

AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE

LEITUNG: PROF. DR. M. NERLICH

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

In vitro Untersuchung des Dehnungsverhaltens des Gelenkknorpels

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin**

der

**Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Sandra Rohde

2010

AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE

LEITUNG: PROF. DR. M. NERLICH

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

In vitro Untersuchung des Dehnungsverhaltens des Gelenkknorpels

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sandra Rohde

2010

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Carsten Englert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 2011

Für

.... meine Eltern, die mich immer unterstützt haben
und mir alles ermöglicht haben.

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	6
2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	9
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
3 Einleitung.....	12
Hyaliner Knorpel	12
Stand der Technik zur Analyse der Gelenkknorpelintegration.....	15
Fragestellung.....	17
Wie kann der Gelenkknorpel markiert werden, so dass die Dehnung und Verformung des Knorpelstreifens optisch gemessen werden kann?.....	17
Toxizitätsprüfung der Markierungsmethode.....	17
Toxizitätsprüfung der Dehnung während des T-Peel Manövers.....	17
4 Material und Methoden.....	18
4.1 Materialliste.....	18
4.2 Probenpräparation.....	19
4.3 Hilfsmittel für Markierungsmethoden.....	21
4.4 Markierungsmethoden.....	22
4.4.1 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung von Hydrochinon und Silbernitrat.....	22
Grundlegendes über Hydrochinon und Silbernitrat.....	22
Vorbereitende Maßnahmen und Versuchsdurchführung.....	24
4.4.2 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung einer Zuckerlösung und Kaliumpermanganat.....	25
Grundlegendes über Natriumthiosulfat Pentahydrat und Kaliumpermanganat.....	25
Vorbereitende Maßnahmen und Versuchsdurchführung.....	26
4.4.3 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung von einer in Tusche getunkten Rasierklinge.....	27

Versuchsdurchführung.....	27
4.4.4 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung von verschiedenen in Tusche getunkten Nadeln.....	28
Versuchsdurchführung.....	28
4.4.5 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung eines Lasers.....	28
Technische Daten	28
Versuchsdurchführung.....	29
4.4.6 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung eines erhitzten Modellierinstrumentes bzw. einer erhitzten Nadel.....	30
Versuchsdurchführung.....	30
4.5 Live/Dead ® Viability/Cytotoxicity Assay Kit (L-3224).....	32
4.5.1 Informationsbeschreibung zum Live/Dead Kit (23s).....	32
4.5.2 Versuchsvorbereitung und Versuchsdurchführung.....	32
4.6 Technische Daten zum Peelvorgang.....	33
5 Ergebnisse.....	36
5.1 Hydrochinon und Silbernitrat.....	36
5.2 Kaliumpermanganat und Natriumthiosulfat Pentahydrat.....	36
5.3 Tusche.....	37
5.4 Laser.....	41
5.5 Erhitztes Modellierinstrument und erhitzte Nadel.....	43
5.6 Zusatz.....	48
Markierungsgrößen und Live/Dead Kit.....	48
6 Diskussion.....	50
6.1 Hydrochinon und Silbernitrat.....	51
6.2 Kaliumpermanganat und Natriumthiosulfat Pentahydrat.....	52
6.3 Tusche.....	53
6.4 Laser.....	54
6.5 Erhitztes Modellierinstrument und erhitzte Nadel.....	55
6.6 Markierungen.....	56
7 Zusammenfassung.....	58

8 Literaturverzeichnis.....	61
9 Curriculum Vitae.....	65
10 Danksagung	66
11 Erklärung.....	67

2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Es wird die Struktur und Aufbau des Gelenkknorpels dargestellt. A) Schematische und B) elektromikroskopische Darstellung der einzelnen Knorpelzonen und der Bindegewebsanordnung [20].
- Abb. 2:** Es wird die Lokalisation des Kniegelenks des Rindes dargestellt. Vom Hinterlauf wird aus dem distalen Femur Knorpelgewebe gewonnen.
- Abb. 3:** Links ist ein Knorpelknochenblock illustriert, der mit einem Skalpell an der Oberfläche in definierten Abständen eingeschnitten ist. Darunter findet sich ein Foto mit der Dokumentation, wie dies durchgeführt wird. In dieser wird die Beschränkung der Länge dargestellt und rechts das Abheben des Knorpelblocks in definierter Länge, Breite und Höhe.
- Abb. 4:** Technische Darstellung des zugeschnittenen Knorpelblockes mit einer Schnittnut für die Einspannung in einer mechanischen Testmaschine für den Zellvorgang.
- Abb. 5:** Haltevorrichtung (Position 1).
- Abb. 6:** Chemische Strukturformel für die beiden Substanzen Hydrochinon und Silbernitrat.
- Abb. 7:** Natriumthiosulfat Pentahydrat..
- Abb. 8:** Kaliumpermanganat..
- Abb. 9:** Markierung der Knorpelprobe durch ein Modellierinstrument.
- Abb. 10:** Fertig markierter Knorpelstreifen.
- Abb. 11:** Charakteristisches Kraft-Weg-Diagramm nach einem T-peel Versuch eines Knorpelblocks.
- Abb. 12:** Station der Prüfstandvorrichtung.
- Abb. 13:** Überarbeiteter Prüfstand mit neuem Becken und neuer Haltevorrichtung.

Abb. 14: Bildfolge aufgenommen durch „Aramis“, sowie die ausgewertete Spannungs-Dehnungskurve.

a) Probe im Ruhezustand; b) Anfang des Peelvorganges;
c) Peelvorgang kurz vor dem Ende [59].

Abb. 15: Durch Live/Dead gefärbter Knorpelstreifen. Zu sehen ist die Markierung mit schwarzen Pigmenten durch die Punktion einer Nadel. Grün gefärbte Zellen zeigen vitale Zellen. Rot gefärbte Zellen zeigen avitale Zellen.

a) vermehrte avitale Zellen um die Einstichstelle; b) kaum avitale Zellen um die Einstichstelle.

Abb. 16: Live/Dead gefärbter Knorpelstreifen. Markierung anhand schwarzer Pigmente unter Verwendung einer Rasierklinge. Vermehrte avitale Zellen um die Schnittstelle herum.

Abb. 17: Frontalansicht: Laserpunktmarkierung auf je einer der auf 150 µm geteilten Fläche.

Abb. 18: Seitenansicht: Lasermarkierungstiefe die in die 2,5 mm große Knorpelfläche reicht.

Abb. 19: Deutlich sichtbare Traumatisierung auch des angrenzenden Areals durch den Laser.

Abb. 20: Live/Dead Test: Markierung durch erhitztes Modellierinstrument (Variante 2).

Abb. 21: Live/Dead Test: Markierung durch erhitzte einer Nadel (Variante 3).

Abb. 22: Abrissfläche. Vermutlich an einem Markierungspunkt - verursacht durch ein Instrument.

Abb. 23: Abrissfläche an einem Markierungspunkt - verursacht durch eine Nadel.

Abb. 24: Avitale Zellblöcke verursacht durch die Einspannung in Zugmaschine.

Abb. 25: Avitale Zellebereiche durch den Druck einer anatomischen Pinzette.

Abb. 26: Avitale Zellen. Wahrscheinlich bei der Probenpräparation entstanden.

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Laserstrahleinstellungen an Knorpelstreifen mit und ohne Tusche.
- Tab. 2:** Peelingproben von mit Tusche und Nadel markierten Knorpelstreifen.
- Tab. 3:** Nullproben – unmarkiert.
- Tab. 4:** Ergebnis des Versuchsablaufs durch ein(e) erhitzte(s) Instrument/Nadel.
- Tab. 5:** Vergleich der durchschnittlichen Markierungsläsionsgrößen in μm bzw. Volumenangabe in nl.

3 Einleitung

Hyaliner Knorpel

Hyaliner Knorpel bedeckt die Enden von Diarthrosen. Die Dicke des hyalinen Knorpels variiert zwischen den verschiedenen Gelenken, sowie innerhalb eines Gelenkes, so dass je nach Belastung die einwirkenden Kräfte gleichmäßig verteilt werden können [1] [2].

Der hyaline Knorpel ist besonders geeignet mechanischen Belastungen zu widerstehen. Die Last wird auf dem darunter liegenden Knochen verteilt, so dass sich die Last pro Fläche verringert [3] [4] [5] [6]. Die Oberflächenbeschaffenheit mit den schmierenden Eiweißen die sich auch in der Gelenkflüssigkeit finden, sorgen für eine geringe Reibung [7] [8].

Der hyaline Knorpel setzt sich aus Zellen und aus einer wasserhaltigen Matrix zusammen. Der Zellanteil im humanen Gelenkknorpel ist im Vergleich zu anderen Tierarten (z.B. dem Kaninchen oder der Ratte), trotz verhältnismäßig dickerer hyalinen Knorpels, geringer [2]. Die amorphe Grundsubstanz der extrazellulären Matrix setzt sich im Wesentlichen aus 60 bis 80 Vol.-% Wasser [9] und aus 10 bis 20 Vol.-% Kollagen vom Typ II zusammen. Die Proteoglykane (Aggrecane) machen 5 bis 7 Vol.-% aus und sorgen für viskoelastische Eigenschaften, sowie für Druckfestigkeit [10]. Andere Bestandteile wie Hyaluronate, Lipide, Anchorin, Fibronectin, Kollagene (Typ V, VI, IX, X, XI) etc. bilden weniger als 5 Vol.-% [2]. In der extrazellulären Matrix eingebettet befinden sich Chondrozyten. Ihr Anteil beträgt circa 1 % bis 10 % des gesamten Knorpelvolumens. Sie produzieren die Grundsubstanz und sind je nach Belastung an dessen Umbau beteiligt [11] [12] [13]. Das Strukturprotein Kollagen vom Typ II bildet mit circa 90 Vol.-% den größten Kollagenanteil und wirkt Zugbelastungen entgegen [14] [15]. Kollagen vom Typ IX und vom Typ XI treten immer in Verbindung mit Kollagen vom Typ II auf und bilden Brückenbindungen mit den feinen Typ II Kollagenfibrillen [16]. Fasern vom Typ X umgeben hypertrophe Zellen und Fasern vom Typ VI befinden sich in der Peripherie von Chondrozyten und verbinden diese mit der extrazellulären Matrix [17].

Die Kollagenfibrillen sind arkadenförmig aufgebaut. In der Superfizialzone verlaufen die Fasern annähernd parallel zur Oberfläche, machen einen bogenförmigen Verlauf in der mittleren Zone und stehen schließlich in der tieferen Radiärzone senkrecht zur Oberfläche (Abb. 1) [18] [19].

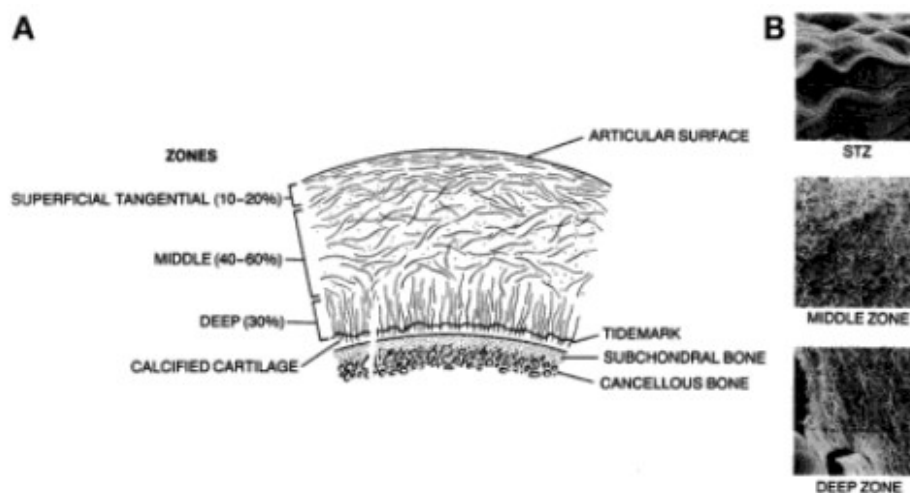


Abbildung 1: Es wird die Struktur und Aufbau des Gelenkknorpels dargestellt.

A) Schematische und B) elektromikroskopische Darstellung der einzelnen Knorpelzonen und der Bindegewebsanordnung [20].

Der juvenile Knorpel enthält Gefäße, über die der Knorpel während seines Wachstums ernährt wird [20]. Der adulte Gelenkknorpel ist hingegen frei von Blut-, Lymph- und Nerven Gefäßen und wird von der Synovialflüssigkeit durch Diffusion ernährt [21] [1].

Das mangelnde Zusammenwachsen gebrochener Gelenkflächenanteile wird als ein wesentlicher Grund des posttraumatischen Gelenkverschleißes angesehen. Knorpelknochenblocktransplantate, welche zur Behandlung von Knorpeldefekten verwendet werden, weisen im Bereich der knorpeligen Kontaktflächen meist keine Integration auf. Diese mangelnde Integration von Gelenkknorpelwunden mit Folgen für das betroffene Gelenk stellt bis heute ein ungelöstes Problem in der Traumatologie und Orthopädie mit einem hohen volkswirtschaftlichen Schaden

dar [22].

Aus klinischen Beobachtungen ist der Verlauf einer Gelenkknorpelverletzung zur posttraumatischen Arthrose seit langem bekannt [23]. Wenn es zu einer Fraktur mit Stufenbildung der Gelenkknorpeloberfläche kommt, entwickeln sich Fehlbelastungen des Gelenks. Diese können in Grenzen vom Gelenk kompensiert werden, so dass eine konservative Behandlung eines Gelenkbruches möglich ist. Die akzeptablen Grenzen einer Gelenkflächenstufe sind von Buckwalter und Mitarbeitern für jedes Gelenk und Lokalisation beschrieben [24] [25] [23]. Zusammenfassend ist eine Gelenkknorpelstufe in lasttragenden Gelenken, wie zum Beispiel dem Sprunggelenk, nicht akzeptabel [26]. Wenn aber die Gelenkknorpeloberflächen über einen Meniskus gleiten, wie es im Kniegelenk der Fall ist, so sind auch in diesem Areal Gelenkstufen akzeptabel. Auch die verbliebenen Frakturlinien führen zu einer mangelnden Überbrückung *in vivo*, die für eine posttraumatische Arthrose verantwortlich gemacht werden. Deshalb ist die bündige Integration des Gelenkknorpels nach einer Verletzung im lasttragenden Areal notwendig, um einen posttraumatischen Gelenkverschleiß zu verhindern. Deshalb wurde und wird intensiv die mangelnde Integrationsfähigkeit des Gelenkknorpels erforscht. Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigen diese mangelnde Integrationsfähigkeit des Gelenkknorpels *in vivo* [27] [28] [29], den posttraumatisch degenerativen Verlauf eines oberflächlichen und tiefen Gelenkknorpeldefektes [30] [31]. *In vitro* Gewebeuntersuchungen mit Gelenkknorpel widerlegen die zuvor gefestigte Meinung, dass Gelenkknorpel nicht wieder zusammen wachsen kann. So wies Scully seinerzeit eine Integration zweier Knorpelblöcke nach, indem er diese Blöcke *in vitro* aufeinander legte [32]. Die Integration von Knorpelgewebe ist grundsätzlich von der Integration lebender Knorpelzellen, dessen Kollagensynthese, der Kollagenanlagerung und dessen Quervernetzung abhängig. Dies konnte in vielen *in vitro* Untersuchungen des Knorpelgewebes nachgewiesen werden [33] [34] [35] [36].

Für die Diskrepanz der mangelnden Integration des Gelenkknorpels *in vivo* zur Integration *in vitro* werden äußere und innere Faktoren vermutet. Nach einer Verletzung finden Entzündungsreaktionen statt, welche als innere Faktoren im Wesentlichen für eine mangelnde Integration oder Degradation des Gelenkknorpels angeführt werden [37] [38] [39]. Dies sind katabole Entzündungsreaktionen mit

Expression diverser Cytokine [40]. Ein Cytokine wie das Interleukin-1 (IL-1) hat einen negativen Effekt auf die Zusammensetzung und auf die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels [41] [42]. Steroidhormone, wie das Dehydroepiandrosterone (DHEA) haben gezeigt, dass diese einen katabolen Zellstoffwechsel des Gelenkknorpels vermindern können [43]. Genauso könnten Steroidhormone einen positiven Einfluss auf den posttraumatischen Verlauf der Gelenkknorpelheilung haben, indem eine anabole Stimulation des Knorpelgewebes an der Kontaktfläche erfolgt und die Wundränder entsprechend stabilisieren könnte. Diese Hypothese das Steroidhormone die Gelenkknorpelintegration steigern können wurde erfolgreich belegt [44].

