

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius
Pathologie

Histologische und ultrastrukturelle Analyse von
sphäroidbasierten autologen Chondrozytentransplantaten
mittels klassischer Methoden und automatischer Bildanalyse

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Naemi Reyersbach

2025

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius
Pathologie

Histologische und ultrastrukturelle Analyse von
sphäroidbasierten autologen Chondrozytentransplantaten
mittels klassischer Methoden und automatischer Bildanalyse

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Naemi Reyersbach

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Volker Alt
Tag der mündlichen Prüfung:	10.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Struktur und Physiologie des hyalinen Knorpels.....	5
1.1.1. Strukturelle Schichten.....	5
1.1.2. Chondrozyten	7
1.1.3. Zusammensetzung, Gliederung und Funktion der extrazellulären Matrix.....	7
1.1.4. Pluripotente Zellen.....	8
1.1.5. Kollagene.....	8
1.1.6. Proteoglykane.....	9
1.1.7. Mechanik der Belastungsverteilung.....	10
1.2. Knorpelschäden und deren klinische Relevanz.....	11
1.3. Therapeutische Möglichkeiten.....	14
1.3.1. Mikrofrakturierung.....	16
1.3.2. Osteochondrale autologe Transplantationssysteme.....	17
1.3.3. Autologe Chondrozytentransplantation.....	18
1.3.4. Vergleich verschiedener Verfahren.....	20
1.4. Morphologie des Zellkerns in verschiedenen Zuständen.....	23
1.4.1. Aufbau und Funktion des Nukleus.....	23
1.4.2. Morphologische Merkmale des Nukleus in verschiedenen Zuständen.....	23
1.5. Virtuelle Mikroskopie und automatische Bildauswertung.....	25
1.5.1. Digitale Präparate und virtuelle Mikroskopie.....	25
1.5.2. Automatische Bildanalyse.....	26
1.6. Fragestellung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.1.1. Probenmaterial	28
2.1.2. Geräte und Materialien.....	28
2.1.2.1. Verwendete Geräte und Zubehör.....	28
2.1.2.2. Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.2.3. Verwendete Reagenzien.....	30
2.1.2.4. Software.....	31

2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Gewebepräparation.....	32
2.2.1.1 Histologische Präparation.....	32
2.2.1.2 Präparation für die TEM.....	33
2.2.2 Auswertung der histologischen und Semidünnschnitt-Präparate.....	35
2.2.2.1 Kernanzahl.....	36
2.2.2.2 Kern zu Matrixverhältnis.....	37
2.2.2.3 Größe.....	37
2.2.2.4 Zellkernform.....	38
2.2.2.5 Superfizialschicht.....	38
2.2.2.6 Lipideinlagerungen.....	38
2.2.3 Auswertung der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder.....	39
3. Ergebnisse.....	40
3.1. Ergebnisse der histologischen Untersuchung.....	40
3.1.1. Evaluation des Materials in Paraffin und Epon Präparaten.....	40
3.1.2. Ergebnisse der morphologischen Evaluation anhand der Semidünnschnittpräparate.....	44
3.1.2.1. Größe.....	44
3.1.2.2. Form.....	46
3.1.2.3. Morphologische Hinweise auf die Bildung einer Superfizialschicht.....	47
3.1.2.4. Evaluation der strukturellen Zusammensetzung der Sphäroide.....	48
3.1.2.5. Lipideinlagerungen.....	50
3.1.3. Evaluation morphologischer und quantitativer Aspekte der Zellkerne.....	53
3.1.3.1. Zellkern zu Matrixverhältnis.....	54
3.1.4. Zellkernmerkmale.....	57
3.1.4.1. Zellkerngröße.....	57
3.1.4.2. Zellkernform.....	58
3.2. Transmissionselektronenmikroskopische Merkmale.....	59
3.2.1. Veränderungen des Chromatins.....	59
3.2.2. Exemplarische Betrachtung der ultrastrukturell erkennbaren Zellkernform.....	63

3.2.3. Zustand der Zellorganelle, Zell-Zellkontakte und der Extrazellulären Matrix.....	63
3.2.4. Lipideinlagerungen.....	63
4. Diskussion.....	64
5. Zusammenfassung.....	72
6. Anhang.....	74
6.1. Literaturverzeichnis.....	84
7. Danksagung	
8. Lebenslauf	

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der histologischen und ultrastrukturellen Auswertung sphäroidbasierter autologer Chondrozytentransplantate. Eine ihrer zentralen Aufgaben ist es, einen Ansatz für eine optimierte Bearbeitung des Probenmaterials zu finden. Des Weiteren beschäftigt sie sich mit Strukturmerkmalen der Sphäroide und sich daraus ableitenden, möglichen Kriterien für eine Qualitätskontrolle der Sphäroide vor Implantation. Ein zusätzlicher Fokus wird auf die Ergänzungsmöglichkeiten der klassischen, histologischen Auswertung durch die digitale Mikroskopie und automatische Bildanalyse gesetzt und deren Anwendbarkeit analysiert.

1.1 Struktur und Physiologie des hyalinen Knorpels

1.1.1 Strukturelle Schichten

Hyaliner Knorpel überzieht die Gelenkflächen aller echten Gelenke, also die der Diarthrosen und Amphiarthrosen, mit Ausnahme des Kiefer- und des Sternoklavikulargelenks.(1) Er übernimmt wichtige strukturgebende und mechanische Funktionen und ermöglicht somit das Tragen von Lasten die schon bei alltäglichen Tätigkeiten einem Vielfachen des Körpergewichts entsprechen. Gelenkknorpel kann ohne Schädigung über 100 Millionen Belastungszyklen durchlaufen.(2,3) Den dabei entstehenden Druck- und Zugkräften hält das Gewebe ohne einen durch direkte Blutversorgung erleichterten Metabolismus stand. Hyaliner Knorpel lässt sich lichtmikroskopisch in vier Schichten - superfiziale, intermediäre, tiefe und kalzifizierende Zone - unterteilen.(4) Als fünfte Zone kann die *Lamina splendens*, eine zellfreie, bis zu einem Mikrometer dicke Schicht aus angereicherten Proteinen der Synovia über der Superfizialschicht, gezählt werden.(5) Die Zonen unterscheiden sich in der Orientierung der Kollagenfasern, Anzahl und Anordnung der Zellen sowie in der Zusammensetzung und damit dem histologischen Verhalten der extrazellulären Matrix.(6–8)

