abb. 4 Die am häufigsten angewandten Untersuchungsmethoden (%)

Fazit für die Praxis

- Der Einsatz von Großtieren in der translationalen Forschung zur regenerativen Therapie von Gelenkknorpel eröffnet eine Vielzahl von Parametern, die in einer Studie berücksichtigt werden müssen.
- Voraussetzung für Großtiermodelle ist eine entsprechende Infrastruktur zur artgerechten, meist längerfristigen Haltung, die moderne Auswertestrategien zulässt.
- Die Beurteilung der biomechanischen Kompetenz von Knorpelgewebe ermöglicht eine realitätsnahe Analyse. Hierdurch wird das Spektrum der Zielkriterien erweitert, ohne bisher bekannte zu ersetzen.
- Ein standardisiertes Vorgehen bei der Wahl des Modells kann innerhalb einzelner Arbeitsgruppen gesehen werden. Daneben werden fast in allen Studien histologische/immunhistologische und biochemische Auswerteverfahren benutzt, so dass dieses Vorgehen als derzeitiger Goldstandard zu bewerten ist.
- Weitere Schritte zur Standardisierung in den Tiermodellen sind zu fordern, um eine zulassungsrelevante Vergleichbarkeit zu erreichen, den Einsatz von Versuchstieren zahlenmäßig zu reduzieren und dem Tierschutz gerecht zu werden.

Korrespondenzadressen

Dr. rer. nat. B. Schneider-Wald

Sektion experimentelle Orthopädie und Unfallchirurgie, Orthopädisch-Unfallchirurgisches Zentrum, Universitätsmedizin Mannheim, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg Theodor-Kutzer-Ufer 1–3, 68167 Mannheim barbara.schneider@medma.uni-heidelberg.de

Prof. Dr. M.L.R. Schwarz

Sektion experimentelle Orthopädie und Unfallchirurgie, Orthopädisch-Unfallchirurgisches Zentrum, Universitätsmedizin Mannheim, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg Theodor-Kutzer-Ufer 1–3, 68167 Mannheim Markus.Schwarz@medma.uni-heidelberg.de

Danksagung. Die Autoren bedanken sich beim BMBF für die Unterstützung im Rahmen des Projekts „Funktionelle Qualitätssicherung von regenerativen Gewebeersatzmaterialien für Knorpel und Meniskus (QuRe-Ge)“, Förderkennzeichen 0315577G und 0315577C.

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt für sich und seine Koautoren an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- (o A) (2006) Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313). S 1206–1313
- Administration UFaD (2007) Guidance for industry preparation of IDEs and INDs for products intended to repair or replace knee cartilage. In: Office of Communication OaDO (Hrsg) US Food and Drug Administration, 1404 Rockville Pike
- Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaefer TP (2009) Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 17:705–713

- Ando W, Tateishi K, Hart DA et al (2007) Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28:5462–5470
- ASTM (2005) Standard guide for in vivo assessment of implantable devices intended to repair or regenerate articular cartilage. ASTM international
- Barnewitz D, Endres M, Krüger I et al (2006) Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials* 27:2882–2889
- Blanke M, Carl HD, Klinger P et al (2009) Transplanted chondrocytes inhibit endochondral ossification within cartilage repair tissue. *Calcif Tissue Int* 85:421–433
- Brehm W, Aklin B, Yamashita T et al (2006) Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage* 14:1214–1226
- Breinan HA, Martin SD, Hsu H-P, Spector M (2000) Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res* 18:781–789
- Breinan HA, Minas TOM, Hsu H-P et al (1997) Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 79:1439–1451
- Brown WE, Potter HG, Marx RG et al (2004) Magnetic resonance imaging appearance of cartilage repair in the knee. *Clin Orthop Relat Res* 422:214–223
- Burks RT, Greis PE, Arnoczky SP, Scher C (2006) The use of a single osteochondral autograft plug in the treatment of a large osteochondral lesion in the femoral condyle. *Am J Sports Med* 34:247–255
- Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD (2007) Chitosan glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 15:316–327
- Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD (2011) Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol phosphate/blood implants. *Osteoarthritis Cartilage* 19:136–144
- Chiang H, Kuo T-F, Tsai C-C et al (2005) Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 23:584–593
- Chu CR, Szczodry M, Bruno S (2010) Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 16:105–115
- Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC (2003) Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (bnp-7) in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 85:116–123
- Custers RJH, Saris DBF, Dhert WJA et al (2009) Articular cartilage degeneration following the treatment of focal cartilage defects with ceramic metal implants and compared with microfracture. *J Bone Joint Surg Am* 91:900–910
- Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J et al (2003) Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res* 21:123–131

Hier steht eine Anzeige.