Als äußerer Faktor wird die Gelenkflüssigkeit diskutiert, die sich bei natürlichen Bewegungen eines Gelenkes in den Bruchspalt presst [45] [46]. Ein weiterer äußerer Faktor einer mangelnden Gelenkknorpelintegration könnten auch die Moleküle aus der Gelenkflüssigkeit oder der Knorpeloberfläche sein, die für den sehr geringen mechanischen Reibungskoeffizienten verantwortlich sind. Diese Moleküle könnten sich an die Bruchflächen des Gelenkknorpels binden und ein Zusammenwachsen verhindern. Im Wesentlichen sind dies Phospholipide, Hyaluronsäure und das Glykoprotein PRG4, welches auch als MSF/Superficial Zone Protein bezeichnet wird. PRG4 findet sich sowohl an der Lamina splendens des Gelenkknorpels als auch in der Synovia [47]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Moleküle aus der Synovia durch Anbindung an die Knorpeloberfläche eine Integration des Gelenkknorpels behindern können [48]. Würde diese Hypothese zutreffen, so müsste ein neues Behandlungskonzept für gelenknahe Frakturen entwickelt werden. Die Gelenkknorpelwunde sollte neben einer anatomischen Reposition auch zur Synovia verschlossen werden.

Stand der Technik zur Analyse der Gelenkknorpelintegration

Nach der Etablierung eines Scherbruchversuchs zur Untersuchung einer mechanischen Integration von Gelenkknorpel und der Darstellung von Nachteilen, ist nach theoretischen-mathematischen Überlegungen ein neues Verfahren durch die

Ingenieure der Fachhochschule Regensburg erarbeitet und als T-Peel-Test bezeichnet worden. Eine maschinelle Voraussetzung von den Kollegen war die Herstellung von Halterungen für die Probenstücke in einem Wasserbad. Ein wesentlicher theoretischer Vorteil des T-Peel Tests ist, dass ein Referenzwert für die Integration erzeugt wird. Die initiale Zerreißung des Knorpelstückes mit anschließender Heilung des zerrissenen Areals führt zu einem direkten Vergleich, der auf die in vivo Situation direkt übertragen werden kann.

Für die Weiterentwicklung des T-Peel Tests zur Einsatzreife sind noch mehrere Schritte notwendig. Zum Beispiel ist die Dehnung des Gelenkknorpels bei der Zerreißung durch die in der Werkzeugkunde eingesetzten Goniometer nicht messbar. Eine Markierungsmethode für den Gelenkknorpel ist nicht existent. Verschiedenste Markierungstechniken sollen in dieser Arbeit untersucht und für den T-Peel Test etabliert werden. Aus dem Dehnungsverhalten während der Zerreißung, im englischen peeling, können mit den aufgenommenen Kraftwerten Spannungs-Dehnungsdiagramme und alle wichtigen mechanischen Werte aufgenommen werden.

Die Vitalität des Gelenkknorpels ist ein wichtiger Faktor für den Heilungsprozess. Deshalb sind die folgenden Untersuchungen darauf ausgelegt, die Vitalität des Gelenkknorpels durch den Zerreißungsprozess als auch durch die Markierungstechniken zu untersuchen.

Fragestellung

Wie kann der Gelenkknorpel markiert werden, so dass die Dehnung und Verformung des Knorpelstreifens optisch gemessen werden kann?

Diesbezüglich muss für das Messinstrument (Goniometer) eine erkennbare Markierung am Objekt erprobt werden, die **Markierungsmethode**.

Ist eine Markierungsmethode gefunden, so muss diese in einer Anordnung auf dem Objekt erprobt werden, so dass das Messinstrument die Verformung des Objektes bei Versuchsdurchführung erfassen kann, die **Markierungsanordnung**.

Toxizitätsprüfung der Markierungsmethode

Sowohl die Markierungsmethode als auch Markierungsanordnung sollen für nachfolgende Versuche mit den Objekten keine negativen Auswirkungen auf die Zellvitalität haben. Deshalb wird, nachdem eine erfolgreiche Markierungsmethode gefunden ist, die Toxizität des Verfahrens bestimmt.

Toxizitätsprüfung der Dehnung während des T-Peel Manövers

Der neu zu entwickelnde T-Peel Test wird ebenfalls auf seine Toxizität in Bezug auf das initiale Trauma durch die Zerreißung des Knorpelstückes untersucht.

4 Material und Methoden

4.1 Materialliste

Material / Substanz	Bezeichnung	Hersteller	Ort/Land
oszillierenden Pendelsäge		Stryker Instruments	Kalamazoo, MI, USA
Schlittenmikrotom	Microm HM440E		Deutschland
Haltevorrichtung		Sandra Rohde	Regensburg, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen			
Objektträger		Starfrost	
Mikrofeine Nadel (ca. 0,1mm Durchmesser)			
Nadeln (ca. 0,4mm Durchmesser)			
Standard Rasierklinge aus Stahl mit unbeschichteter Schneide	Rasierklinge	Firma GEM	Deutschland
Augenlaser	VISULAS 532s	Carl Zeiss Meditec AG	Jena, Deutschland
Handbunsenbrenner (1750°C)	Lötlampe	Rothenberger	
Feuerzeug		BIG	
HS-Thomas-Color Instrumente	Modellier-instrument		
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin	15070-022	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Calcium- and Magnesium freier Phosphatsalzpuffer	PBS	Gibco	Deutschland
Petrischale			
Skalpellstanzen		Fachhochschule Regensburg	Regensburg, Deutschland
Tasterzirkel	Iwanson	Mede Technik	Emmingen-Lipt., Deutschland
Universal-prüfmaschiene		Hegewald & Peschke GmbH	
Einspannvorrichtung		Fachhochschule Regensburg	Regensburg, Deutschland
Kamera (GOM)	Typ „Aramis“	Gesellschaft für optische Messtechnik AG	Deutschland
Assay			
Natriumthiosulfat Pentahydrat			
Hydrochinon			
Silbernitrat			
Kalium-permanganat			
Tusche: schwarz, deckend, opak	Tusche A Drawing Ink	Pelikan	Hannover, Deutschland
Calcein AM	Live/Dead Kit	Molecular Probes Europe BV	Niederlande
Ethidiumbromid homodimer (EthD-1)	Live/Dead Kit	Molecular Probes Europe BV	Niederlande
Gewebe	Gelenkknorpel	Lokale Metzgereien	Bayern, Deutschland

4.2 Probenpräparation

Für alle nachfolgenden Versuche wird Knorpelgewebe von Kälbern gewonnen. Die Kälber sind alle bei Schlachtung circa 8 bis 12 Wochen alt. Durch eine lokale Metzgerei erfolgt unmittelbar nach Opferung des Tieres die Dissektion mit Abtrennung des geschlossenen Kniegelenkes (Abb. 2 [49]). Das Knie im Stück wird nach Freigabe durch den Veterinär vom Schlachter kommerziell erworben. Der Transport der Kniegelenke erfolgt in eisgekühlten Beuteln.

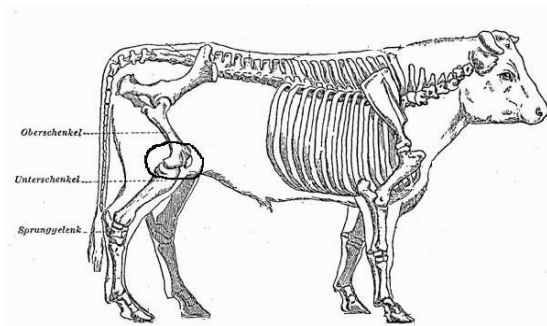


Abbildung 2: Es wird die Lokalisation des Kniegelenks des Rindes dargestellt. Vom Hinterlauf wird aus dem distalen Femur Knorpelgewebe gewonnen.

Es werden 20 mm x 15 mm x 15 mm große Knorpelknochenblöcke mittels einer oszillierenden Pendelsäge (Stryker Instruments, Kalamazoo, MI, USA) aus dem patellaren Gleitlager entnommen (Abb.3). Dabei wird darauf geachtet, dass diese Knorpelknochenblöcke möglichst plane Oberflächenbereiche der lateralen und medianen femoralen Kondylen, sowie aus der Facies patellaris aufweisen. Diese werden durch speziell angefertigte Skalpellenstanzen, an der Knorpel befindlichen Seite, in 12 mm x 2,5 mm große Areale unterteilt. Mit einem Schlittenmikrotom (Microm HM440E, Deutschland) werden die angestanzten Knorpelblöcke in 600 µm dicke Knorpelstreifen geschnitten, wobei die ersten 6 mm so geschnitten werden, dass die Streifen in zwei 300 µm dicke Streifen unterteilt sind. Somit entsteht ein Knorpelstreifen mit einer T-ähnlichen Anordnung, dessen Gesamtgeometrie 12 mm x 2,5 mm x 0,6 mm beträgt (Abb. 4).

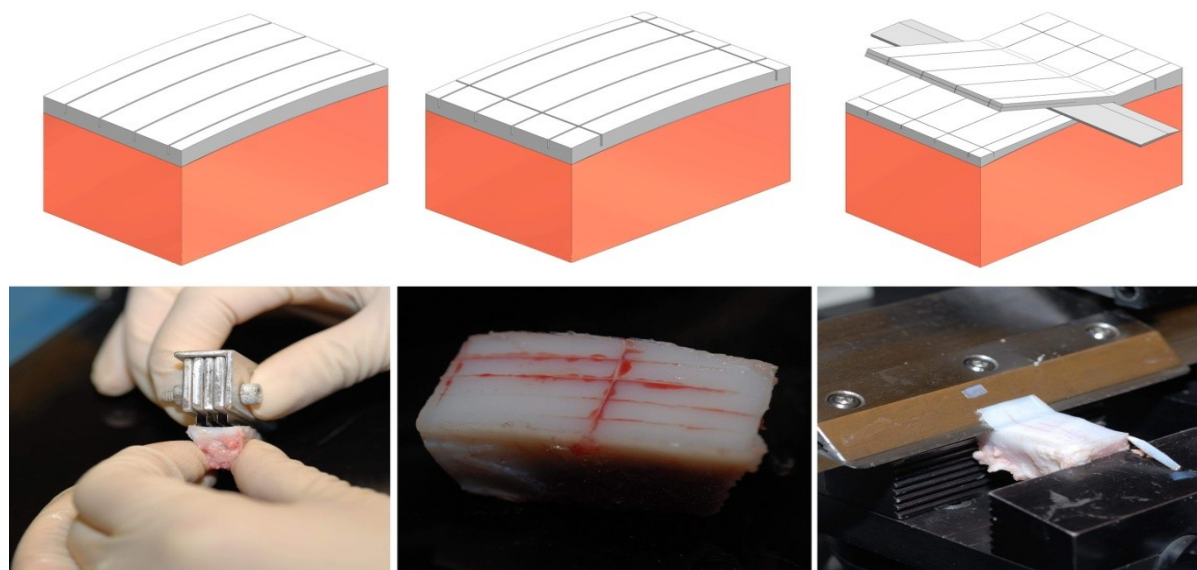


Abbildung 3: Links ist ein Knorpelknochenblock illustriert, der mit einem Skalpell an der Oberfläche in definierten Abständen eingeschnitten ist. Darunter findet sich ein Foto mit der Dokumentation, wie dies durchgeführt wird. In dieser wird die Beschränkung der Länge dargestellt und rechts das Abheben des Knorpelblocks in definierter Länge, Breite und Höhe.

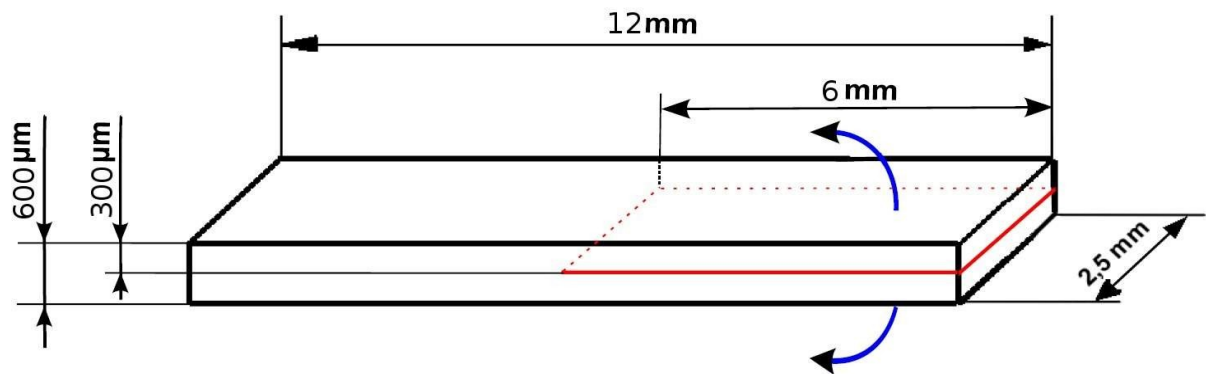


Abbildung 4: Technische Darstellung des zugeschnittenen Knorpelblockes mit er Schnittnut für die Einspannung in einer mechanischen Testmaschine für den Pellvorgang.

4.3 Hilfsmittel für Markierungsmethoden

Haltevorrichtung

Um die verschiedenen Markierungsmethoden bestmöglich auf die 600 µm großen Knorpelblöcke auftragen zu können, wird hierfür eine spezielle, jedoch simple Haltevorrichtung entworfen und hergestellt. Diese bietet eine für die jeweiligen Knorpelblöcke optimale komfortable, kompressionslose, nicht ausweichbare und sterile Einspannungs- und Bearbeitungsmöglichkeit. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Knorpel relativ feucht in der Form gehalten werden kann und dadurch nicht austrocknet. Das Feuchthalten wird durch eine mit PBS gefüllte Pipette durchgeführt. Für den Prototyp dieser Haltevorrichtung werden zwei gleich große Plexiglasscheiben verwendet, so dass sie exakt übereinander passen. Die Größe der Scheiben wird so gewählt, dass sie gut in der Hand liegen und gut zu handhaben sind. Die Maß der Plexiglasscheiben betragen jeweils 100 mm x 50 mm x 2 mm. Auf eine Scheibe wird eine Aluminiumplatte von circa 80 mm Länge und 0,6 mm Dicke aufgeklebt. Die zweite Plexiglasscheibe wird anschließend auf die Aluminiumfläche gelegt.

Die Aluminiumplatte besitzt an beiden Enden jeweils eine mittige Aussparung von 1,7 mm x 12,5 mm. Die Einspannung der Knorpelstreifen kann somit in einer von Zwei 600 µm dicken und 12,5 mm langen und 1,7 mm tiefen Hohlvorrichtung erfolgen. Der Knorpelstreifen wird dadurch von fünf Seiten gefasst.

Die Aluminiumplatte wird so platziert, dass ein Ende genau mit der 50 mm großen Seite der Plexiglasscheibe abschließt. Bei dieser randständigen Vorrichtung liegt der Knorpel nicht vollständig mit seiner 2,5 mm breiten Seite zwischen den zwei Plexiglasscheiben, sondern steht etwas hervor (Pos. 1, Abb. 6). Dies hat den Vorteil Markierungen mit einer flüssigen Lösung, wie z.B. „Silbernitrat“ oder „Tusche in Kombination mit einer Nadel“ so auftragen zu können, dass das flüssige Färbemittel nur wenig zwischen Knorpel und Halterung diffundiert und nur am Markierungspunkt den Knorpel wunschgemäß anfärbt.

Die zweiten Hohlvorrichtung (Pos. 2) liegt auf dem entgegengesetzten Ende der Einspannvorrichtung, wobei die untere Plexiglasscheibe hervorschaut. Somit liegt der

Knorpel mit seiner unteren 12 mm x 2,5 mm großen Fläche vollständig auf der Scheibe auf, während der Einspannungsbereich der oberen Seite je nach gewünschter Markierungsschnitttiefe durch die verschiebbare Plexiglasscheibe wahlweise gefasst werden kann.

In dieser Positionierung kann der Knorpel besonders komfortabel z.B. mit einer Rasierklinge angeschnitten werden. Dadurch, dass die zweite Plexiglasscheibe verschiebbar ist und der Knorpel aufgrund der Vorrichtung nicht ausweichen kann, kann die gewünschte Schnitttiefe des Knorpels sehr gut kontrolliert werden.



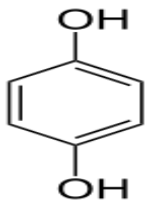
Abbildung 5: Haltevorrichtung (Position 1)

4.4 Markierungsmethoden

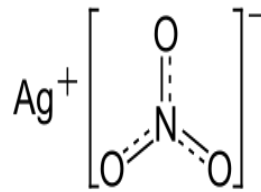
4.4.1 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung von Hydrochinon und Silbernitrat

Grundlegendes über Hydrochinon und Silbernitrat

Die ersten Markierungsüberlegungen beziehen sich auf eine permanente Markierung des Knorpels. Hierfür werden die Chemikalien Hydrochinon und Silbernitrat verwendet.



Hydrochinon



Silbernitrat

Abbildung 6: Chemische Strukturformel für die beiden Substanzen Hydrochinon und Silbernitrat.