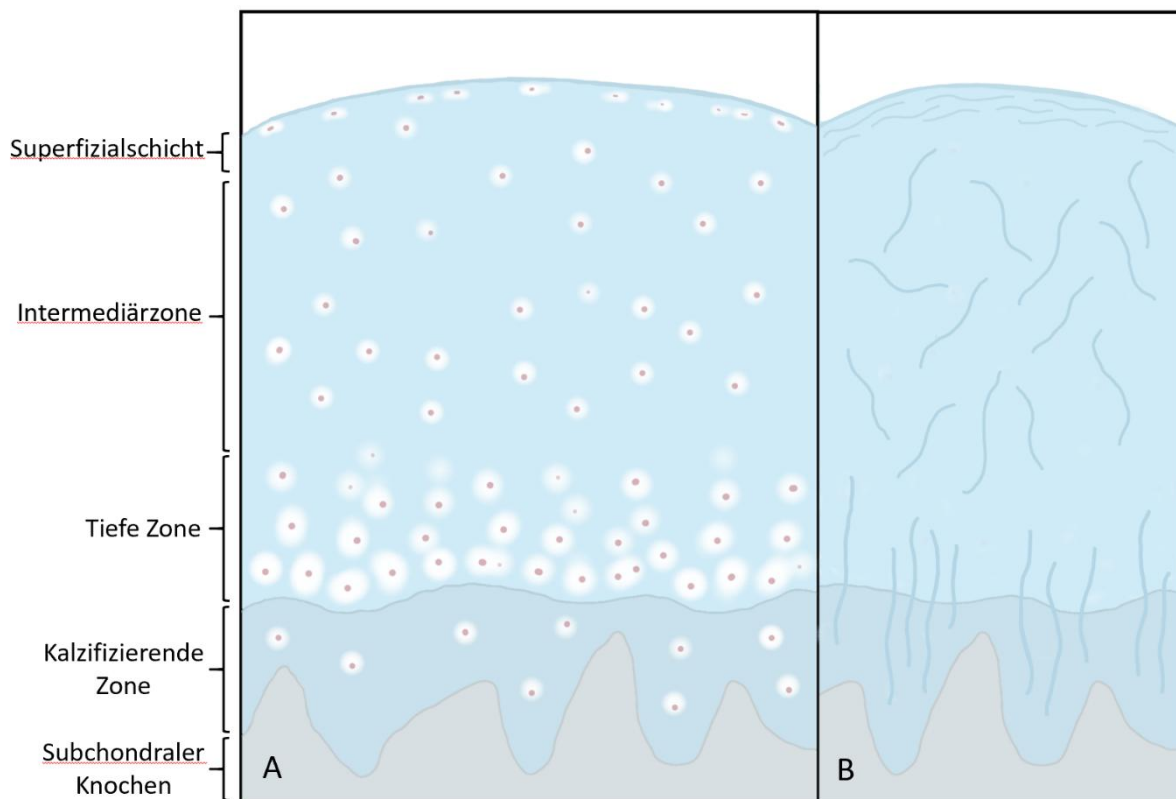


Abbildung 1: Aufbau des hyalinen Knorpels in verschiedenen Schichten (A) und Anordnung der Kollagenfasern (B)

Der subchondrale Knochen geht an der *Cement line* in die kalzifizierende Zone über. Beide Schichten sind kammartig ineinander verzahnt und schwer voneinander zu lösen. Die kalzifizierende Zone enthält im Gegensatz zu den restlichen Schichten Kalziumsalze und eine geringere Anzahl Chondrozyten. Sie dient der Verankerung der Kollagenfasern, welche in die oberflächlicheren Zonen ausstrahlen. Die Grenze zwischen kalzifizierender und tiefer Zone wird als *tidemark* bezeichnet.(6,9) Charakteristisch für die kalzifizierenden und die tiefe Zone ist eine größere Menge an Kollagen X und alkalische Phosphatase, so wie verhältnismäßig deutlich größere Chondrozyten in der tiefen Zone und deren Anordnung zu Säulen. In der Intermediärzone löst sich diese Anordnung der Chondrozyten auf, die Kollagenfasern verlaufen weniger geordnet, um Scherkräften besser standzuhalten. Hier machen Proteoglykane einen großen Anteil der extrazellulären Matrix aus. Die Superfizialzone wird durch tangential verlaufende Kollagenfasern, welche Wasser im Gewebe zurückhalten und durch das Vorliegen länglich geformter, abgeflachter Chondrozyten charakterisiert.(6,7,10,11) Die *Lamina splendens*, die weder Zellen noch Fasern enthält, sondern zu großen Teilen aus Hyaluronan und Lubricin besteht, verringert

gemeinsam mit der Synovia die bei Bewegung entstehende Reibung und verhindert die Anlagerung anderer Proteine oder Zellen.(12–14) Die oberen Schichten sind zwar durch Druck verformbar, halten aber durch die Anordnung der Kollagenfasern in der Superfizialschicht Scherkräften besonders gut stand. Die unteren Schichten sind für das Abfangen der Druckbelastung konzipiert.(7)

1.1.2 Chondrozyten

Chondrozyten sind die den Aufbau des hyalinen Knorpels prägenden Zellen, haben einen Durchmesser von etwa 13 µm und machen 5-10% des Gesamtvolumens des Knorpels aus. Sie sind meist rund und haben große runde bis ovale Kerne. Raues endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat sind, als Zeichen ihrer hohen Syntheseleistung, stark ausgeprägt. Chondrozyten erhalten ein Leben lang unter geringen Sauerstoffgehalt, hohem Druck und trotz geringer Regenerationsfähigkeit die extrazelluläre Matrix aufrecht. Ernährt werden sie durch Diffusion aus der Synovia.(15–17)

1.1.3 Zusammensetzung, Gliederung und Funktion der extrazellulären Matrix

Strukturell lässt sich hyaliner Knorpel nicht nur in die bereits erwähnten Schichten parallel zur Gelenkfläche, sondern auch durch unterschiedliche Zonen der Matrix, die radiär um die Chondrozyten verlaufen, unterteilen.(18) Die kleinste funktionelle Einheit bildet hier das Chondron. Dieses besteht aus Chondrozyt und der ihm unmittelbar angrenzenden perizellulären Matrix.(18,19) Die Chondrone liegen in der territorialen Matrix und diese wiederum in der interterritorialen Matrix. Diese drei Zonen unterscheiden sich in der Zusammensetzung von Kollagenfasern und Matrixmolekülen und somit in ihrer Funktion.(18)