20. Dorotka R, Windberger U, Macfelda K et al (2005) Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials* 26:3617–3629
21. Duda GN, Zully MM, Petra K et al (2005) On the influence of mechanical conditions in osteochondral defect healing. *J Biomech* 38:843–851
22. Ebihara G, Sato M, Yamato M et al (2012) Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* 33:3846–3851
23. Efe T, Schofer M, Fuglein A et al (2010) An ex vivo continuous passive motion model in a porcine knee for assessing primary stability of cell-free collagen gel plugs. *BMC Musculoskelet Disord* 11:283
24. Efe T, Theisen C, Fuchs-Winkelmann S et al (2012) Cell-free collagen type I matrix for repair of cartilage defects – clinical and magnetic resonance imaging results. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:1915–1922
25. EMA Ema (2010) Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee. In: EMA (Hrsg) European medicines agency, S 7
26. Filová E, Rampichová M, Handl M et al (2007) Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol Res* 56(Suppl 1):5–16
27. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ (2002) Insulin-like growth factor-1 enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 84-B:276–288
28. Frisbie DD, Bowman SM, Colhoun HA et al (2008) Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects – results at 12 and 18 months. *Osteoarthritis Cartilage* 16:667–679
29. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW (2006) A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19:142–146
30. Gille J, Kunow J, Boisch L et al (2010) Cell-laden and cell-free matrix-induced chondrogenesis versus microfracture for the treatment of articular defects: a histological and biomechanical study in sheep. *Cartilage* 1:29–42
31. Goodrich L, Hidaka C, Robbins P et al (2007) Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br* 89:672–685
32. Gotterbarm T, Reitzel T, Schneider U et al (2003) Einwachsverhalten von periostgedeckten Knochenübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen. *Orthopäde* 32:65–73
33. Gotterbarm T, Richter W, Jung M et al (2006) An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. *Biomaterials* 27:3387–3395
34. Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, Jung M (2008) The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim* 42:71–82
35. Guo X, Wang C, Duan C et al (2004) Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng* 10:1830–1840
36. Hembry RM, Dyce J, Driesang I (2001) Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 83:826–838
37. Ho STB, Huttmacher DW, Ekaputra AK et al (2010) The evaluation of a biphasic osteochondral implant coupled with an electrospun membrane in a large animal model. *Tissue Eng Part A* 16:1123–1141
38. Hoemann C, Kandel R, Roberts S et al (2011) International Cartilage Repair Society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage* 2:153–172
39. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E et al (2005) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 87:2671–2686
40. Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432–463
41. 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
42. Hunziker EB, Stähli A (2008) Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis Cartilage* 16:1067–1073
43. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA et al (2011) Preclinical studies for cartilage repair: recommendations from the international cartilage repair society. *Cartilage* 2011:137–152
44. Jackson DW, Halbrecht J, Proctor C et al (1996) Assessment of donor cell and matrix survival in fresh articular cartilage allografts in a goat model. *J Orthop Res* 14:255–264
45. 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
46. Jiang C-C, Chiang H, Liao C-J et al (2007) Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *J Orthop Res* 25:1277–1290
47. Jones CW, Willers C, Keogh A et al (2008) Matrix-induced autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy. *J Orthop Res* 26:292–303
48. Jubel A, Andermahr J, Schiffer G et al (2008) Transplantation of de novo scaffold-free cartilage implants into sheep knee chondral defects. *Am J Sports Med* 36:1555–1564
49. Jubel A, Fischer J, Andermahr J et al (2006) Die Implantation von matrixfreien dreidimensionalen Knorpeltransplantaten in standardisierte Knorpeldefekte am Schafskniegelenk. *Orthopäde* 35:1246–1257
50. Jung M, Kaszap B, Redöhl A (2009) Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell Transplant* 18:923–932
51. Jung M, Gotterbarm T, Gruettgen A et al (2005) Molecular characterization of spontaneous and growth-factor-augmented chondrogenesis in periosteum – bone tissue transferred into a joint. *Histochem Cell Biol* 123:447–456
52. Kangarlu A, Gahunia HK (2006) Magnetic resonance imaging characterization of osteochondral defect repair in a goat model at 8 T. *Osteoarthritis Cartilage* 14:52–62
53. Kleemann R (2006) Biomechanik und Mechanobiologie in der Regeneration osteochondraler Defekte im Kniegelenk. TU Berlin, Berlin
54. Kon E, Delcogliano M, Filardo G et al (2009) Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res* 28:116–124
55. Kon E, Filardo G, Delcogliano M et al (2010) Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord* 11:220
56. Lane JG, Healey RM, Chen AC et al (2010) Can osteochondral grafting be augmented with microfracture in an extended-size lesion of articular cartilage? *Am J Sports Med* 38:1316–1323
57. Li W-J, Chiang H, Kuo T-F et al (2009) Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J Tissue Eng Regen Med* 3:1–10
58. Lind M, Larsen A (2008) Equal cartilage repair response between autologous chondrocytes in a collagen scaffold and minced cartilage under a collagen scaffold: an in vivo study in goats. *Connect Tissue Res* 49:437–442
59. Lind M, Larsen A, Clausen C et al (2008) Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG poly(lactide) scaffold: an in vivo study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16:690–698
60. Litzke LF, Wagner E, Baumgaertner W et al (2004) Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng* 32:57–69
61. Liu Y, Chen F, Liu W et al (2002) Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng* 8:709–721
62. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M et al (2003) Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 85-A:45–57
63. Marlovits S, Aldrian S, Wondrasch B et al (2012) Clinical and radiological outcomes 5 years after matrix-induced autologous chondrocyte implantation in patients with symptomatic, traumatic chondral defects. *Am J Sports Med* 40:2273–2280
64. Miot S, Brehm W, Dickinson S et al (2012) Influence of in vitro maturation of engineered cartilage on the outcome of osteochondral repair in a goat model. *Eur Cell Mater* 23:222–236
65. Moradi B, Schönit E, Nierhoff C et al (2012) First-generation autologous chondrocyte implantation in patients with cartilage defects of the knee: 7 to 14 years' clinical and magnetic resonance imaging follow-up evaluation. *Arthroscopy* 28:1851–1861
66. Muehleman C, Li J, Abe Y et al (2009) Effect of risdonate in a minipig cartilage defect model with allograft. *J Orthop Res* 27:360–365
67. Nehr 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
68. O'Driscoll SW, Keeley F, 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
69. Petersen J, Uebliker P, Goepfert C et al (2008) Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci Mater Med* 19:2029–2038