Hydrochinon kann aus Chinasäure oder aus Chinon gewonnen werden. Es kristallisiert in farblosen sechsseitigen Prismen. Es ist geruchlos, süßlich schmeckend und in Wasser, sowie Alkohol leicht löslich [50]. Es ist ein Reduktionsmittel mit krebserzeugenden Eigenschaften die bereits in Tierversuchen nachgewiesen werden konnten. Es ist als Gesundheitsschädlich und Umweltgefährdend eingestuft [51]. Trotzdem darf das zweiwertige Phenol laut neuster Verordnung [52] in bestimmten Höchstkonzentrationen in Haarfärbemitteln, als Riechstoff in Parfums, in Cremes (als Bleichmittel für die Haut) etc. beigefügt werden. Auch in der chinesischen Volksmedizin hat es als Seerosengewächs *Nelumbo nucifera* Bedeutung [53].

Lapis infernalis ist die lateinische Bezeichnung für Silbernitrat. Es ist trivial als Höllenstein bekannt und in der Medizin findet man es unter den Namen Argentum nitricum. Silbernitrat ist ein Salz der Salpetersäure. Es bildet geruchs- und farblose tafelförmige Kristalle und ist in Wasser leicht löslich, während es in Ethanol schwere Löslichkeit zeigt.

Es findet z.B. Verwendung als Nachweisen von Proteinen, in der Histologie zur Färbung von Gewebeschnitten, in der Fotografie zur Wiedergabe der Silberhalogenide und in der Medizin findet es Anwendung als Antiseptikum oder als Ätzmittel, aber auch in der Homöopathie wird es z.B. gegen chronische Rachen- und Kehlkopfentzündungen, Diarrhö, geistige Ermüdung und Nervensystemstörungen mit Lähmung und Krämpfen der Gliedmaßen eingesetzt [54] [55].

Vorbereitende Maßnahmen und Versuchsdurchführung

Als vorbereitende Maßnahmen zur Markierung werden folgende Schritte durchgeführt:

Es wird eine kleine Menge Silbernitrat als fein gemahlenes Pulver auf einem Objektträger gestreut und eine Hydrochinonlösung mit maximaler Löslichkeit angesetzt. Hierzu werden 1,5 ml 0,1M Phosphatpuffer mit 100 mg Hydrochinon vermengt. Hydrochinon ist ein Reduktionsmittel, das Silbernitrat reduziert und damit sichtbar macht. Die angesetzte Hydrochinonlösung wird in drei Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt:

Im ersten Röhrchen kann der Knorpelstreifen für circa fünf Sekunden eingelegt werden, um ihn für den nächsten Schritt reaktionsfreundlicher zu machen.

Im zweiten Röhrchen kann eine mikrofeine Nadel (die der darauf folgenden Markierung dient) in die Hydrochinonlösung eingetaucht und befeuchtet werden. Als sehr komfortabel in der Handhabung erweist sich dabei das Auftragen eines kleinen Tropfens Hydrochinonlösung aus dem Röhrchen auf einen Objektträger.

Im dritten Röhrchen soll der Streifen nach der Markierung wieder in die Lösung eingetaucht und geschwenkt werden, um die Silbernitratpartikel am Knorpel nochmals zu reduzieren und den Überschuss an Silbernitrat zu entfernen.

Bei der Versuchsdurchführung werden hierbei verschiedene zeitliche Abfolgen, bezogen auf die Anwendung mit der Hydrochinonlösung und dem Silbernitrat, getestet:

i. Im ersten Anlauf wird der Knorpel in das erste Röhrchen kurz eingetaucht. Anschließend wird er herausgenommen und vorsichtig trocken getupft. Das Trocknen dient dem Erzielen einer sauberen, nicht verschwommenen Markierung. Die Markierung erfolgt dann durch eine mikrofeine Nadel die vorher ins Röhrchen zwei und im Anschluss in fein gemahlenes Silbernitratpulver getunkt wird.

Bei diesem Vorgang wird festgestellt, dass sich an der Nadelspitze ein dicker Klumpen Silbernitrat anheftet. Um einen kleinen, feinen, gesättigten Tropfen Silbernitrat an der Nadel zu erhalten wird die Nadel abwechselnd in das Silbernitratpulver und in das Hydrochinon (auf Objektträger) eingetaucht, bis die

Nadelspitze gleichmäßig benetzt ist. Die Markierungsabstände und die Häufigkeit der vorkommenden Markierungen werden willkürlich gewählt.

Am Ende wird der Knorpel kurz im dritten Röhrchen geschwenkt, erneut reduziert und vom Überschuss an Silbernitrat befreit (s.o.).

ii. Im zweiten Anlauf wird der Knorpel direkt markiert, ohne ihn vorher in die Hydrochinonlösung des ersten Eppendorf-Röhrchens einzulegen. Die Markierung erfolgt wie unter Punkt i. beschrieben.

Es gibt nun zwei Verfahrensmöglichkeiten die Markierung durchzuführen.

Die erste Möglichkeit besteht darin den Knorpel mit der benetzten Nadelspitze zu penetrieren und bei der zweiten Verfahrensweise wird die befeuchtete Nadel mit ihrer Längsfläche senkrecht auf die 600 µm breite Knorpelfläche mit etwas Druck abgestreift. Um die Markierung vornehmen zu können, wird die Nadel vorher in die wie unter Abschnitt 4.3 beschriebene Haltevorrichtung eingespannt.

Der Vorgang für die nächste Markierung wird nach dem gleichen Verfahren wiederholt, wobei es sich als vorteilhaft erweist die Nadel vorher durch das Abwischen mit einem Tuch zu reinigen.

Bei den beschriebenen Abläufen ist darauf zu achten, dass sich der Knorpel nicht länger als erforderlich in der Haltevorrichtung befindet und unter Zuhilfenahme einer weiteren Person nach den Markierungen immer wieder durch eine PBS Lösung befeuchtet wird.

4.4.2 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung einer Zuckerlösung und Kaliumpermanganat

Grundlegendes über Natriumthiosulfat Pentahydrat und Kaliumpermanganat

Natriumthiosulfat Pentahydrat ist auch unter dem Namen Fixiersalz bekannt, da es unter anderem zur Fixierung bei Filmentwicklungen hergenommen wird. Es ist ein geruchs- und farbloses Pulver, welches keiner Gefahrenstoffkennzeichnung unterliegt. Es ist gut in Wasser, jedoch nicht gut in Ethanol löslich. Natriumthiosulfat

ist ein Reduktionsmittel und zeigt eine leichte Reaktion mit Kaliumpermanganat, einem Oxidationsmittel [56].

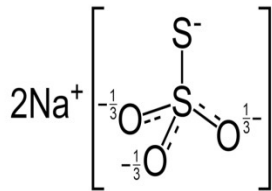


Abbildung 7: Natriumthiosulfat Pentahydrat

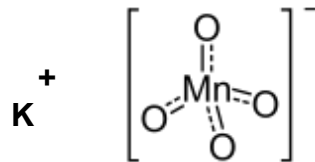


Abbildung 8: Kaliumpermanganat

Kaliumpermanganat besteht aus dunkelvioletten Kristallen mit metallischem Glanz. Dieses Oxidationsmittel ist nur mäßig in Wasser löslich. Laut Gefahrenstoffkennzeichnung ist es brandfördernd, gesundheitsschädlich und umweltgefährlich. Es findet Verwendung als Desinfektionsmittel, Deodorant, Algizid, zum Bleichen von Naturschwämmen und dient ferner in der Technik der Fotografie dem Nachweis von Natriumthiosulfat Pentahydrat [57].

Vorbereitende Maßnahmen und Versuchsdurchführung

Als vorbereitende Maßnahmen zur Markierung werden folgende Schritte durchgeführt:

Es werden 25 ml einer 0,1M Phosphatpufferlösung mit 1 g Natriumthiosulfat Pentahydrat angesetzt. Zwei leere Petrischalen werden mit der angesetzten Lösung halbvoll aufgefüllt.

Bei der Versuchsdurchführung wird der Knorpelstreifen fünf Minuten lang in der ersten vorbereiteten Petrischale eingelegt. Danach wird der Knorpel mit einer mit Kaliumpermanganat beschichteten Nadel markiert. Auf einem Objektträger wird ein Tropfen Fixiersalz mit dem feinen Kaliumpermanganatpulver gesättigt, um somit das Kaliumpermanganat so gezielt wie nur möglich mit einer mikrofeinen Nadel aufnehmen und applizieren zu können. Unter Zuhilfenahme der Haltevorrichtung wird das Kaliumpermanganat auf die Knorpeloberfläche bzw. in den Knorpel appliziert.

Dabei wird versucht wie unter Abschnitt 4.4.1 beschrieben, punktuelle bzw. lineare Kaliumpermanganatmarkierungen nebeneinander zu legen. Die Markierungsabstände und die Häufigkeit der vorkommenden Markierungen werden willkürlich gewählt.

Anschließend wird das überschüssige Kaliumpermanganat in der zweiten vorbereiteten Petrischale durch Schwenken abgewaschen.

4.4.3 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung von einer in Tusche getunkten Rasierklinge

Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung wird etwas schwarze Tusche auf einem Objektträger appliziert. Eine einzelne Rasierklinge oder eine in einem bestimmten Abstand aneinander gereihte Rasierklingenkonstruktion wird in die Tusche eingetaucht. Danach wird/werden die Klinge/Klingen kurz auf einer glatten Fläche abgeklopft und anschließend von oben her an den Plexiglasrand der Haltekonstruktion angelegt (Position 2 der Haltevorrichtung) und durch den etwas hervorstehenden Knorpelabschnitt (circa 200 µm von dem insgesamt 2,5 mm breiten Knorpel) geführt. Hierdurch lassen sich saubere, gleichmäßige und präzise Schnitte durchführen.

Hypothetischer Hintergrund: Tusche besitzt Pigmente. Diese verbleiben während des Schneidevorganges in den Schnittstellen zurück. Die Markierungen werden auf der 600 µm breiten Fläche durchgeführt. Die Markierungsabstände und die Häufigkeit der vorkommenden Markierungen werden willkürlich gewählt.

Damit der Knorpel nicht austrocknet wird dieser zwischendurch immer wieder durch das Aufbringen einiger Tropfen einer Phosphatpufferlösung feucht gehalten.

4.4.4 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung von verschiedenen in Tusche getunkten Nadeln

Versuchsdurchführung

Bei dieser Markierungstechnik wird ein großer Tropfen schwarzer Tusche auf einen Objektträger appliziert. Der zu markierende Knorpelstreifen wird feucht in die Haltevorrichtung eingelegt und zwischendurch immer wieder mit Phosphatpuffer beträufelt, um diesen feucht zu halten. Es wird die Position 1 der Vorrichtung gewählt (siehe Abschnitt 4.3). Die Spitze der Nadel wird in die Tusche eingetaucht, so dass ein kleiner Tropfen an der Nadelspitze anhaftet. Im nächsten Schritt wird die mit Tusche benetzte Nadel in den Knorpel gestochen, so dass das Ergebnis aus einer punktförmigen Läsion besteht, in welcher die Pigmente verbleiben. Die Markierungsabstände werden willkürlich gewählt und auf die 600 µm breiten Fläche aufgetragen. In dem Bereich des geteilten Knorpels (zwei x 300 µm) wird ebenfalls versucht mit der Nadel eine Markierung zu setzen. Des Weiteren wird die Punktierung auf den jeweils 300 µm breiten Flächen so angebracht, dass die Markierungen möglichst exakt übereinander liegen. Der Versuch wird zum einen mit einer handelsüblichen feinen Nähnadel und darauf mit einer Mikronadel getestet bzw. durchgeführt.

Die Markierungen durch die mikrofeine Nadel werden einem Live/Dead Test unterzogen.

4.4.5 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung eines Lasers

Technische Daten

Die Markierungen werden in der Augenklinik des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Der verwendete Lasertyp ist ein frequenzverdoppelter diodengepumpter Festkörperlaser, der seine Strahlen kontinuierlich (cw = continuous wave, Dauerstrichlaser) abgibt. Er besitzt eine Wellenlänge von 532 nm und eine Leistung

von 1,5 W an der Corona. Die Zielstrahl-Diode beträgt 635 nm bzw. Maximum 1 mW. Die Pulsdauer kann zwischen 10 ms und 2500 ms cw und der Autopuls zwischen 100 ms und 600 ms Pulspausen variiert werden. Das parafokale System bildet den Laserspot und kann zwischen 50 μm und 1000 μm eingestellt werden, wodurch das Zielgewebe scharf getroffen werden kann [58].

Beim Dauerlaser wird die Leistung (P) in Watt (W) angegeben. Die Leistung setzt sich aus der Energie pro Zeiteinheit zusammen. 1 W entspricht 1 J.

Versuchsdurchführung

Der mit Phosphatpuffer feucht gehaltene Knorpelstreifen wird bis an den Objektträger rand gelegt, so dass dieser auf der 600 μm breiten Seite bestrahlt werden kann.

Der unbehandelte Knorpelstreifen wird im ersten Durchlauf direkt bestrahlt. Da der Knorpelstreifen keine optischen Verkohlungserscheinungen zeigt, wird ein zweiter Durchlauf gestartet. In diesem zweiten Durchlauf wird er mit schwarzer opaker Tusche bestrichen.

Die Bestrahlung findet unter verschiedenen Energieintensitäten statt.

Der kleinste mögliche einzustellende Laserdurchmesser beträgt 50 μm . Der Laser hat eine Leistung von xy. Die übertragene Energie wird durch die Faktoren Zeit, Energie in Watt und Blendung (Durchmesser des Lichtstrahls) bestimmt. Das Ziel der punktuellen Verkohlung des Gewebes wird in Mikrometer bestimmt.

Im ersten Durchlauf wird der unbehandelte Knorpel durch die Faktoren Zeit (100 ms) und Blendung (50 μm) mit des Lichtstrahls und die Energieleistung von 100 mW auf 200 mW und letztendlich auf 250 mW gesteigert.

In der zweiten Testreihe wird der Knorpel mit schwarzer opaker Tusche bestrichen. Die Faktoren Zeit und Blendung werden beibehalten. Der Knorpel wird anfangs mit einer Wattzahl von 220 mW bestrahlt. Anschließend wird die Wattzahl auf 220 mW, 200 mW und schließlich auf 100 mW reduziert. Alle hierzu relevanten Parameter der Versuchsdurchführungen werden in Tabelle 1 aufgelistet.

4.4.6 Markierung der Knorpelstreifen unter Verwendung eines erhitzten Modellierinstrumentes bzw. einer erhitzten Nadel

Versuchsdurchführung

Der Knorpelstreifen wird feucht in die Position 1 der Haltevorrichtung eingelegt (siehe Abb. 5). Als erste Markierungsvariante wird, der besseren Handhabung wegen, der Knorpelstreifen mit einem Modellierinstrument markiert. Bei dem Instrument handelt es sich dabei um ein oval förmiges, plattes Werkzeug aus Metall, welches zum Ende hin spitz verläuft und an einem Griff gehalten wird. Die Maße der Werkzeugspitze betragen circa 8 mm x 1 mm x 0,5 mm. Vom Schaft bis zur Spitze ist es an seiner Ober- und Unterseite wie ein stumpfes Messer konzipiert (Abb. 9). Es speichert gut die Wärme und verkohlt nicht.

Das Modellierinstrument wird in die Flamme des Bunsenbrenners gehalten, bis das Instrument leicht aufglüht. Dann wird es mit einem Schwenker aus dem Handgelenk kurz abgekühlt, bevor es an die 600 µm breite Seite des Knorpelstreifens angelegt wird. Nach einem Erhitzungsvorgang des Instrumentes sind mehrere Markierungen hintereinander möglich, bevor das Instrument erneut in der Flamme erhitzt werden muss.

Es werden verschiedene Markierungsvarianten getestet:

1. Das Instrument wird mit der Spitze an die Knorpeloberfläche gehalten.
2. Das Instrument wird mit der „Messerkante“ an die Knorpeloberfläche gehalten (Abb. 9).
3. Das Instrument wird mit der „Messerkante“ an der Knorpeloberfläche abgestrichen. Es werden bei dem Instrument (nach einigen Markierungsversuchen) frei ausgewählte Abstände von circa 2 mm als sinnvoll eingestuft und gewählt (Abb. 10). Bei der Variante mit der Instrumentenspitze wird neben den 2 mm Abständen im 600 µm breiten Bereich, je ein Markierungspunkt auf den 300 µm großen Flächen gesetzt.

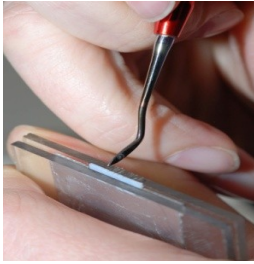


Abbildung 9: Markierung der Knorpelprobe durch ein Modellierinstrument.



Abbildung 10: Fertig markierter Knorpelstreifen.