In der perizellulären Matrix bilden feine Kollagenfasern eine Hülle um einzelne Chondrozyten die als perizelluläre Kapsel bezeichnet wird.(20) Ein Komplex aus Kollagen VI, Biglycan, Decorin und Matrilinen ist strukturgebend für die perizelluläre Matrix und ermöglicht die Vernetzung mit Kollagen Typ II und Aggrecan. Laminine, Nidogene, Kollagen Typ IV und Perlecan – Proteine die typischerweise Strukturbestandteil der Basalmembran anderer Gewebe sind – spielen eine wichtige Rolle in der Zusammensetzung und Funktion der perizellulären Matrix.(21) Sie schützt die Chondrozyten vor Verformung unter Druckbelastung und dient durch ihre mit Poren durchsetzte, kapselartige Struktur als Filter für aus oder in die Zelle

diffundierende Moleküle.(21) Die perizelluläre Matrix ist entscheidend an der Mechanotransduktion beteiligt, also der Übertragung von Zug- oder Druckbelastungen auf die Zellen und deren Umwandlung in biochemische Signale.(16) Als Mechanosensoren dienen der Zelle dabei das primäre Zilium und ionensensitive Kanäle. Um eine gesunde extrazelluläre Matrix aufrechtzuerhalten ist eine physiologische, mechanische Stimulation nötig. Pathologisch hohe Belastungen oder die lange Ruhigstellung eines Gelenks führen zur Degeneration des Knorpels.(22,23)

Territoriale und interterritoriale Matrix ähneln sich in ihrer Zusammensetzung aus Kollagen Typ II und Proteoglykanen. Die Durchmesser der Kollagenfasern nehmen allerdings im Übergang von territorialer zu interterritorialer Matrix deutlich zu. Die Proteoglykane der territorialen Matrix sind zu großen Teilen Chondroitinsulfat haltig, in der interterritorialen Matrix vorwiegend Keratansulfat haltig.(5,18)

1.1.4 Pluripotente Zellen

Chondrozyten sind nicht wie vielfach beschrieben die einzigen Zellen des hyalinen Knorpels. In der Literatur gibt es Hinweise auf in der Superfizialschicht nachweisbare pluripotente Zellen, die Studien zufolge sowohl zu Knorpeldefekten migrieren können als auch eine höhere Fähigkeit zur Bildung von Kolonien aufweisen. Zudem können sie je nach Stimulation auch zu anderen Geweben wie Knochen oder Fettgewebe ausreifen.(24)

1.1.5 Kollagene

Kollagen macht etwa zwei Drittel des Trockengewichts des Gelenkknorpels aus und spielt eine grundlegende Rolle bei der Strukturhaltung.(8) Es wird in Form von Prokollagen-Trimeren von den Chondrozyten sezerniert und außerhalb der Zelle verknüpft. Den größten Anteil an Fasern macht Kollagen Typ II mit ca. 50% des gesamten Trockengewichts aus.(5) Kollagen Typ IX und XI sind, sowie Kollagen Typ VI, besonders in der direkten Umgebung der Chondrozyten nachweisbar.(19,25) Kollagen Typ IX kann dabei kovalente Bindungen sowohl mit sich selbst, als auch mit Kollagen Typ II ausbilden, weshalb es mutmaßlich zur Stabilität des Gewebes beiträgt. Kollagen Typ XI bildet mit sich selbst, Heparin, Heparansulfat und Dermatansulfat Bindungen aus. Über Heparan- und Dermatansulfat enthaltende Proteoglykane an der Zelloberfläche der Chondrozyten bleiben Typ XI Fasern nach ihrer Synthese verankert. Es wird vermutet, dass sie dort die Bildung anderer Kollagenfasern

beeinflussen.(25) Laterale Verknüpfungen der Typ XI mit Typ II Fibrillen können sowohl außerhalb als auch in der Fibrille liegen und kontrollieren möglicherweise das laterale Wachstum.(8) Kollagen Typ I findet sich in gesundem Gelenkknorpel nur in der Superfizialschicht und wird in Monolayerkulturen vermehrt von dedifferenzierten Chondrozyten produziert.(5) Kollagen Typ X ist ein Marker für hypertrophe Chondrozyten und ist in der kalzifizierenden Zone zu finden. (5,10) Kollagen Typ III, XII und XIV sind in geringen Mengen in der extrazellulären Matrix nachweisbar.(8)

1.1.6 Proteoglykane

Um die dynamische Belastung der Gelenke zu ermöglichen, ist die reversible Einspeicherung von Flüssigkeit im Knorpelgewebe entscheidend. Diese wird durch Proteoglykane bewerkstelligt, die mit negativen Ladungen einen negativen osmotischen Druck auf die Synovia ausüben. Die Proteoglykane werden wiederum von dem Netz aus Kollagenfasern fixiert, so dass die Flüssigkeit nur bei großer Druckbelastung und dann langsam aus dem Gewebe entweicht.(15,26) Proteoglykane sind zusammengesetzt aus einem Kernprotein und kovalent daran gebundenen, negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAGs). Aggrecan ist das typische Proteoglykan für hyalinen Knorpel. Sein Kernprotein besteht aus drei globulären Domänen und ist mit Dermatan-, Keratan-, Chondroitin-4- oder Chondroitin-6-Sulfat kovalent verknüpft. Eine Besonderheit des Aggrecans ist, dass es mit hoher Affinität an Hyaluronan, das größte GAG im Knorpel, binden kann. Durch die Bindung vieler Aggrecan-Moleküle an ein Hyaluronan bilden sich große Aggregate, die so im Kollagennetzwerk des Gewebes verbleiben.(5)

beruht, wird durch die glycosylierten Lubricin und Aggrecan Moleküle an der Knorpeloberfläche ermöglicht. Zum einen binden diese beiden Moleküle Wasser und halten es auch unter Druck zwischen den Gelenkflächen. Zum anderen bewirkt die Quervernetzung der Kern- und GAG-Moleküle eine Bürstenform. Diese birgt auch gewisse dynamische Vorteile in sich: Unter Druck werden diese Bürsten in sich komprimiert statt ineinander - dadurch wird die Belastung auf die gegenüberliegenden Gelenkflächen reduziert.(28) Die EHL, die durch die rheologischen Eigenschaften der Synovia entsteht, kommt bei Belastung durch große Scherkräfte zu Tragen. Die Synovia ist als Ultrafiltrat des Blutes ein nichtnewtonsches Fluid, sie verändert also belastungsabhängig ihre Viskosität. Unter Druck erhöht sich ihre Dichte und es bilden sich Aggregate. Die so gebildete Schicht schützt die Gelenkflächen und verbessert die Gleitfähigkeit.(3,30,31) Die *weeping lubrication* unterstützt die EHL, indem sie unter Druck Flüssigkeit aus Poren im Knorpel freisetzt. Diese Flüssigkeit wird nach Ende der Belastung wieder in das Gewebe aufgenommen.(28)