70. Pineda S, Pplack A, Stevenson S et al (1992) A semi-quantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel)* 143:335–340
71. Räsänen T, Messner K (1996) Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J Biomed Mater Res* 31:519–524
72. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW (2005) Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9:23–32
73. Richter W, Diederichs S (2009) Regenerative Medizin in der Orthopädie. *Orthopäde* 38:859–869
74. Russlies M, Behrens P, Ehlers E-M et al (2005) Periosteum stimulates subchondral bone densification in autologous chondrocyte transplantation in a sheep model. *Cell Tissue Res* 319:133–142
75. Russlies M, Rütter P, Köller W et al (2003) Biomechanische Eigenschaften von Knorpelersatzgewebe nach verschiedenen Methoden der Knorpeldefektbehandlung beim Schaf. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 141:465–471
76. Schagemann JC, Erggelet C, Chung H-W et al (2009) Cell-laden and cell-free biopolymer hydrogel for the treatment of osteochondral defects in a sheep model. *Tissue Eng Part A* 15(1):75–82
77. Schinhan M, Gruber M, Vavken P et al (2012) Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. *J Orthop Res* 30:214–220
78. Schlichting K, Schell H, Kleemann RU et al (2008) Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing. *Am J Sports Med* 36:2379–2391
79. Schneider U, Schmidt-Rohlfing B, Gavenis K et al (2011) A comparative study of 3 different cartilage repair techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1–8
80. Schrimpf F (2004) Beeinflussung der Gelenkknorpelregeneration beim Schaf durch den Einsatz resorbierbarer Implantate. Dissertation
81. Schrödl S (2005) Erprobung eines bio-resorbierbaren Bioimplantates zum Knorpelersatz im Schafsfemur. In: *Orthopädische Klinik der LMU. Ludwigs-Maximilians-Universität München, München*, S 91
82. Schwarz MLR, Schneider-Wald B, Kruse A et al (2012) Tribologische Messungen am Gelenkknorpel. *Orthopäde* 41:827–836
83. Siebert C, Schneider U, Sopka S et al (2006) In-growth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study. *Arch Orthop Trauma Surg* 126:247–252
84. Simon TM, Aberman H (2010) Cartilage regeneration and repair testing in a surrogate large animal model. *Tissue Eng Part B Rev* 16:65–79
85. Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W (2009) Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev* 18(7):969–978
86. Streitparth F, Schöttle P, Schlichting K et al (2009) Osteochondral defect repair after implantation of biodegradable scaffolds: indirect magnetic resonance arthrography and histopathologic correlation. *Acta Radiol* 50:765–774
87. Vasara AI, Hyttinen MM, Lammi MJ et al (2003) Subchondral bone reaction associated with chondral defect and attempted cartilage repair in goats. *Calcif Tissue Int* 74:107–114
88. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG et al (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579–592
89. Watanabe A, Boesch C, Anderson SE et al (2009) Ability of dGEMRIC and T2 mapping to evaluate cartilage repair after microfracture: a goat study. *Osteoarthritis Cartilage* 17:1341–1349
90. Wegener B, Schrimpf FM, Pietschmann MF et al (2009) Matrix-guided cartilage regeneration in chondral defects. *Biotechnol Appl Biochem* 53:63–70
91. Welch RD, Berry BH, Crawford K et al (2002) Subchondral defects in caprine femora augmented with in situ setting hydroxyapatite cement, polymethylmethacrylate, or autogenous bone graft: biomechanical and histomorphological analysis after two-years. *J Orthop Res* 20:464–472
92. Heir S, Arøen A, Løken S et al (2010) Intraarticular location predicts cartilage filling and subchondral bone changes in a chondral defect. *Acta Orthop* 81(5):619–27
93. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A et al (1996) Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res* 326:270–83