Die zweite Markierungsvariante wird mit einer erhitzten Nadel durchgeführt. Sie markiert ebenfalls die 600 µm breite Oberfläche des Knorpelstreifens.

Aufgrund der Starken Hitze wird die Nadel mit Hilfe einer Zange gehalten. Dies scheitert. Die Hitzeentwicklung der Nadel ist zu groß. Beim nächsten Versuch wird die Nadel anstelle des Bunsenbrenners mit einem handelsüblichen Feuerzeug erhitzt. Die Nadel wird so lange in das Hitzezentrum der Flamme gehalten werden bis diese aufglüht. Die Markierung muss schnell erfolgen und der Vorgang wird nach jeder Markierung wiederholt.

Es werden auch hier verschiedene Markierungsvarianten getestet:

4. Die Nadel wird mit ihrer Spitze an die Knorpeloberfläche gehalten.
5. Die Nadel wird mit ihrer Längsfläche an die Knorpeloberfläche gehalten.
6. Die Nadel wird mit der Längsfläche an der Knorpeloberfläche abgestrichen.

Die Markierungsabstände werden frei gewählt. Sie betragen anfangs circa 2 mm. Durch die feinen Brennpunkte können und werden auch Markierungen vorgenommen, die einen kleineren Abstand (z.B. 0,6 mm bis 1 mm) aufweisen. Auch hier markiert die heiße Nadelspitze die jeweils 300 µm breiten Flächen.

Die durch Hitze erzeugten Markierungen werden einem Live /Dead Test unterzogen. Es werden ungepeelte und gepeelte Proben untersucht.

4.5 Live/Dead ® Viability/Cytotoxicity Assay Kit (L-3224)

4.5.1 Informationsbeschreibung zum Live/Dead Kit (23s)

Das Live/Dead Kit wurde für eukaryontische Zellen entwickelt. Mit dem Kit kann der Benutzer die Anzahl lebender und abgestorbener Zellen gleichzeitig feststellen, ohne die zu untersuchenden Zellen zu beschädigen oder gar abzutöten.

Der Hersteller dieses Produktes verspricht im Vergleich zu anderen Herstellern einen sicheren, schnellen, sensitiven und kostengünstigen Farbindikator für zytotoxische Ergebnisse.

Die Farbstoffindikatoren die hierzu zum Einsatz kommen sind „Calcein AM“ und „Ethidiumbromid homodimer“ (EthD-1).

Die Funktionsweise des Live/Dead Kit's wird wie folgt beschrieben: Lebende Zellen sind durch ihre Esteraseaktivität gekennzeichnet. Calcein AM kann die Zellmembran lebender Zellen durchdringen und wird dort im Zytoplasma einbehalten. Unter einem (in diesem Versuch verwendeten) Fluoreszenzmikroskop leuchtet das Calcein bei ex/en ~495nm/~515nm, wie in der Anwendung beschrieben, intensiv und eintönig grün.

Abgestorbene Zellen hingegen werden durch den Farbindikator EthD-1, unter dem Fluoreszenzmikroskop, bei einer Wellenlänge ex/en ~495nm/~635nm, rot sichtbar. Das Prinzip hier: EthD-1 durchdringt nur beschädigte Zellmembranen und bindet sich an die Nukleinsäure.

Unter dem Mikroskop kann somit die Ausdehnung avitaler Zellen dargestellt werden und die im Durchschnitt traumatisierte Fläche, bezogen auf ihr Volumen, berechnet werden. Anschließend können die Läsionsausdehnungen der einzelnen Methoden miteinander verglichen werden.

4.5.2 Versuchsvorbereitung und Versuchsdurchführung

Zum Ansetzen der Indikatorlösung wird die Live/Dead Stammlösung aus dem Gefrierschrank entnommen und auf Raumtemperatur erwärmt. Es werden 20 µL der

mitgelieferten 2 mM EthD-1-Stammlösung (Komponente B) zu 10 ml steriler PBS Lösung zugegeben und gut durchgemischt. Es entsteht eine etwa 4 μ M EthD-1-Lösung.

Nun werden 5 μ L der gelieferten 4 mM Calcein AM Stammlösung (Komponente A) auf die 10 ml EthD-1-Lösung zugegeben. Nach diesem Schritt wird die neu entstandene Lösung ebenfalls gründlich vermischt. Die Endkonzentration beträgt DMSO $\leq 0,1\%$; dies ist laut Hersteller ein Niveau, welches im Allgemeinen für die meisten Zellen unschädlich ist. Die Knorpelstreifen werden in eine Petrischale mit circa 2 μ M Calcein AM und 4 μ M EthD-1 Lösung für circa 30 Minuten eingelegt. Die Indikatoren werden von den jeweiligen vitalen bzw. avitalen Zellen aufgenommen. Danach wird der zu untersuchende Knorpelstreifen kurz in einer zweiten Petrischale mit reiner PBS Lösung ausgewaschen. Anschließend wird der Knorpelstreifen auf einem Objektträger platziert. Um ein Austrocknen der Knorpelstreifen auf dem Objektträger zu vermeiden werden sie mit PBS Lösung feucht gehalten.

Untersucht werden nur die in engerer Auswahl stehenden Markierungsmethoden. Dies sind die Versuche mit der Tusche in Kombination mit einer Nadel, mit der Tusche in Kombination mit einer Rasierklinge, mit dem Modellierinstrument und mit der erhitzten Nadel.

4.6 Technische Daten zum Peelvorgang

In diversen Vorversuchen wird das „Peelen“ von Knorpel dazu verwendet die Stabilität kultivierter Knorpelblöcke anhand computergestützter Zeitstandversuche zu ermitteln. Dabei ist es unbedeutend ob es sich um ein T-peel Versuch, ein Push-out-Versuch oder ein Single-Lap-Versuch handelt. Es werden die Kraft, die Zeit und der Weg festgehalten und in ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm übertragen (Abb. 11). Die Kraft wird durch eine Kraftmessdose gemessen.

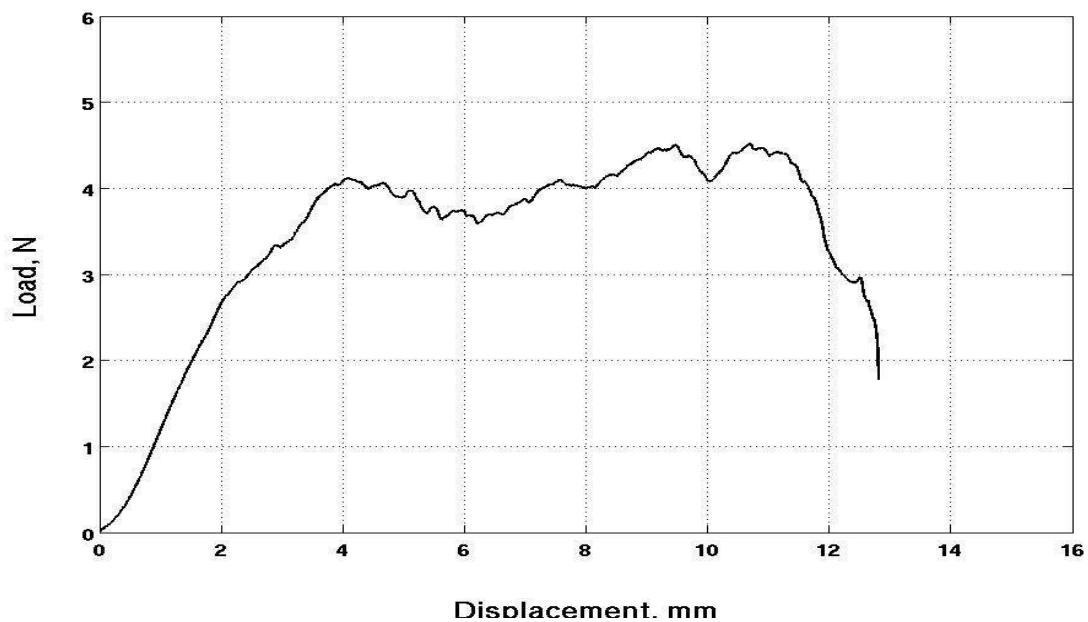


Abbildung 11: Charakteristisches Kraft-Weg-Diagramm nach einem T-peel Versuch eines Knorpelblocks (Quelle: Biomechanik_Hammer_Englert)

Die markierten Knorpelstreifen werden an der von der Fachhochschule Regensburg im Jahr 2006 weiterentwickelten uniaxialen Einspannvorrichtung gepeelt. Diese Einspannvorrichtung wird in eine Universalprüfmaschine eingesetzt.

Die neueste Modifikation des Prüfstandes besteht in der Veränderung der Haltevorrichtung durch ein Hebelsystem mit integrierter Zugfeder. Hierdurch gleiten die Knorpelproben nicht mehr so leicht aus der Halterung. Dieses Verfahren wird am Anfang dieser Testreihe zusätzlich durch ein eingesetztes Schleifpapier verfeinert.

Das Peeling in dieser Testreihe soll veranschaulichen, ob die Markierungen einen Einfluss auf das Peelverhalten haben.

Der Knorpel wird jeweils an seinen beiden 300 µm dicken Enden fixiert. Anschließend wird das neue, mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Becken so platziert, dass sich der Prüfkörper während des Peelvorgangs vollkommen in Flüssigkeit befindet. Es wird darauf geachtet, dass die Knorpelenden möglichst genau in die Vorrichtung platzieren werden. Die Knorpelproben werden komplett bzw. bis zum Versagen gepeelt.

Es handelt sich bei den Versuchsreihen um statische Testreihen. Die

Distaktionsgeschwindigkeit beträgt 15 mm/min. Alle weiteren aufgeführten Parameter werden aus den Vorversuchen übernommen. Die resultierende Kraft wird mit einer 100 N Lastmessdose aufgezeichnet. Das begrenzende Gewichtsmaß beträgt dabei 5 N. Die Genauigkeit beträgt dabei 0,01 N (die Genauigkeit des Wegaufnehmers 0,01 mm).

Über eine Datenschnittstelle des Typs PCI-MIO-16E-4 (National Instruments, München, Germany) wird die Beziehung zwischen Kraft und Weg digitalisiert und wie oben beschrieben als Diagramm wiedergegeben. Wie bei den vorherigen Testreihen beträgt die Wegsignalgenauigkeit 0,06 mm und die des Lastsignals 0,08 N.

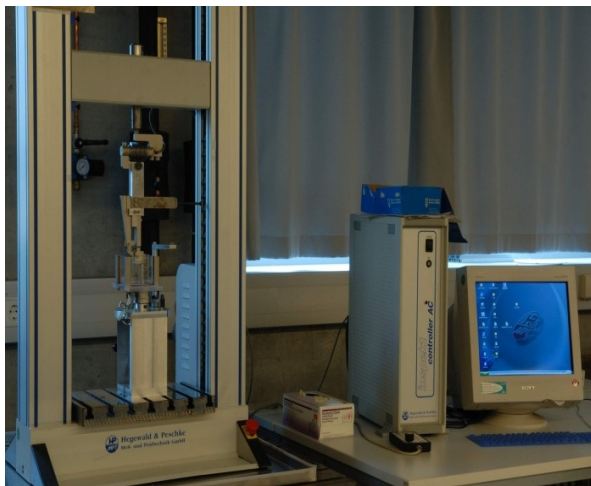


Abbildung 12: Station der Prüfstandvorrichtung.

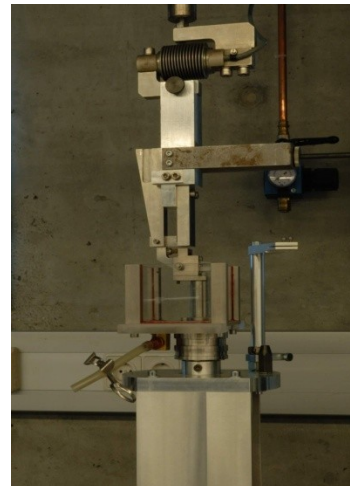


Abbildung 13: Überarbeiteter Prüfstand mit neuem Becken und neuer Haltevorrichtung.

Nach der Auffindung der geeignetsten Markierungsmethode wird die optische Verformung während des Peelvorganges gemessen. Die Messung erfolgt durch eine spezielle Kamera des Typs „Aramis“ der Firma GOM. Diese ist technisch so konzipiert, dass sie pro Sekunde zwei Bilder aufnehmen kann. Dadurch ergeben sich etwa 120 Bilder bei einer Durchschnittlichen Peelingdauer (pro Knorpelstreifen) von etwa einer Minute.

Es kann die Dehnung zwischen den jeweiligen Markierungen und damit die gesamte Dehnung des Knorpels berechnet werden.

5 Ergebnisse

Zwischen den frischen und den 24 Stunden alten Knorpelstreifen gibt es hinsichtlich der Markierungsergebnisse keine signifikanten Unterschiede im Markierungsergebnis, so dass die ersten Übungsmarkierungen auch an den älteren Knorpelstreifen bedenkenlos durchgeführt werden können. Für den Live/Dead Versuch und für zukünftige Kultivierungsversuche sind allerdings frischen Kniegelenke notwendig.

5.1 Hydrochinon und Silbernitrat

Die Markierungspunkte durch Hydrochinon und Silbernitrat sind gut sichtbar und nicht abwischbar. Der komplette Knorpel färbt sich beim Einlegen in Röhrchen Eins und Drei durch die Aufnahme des Hydrochinons gelblich. Die erste unter 4.4.1 beschriebene Abfolge zeigt eine lange Durchführungsdauer und ungenaue Markierungspunkte. Die erste Methode zeichnet sich durch ihre schnellere Abfolge und genauen Markierungspunkten aus. Allgemein wird das Vorhaben durch die schlechte Dosierungsmöglichkeit des Silbernitrates auf der Nadel kompliziert, da dies viel manueller Geschicklichkeit bedarf. Das Abtupfen des Knorpels führt zusätzlich zum Austrocknen des Knorpels. Der in PBS-Lösung gelagerte Knorpel zeigt nach wenigen Tagen einen Elastizitätsverlust und wirkt steif.

Diese Markierung wird daher als nicht geeignet gesehen und der Knorpelstreifen daher nicht weiter auf Dehnbarkeit und Vitalität untersucht.

5.2 Kaliumpermanganat und Natriumthiosulfat Pentahydrat

Die Markierung der Knorpeloberfläche durch das Aufmalen des Kaliumpermanganats liefert keine akzeptablen Ergebnisse, da sich das Kaliumpermanganat sofort abwischen lässt. Beim Versuch das Kaliumpermanganat mit der mikrofeinen Nadel in den Knorpel zu applizieren, lässt sich das Kaliumpermanganat nicht immer beim

Einstechen in den Knorpel abstreifen. Zudem wäscht sich das Kaliumpermanganat bei längerem Verweilen des Knorpelstreifens in einer Flüssigkeit (z.B. der Phosphatlösung beim Peelen) heraus. Daher wird diese Markierung als nicht geeignet gesehen und der Knorpelstreifen wird nicht weiter auf Dehnbarkeit und Vitalität untersucht.

5.3 Tusche

Die Markierungsmethode durch das Applizieren der Tusche in den Knorpel zeigt trotz einigen Nachteilen akzeptable Ergebnisse.

Die Punktion durch die Nadel ergibt im Durchmesser kleine, jedoch sichtbare Markierungen. Die Anordnungen der Punkte nebeneinander, verteilt auf die 12 mm lange und 600 µm breite Fläche, lassen sich gut durchführen. Der Versuch zwei gegenüberliegende Markierungen auf den jeweils 300 µm breiten Flächen zu setzen, gestaltet sich allerdings als sehr schwierig, da der Knorpel immer wieder mal ausweicht.

Während des Markierungsprozesses kann der Knorpel gut feucht gehalten werden und die im Knorpel verbleibende Tusche wäscht sich, auch bei länger feuchter Einlagerung (z.B. in PBS-Lösung), nicht heraus. Die Eindringtiefe der Nadel kann manuell nicht exakt bestimmt werden. Die Peelingergebnisse zeigen jedoch keinen wesentlichen Unterschied zu den Nullproben, so dass festgehalten werden kann, dass bei dem Peelingvorgang mit der bevorzugten Methode - der Nadelpunktion in Kombination mit der Tusche - fünf Proben komplett bis zum Ende mittig durchgerissen sind und sieben der Proben schon frühzeitig versagten (Tab. 1). Setzt man das Verhältnis dieser markierten Knorpelstreifen in einen Vergleich mit Knorpelstreifen aus einer Nullprobe (Tab. 2), so ist kein allzu signifikanter Unterschied ersichtlich. Denn bei den Nullproben zeigt sich ein Verhältnis von neun durchgehend gepeelten zu neun frühzeitig ausgerissenen Proben.