1.2 Knorpelschäden und deren klinische Relevanz

Der Fluss von Wasser im Gewebe führt unter normalen Belastungen zur Dämpfung der auf das Gelenk wirkenden Kräfte. Ist die Belastung aber zu groß, führen die durch Strömung entstehenden Scherkräfte zu Schäden an den Chondrozyten und dem Netzwerk aus Makromolekülen der extrazellulären Matrix. Unter normalen Bedingungen fängt die Muskulatur durch Kontraktion einen Teil der auf das Gelenk wirkenden Kraft ab. Ist eine Bewegung ruckartig, kann dieser Mechanismus nicht rechtzeitig greifen. Nicht jede die normale Belastung überschreitende Bewegung schädigt den Knorpel sichtbar, führt aber, besonders bei Wiederholung, zu Veränderungen der extrazellulären Matrix. Die Synthese von Proteoglykanen sinkt, das Kollagen Netzwerk wird instabil und der Knorpel schwillt an. Sind diese Veränderungen eingetreten, bedingen sie sich gegenseitig negativ und das Gewebe verliert an Belastbarkeit.(32–34) Buckwalter teilt Verletzungen des Knorpels in drei Gruppen mit je unterschiedlichen Chancen auf Regeneration ein. (32,34)

Tabelle 1 Einteilung von Knorpelverletzungen nach Buckwalter

Verletzung	Klinisches Erscheinungsbild	Reaktion des Gewebes	Potential zur vollständigen Regeneration
<i>Verletzung der extrazellulären Matrix und/oder Zellen und/oder des subchondralen Knochens ohne sichtbaren Schaden an der Oberfläche</i>	Keine Symptome, bei Verletzung des subchondralen Knochens eventuell Schmerzen	Synthese neuer Matrix, fragliche Zellproliferation Im MRT kann ein Ödem sichtbar sein	Ist die grundlegende Matrixstruktur erhalten, kann sich das Gewebe regenerieren Ist die extrazelluläre Matrix oder die Chondrozytenpopulation schwer geschädigt, kann es zu degenerativen Veränderungen kommen
<i>Verletzung des Knorpels mit sichtbarem Schaden der Oberfläche</i>	Kann mechanische Symptome, Synovitis, Gelenkserguss und Schmerzen verursachen	Keine Bildung eines Fibrinklots, keine Entzündung Synthese neuer Matrix und Zellproliferation, Defekt kann aber nicht vollständig ausgeglichen werden	Je nach Lage, Größe und abhängig von sonstigen Verletzungen des Gelenks, kann der Knorpel degenerieren
<i>Verletzung von Knorpel und Knochen (osteochondrale Fraktur)</i>	Kann mechanische Symptome, Synovitis, Gelenkserguss und Schmerzen verursachen	Bildung eines Fibrinklots, Entzündung, Invasion neuer Zellen und Bildung neues Knochen- und Knorpelersatzgewebes	Je nach Lage, Größe und abhängig von sonstigen Verletzungen des Gelenks, kann das Narbengewebe als funktionsfähige Knorpeloberfläche dienen oder degenerieren

Um die Knorpeloberfläche in einem einzigen Vorgang zu beschädigen sind Kräfte von mehr als 25 N/mm² nötig, also 15 bis 20 N/mm² mehr als auf Knie- und Hüftgelenk unter alltäglichen Bedingungen wirken. (35,36) Verletzungen mit dieser Wucht

betreffen meist nicht isoliert den Gelenkknorpel, sondern sind mit Rissen von Bandstrukturen und Menisken verbunden. Am häufigsten sind hierbei vorderes Kreuzband und medialer Meniskus betroffen. Diese kombinierten Traumata stellen oft Sportverletzungen aktiver Patienten in der Altersgruppe von 20-40 Jahre dar.(37) Folge einer solchen Knieverletzung ist in mehr als 40% der Fälle eine posttraumatische Arthrose, mindestens 12% aller Arthrosen der unteren Extremität sind mit einem Trauma in Verbindung zu setzen.(38)

Die ersten eine Arthrose begünstigenden Veränderungen setzen direkt nach dem Trauma ein. Chondrozyten gehen durch direkte Schäden oder durch Apoptose zu Grunde, Sauerstoffradikale und Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. Die Sauerstoffradikale aus direkt betroffenen Chondrozyten schädigen wiederum benachbarte Chondrozyten und Makromoleküle der extrazellulären Matrix.(38,39) Proinflammatorisch wirken sich Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-17, Matrixmetalloproteasen (MMPs), Stickstoffmonoxid (NO) und Fragmente der extrazellulären Matrix aus. TNF- α verstärkt die Apoptose durch Caspasen. IL-1, -6 und -17 sorgen für eine Reduktion der extrazellulären Matrix, indem IL-1 deren Synthese hemmt und IL-6 und IL-17 den Abbau fördern. Auch die MMPs haben katabole Wirkung, sie bauen Proteoglykane und Kollagenfasern ab. Die dadurch entstehenden Fragmente aktivieren weitere MMPs, was dem Gewebe zunehmend die Stabilität nimmt.(40) Der Verlust von Proteoglykanen geht dem Verlust von Kollagenfasern voran. So lange nur die Proteoglykane betroffen sind ist der Knorpelschaden reversibel. Mit dem Abbau der Kollagenfasern ist allerdings ein irreversibles Stadium erreicht.(41) Lieberthal stellt die These auf, dass die Reaktion nach Trauma bei manchen Patienten nicht ausreichend kontrolliert abläuft und in eine chronische übergeht. So könnte sie eine Arthrose auslösen.(41,42)

Ein weiterer, für die Degeneration eines Gelenks relevanter, aus einer Verletzung resultierender Faktor ist die veränderte mechanische Belastung des Gelenks. Unter normalen Bedingungen belastete Bereiche werden entlastet und andere überbelastet. Dadurch verändert sich die Homöostase im Gelenk, die Matrix wird umgebaut und die normale Funktion des Knorpels kann weiter eingeschränkt werden.(40,43)

Das Besondere an der posttraumatischen Arthrose ist, dass sie die oben bereits erwähnten jungen, aktiven Patienten trifft. Bei dieser Patientengruppe sind

therapeutisch Endoprothesen nicht die erste Wahl, da in Anbetracht der Lebenserwartung mehrere Prothesenwechsel nötig wären.(34,38,44) Kniegelenksverletzungen dieses Ausmaßes sind nicht nur mit Entwicklung einer posttraumatischen Arthrose verbunden, sondern können auch zu Adipositas und reduzierter Lebensqualität führen.(45) Übergewicht ist wiederum ein begünstigender Faktor für die Entwicklung und Verschlechterung einer Arthrose.(44) Gemessen an den so genannten „Years lived with disability“ (YLDs) sind Knie- und Hüftgelenksarthrose auf Platz 11 unter 291 Erkrankungen, die in der Global Burden of Disease 2010 Study erfasst wurden. Kniegelenksarthrose hat dabei eine Prävalenz von 5,0% bei Frauen und 3,0% bei Männern in Mitteleuropa.(46) Zusätzlich zu dem immateriellen Schaden – Schmerzen, körperliche und soziale Einschränkungen und damit reduzierte Lebensqualität - entstehen direkte und indirekte Kosten für das Individuum und die Gesellschaft. Die direkten Kosten entstehen durch die Therapie, die indirekten durch Arbeitsausfälle, reduzierte Leistungsfähigkeit bis hin zu früherem Versterben.(47)