PharmNet.Bund Transparente Informationen über klinische Studien

In Deutschland genehmigte klinische Arzneimittelstudien werden ab sofort im Portal PharmNet.Bund transparent veröffentlicht. Die Daten über klinische Studien können von jedermann kostenfrei eingesehen werden und stehen somit nicht nur Ärzten, sondern auch Patienten und interessierten Bürgern zur Verfügung.

Die Datenbank enthält Datensätze zu klinischen Studien ab August 2004. Folgende Informationen können abgerufen werden:

- Sponsor (verantwortliche natürliche oder juristische Person)
- Design (Aufbau, Dauer etc.)
- zu prüfende/geprüfte Arzneimittel
- Anwendungsgebiete, Ziele der Prüfungsphase
- Personen, die in die Studie eingeschlossen werden sollen

PharmNet.Bund informiert über die Herkunft der Daten und nach welchen Regeln diese veröffentlicht werden. Zusätzlich werden zeitnah auch die Ergebnisberichte von vielen klinischen Prüfungen in der Datenbank zu finden sein. Im Portal PharmNet.Bund werden alle in der Datenbank benutzen Begriffe erklärt, eine komfortable Suchfunktion erleichtert das Finden von bestimmten Aspekten der Studien. Mit dem Portal entsteht ein integriertes Arzneimittel-Informationssystem des Bundes und der Länder, das die amtlichen Daten über zugelassene Arzneimittel zentral zur Verfügung stellt.

*Quelle: PharmNet.Bund,
www.pharmnet-bund.de*