Probe:	durchgehend gepeelt	frühzeitig ausgerissen
Probe 1		x
Probe 2		x
Probe 3	x	
Probe 4		x
Probe 5	x	
Probe 6	x	
Probe 7	x	
Probe 8		x
Probe 9	x	
Probe 10		x
Probe 11		x
Probe 12		x
Ergebnis:	5	7

Tabelle 1: Peelingproben von mit Tusche und Nadel markierten Knorpelstreifen. Das Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen durchgehend gepeelten und frühzeitig ausgerissenen Proben.

Probe:	durchgehend gepeelt	frühzeitig ausgerissen
Probe 1	x	
Probe 2		x
Probe 3	x	
Probe 4		x
Probe 5		x
Probe 6		x
Probe 7		x
Probe 8	x	
Probe 9		x
Probe 10	x	
Probe 11	x	
Probe 12	x	
Probe 13	x	
Probe 14		x
Probe 15	x	
Probe 16	x	
Probe 17		x
Probe 18		x
Ergebnis:	9	9

Tabelle 2: Gepeelte Nullproben – unmarkiert. Das Ergebnis zeigt ein ausgewogenes Verhältnis zwischen durchgehend gepeelten und frühzeitig ausgerissenen Proben.

Während der Bildaufzeichnung des Peelvorgangs durch die GOM-Kamera kann festgestellt werden, dass zum Ende des Peelings nur noch die untere Knorpelhälfte im Aufzeichnungsbereich verbleibt, während die obere Hälfte dem Scheerverlauf nach kranial herausgezogen wird. Dies liegt daran, dass die Einstellschärfe und der Abstand zum relativ großen Objekt (Knorpellänge) nicht überein zu bringen sind. Je nachdem wo der Riss entlang verläuft befindet sich die Nadelpunktionsmarkierung demnach „im“ oder im ungünstigsten Fall „außerhalb“ des Aufzeichnungsbereich (Abb. 14).

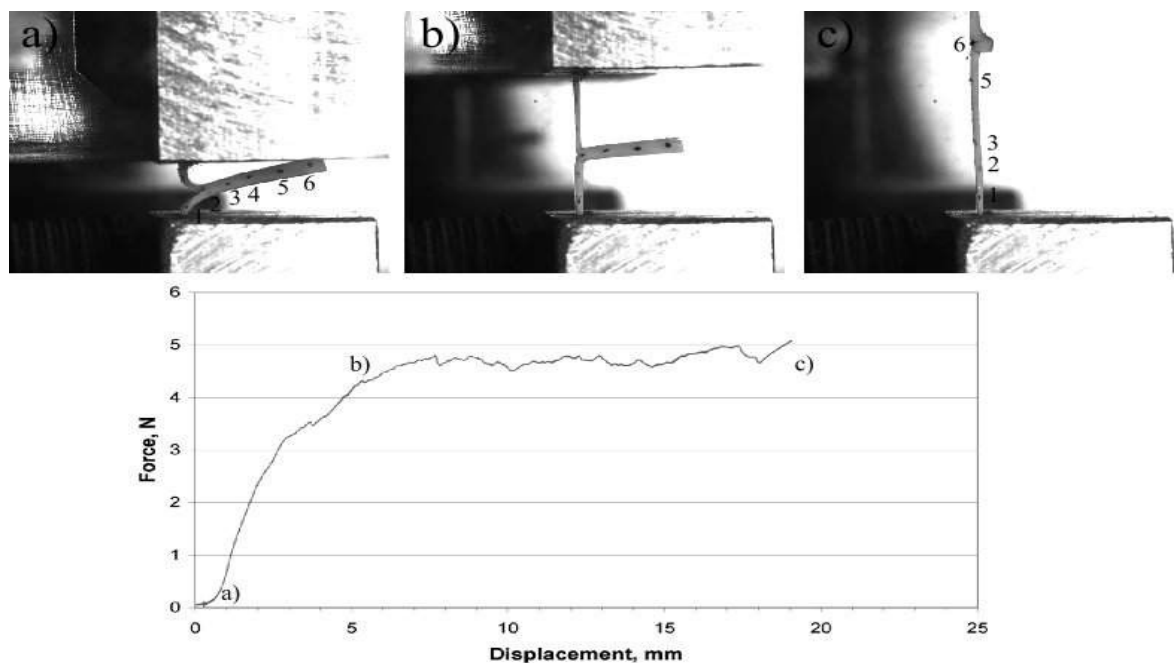


Abbildung 14: Bildabfolge aufgenommen durch „Aramis“, sowie die ausgewertete Spannungs-Dehnungskurve.

a) Probe im Ruhezustand; b) Anfang des Peelvorganges; c) Peelvorgang kurz vor dem Ende [50].

Live/Dead Versuche zeigen eine deutliche Anzahl an vital gebliebenen Zellen im Vergleich zu „gebrannten Markierungen“. Die meisten am Lichtmikroskop untersuchten Punktierungen zeigten eine nur unwesentlich vermehrte Anzahl an

avitalen Zellen um die Einstichstelle. Der traumatisierte Bereich beträgt etwa 280 μm in der Tiefe und 200 μm um die Einstichstelle herum (Abb. 15a). Andere Einstichstellen zeigten allerdings nicht mehr avitale Zellen als in einem anderem nicht traumatisierten Knorpelareal (Abb. 15b).

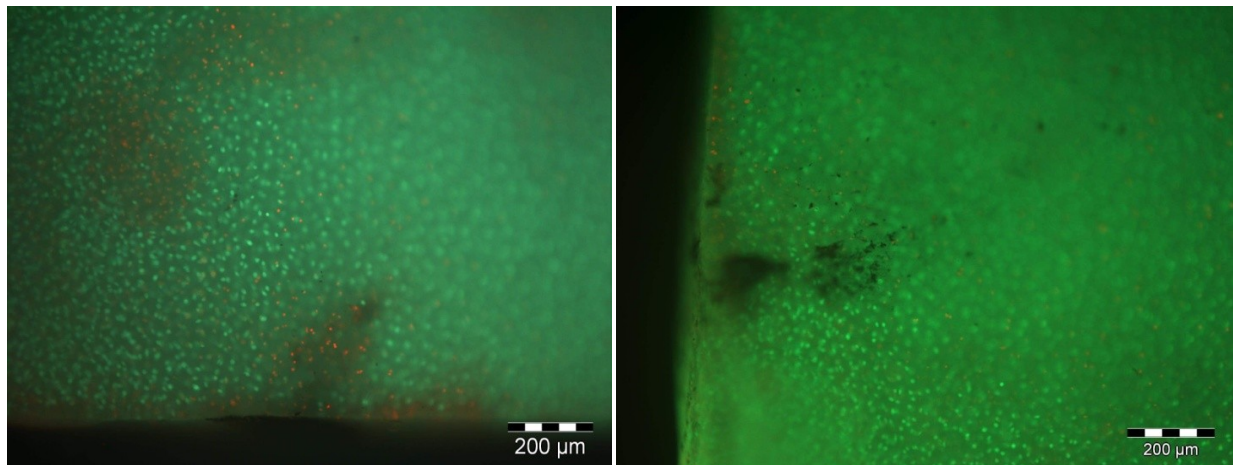


Abbildung 15: Durch Live/Dead gefärbter Knorpelstreifen. Zu sehen ist die Markierung mit schwarzen Pigmenten durch die Punktion einer Nadel. Grün gefärbte Zellen zeigen vitale Zellen. Rot gefärbte Zellen zeigen avitale Zellen.

a) vermehrte avitale Zellen um die Einstichstelle

b) kaum avitale Zellen um die Einstichstelle

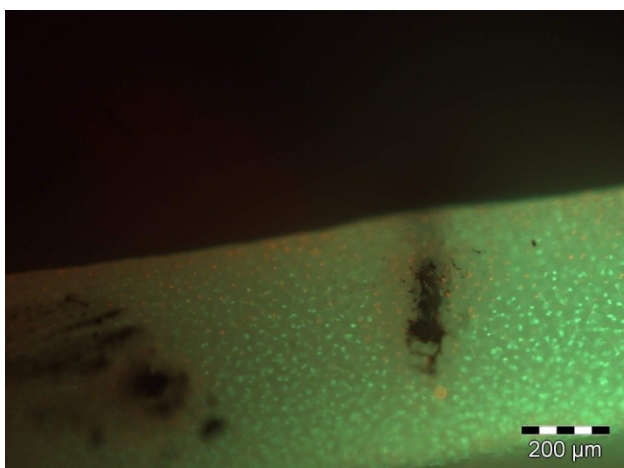


Abbildung 16: Live/Dead gefärbter Knorpelstreifen. Markierung anhand schwarzer Pigmente unter Verwendung einer Rasierklinge. Vermehrte avitale Zellen um die Schnittstelle herum.

Bei der Rasierklingenmethode findet man im Vergleich zur Nadelpunktion mehr avitale Zellen, da die zugefügte Gewebetraumatisierung eine größere Fläche aufweist. Die Markierung welche so breit wie eine Rasierklinge ist, verläuft längs über die 600 μm . Sie ist ebenfalls eindeutig als schwarze lineare Markierung abzugrenzen. Der traumatisierte Bereich umfasst somit eine Größe von etwa 200 μm Breite, 600 μm Länge und etwa 350 μm bis 400 μm Tiefe (Abb. 16).

Beim Ansetzen der Rasierklinge weicht der Knorpel teilweise etwas aus. Die Klinge stumpft schnell ab, da sie unweigerlich den Plexiglasrand tuschiert.

Es werden aufgrund der wenig zur Verfügung stehenden Proben nur sechs markierte Knorpelstreifen gepeelt, davon führten drei zu positiven Ergebnissen.

5.4 Laser

Im ersten Durchlauf wird der unbehandelte Knorpelstreifen bestrahlt. Beim Bestrahlen des Knorpels in diesem Versuch zeigt sich nicht bei jeder Energieabsonderung eine optische Markierung in Form einer dunklen Gewebeverkohlung, auch der Versuch andere Areale zu Lasern ergibt keine kontrollierbare und reproduzierbare Ergebnisse. Der Versuch die Energieintensität zu ändern (Tab. 3) scheitert ebenfalls.

Probe	Laserspot in μm	Zeit (t) in ms (Autopuls)	Energie(E) in mW	Ergebnis
ohne Tusche	50	100	100	-
ohne Tusche	50	100	200	-
ohne Tusche	50	100	250	-
mit Tusche	50	100	250	sehr große und tief reichende Läsion
mit Tusche	50	100	220	sehr große und tiefe Läsion
mit Tusche	50	100	200	große und tiefe Läsion
mit Tusche	50	100	100	sichtbare kleine Läsion

Tabelle 3: Laserstrahleinstellungen und Ergebnisse an Knorpelstreifen ohne und mit Tusche.

Wird der Knorpelstreifen jedoch mit schwarzer opaker Tusche bestrichen, erkennt man eine Markierungsläsion an der Knorpeloberfläche. Die schwarzen Pigmentpartikel der Tusche die an der Knorpeloberfläche haften, wenn auch unregelmäßig, scheint der Laserstrahl zu erfassen und beim Bestrahlen entsteht eine Markierung in Form einer sichtbaren kleinen punktuellen Brandmarkierung (Abb. 17). Gestartet wird mit der zuletzt eingestellten Energieleistung von 250 mW. Das Ergebnis sind sehr große Läsionen die im Durchschnitt etwa 300 μm x 540 μm beträgt. Die Energie wird schrittweise bis auf 100 mW gesenkt, so dass die kleinstmögliche Brandmarkierung von Durchschnittlich etwa 200 μm Breite, 400 μm Länge und 70 μm Tiefe entsteht (Abb. 17-18).

Die Brandmarkierungen fallen somit in Durchmesser und in der Tiefe je nach Energiewert unterschiedlich groß aus.

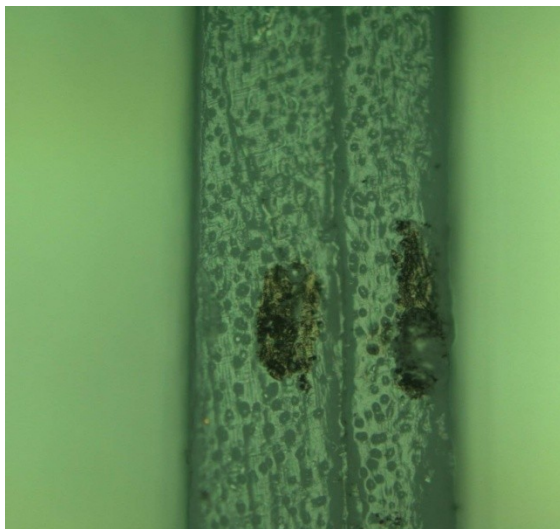


Abbildung 17: Frontalansicht: Laserpunktmarkierung auf je einer der auf 150 μm geteilten Fläche.

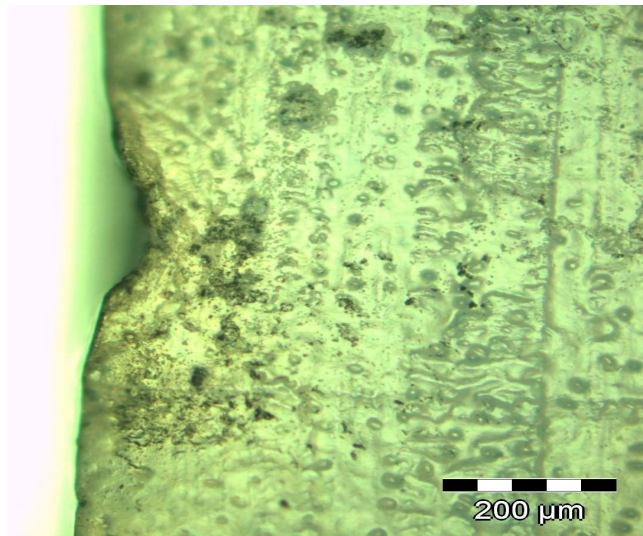


Abbildung 18: Seitenansicht: Lasermarkierungstiefe die in die 2,5 mm große Knorpelfläche reicht.

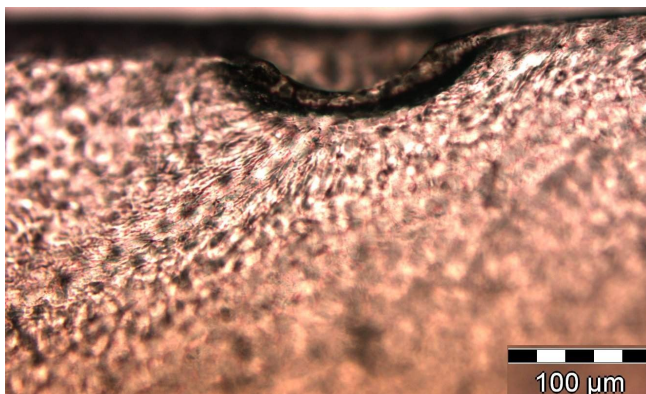


Abbildung 19: Deutlich sichtbare Traumatisierung auch des angrenzenden Areals durch den Laser.

5.5 Erhitztes Modellierinstrument und erhitzte Nadel

Die Ergebnisse werden in Tabelle 4 zusammengefasst und anhand von Noten bewertet.

	Hitzequelle	Sichtbarkeit	Markierungsanordnung	Traumatisierung	Handhabung (Anwenderfreundlich, Testdauer...)	Fixierung	Live/Dead Test
Das Instrument wird mit der Spitze an die Knorpeloberfläche gehalten	Bunsenbrenner	gut	befriedigend-mangelhaft	punktuell, Eindringtiefe unkontrollierbar	befriedigend	befriedigend	mangelhaft
Das Instrument wird mit der „Messerkante“ an die Knorpeloberfläche gehalten	Bunsenbrenner	sehr gut	sehr gut	linear, Eindringtiefe kontrollierbar	gut	gut	mangelhaft
Das Instrument wird mit der „Messerkante“ an der Knorpeloberfläche abgestrichen	Bunsenbrenner	sehr gut	sehr gut	linear, Eindringtiefe kontrollierbar	gut	gut	mangelhaft
Die Nadel wird mit ihrer Spitze an die Knorpeloberfläche gehalten	Feuerzeug	mangelhaft	gut-befriedigend	punktuell, gering, Eindringtiefe unkontrollierbar	ausreichend	gut-befriedigend	/
Die Nadel wird mit ihrer Längsfläche an die Knorpeloberfläche gehalten	Feuerzeug	ausreichend	gut-befriedigend	linear, gering, Eindringtiefe kontrollierbar	befriedigend	gut-befriedigend	/
Die Nadel wird mit der Längsfläche an der Knorpeloberfläche abgestrichen	Feuerzeug	befriedigend	gut	linear, gering, Eindringtiefe kontrollierbar	befriedigend	gut-befriedigend	befriedigend
Nadel	Bunsenbrenner	mangelhaft	nicht durchführbar	nicht bewertbar	mangelhaft	nicht durchführbar/mangelhaft	/

Tabelle 4: Zusammenfassung und Bewertung der Versuchsergebnisse, welche durch ein erhitztes Instrument bzw. einer erhitzten Nadel entstanden sind.