1.3 Therapeutische Möglichkeiten

Um über die geeignete Therapie chondraler oder osteochondraler Defekte zu entscheiden, müssen diese auf Größe und Tiefe beurteilt werden. Diese Einteilung kann beispielsweise nach Noyes und Stabler erfolgen. Sie teilen zuerst je nach Zustand der Knorpeloberfläche in drei Gruppen mit je den Untergruppen A und B. Grad I zeichnet sich durch eine noch intakte Oberfläche aus, wobei Ia einem umschriebenen Defekt mit teilweise erhaltener Elastizität entspricht, während Ib sich durch einen größeren Defekt mit nicht mehr erhaltener Elastizität definiert. Grad II teilt Defekte, die den subchondralen Knochen noch nicht erreichen, nach Tiefe in Prozent der Knorpeldicke ein. Hierbei ordnen Noyes und Stabler Defekte mit einer Tiefe von weniger als 50% der Knorpeldicke Gruppe IIa und mit mehr als 50% Gruppe IIb zu. Grad III definiert sich als einen vollständigen Verlust des hyalinen Knorpels im Defekt, wobei sich bei IIIa der subchondrale Knochen als intakt darstellt, während er bei IIIb mitbeteiligt ist. Eine grafische Darstellung dieser Einteilung zeigt Abbildung 3. Weitere viel genutzte Einteilungen sind die der „International Cartilage Research Society“ (ICRS) und die Klassifikation nach Outerbridge.(48–50)

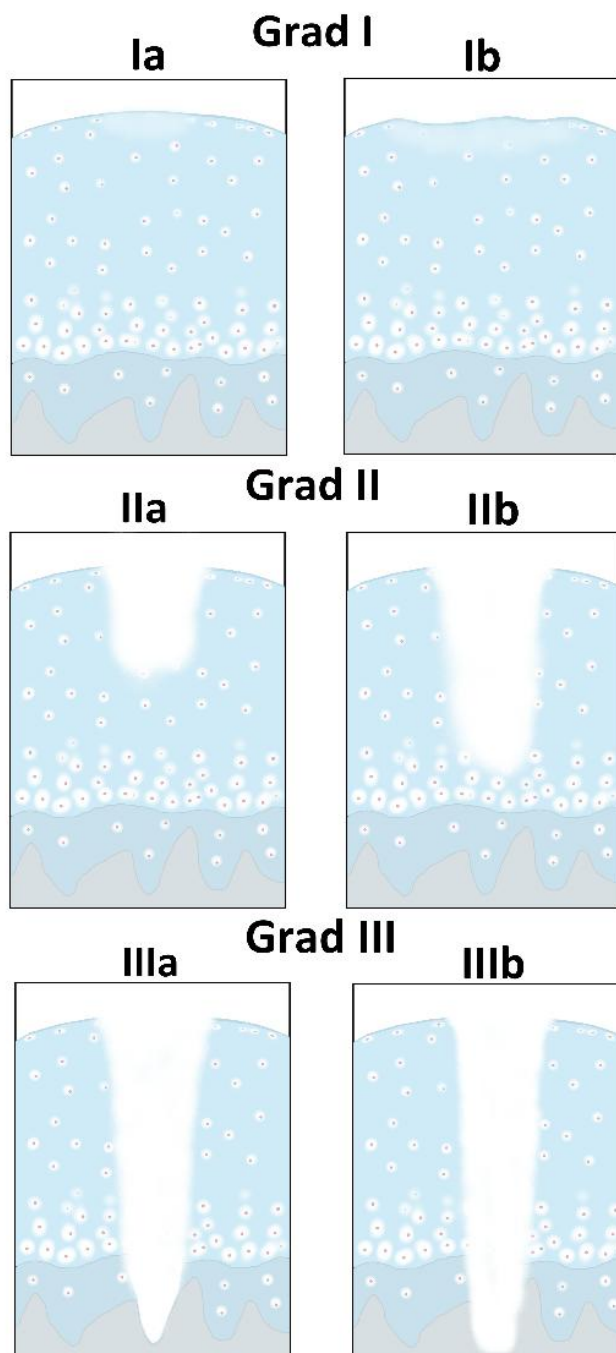


Abbildung 3: Einteilung der Knorpeldefekte nach Noyes und Stabler (48,50)

Grad Ia: umschriebener Defekt mit intakter Knorpeloberfläche und teilweise erhaltener Elastizität; entspricht ICRS-Grad 0

Grad Ib: großflächiger Defekt mit intakter Oberfläche, aber nicht mehr erhaltener Elastizität; entspricht ICRS-Grad 1a

Grad IIa: Defekt kleiner 50% der Knorpeldicke; entspricht ICRS-Grad 2

Grad IIb: Defekt tiefer als 50% der Knorpeldicke; entspricht ICRS-Grad 3a/b

Grad IIIa: Subchondraler Knochen intakt; entspricht ICRS-Grad 3c

Grad IIIb: Subchondraler Knochen ausgemuldet; entspricht ICRS-Grad 4a/b

1.3.1 Mikrofrakturierung

Die Mikrofrakturierung wurde 1994 von Steadman et al. beschrieben und macht sich den natürlichen Heilungsvorgang einer osteochondralen Fraktur zu nutzen. Diese Methode kann einzeitig und arthroskopisch durchgeführt werden. Zuerst wird ein stabil begrenzter Defekt geschaffen, indem ein Debridement des instabilen Knorpels vorgenommen wird. Der subchondrale Knochen wird in diesem Bereich sauber freigelegt und dann mit einer speziellen Ahle im Abstand von 3-4 mm und mit einer Tiefe von 2-4 mm eröffnet. Es sollen dabei unbedingt Stege der Oberfläche des subchondralen Knochens erhalten bleiben, um die Form der Gelenkfläche nicht zu verändern. Aus den entstandenen Löchern tritt Knochenmark aus und sammelt sich im Defekt. Der sich bildende Klot wird als „*super clot*“ bezeichnet und enthält pluripotente Stammzellen.(51–53) Die Mikrofrakturierung eignet sich insbesondere für junge Patienten (<40), mit isolierten Läsionen unter 4 cm².(52,54,55) Als Kontraindikation gelten Fehlstellungen, mangelnde Compliance, ein nicht alle Schichten umfassender Knorpeldefekt, die Unfähigkeit das andere Bein in der Rehabilitation zu belasten und als relative Kontraindikation gilt ein Alter über 60.(51) In einigen Studien wird beschrieben, dass sich die Beschwerden der Patienten nach Mikrofrakturierung zwar initial für ein bis zwei Jahre postoperativ verbessern, dann aber wieder verschlechtern. Trotzdem stellen auch diese Studien eine anhaltende Verbesserung gegenüber dem präoperativen Zustand fest. Histologisch lässt sich in den ersten 24 Monaten nach dem Eingriff bei 33 bis 57% der Patienten Faserknorpel statt hyalinem Knorpel nachweisen. Bei 39- 64% findet sich im Defekt ein Mischtyp aus hyalinem und Faserknorpel.(52,54,56)

Als Erweiterung der Mikrofrakturierung kann die autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC), die 2010 von Benthien und Behrens beschrieben wurde, angesehen werden.(57,58) Bei dieser Technik wird der bei der klassischen Mikrofrakturierung entstandene Klot mit einer Membran aus Kollagen I und III bedeckt. Die Membran kann sowohl mit Nähten als auch mit Fibrinkleber fixiert werden.(59) Die Membran soll zum einen die Zellen im Klot an Ort und Stelle halten und mechanisch schützen, zum anderen führt ihre Zusammensetzung nachweislich zu einer besseren Differenzierung der Zellen.(52,58,60) In ihrer ersten Beschreibung sehen Benthien und Behrens ihre Technik für vollschichtige Knorpeldefekte und osteochondralen Läsionen mit einer maximalen Größe von 1,5 cm² vor.(58) Eine Studie von Volz et al.

zeigt aber auch deutlich verbesserte Ergebnisse der AMIC bei Patienten mit mittlerer Defektgröße von 3,6 cm². Im Vergleich zur klassischen Mikrofrakturierung zeigen Patienten dieser Studie nach fünf Jahren bessere Ergebnisse im Hinblick auf Schmerz, Funktionalität und MRT-Befunde. Bei den zwei Patienten bei denen eine Biopsie nach zwei Jahren möglich war, wurde Faserknorpel im Defekt gefunden.(59)

1.3.2 Osteochondrale autologe Transplantationssysteme

Die osteochondrale autologe Transplantation wurde 1993 das erste Mal beschrieben.(61) Sie kann je nach Lokalisation des Defekts arthroskopisch oder offen chirurgisch durchgeführt werden.(55,61) Die Idee hinter der Technik ist, einen größeren, vollschichtigen Defekt in einem stark belasteten Areal mit mehreren kleineren Knorpel-Knochenzylindern aus wenig belasteten Abschnitten des Gelenks zu füllen. Die kleineren Defekte können besser abheilen und der belastete Anteil ist wieder mit physiologisch aufgebautem Knorpel bedeckt.(56,62,63) Die Transplantate werden bei einem offen chirurgischen Eingriff aus der Peripherie der Femurkondylen und bei der arthroskopischen Durchführung vom medialen Rand der medialen Kondyle entnommen. Sie haben in etwa einen Durchmesser von 2,7 bis 8,5 mm und eine Länge von 15 mm bei Defekten mit intaktem subchondralem Knochen. Ist der Knochen mitbetroffen, werden die Zylinder in einer Länge von ca. 25 mm entnommen. Die Transplantate werden in den Defekt eingepasst und der Zugangsweg geschlossen.(62) Indiziert ist das osteochondrale autologe Transplantationssystem bei Läsionen bis zu einer Größe von 4 cm², es kann aber in Ausnahmefällen auch bei 8-9 cm² großen Defekten angewendet werden und wird dann als Mega-OATS bezeichnet. (62,64) Wie bei der Mikrofrakturierung spielen Patientenalter, -ansprüche und Compliance eine wichtige Rolle bei der Indikationsstellung.(52) Ein Risiko des Eingriffs sind Schmerzen im Bereich der Entnahmestellen der Knorpelzylinder. Diese wurden in einer Studie von László Hangody und Péter Füles allerdings nur bei 3% der Patienten und nur vorübergehend im ersten Jahr postoperativ festgestellt werden.(65) Histologische Untersuchungen von Biopsien im Rahmen einer second look Arthroskopie zeigen einen hohen Anteil an Kollagen II und Proteoglycanen im ehemaligen Defekt.(65)

1.3.3 Autologe Chondrozytentransplantation

Die autologe Chondrozytentransplantation oder -implantation (ACI) wurde erstmals 1987 von Brittberg et al. durchgeführt und seitdem um mehrere Generationen erweitert.(66,67) Grundlage jeder ACI ist die arthroskopische Entnahme von Chondrozyten an einer wenig gewichttragenden Stelle des verletzten Kniegelenks. Bevorzugte Entnahmestelle ist hierbei die obere mediale Femurkondyle, aber auch die obere laterale Femurkondyle und die Fossa intercondylaris femoris können genutzt werden. Entnommen werden ca. 300-500 mg Knorpel.(66,68) Liegt eine Meniskusverletzung vor, kann diese im Anschluss an die Knorpelentnahme in der ersten OP versorgt werden. Verletzungen der Bandstrukturen werden im Rahmen der zweiten OP korrigiert.(68) Nach der Entnahme werden die Chondrozyten enzymatisch isoliert und in Zellkulturen vermehrt.(48,69) Nach 14 bis 21 Tagen können die Zellen implantiert werden.(66) Bei dem von Brittberg etablierten Verfahren der ersten Generation (P-ACI) wird in einem zweiten, offenen Eingriff ein Periostlappen in Größe des Defekts von der proximalen Tibia entnommen. Der Defekt wird debridiert und ein möglichst gesunder und stabiler Rand aus gesundem Knorpel freigelegt. Der Periostlappen wird mit Nähten fixiert und die Zellsuspension darunter gespritzt.(66,69,70) Um das Periost wasserdicht mit dem Knorpel zu verbinden kann das Verfahren auch mit Fibrinkleber durchgeführt werden.(67) Probleme der ersten Generation der ACI sind das Austreten der Zellen aus dem Defekt, ungleichmäßige Verteilung im Defekt und das Auftreten von Hypertrophien des Periostlappens.(69,70)

Die ACI der zweiten Generation oder ACI-C versucht das Problem der Periosthypertrophie zu lösen, indem der Periostlappen durch eine Kollagen I/III Membran ersetzt wird.(69) Die Membran wird aus Peritoneum und Haut vom Schwein hergestellt und wird innerhalb weniger Monate nach Implantation vollständig resorbiert.(71)