Die Markierung durch das Modellierinstrument liefert an sich ein optisch akzeptables Ergebnis und auch die Bearbeitungsdauer verläuft recht zügig, wobei das Ergebnis zwischen den verschiedenen Testvarianten untereinander unterschiedlich ausgefallen ist.

1. Das Modellierinstrument wird mit seiner Spitze an die Knorpeloberfläche gehalten: Positiv sind der visuell sichtbare Brennfleck und der zügige Durchlauf, da die Instrumentenwärme für mehrere Markierungen an einem Knorpel ausreicht. Zu bemängeln ist der durchschnittlich große Brennfleck, die unkontrollierbare Eindringtiefe des erhitzten spitzen Instrumentes in den Knorpel und auch die Anpeilung des Knorpels erweist sich als schwierig. Die Markierung der 300 µm breiten Flächen scheitert jedoch bzw. liefert keine befriedigende Ergebnisse, da die zwei Knorpelhälften ausweichen und die Markierung - bezogen auf die zur Verfügung stehende Fläche - zu groß wird.

2. Das Modellierinstrument wird mit seiner Längsfläche an die Knorpeloberfläche gehalten:

Diese Variante kristallisiert sich (zusammen mit Variante 3), trotz linienartiger und somit großflächiger Markierung, als die Beste von allen in 4.4.6 beschriebenen Durchführungsarten heraus. Die Markierung ist sichtbar, das Instrument kann kontrolliert angesetzt werden und es sind auch hier mehrere Markierungen durch einmaliges Erhitzen möglich. Die Eindringtiefe lässt sich ebenfalls gut durch die Haltevorrichtung kontrollieren, so dass jede Markierung die gleiche Eindringtiefe besitzt.

3. Das Modellierinstrument wird mit der Längsfläche an der Knorpeloberfläche abgestrichen:

Diese Variante besitzt die gleichen Vor- und Nachteile wie die oben beschriebene Testvariante Nummer 2. Ein weiterer negativer Aspekt ist die Tatsache, dass das erhitzte Instrument durch das abstreifen am Knorpel länger Kontakt mit dem Knorpel hat.

Das Erhitzen einer Nadel mit einem Bunsenbrenner erweist sich als nicht durchführbar. Das Erhitzen einer Nadel mit einem Feuerzeug erweist sich als handlicher und durchführbar, jedoch glüht die Nadel sehr schnell aus, so dass der

zeitliche Aufwand bei allen drei Markierungsvarianten sehr groß ist, da nur eine Markierung pro Erhitzen möglich ist.

4. Die Nadel wird mit ihrer Spitze an die Knorpeloberfläche gehalten:

Bei dieser Variante ist die Traumatisierung durch die grazile Nadel am geringsten, wobei die Eindringtiefe nicht bei jedem Einstich gleichmäßig kontrolliert werden kann, der visuelle Effekt ist schlechter und die Handhabung, sowie die Fixierung gestalten sich schwieriger als bei dem Modellierinstrument. Auch ist das genaue Anbringen der Markierungspunkte an den 300 µm breiten Flächen durch die Nadel enorm schwierig bis unmöglich.

5. Die Nadel wird mit ihrer Längsfläche an die Knorpeloberfläche gehalten:

Auch bei dieser Variante ist die Traumatisierung des Knorpels geringer als bei dem Modellierinstrument. Die Eindringtiefe lässt sich besser kontrollieren als bei Variante 4. Der zeitliche Aufwand ist genauso so groß wie bei Variante 4 und 6 und auch in der Handhabung und der Fixierung gibt es kaum einen nennenswerten Unterschied.

6. Die Nadel wird mit der Längsfläche an der Knorpeloberfläche abgestrichen:

Hier zeigen sich die gleichen Vor- und Nachteile wie bei Variante 4 und 5. Der einzige Unterschied liegt im optischen Ergebnis - es fällt hier besser aus.

Der Live/Dead Versuch wird an den „Testsiegern“ der jeweiligen zwei Versuchsvarianten durchgeführt:

i. Bei der Markierung durch das Aufbringen eines erhitzten Modellierinstrumentes sind deutliche girlandenförmige rote Areale um das traumatisierte Gewebe zu erkennen (Abb. 20), die auf abgestorbene Zellen hindeuten. Die Einkerbungen durch das Instrument sind im Durchschnitt circa 300 µm bis 400 µm breit und reichen etwa 120 µm bis 160 µm in den Knorpel hinein. Die Bereiche an avitalen Zellen können etwa 40 µm am seitlichen Randbereich der Einkerbung und circa 200 µm um den Einkerbungspunkt herum betragen. Eine Läsion kann somit etwa 430 µm tief, etwa 500 µm breit und 600 µm lang sein. Der Bereich zwischen den Markierungen hat eine tote Zone von etwa 50 µm bis 120 µm die in die Tiefe reicht. Auch Zellen in entfernteren Bereichen scheinen mit betroffen zu sein, denn es lassen sich avitale Inselgruppen erkennen (Abb. 20).

ii. Die Ergebnisse des Live/Dead Versuches am Knorpelgewebe die durch eine erhitzte abgestreifte Nadel resultieren, zeigen deutlich weniger avitale Zellareale. Die Läsion bei dieser Methode besitzt eine Größe von Durchschnittlich circa 40 μm Länge und 40 μm Tiefe. Avitale Zellen ziehen sich saumförmig von Markierung zu Markierung. Der Saum hat eine Größe die im Durchschnitt zwischen 40 μm und 80 μm liegt. Trotz der geringen Läsion durch die feine Nadel zeigt sich die enorme Hitzeausbreitung der Nadel ins Knorpelinnere. Die gesamte Läsion kann somit etwa 350 μm x 350 μm x 350 μm betragen. Es finden sich hier jedoch keine avitalen Inselareale (Abb. 21).

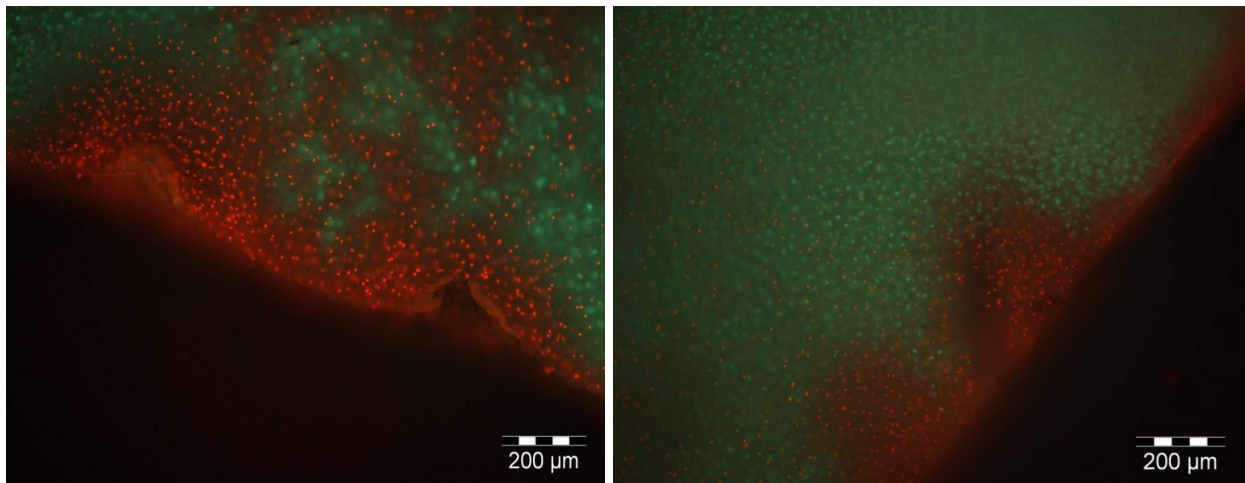


Abbildung 20: Live/Dead Test: Markierung durch erhitztes Modellierinstrument (Variante 2).

Abbildung 21: Live/Dead Test: Markierung durch erhitzte einer Nadel (Variante 3).

Beim Peelen der Knorpelstreifen können frühe Ausfälle festgehalten werden. Einige dieser Ausfälle befinden sich genau oder in der Nähe der Brandmarkierungen. Generell auffällig sind deutlich vermehrt avitale Zellen an den Abrissflächen zu erkennen (Abb. 22, 23).

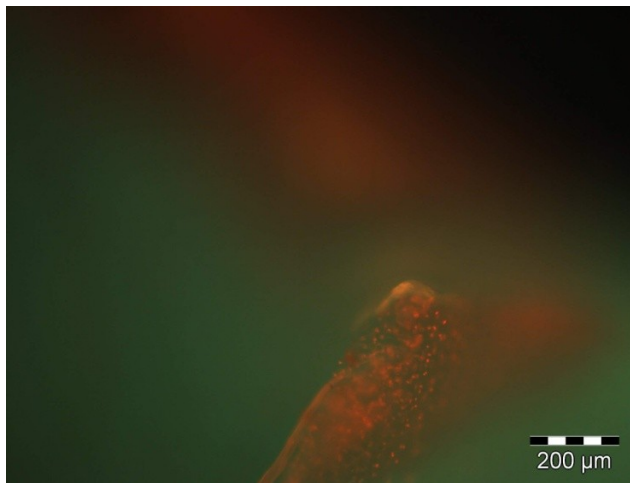


Abbildung 22: Abrissfläche. Vermutlich an einem Markierungspunkt - verursacht durch ein Instrument.

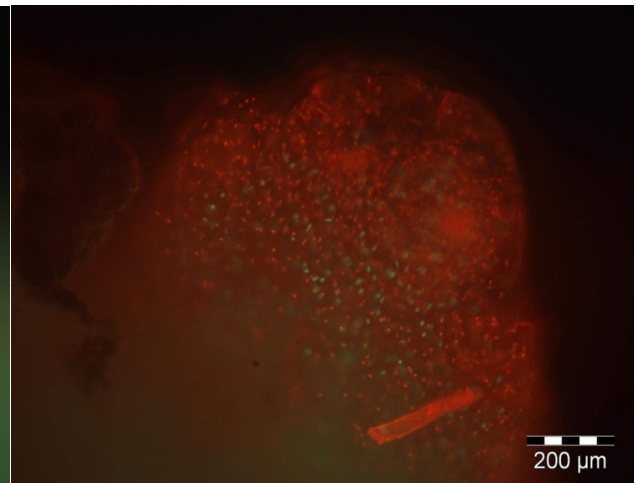


Abbildung 23: Abrissfläche an einem Markierungspunkt verursacht durch eine Nadel.

5.6 Zusatz

Markierungsgrößen und Live/Dead Kit

Methode	Läsionsgröße (L/B/T)	Läsionsgröße anhand Live/Dead	Traumatisierung zw. den Markierungen	in Volumen: Läsionsgröße anhand Live/Dead
Laser	400 x 200 x 70	/	/	/
Tusche + Nadel	40 x 40 x 40	200 x 200 x 280	/	11,2
Tusche + Rasierklinge	600 x 150 x 40	600 x 200 x 400	/	48
Modellier-instrument heiß	600 x 400 x 160	600 x 500 x 430	50 - 200	180
Nadel heiß	40 x 40 x 40	600 x 350 x 350	40 - 80	73,5

Tabelle 5: Vergleich der durchschnittlichen Markierungs-läsionsgrößen in µm bzw. Volumenangabe in nl. Die Nadel in Kombination mit der Tusche zeigt die geringste, das erhitzte Modellierinstrument hingegen die größte Knorpeltraumatisierung.

Die durch Schnitte bzw. Punktionen entstandenen Läsionsgrößen sind teilweise anhand der Instrumentengröße ausgemessen worden. Sie können am Knorpel kleiner ausfallen, da sich der Knorpel nach dem Herausziehen des invasiv eindringenden Instrumentes Rückstellen kann.

Beispiel: Die Rasierklinge dringt mit ihrer 150 µm breiten Klinge in den Knorpel ein. Nach Knorpelrückstellung beträgt die Läsion etwa noch 50 µm. Dieses Verhalten trifft nicht bei den durch Hitze traumatisierten Läsionen zu.

Tiefere Zellschichten sind im Live/Dead Test schwieriger darzustellen und zu beurteilen. Es wird daher die unter dem Mikroskop sichtbare Fläche in etwa vermessen und als Volumen angegeben. Die Ergebnisse aus Tabelle 5 zeigen dabei deutliche Unterschiede in den Läsionsgrößen. Das kleinste Volumen an avitalen Zellen zeigt die Methode mit der Nadel in Kombination mit der Tusche auf, gefolgt von der Rasierklinge in Kombination mit der Tusche. Ein fast 6-fach größerer avitaler Bereich, im Gegensatz zur Nadelpunktion mit Tusche, entsteht mit der erhitzten Nadel. Bei dem erhitzten Modellierinstrument liegt dieser avitale Bereich sogar um ein 16-faches höher.

6 Diskussion

Ein möglichst früher Entnahmezeitpunkt des Kniegelenkes (innerhalb von ein bis zwei Stunden nach der Schlachtung) gewährleistet, dass autolytische Prozesse noch wenig fortgeschritten sind und alle Feinstrukturen sich noch in einem bestmöglichen Erhaltungszustand befinden. Es werden jedoch auch Knieproben verarbeitet die nach der Entnahme schon circa 24 Stunden alt sind. Dies liegt vor allem daran, dass es sehr schwer ist frische Kniegelenke von Jungtieren zu erhalten. Solche Kniegelenke werden in der experimentellen Anfangsphase der Markierungsfindung verwendet. Sie können jedoch wegen der erhöhten Anzahl an avitalen Zellen nicht für Kultivierungsversuche herangezogen werden.

Um eine Austrocknung und dem daraus resultierenden Zelltod entgegenzuwirken, ist es wichtig möglichst alle Vorgänge unter keimarmen Bedingungen und bei möglichst permanenter Feuchthaltung durch gekühlte PBS-Lösung zu verarbeiten, was bei nicht allen Methoden konsequent eingehalten werden kann. So trocknet zum Beispiel, wie oben bereits beschrieben, der Knorpel bei der Methode durch Hydrochinon schnell aus.

Eine Problematik bei der Präparation von juvenilen Knorpelblöcken bzw. Knorpelstreifen stellen die vermehrt auftretenden Gefäßeinsprossungen dar, so dass weniger Probematerial aus einem Knie gewonnen werden kann. Diese können zu einem frühzeitigen Peelingabbruch führen. Es stellt sich die Frage nach realitätsnäheren Bedingungen, sprich nach adultem Knorpel, denn die meisten Verletzungen finden sich an einem erwachsenen Knorpel.

Die Durchführung eines „Live/Dead“ an den für erfolgreich befundenen Methoden zeigen nach dem Peelen an den Rissflächen vermehrt abgestorbene Zellen (Abb. 22, 23). Besonders an den Einspannungsstellen in der Zugvorrichtung sind deutliche avitale Arealblöcke zu erkennen (Abb. 24). Diese Tatsache ist jedoch vernachlässigbar, da diese Knorpelenden nicht zusammenwachsen müssen. Sie dienen später wieder den Einspannungsbereichen. Wichtig ist jedoch die Erkenntnis, dass sich Druck gravierend negativ auf den Knorpel ausübt. So sind weitere vermehrt avitale Zelleareale z.B. an Stellen zu erkennen, an denen eine anatomische Pinzette

den Knorpel hält. Bessere Ergebnisse zeigen Pinzetten die ganz flach sind. Des Weiteren sollte der Knorpel nicht durch zu stark erzeugten Druck (z.B. mit einer Pinzette) gehalten werden (Abb. 25).

Ebenfalls am Mikroskop sichtbar sind Schnittstellen die aller Wahrscheinlichkeit nach durch das nicht gleichmäßige durchziehen der Rasierklingen entstanden sind. Das gleichmäßige senkrechte Durchziehen der Klingen gestaltet sich jedoch als schwierig. Die Klingen werden beim Schneiden des Knorpels sehr schnell stumpf und der Knorpel unterliegen einer gewissen Verformung beim trennen, so dass besonders in der Anfangsphase der Schnittführung ein Ausweichen erfolgt. Somit besteht auch immer die Tendenz den Knorpel wie mit einem Messer zu „zersägen“. Diese Schnittstellen zeigen vermehrt avitale Zellbereiche auf und sind selbstverständlich als kritisch zu betrachten. Daher kann bereits bei der Präparation ein erhöhter Anteil an avitalen Zellen herbeigeführt werden, so dass die Verwachsung zwischen den zwei zu kultivierenden Knorpelstreifen vermindert und somit geschwächt sein könnte (Abb. 26)

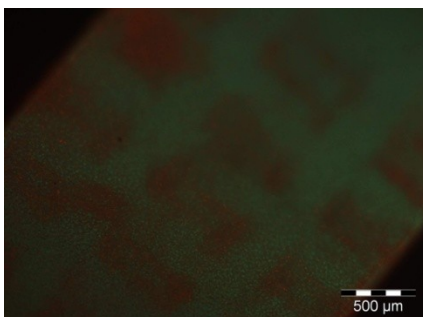


Abbildung 24: Avitale Zellblöcke verursacht durch die Einspannung in Zugmaschine.