Die ACI der dritten Generation beinhaltet die matrixassoziierte ACI (MACI) und auf Scaffolds basierende Methoden. Beide Konzepte sollen zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Zellen im Defekt führen, sind arthroskopisch oder mit Miniarthrotomie durchführbar und in einigen Fällen durch die Haftung ohne Suturen weniger zeitaufwendig.(70,72,73) Bei der MACI-Methode werden Chondrozyten nach ca. 4 Wochen Zellkultivierung und Expansion auf eine Kollagen I/III Membran gegeben und

mit Fibrinkleber im Defekt fixiert. Die Membran wird aus peritonealem Gewebe von Schweinen produziert. Die zum Defekt gerichtete Seite ist rau und ermöglicht den Zellen eine bessere Haftung, die zum Gelenkspalt gerichtete Seite ist glatt und für die Chondrozyten undurchlässig.(67,72) Die dreidimensionalen Scaffoldssysteme sollen einen positiven Effekt auf den chondrozytären Phänotyp der implantierten Zellen haben.(74,75) Für den Einsatz im Menschen sind protein- und kohlenhydratbasierte Scaffolds typisch.(75) Ein Beispiel ist Hyalograft® C ein aus einem aus HYAFF 11 und autologen Chondrozyten bestehendes Autograft, das arthroskopisch implantiert werden kann. HYAFF 11 ist ein auf Hyaluronan basierendes Biopolymer, das ohne Entzündungsreaktion komplett resorbierbar ist.(76,77)

Eine Methode ohne den Einsatz von körperfremdem Material ist die Chondrosphere® Technik, die in Deutschland seit 2004 lizenziert ist.(78) Das Verfahren ist für große Knorpeldefekte von 4 bis 10 cm² mit einem ICRS von III oder IV konzipiert.(78–80) Der entnommene Knorpel wird mit Collagenase Typ II verdaut und autologes Patientenserum dem Kulturmedium hinzugefügt. Die Chondrozyten werden in Monolayerkulturen expandiert und dann in Dosen von 2×10^5 in Hydrogel-beschichtete 96-well Platten gegeben.(78,81) Anderer und Libera beschreiben, wie die Chondrozyten dort innerhalb eines Tages zu Scheiben mit einem Durchmesser von 900-1200 μm aggregieren, die sich im Laufe von 14 Tagen zu Sphäroiden mit einem Durchmesser von 350-500 μm verdichten und abrunden. Die in der Monolayerkultur verlorenen Fähigkeiten der Zellen zur Produktion von Kollagen II und Expression von Protein S-100 konnten von ihnen in der 3D Kultur wieder nachgewiesen werden. Zudem konnten sie mit einer Safranin O Färbung die für hyalinen Knorpel typischen Proteoglykane sichtbar machen.(81) Sechs bis acht Wochen nach Entnahme des Knorpelgewebes werden die Sphäroide arthroskopisch oder mithilfe einer Miniarthrotomie in den Defekt eingebracht.(78,79,82–84) Sie bleiben innerhalb von 15-20 Minuten selbst auf dem zuvor debridierten Defekt haften.(48,82–84) Standardmäßig werden 10 – 70 Sphäroide pro cm² in den Defekt gegeben. Eine Studie von Becher et al. konnte nach drei Jahren keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten die mit 3-7, 10-30 oder 40-70 Sphäroiden/cm² behandelt wurden zeigen.(78,80) Im Rahmen mehrerer second-look Arthroskopien 6-72 Monate nach Implantation der Sphäroide beschrieben Siebold et al. bei 91,3 % der Fälle normales oder annähernd normales Gewebe im Defekt. Die behandelten Defekte hatten einen

Größenspielraum zwischen 0,5 und 20 cm², befanden sich in den meisten Fällen an der medialen Femurkondyle und wurden als ICRS II-III bewertet. Eine gute Integration des regenerierten Gewebes in den umliegenden Knorpel konnte in 80,7% der Läsionen festgestellt werden. Das Knorpelgewebe im Defekt wurde in den meisten Fällen als minimal weicher als gesunder Knorpel beschrieben, was laut Autoren auch an dem geringen Zeitraum zwischen Implantation und second-look Arthroskopie liegen könnte.(82)

1.3.4 Vergleich verschiedener Verfahren

Der Vergleich der verschiedenen beschriebenen Therapieverfahren zeigt sich aus mehreren Gründen problematisch. Aus ethischen Gründen kann keine Vergleichsgruppe ohne Therapie geführt werden und die unterschiedlichen Verfahren sind für unterschiedlich große Defekte empfohlen, wodurch die Patienten von vornherein sehr unterschiedliche Ausgangsparameter aufweisen können.(78) Bei einem Vergleich zwischen Mikrofrakturierung oder OATS und ACI ist es nicht möglich die Patienten zu verblinden, da sich die Anzahl der notwendigen Operationen unterscheidet. Ein Placeboeffekt kann somit nicht ausgeschlossen werden.(84) Eine weitere Schwierigkeit ist, dass Second-look Arthroskopien, die mit Biopsien der Transplantate verbunden werden können, nicht bei allen Patienten durchgeführt werden, sondern insbesondere wenn Symptome vorliegen. Ist das Ergebnis also wie gewünscht – ein symptomfreier Patient - gibt es oft keine Biopsie und keine Aussage über Aussehen und Festigkeit des Regenerats.(82,85,86) Mehrere Autoren kritisieren das Fehlen großer randomisiert kontrollierter Studien in denen die verschiedenen Formen der ACI miteinander verglichen werden. Besonders zwischen den verschiedenen Produkten der dritten Generation gibt es bisher keine Vergleichsmöglichkeiten.(85–88) Deutlich gezeigt werden konnte, dass die ACI der ersten Generation eine hohe Inzidenz an Periosthypertrophien aufweist, die einen großen Anteil der Folgeeingriffe nötig macht. Diese Folgeeingriffe konnte von 27% in der ersten Generation auf weniger als 10% in den späteren Generationen reduziert werden.(69,85) Des Weiteren wurde ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an fehlgeschlagenen Eingriffen zwischen offener (6,1%) und arthroskopischer (0,83%) ACI gefunden. Nach ACI mit Arthrotomie waren in 20% der Fälle erneute Eingriffe nötig, nach arthroskopischer in 1,4%. Arthrofibrosen traten nach Arthrotomie in 2,7% der Fälle auf und konnten nach arthroskopischen Eingriffen in keinem Fall