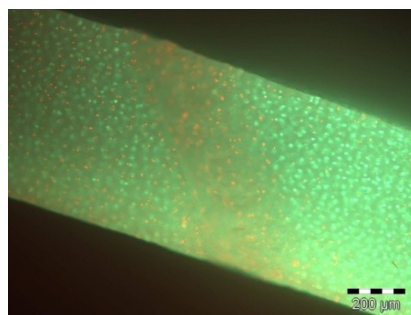


Abbildung 25: Avitale Zellebereiche durch den Druck einer anatomischen Pinzette.

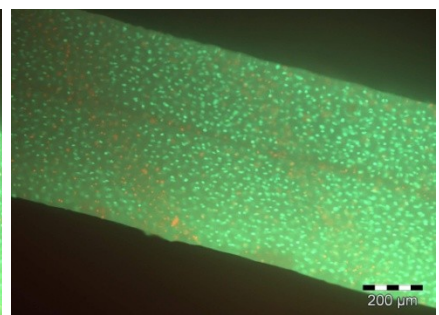


Abbildung 26: Avitale Zellen. Wahrscheinlich bei der Probenpräparation entstanden.

6.1 Hydrochinon und Silbernitrat

Die Ergebnisse durch Hydrochinon und Silbernitrat, rein bezogen auf die Markierungspunkte bzw. Markierungsstriche, sind durchaus zufrieden stellend, da sie

gut sichtbar und nicht abwischbar sind.

Durch das Einlegen in Hydrochinon und dessen Aufnahme färbt sich der gesamte Knorpelstreifen allerdings gelblich. So verzeichnet die zweite beschriebene Abfolge – ohne den Knorpelstreifen vorher in Röhrchen Nummer eins einzulegen – zwar eine leichtere Abfolge, genauere Markierungen und wahrscheinlich weitaus mehr vitale Zellen, jedoch wird der Knorpel auch hier komplett im relativ toxischen Hydrochinon gewaschen. Durch die scheinbar hohe Gewebetoxizität und Versteifung des Hydrochinons zieht dies eine Zellschädigung am gesamten Knorpel nach sich und scheidet somit für weitere Peelings- und Kultivierungsversuche definitiv aus. Ein weiteres Untauglichkeitskriterium ist die relative Trockenhaltung zum „punktuellen“ Auftragen des Silbernitrates durch Austrocknung oder durch Abtupfen. Dies fördert wiederum den frühzeitigen Zelltod. Ferner kompliziert sich das Vorhaben durch die schlechte Dosierungsmöglichkeit des Silbernitrates auf der Nadel, was wiederum viel Geduld und manuelle Geschicklichkeit verlangt. Im Vergleich zu anderen Methoden sind die Kosten bei dieser Methode gering.

Aufgrund der vielen negativen Eigenschaften wird jedoch dieser Methode keine Beachtung mehr geschenkt.

6.2 Kaliumpermanganat und Natriumthiosulfat Pentahydrat

Obwohl durch die Nadel feine Markierungen möglich wären, liefert die Markierung durch Kaliumpermanganat und Natriumthiosulfat Pentahydrat kein zufriedenstellendes Ergebnis. Die aufgetragenen bzw. punktierten dunkelvioletten Markierungspunkte sind nicht farbecht, sprich beim Einlegen des Knorpels in eine Lösung waschen diese sich raus. Zudem ist diese Markierungsart sehr Zeitintensiv, so dass Knorpelzellen absterben können und für weitere Kultivierungsversuche unbrauchbar sind. Die Durchführung erfordert eine ruhige Hand, da die Markierung sonst keinen sauberen Punkt ergibt. Die Kosten bei dieser Methode sind gering.

Aufgrund der durchweg negativen Eigenschaften wird dieser Methode keine Beachtung mehr geschenkt.

6.3 Tusche

Vergleicht man die Markierungsmethode durch die Nadel mit der Methode der Rasierklinge, so ist festzuhalten, dass die Markierung durch die Nadel die Bessere ist. Der Grund liegt in der Größe der Traumatisierung - Längsanschnitt versus Nadelpunktion.

Als Negativ zu betrachten ist die schlecht kontrollierbare Einschnitttiefe durch die Rasierklinge, denn wird die Klinge so angesetzt, dass sie z.B. nur etwa 50 µm in die 2,5 mm breite Knorpelfläche eindringt, dann weicht der Knorpel aus und es erfolgt kein Schnitt bzw. ein unsauberer Schnitt. Daher muss die Rasierklinge zwangsläufig tiefer angesetzt werden. Ein weiterer Nachteil ist das schnelle abstumpfen Klinge, insbesondere durch das unweigerliche tuschieren des Plexiglasrand.

Positive Eigenschaften bei der Nadelpunktion sind saubere, kleine punktuelle und sichtbare Markierungspunkte. Als vernachlässigbar, durch den geringe Nadel-durchmesser, ist die nicht exakt kontrollierbare Eindringtiefe zu sehen, wobei jede Art von Gewebeschädigung sich beim Peelen in Form eines frühzeitigen Ausfällens widerspiegeln könnte. In Tabelle 1 und 2 sind solche signifikanten Unterschiede zwischen Nullproben und markierten Proben nicht zu erkennen. Das gleiche gilt für jene Versuche bei der die Klinge angesetzt wird. Für eine genauere Aussage sollten jedoch mehr Knorpelproben zur Verfügung stehen und untersucht werden. Weitere Faktoren die untersucht werden sollten, sind mögliche Einflüsse die unter anderem durch die Handhabung bei der Knorpelgewinnung - sprich der Präparation, bei der genauen geraden Einspannung in die Zugmaschine, durch den Knorpelfaserverlauf oder durch feine Gefäßeinsprossungen entstehen.

Bei dem Vorgang der Markierung kann der Knorpel gut (durch eine Phosphatpufferlösung) befeuchtet in der Haltevorrichtung liegen und geschnitten oder punktiert werden. Somit trocknet der Knorpel nicht aus, was wiederum zur Folge hat, dass die Zellen nicht austrocknen und vital für Kultivierungsversuche bleiben. Auch verbleiben die beim Schnitt bzw. Einstich abgestrichenen Pigmente der Tusche im Knorpel und waschen sich nicht durch das Einlegen, wie in z.B. Phosphatlösung, aus.

Positiv ist ebenfalls die Gewebefreundlichkeit der Pigmente, was einer späteren

Kultivierung entgegen kommt. Allerdings müsste dies durch weitere Tests belegt werden. Avitale Flächen sind bei der Nadelpenetration geringer als bei der Rasierklingenmethode oder auch bei anderen mit Live/Dead untersuchten Methoden und entstehen rein durch den mechanischen Eingriff.

Bei der Aufzeichnung durch die Kamera beim Peelvorgang zeigt die Methode der Nadelpunktion anfangs scheinbar eine Schwachstelle. Es kann passieren, dass der Riss so verläuft, dass z.B. ein Markierungspunkt aus dem Bild „flieht“. Dies kann bei den linear angeordneten Markierungen durch eine Klinge nicht geschehen. Es hat sich allerdings im Verlauf der Peelingreihe gezeigt, dass die Anordnung der Nadelstiche nicht relevant für die Berechnung der Dehnung ist. Es genügt nur den 600 µm breiten Bereich mit einer Markierung zu versehen, vorzugsweise mit einer Nadelpunktion. Der zweite Punkt liegt am Ende des Knorpels. Das erleichtert die Handhabung und den zeitlichen Aufwand zusätzlich. Nachteilig würde sich dieses Verfahren nur dann auswirken, wenn die Dehnung der einzelnen Knorpelsegmente separat aufgezeichnet werden müsste.

Die Kosten bei dieser Methode sind gering.

6.4 Laser

Der Gedanke den Knorpel zu Lasern ist theoretisch gesehen gut. Im Laufe der experimentellen Versuchsreihe listen sich jedoch schnell viele negative Punkte auf.

Die Versuchsdurchführung kann in späteren Kultivierungsversuchen nicht keimarm durchgeführt werden. Die Anschaffung eines Lasers ist notwendig, was sich jedoch meines Erachtens hinsichtlich des Preis/Nutzungsverhältnisses nicht rentiert. Ebenfalls müsste ein geeigneter Raum vorhanden sein der den Laserschutzvorschriften entsprechen sollte. Eine zweite Schwierigkeit entsteht bei der Probenvorbehandlung. Der Knorpel muss bevor er mit dem Laser behandelt wird farblich markiert werden. Die Hypothese des Misserfolges scheint der helle, weißliche Knorpel zu sein, der den Strahl nicht aufnimmt, sondern ableitet. Dies kostet zusätzlich Zeit. Außerdem liegt die Probe während der Bestrahlung auf einem Objektträger, was zwangsläufig zu einer zusätzlichen Austrocknung führt.

Die Läsion ist verglichen mit anderen Markierungen groß.

6.5 Erhitztes Modellierinstrument und erhitzte Nadel

Die Anwendung des Modellierinstrumentes erweist sich als sehr komfortabel in der Handhabung. Es lässt sich leicht und verletzungsfrei an den Bunsenbrenner halten. Es speichert gut die Hitze und gibt sie über einen längeren Zeitpunkt ab, so dass mehrere Markierungen nacheinander an einem und demselben Knorpel möglich sind. Negativ, jedoch nicht von großer Bedeutung ist, die abnehmende Intensität der Brandmarkierungen, wodurch einige Markierungen optisch blass erscheinen (Abb. 10).

Saubere Markierungen entstehen auf der 600 µm breiten Fläche durch die Spitze des Instrumentes, jedoch gestaltet sich die Markierung von zwei gegenüberliegenden Punkten auf der je 300 µm großen Fläche als nicht möglich. Es verlangt eine sehr ruhige Hand und man darf das Instrument nicht zu lange an den Knorpel halten, sonst wird die Läsion zu groß und es entstehen keine sauberen Markierungspunkte. Im Gegensatz dazu sind die Längsmarkierungen durch das Abstreifen bzw. Auflegen des Instrumentes einfacher zu handhaben, die Brandmarkierungsfläche ist hingegen größer, dafür aber sauberer. Die bessere Methode scheint daher jene durch das Auflegen des Instrumentes zu sein, da der Knorpel nach punktueller Markierung (wie oben beschrieben) so ungünstig geschädigt werden kann, dass dieser nicht mehr für weitere Versuche geeignet ist. Im Vergleich zum Abstreifen des Instrumentes verbleibt das erhitzte Instrument zu lange am Knorpel, so dass hier eine zu große Hitzeeinwirkung besteht.

Später erfolgte Bildaufnahmen (anhand der Live/Dead Durchführung) veranschaulichen in der Vergrößerung jedoch deutliche Läsionsbereiche, welche neben den eigentlichen Markierungen liegen. Diese verteilen sich über die gesamte 12 mm lange und 600 µm breite Fläche.

Die Erhitzung der Nadel durch einen Bunsenbrenner erweist sich als sehr schwierig bis unmöglich, die Verletzungsgefahr ist sehr groß und der Versuch die Nadel durch eine Zange zu verlängern scheitert ebenfalls, da die Fixierung auf dem Knorpel zu

unkontrolliert erfolgt und die Nadel dadurch zu schnell ausglüht. Die Folge ist keine Markierung.

Die Erhitzung der Nadel durch ein handelsübliches Feuerzeug birgt ein geringeres Verletzungsrisiko und ist durchführbar. Im Vergleich zum Instrument muss die Nadel nach jeder Markierung erneut erhitzt werden. Auch bei dieser Methode ist das genaue Anbringen der Markierungspunkte an den 300 µm breiten Flächen durch die Nadel enorm schwierig bis unmöglich. Die einfachste und optisch zufriedenstellende Variante ist das Verfahren mit dem Abstreifen der Nadel. Die Variante durch das Auflegen der Nadel zeigt optisch keine guten Ergebnisse. Die Nadel scheint die Hitze zu schwach zu speichern bzw. glüht schnell aus.

Im Vergleich zu anderen Markierungsmethoden ist die Beschaffung der benötigten Materialien kostengünstig.

Die Live/Dead Durchführung zeigt eine deutliche Traumatisierung des Gewebes, welche je nach Variante unterschiedlich groß ausfällt. Sie ist in der Dimension mit bloßem Auge nicht zu erkennen. Die Hitze schädigt verstärkt den Knorpel. Dabei geht die größte Schädigung vom erhitzten Modellierinstrument aus, wobei der Traumatisierungsbereich durch die erhitzte Nadel (auch im Vergleich zu anderen Methoden) nur unwesentlich weniger avitale Bereiche aufzeigt. Ebenfalls mit betroffen sind die Bereiche zwischen den Markierungen. Genauso auffällig und in dieser Arbeit als negativ zu bewerten, sind die während des Peelvorganges erhöht frühzeitig auftretenden Ausfällungen. Die Abrissfläche ist deutlich an den Brandmarkierungen zu erkennen. Hierzu liegen allerdings nur wenig Proben vor, so dass eine eindeutige Aussage schwer fällt.

Diese Methode wird, trotz einiger wie unter Abschnitt 5.5 genannten positiven Eigenschaften, aufgrund der erheblichen Gewebetraumatisierung für weitere Kultivierungsversuche als nicht tauglich eingestuft.

6.6 Markierungen

Bei der Anordnung der Markierung wird zuerst versucht möglichst viele Markierungen nebeneinander zu setzen. Je nach Größe des dazu verwendeten Werkzeugs fällt

diese Anzahl unterschiedlich aus. Abstände von circa 1 mm bis 1,5 mm werden bei den gängigen Methoden als sinnvoll und gut durchführbar eingestuft. Sie sind voneinander abzugrenzen und deutlich sichtbar (siehe dazu auch Abb. 10 und 14).

Es hat sich im Verlauf der Peelingtestreihe gezeigt, dass die Markierungen nur zur Berechnung der Dehnung benötigt werden. Irrelevant sind die Markierungen zur Berechnung der zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Kraft. So wurde bei parallel verlaufenden Testreihen der Fachhochschule Regensburg festgestellt, dass wenn der Wert im Kamerabild vor Versuchsstart vom Wert im Bild zu einem definierten Zeitpunkt subtrahiert wird, ein Spannungswert entsteht, der sich mit dem Faktor $x N/V$ in eine Kraft umrechnen lässt. $x N$ entsprechen hierbei $x V$ [59]. Mit der gleichen Methode lässt sich die Lage eines Risses (Kerbspaltes) ablesen. Es kann somit zwischen nativen und integrativen Knorpelstreifen der Kraftwert - ohne Markierungen und die Dehnung - mit Markierungen verglichen werden. Auch lässt sich mit dieser Messtechnik der aus dem Kamerabild „fliehende“ Markierungspunkt berechnen, so dass die oben beschriebene Anfangsproblematik als gelöst gilt.

Bei späteren Kultivierungsversuchen werden die gepeelten Knorpelstreifen aufeinander gelegt, um ein zusammenwachsen zu erzielen. Dabei sollten die Streifen so aufeinander gelegt werden, dass die jeweiligen Markierungen (wie bei der Ausgangssituation) aufeinander liegen. Dies lässt sich jedoch nur durch linienartige Markierungen bewerkstelligen, bzw. durch die auf den 300 µm breiten Knorpelflächen gesetzten Punkten. Das Aufbringen zweier übereinander liegender Punkten erweist sich jedoch mit den aktuell untersuchten Methoden als extrem schwierig bis unmöglich. Eine weitere Überlegung ist den Knorpel nicht bis zum Versagen zu peelen.

7 Zusammenfassung

Als ein wesentlicher Grund des posttraumatischen Gelenkverschleißes wird die mangelnde Knorpelintegration zwischen gebrochenen Gelenkflächenanteilen angesehen. Zur Behandlung von Knorpeldefekten werden u.a. oft Knorpelknochenblocktransplantate verwendet. Diese weisen im Bereich der knorpeligen Kontaktflächen meist keine Integration auf. Das mangelnde Zusammenwachsen von Gelenkknorpelwunden und die daraus resultierenden Folgen für das betroffene Gelenk stellt bis heute ein ungelöstes Problem in der Traumatologie und Orthopädie mit einem hohen volkswirtschaftlichen Schaden dar. Deshalb ist die bündige Integration des Gelenkknorpels nach einer Verletzung im lasttragenden Areal notwendig. Denn bei den Untersuchungen von Gelenkknorpelreparaturen, vor allem für ruptierte Oberflächenstrukturen, fehlen noch immer wichtige Informationen und es bedarf noch weiteren ausgefeilten experimentellen Verfahren.

In dieser Arbeit soll eine geeignete Methode gefunden werden, um die Knorpelstreifen zu markieren. Anhand dieser Markierungen lassen sich dann Berechnungen der Kraftwerte zu einem definierten Zeitpunkt und Berechnungen zur Dehnung, sowie die daraus resultierende Verformung durchführen, so dass native und integrative Knorpelstreifen in weiterführenden experimentellen Forschungsarbeiten miteinander verglichen werden können. Ebenfalls im Fokus dieser Untersuchung steht die Vitalität des behandelten Knorpelstreifens, welche anhand eines Live/Dead Kit untersucht wird.

Es soll eine Markierung gefunden werden, die nicht bzw. nur gering traumatisch ist. Sie soll gut von weiteren Markierungen abzugrenzen sein, möglichst klein und optisch zu erfassen sein. Hierzu werden verschiedene Markierungsmethoden ausgearbeitet und getestet.

Als erstes wird der Knorpel anhand von Hydrochinon und Silbernitrat in Kombination mit einer Nadel punktiert und dadurch markiert. Bezüglich des T-Peelings und des späteren Kultivierens von Knorpel wird diese Methode als untauglich bewertet. Neben anderen negativen Aspekten stellt sich im Verlauf der Untersuchung heraus, dass Hydrochinon auf die Knorpelzellen extrem toxisch zu wirken scheint, denn der in

PBS-Lösung gelagerte Knorpel zeigt nach wenigen Tagen einen deutlichen Verlust an Elastizität und wirkt steif.

Das zweite Konzept, eine Markierung anhand von Kaliumpermanganat und Natriumthiosulfat Pentahydrat in Kombination mit einer Nadel durchzuführen, scheitert während der Versuchsdurchführung daran, dass das violett erscheinende Kaliumpermanganat sich beim Einlegen in die PBS-Lösung aus den punktierten Bereichen raus wäscht. Dadurch geht der Effekt der „optische Erfassbarkeit“ verloren. Somit ist auch diese Methode nicht für weiterführende Versuche geeignet.

Daraufhin wird versucht eine permanente Markierung durch einen frequenzverdoppelten diodengepumten Festkörperlaser, wie er in der Augenheilkunde der Universität Regensburg verwendet wird, zu erzielen. Auch diese Methode stellt sich nicht als die Methode der Wahl heraus. Im Vergleich zu der Nadelpunktion liegt das rein gebrannte Läsionsgebiet um ein 90-faches höher.

Bei der Suche nach einer weniger traumatischen jedoch optisch permanenten Markierungsmethode zeigte die schwarze Tusche gute Eigenschaften. Sie haftet nicht einfach am Knorpel, jedoch kann sie ganz leicht unter Zuhilfenahme einer Nadel oder einer Rasierklinge permanent in den Knorpel eingebracht werden. Eine der bevorzugten Methoden stellt die Nadel dar, da die Live/Dead-Durchführung die geringste Anzahl an avitalen Zellen erkennen lässt. Das beschädigte Volumen beträgt hier gerade mal etwa 11,2 nl. Sie kann zur Berechnung der Verformung genutzt werden. Der Knorpel sollte dazu allerdings nicht bis zum Versagen gepeelt werden. Möchte man in weiteren Versuchen bis zum Versagen peelen und auf jedem Knorpelstreifen ein Markierungspunkt haben, so sollte man sich für die Methode der Rasierklinge, trotz der erhöhten Gefahr des vorzeitigen Versagens und der höheren Anzahl an avitalen Zellen (circa 48 nl), entscheiden. Zur Bestätigung ob ein vermehrt vorzeitiges Versagen stattfindet, sollten allerdings noch mehr Knorpelproben in weiteren Versuchen untersucht werden.

Bei dem Versuch eine Brandmarkierung zu bekommen stellt sich heraus, dass das Instrument trotz guter visueller Eigenschaften etc. die größten Läsionen hervorruft. So beträgt das Volumen hier etwa 180 nl. Bei der erhitzten Nadel liegt das beschädigte Volumen bei etwa 73,5 nl. Dabei sind in dieser Volumenangabe nicht die avitalen Zellen zwischen den Markierungen mit eingerechnet.

Eine Markierungsmethode, die alle positiven Ansprüche verwirklicht, wurde nicht gefunden. Hier könnte noch in weiteren Untersuchungen z.B. nach einer geeigneten Farbe zum auftragen gesucht werden (wobei in dieser Testreihe auch kurz das Auftragen von Henna, der Einsatz von einem Permanent-Edding und wasserfeste Wimperntusche, jedoch ohne Erfolg, untersucht worden sind).

Es hat sich in dem Verlauf der Testreihe gezeigt, dass die Kraftwerte zu einem definierten Zeitpunkt auch ohne Markierungen bestimmt werden können.

Ebenfalls zu beachten und zu überdenken sind die Methode der Materialgewinnung und dessen Handhabung. So sollte der Knorpel möglichst mit scharfen Klingen bearbeitet und die Schnitte ohne das Absetzen des Messer erfolgen. Auch sollte der Knorpel nicht durch eine anatomische Pinzette in dem Areal gehalten werden, indem eine Integration wünschenswert ist. Ebenfalls leicht vermehrte avitale Zellen sind in dem Bereich der Peelingfläche und wesentlich mehr im Bereich der Abrissfläche zu finden. Daher sollte überlegt werden, ob man die Proben bis zum Versagen durchpeelt.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Bruns J, Steinhagen J. Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität. Biologische Grundlagen. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (2000); 51 (2): 42-47.
- [2] Martinek V. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 2003; 54 (6): 166-170.
- [3] Bruckwalter J A. Articular cartilage. In: Instr Course Lect 32 (1983); 349-370
- [4] Frenkel SR, Cesare P E D. Degradation and repair of articular cartilage. In: Front Biosci 4 (1999); Oct, S. D671-D685.
- [5] Spahn G, Wittig R. Biomechanical properties (compressive strength and compressive pressure at break) of hyaline cartilage under axial load. In: Zentralbl Chir 128 (2003); Jan, Nr. 1, 78-82.
- [6] Freeman M. A R, Pinskerova V. The movement of the normal tibio-femoral joint. In: J Biomech 38 (2005); Feb, Nr. 2, S. 197-208
- [7] Jeffery AK, Blunn GW, Archer CW, Bentley G. Three-Dimensional Collagen Architecture In Bovine Articular Cartilage. In: J Bone Joint Surg [Br] (1991); 73-B : 795-801.
- [8] Forster H, Fisher J. The influence of continuous sliding and subsequent surface wear on the friction of articular cartilage. In: Proc Inst Mech Eng (H) 213 (1999); Nr. 4, S. 329-345.
- [9] Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. J Biomech 17 (1984); 377-394.
- [10] Bader DL, Kempson GE. The short-term compressive properties of adult human articular cartilage. In: Biomed Mater Eng (1994); 4 245-56..
- [11] Rudert M, Wirth CJ. Cartilage regeneration and substitution. In: Orthopäde (1998); 27 W309-W321.
- [12] Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, et al. Articular cartilage biology. In: J Am Acad Orthop Surg (2003); 11 421-30.
- [13] Van den Berg F, Cabri J, Gifford L, Arendt-Nielsen L, Bader E. Angewandte Physiologie. In: Thieme (2003); 2nd edition. ISBN: 9783131160324.
- [14] Karvonen RL, Fernandez-Madrid F, Lande M A, Hazlett L, Barrett R, An T, Huebner CJ. Proteoglycans from osteoarthritic human articular cartilage influence type II collagen in vitro fibrillogenesis. In: Connect Tissue Res 27 (1992); Nr. 4, S. 235-250.
- [15] Mollenhauer J, Kuettner KE. Articular Cartilage. In: Dee R. Hrsg. Principles of orthopaedic practice (1997); 2nd edition. New York: McGrawHill, 85-98.

- [16]Eyre D. Collagen of articular cartilage. In: Arthritis Res (2002);4:30-3
- [17]Bruckner P, Van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. In: Microsc Res Technique (1994);28:378–384..
- [18]Rely J. Cartilage Repair Strategies. In: Humana Press (2007); S.1-13. 3ISBN: 9781597453431 bzw. dort drinne: Kyle R, Flik MD, Nikhil Verma MD, Brian J, Cole MD, and Bernard R, Bach Jr. MD. Articular Cartilage: Structure, Biology and Function.
- [19]Sobotta J. Lehrbuch Histologie – Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie. In: v. Welsch, 1st edition. Urban & Fischer München-Jena (2003);115, 106-109, 260-262.
- [20]Rudert M, Tillmann B. Detection of lymph and blood vessels in the human intervertebral disc by histochemical and immunohistochemical methods. In: Ann Anat (1993);175:237-42.
- [21]Metz J. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels, In: Erggelet C, Steinwachs M (Ed), Gelenkknorpeldefekte, Steinkopff Verlag Darmstadt (2001);3-14.
- [22]Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. In: Osteoarthritis Cartilage (2002);10(6):432-463.
- [23]Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. Part II : Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. In: J Bone Joint Surg (1997);79A : 612-632.
- [24]Sah RL, Chen AC, Chen SS. Articular cartilage repair. In: Koopman WJ, editor. Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology. Philadelphia: Lippincott (2001);2264-2278.
- [25]Marsh JL, Buckwalter J, Gelberman R et al. Articular fractures: does an anatomic reduction really change the result? In: J Bone Joint Surg Am (2002); 84-A(7):1259-1271.
- [26]Weller S. Experimenteller Beitrag zur Prognose eines Gelenkes nach Verletzungen der knorpeltragenden Gelenkflächen. In: Archiv für Orthopädische- und Unfall-Chirurgie (1964);56, 583—592.
- [27]Mitchell N, Shepard N. Healing of articular cartilage in intra-articular fractures in rabbits. In: J Bone Joint Surg Am (1980);62(4):628-634.
- [28]Petersen JP, Ueblacker P, Goepfert C, et al. Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. In:J Mater Sci Mater Med (2008); 19 2029-38.
- [29]Bobic V. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. In: Orthopade (1999); 28(1):19-25.
- [30]Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. Mosaicplasty for the

- treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. In: Orthopedics (1998);21(7):751-756.
- [31] Chu CR, Douchis JS, Yoshioka M, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits. In: Clin Orthop (1997); (340):220-229.
- [32] Scully S. In-vitro Integration of articular cartilage enhanced by Growth-Factors.
- [33] Ahsan T, Lottman LM, Harwood F, Amiel D, Sah RL. Integrative cartilage repair: inhibition by beta-aminopropionitrile. In: J Orthop Res (1999);17: 850-857.
- [34] Giurea A, DiMicco MA, Akeson WH, Sah RL. Development-associated differences in integrative cartilage repair: roles of biosynthesis and matrix. In: J Orthop Res (2002);20: 1274-1281.
- [35] DiMicco MA, Sah RL. Integrative cartilage repair: adhesive strength is correlated with collagen deposition. In: J Orthop Res (2001);19: 1105-1112.
- [36] Reindel ES, Ayroso AM, Chen AC, Chun DM, Schinagl RM, Sah RL. Integrative repair of articular cartilage in vitro: adhesive strength of the interface region. In: J Orthop Res (1995);13: 751-760.
- [37] Allan DA. Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries. In: Clin Orthop (1998);32-38.
- [38] Lee JH, Fitzgerald JB, DiMicco MA, Grodzinsky AJ. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. In: Arthritis Rheum (2005);52: 2386-2395.
- [39] Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. In: Osteoarthritis Cartilage (1999);7: 389-391.
- [40] Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S et al. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. In: Arthritis Rheum (2003);48: 1292-1301.
- [41] Temple MM, Xue Y, Chen MQ, Sah RL. IL-1 induces tensile weakening and collagen degradation in cartilage [abstract]. In: Trans Orthop Res Soc (2004);29:112.
- [42] Billingham RC, Wu W, Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, et al. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. In: Arthritis Rheum (2000);43:664-72.
- [43] Jo H, Park JS, Kim EM, Jung MY, Lee SH, Seong SC, et al. The in vitro effects of dehydroepiandrosterone on human osteoarthritic chondrocytes. In: Osteoarthritis Cartilage (2003);11:585-94.

- [44]Englert C, Blunk T, Fierlbeck J, Kaiser J, Stosiek W, Angele P et al. Steroid hormones strongly support bovine articular cartilage integration in the absence of interleukin-1beta. In: Arthritis Rheum (2006);54: 3890-3897.
- [45]Ahsan T, Sah RL. Biomechanics of integrative cartilage repair. In: Osteoarthritis Cartilage (1999);7(1):29-40.
- [46]Fierlbeck J, Hammer J, Englert C, Reuben RL. Biomechanical properties of articular cartilage as a standard for biologically integrated interfaces. (2006); 14(6): 541-7
- [47]Englert C, McGowan KB, Klein TJ, Giurea A, Schumacher BL, Sah RL. Inhibition of integrative cartilage repair by proteoglycan 4 in synovial fluid. In: Arthritis Rheum (2005);52(4):1091-1099.
- [48]Englert C, Blunk T, Müller R, Schulze von GlasserS, Baumer J, Fierlbeck J, Heid IM, Nerlich M, Hammer J. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. In: Arthritis Research & Therapy (2007);9:R47..
- [49]Meyer J. Meyers Konversations-Lexikon, Verlag des Bibliographischen Instituts, 4. Auflage von 1888-1890.
- [50]Wöhler F. Über das Chinon. In: Pharmaceutisches Centralblatt (1844); Nr. 39, 609-615
- [51]Chemie. DE Information Service Gmbh, Berlin a life Science Network Division. (1997-2008).
- [52]Verordnung des EDI über kosmetische Mittel (VKOS), Internet.
- [53]Roth/Kormann, Duftpflanzen – Pflanzendüfte (Lansberg 1997), Internet.
- [54]<http://de.wikipedia.org/wiki/Silbernitrat>
- [55]Von Bruchhausen F, Ebel S, Frahm A.W., Hackenthal E. In: Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Bd. 7, 5th edition, Springer/Birkhäuser Verlag (1995); ISBN 3540526889.
- [56]<http://de.wikipedia.org/wiki/Natriumthiosulfat>
- [57]<http://de.wikipedia.org/wiki/Kaliumpermanganat>
- [58]<http://www.meditec.zeiss.de> VISUALIS 532s. Laserpräzision im handlichen Format, S.1-8, DS-Nr: 000000-1165-377.
- [59]Thomas M. Tissue Engineering: In vitro Charakterisierung der Festigkeiten nativer Gelenkknorpel 2008;17-20. Diplomarbeit.

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Geburtsdaten	geboren am 19.09.1980 in Essen als Tochter von Gabriele M.G. Rohde (geborene Walter) und Dipl. Ingenieur Carlos U. Rohde
Nationalität	deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2009	Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. med. dent. H. Gräml
02/2003 - 03/2003	Zahnmedizinische Fachangestellte in der Praxis Dres. med.dent. Weiss in Essen

Studium

2003-2008	Zahnmedizin an der Universität Regensburg
11/2008	Zahnärztliche Prüfung mit der Note „gut“
05/2006	Physikum
10/2004	Vorphysikum

Berufliche Ausbildung

08/2000 - 01/2003	Zahnmedizinische Fachangestellte in der Praxis Dres. med.dent. Weiss in Essen
-------------------	----------------------------------------------------------------------------------

Schulbildung

2000	Allgemeine Hochschulreife
1991 – 2000	Städt. Gesamtschule Velbert / Deutschland
1989 - 1991	Städt. Grundschule Birth / Velbert / Deutschland
1987 - 1988	Deutsche Schule Montevideo / Uruguay

Promotionsarbeit

7/2007 – 07/2010	In vitro Untersuchung des Dehnungsverhaltens des Gelenkknorpels
------------------	--------------------------------------------------------------------

10 Danksagung

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater, PD Dr. med. Carsten Englert, für das zur Verfügung stellen eines Dissertationsthemas, für die gute Betreuung, sowie für die zu jeder Zeit geduldigen Beantwortungen offener Fragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Nerlich für die Möglichkeit, in der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg promovieren zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Joachim Hammer der Fachhochschule Regensburg, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Nutzung der Geräten und allen seinen Mitarbeitern für das gute Arbeitsklima. Auch Herrn Martin Thomas möchte ich an der Stelle einen besonderen Dank aussprechen. Wir haben viele Stunden gemeinsam im Labor zusammen gearbeitet, so dass jeder mit Hilfe des anderen seinen Teil des Projektes verwirklichen konnte.

Zudem danke ich Herrn Dr. rer. nat. R. Kujat für seine aufopferungsvolle Zeit, seine Denkanstöße und seinem offenem Ohr bei Problemen. Vielen Dank!!

Ein weiteres Dankeschön richte ich an die Augenklinik Regensburg, wo mich Frau Dr. Kobuch und Herr Dr. Framme tatkräftig unterstützt haben.

Abschließend dank ich meiner Familie und Freunden von ganzen Herzen. Besonders meinen Eltern möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen. Sie haben mir das Studium ermöglicht und standen in guten, sowie in schweren Zeiten immer ganz hinter mir. Vielen lieben Dank!!

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderen Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 02.08.2010

Sandra Rohde