nachgewiesen werden.(85) Eine randomisierte multizentrische Studie von Knutsen et al., die P-ACI mit Mikrofrakturierung in einer Verlaufskontrolle von 14 bis 15 Jahren vergleicht, zeigt keinen signifikanten Unterschied im Erfolg beider Methoden bei Patienten mit einer chronischen, symptomatischen Läsion ohne großflächige Anzeichen für Osteoarthritis. Die Therapie versagte bei 42,5% (17/40) der Patienten der ACI Gruppe und 32,5% (13/40) der Gruppe mit Mikrofrakturierung. Therapieversagen wurde als Notwendigkeit einer Reoperation definiert, wobei das Abtragen von hypertrophem Gewebe nicht als Therapieversagen gewertet wurde. Die Patienten mit erfolgreicher Therapie zeigten in beiden Gruppen eine deutliche Verbesserung der klinischen Scores, davon zeigten allerdings ca. 50% Frühzeichen einer Arthritis im Röntgen. Nach fünf Jahren hatte bei keinem der Patienten mit hauptsächlich als hyalin bewertetem Knorpel im Defekt die Therapie versagt, nach 15 Jahren bei einem. Durch die geringe Größe der Gruppe lässt sich ein Zusammenhang nicht sicher nachweisen.(89,90) Hoburg et al. führten eine randomisierte kontrollierte Studie durch, die bestätigen sollte, dass die sphäroidbasierte ACI der Mikrofrakturierung bei Defekten einer Größenordnung zwischen 1 und 4 cm² nicht unterliegt. Obwohl Mikrofrakturierung bei dieser Defektgröße anerkanntermaßen gute klinische Ergebnisse erzielt und ACI für größere Läsionen empfohlen wird, konnten Hoburg et al. nicht nur zeigen, dass die ACI der Mikrofrakturierung nicht unterlegen ist, sondern in einzelnen Teilbereichen des Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Scores (KOOS) überlegen. Dieser ist konzipiert Kurz- und Langzeitsymptome und Funktion des betroffenen Gelenks bei jungen und/oder sehr aktiven Patienten zu evaluieren.(84,91) Der statistische Nachweis für eine Überlegenheit der ACI im Hinblick auf den gesamten KOOS wurde nur knapp verpasst.(84)

DiBartola et al. konnten in einer Metaanalyse keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einem guten klinischen Ergebnis eines Eingriffs und dem ICRS Score der Biopsie finden. Allerdings stellten sie eine statistisch signifikante Korrelation zwischen prozentualer Veränderung der klinischen Parameter und Prozentanteil an Biopsien mit ausschließlich hyalinem Knorpel fest. Ihre Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse ergab, dass die Mikrofrakturierung in den meisten Fällen zu reinem Faserknorpel führt, der nicht, wie das gemischte Gewebe nach P-, C-ACI oder MACI, mit zunehmender Zeit postoperativ dem hyalinen Knorpel ähnlicher wird. (86)

Grevenstein et al. konnten in einer aktuellen Fallstudie erste histologische, histochemische und immunhistologische Ergebnisse von Patienten nach sphäroidbasierter ACI vorstellen. Alle Patienten wurden aufgrund einer traumatischen Knorpelläsion der medialen Femurkondyle behandelt. Die Biopsien wurden fünfeinhalb bis 16 Monate nach Implantation im Rahmen von Reoperationen entnommen. Alle Biopsien zeigten Zellen mit chondrozytärem Phänotyp die in Clustern in avaskulärem Knorpelgewebe lagen. In drei der fünf Patienten war die typische Struktur des Gelenkknorpels mit abgeflachten Zellen in der Superfizialschicht nachweisbar. Diese Patienten zeigten damit übereinstimmend eine in den tiefen Schichten starke Anfärbung mit Alcianblau, die Richtung Gelenkspalt abnahm. Diese Färbung weist Glykosaminoglykane und Mucopolysaccharide in der ECM nach und ihre Intensität lässt Schlüsse auf deren Verteilung zu. Bei den übrigen Patienten war die Färbung durchgehend homogen. Aggrecan konnte bei allen Patienten intensiv angefärbt werden und auch Kollagen II wurde in allen Biopsien, bis auf eine bei der kein Material mehr vorhanden war, nachgewiesen. In keiner Patientenprobe konnte Kollagen 10 als Zeichen für hypertrophe Chondrozyten immunhistochemisch angefärbt werden. Grevenstein et al. kommen aufgrund dieser Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass das durch sphäroidbasierte ACI generierte Gewebe dem gesunden Gelenkknorpel stark ähnelt.(83) Vergleichend konnte eine Studie von Enea et al. in nur 21% ihrer Biopsien nach MACI hyalinem Knorpel ähnliches Gewebe nachweisen.(92)

Zwischen den verschiedenen neuen Formen der ACI gibt es wie bereits erwähnt keine vergleichenden Studien. Aus mehreren Gründen abgesehen von den guten klinischen und histologischen Ergebnissen, könnte die sphäroidbasierte ACI anderen dreidimensional kultivierten Transplantationssystemen überlegen sein. Da die Sphäroide ohne die Verwendung von Scaffolds, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren hergestellt werden, können sie keine Immunreaktion auslösen und unterliegen keinen Zulassungsbeschränkungen.(81) Auch die Problematiken der Scaffolds – der Abbau muss zeitlich passend zum Aufbau neuer Matrix sein, Abbauprodukte dürfen umliegende Zellen nicht schädigen, das Konstrukt muss trotz allmählichem Abbau Stabilität bis zur ausreichenden Ausreifung von Zellen und Matrix bieten – sind bei den Sphäroiden keine Einschränkungen.(75,81)

1.4 Morphologie des Zellkerns in verschiedenen Zuständen

1.4.1 Aufbau und Funktion des Nukleus

Der Nucleus enthält und organisiert das Genom einer Zelle. Seine Form wird durch die Organisation des Chromatins, die Kernmembran und das Zytoskelett aufrechterhalten. Veränderungen oder Schäden an diesen Komponenten können zu einer Störung der Transkription und Schäden an der DNA führen.(93,94) Veränderungen der Zellkernform können Teil eines physiologischen Vorgangs sein, wie im Fall der Chondrozyten als Anpassung an Belastung oder eines pathologischen, wie es bei Krebserkrankungen zu beobachten ist.(94,95) Die Form des Kerns wird durch Chromatin, Laminine und das Zytoskelett bestimmt. Chromatin verhält sich wie eine Feder bei Verformungen des Kerns in geringem Ausmaß, während Laminin A unter solchen Gegebenheiten leicht nachgibt, dafür unter größeren Krafteinwirkungen Stabilität gibt. Das Zytoskelett wirkt von außen auf den Kern und kann ihn sowohl stabilisieren als auch destabilisieren.(93) Das Chromatin kann als Hetero- oder Euchromatin organisiert sein. Im Heterochromatin ist die DNA dicht gepackt und wird nicht transkribiert, es findet sich meist in der Peripherie des Kerns. Die DNA im Euchromatin ist locker organisiert und kann so leichter abgelesen werden.(94) Heterochromatin stabilisiert die Kernform, während ein Hetero- zu Euchromatinverhältnis zugunsten von Euchromatin zu abnormalen Kernformen oder Kernrupturen führen kann.(93)

1.4.2 Morphologische Merkmale des Nukleus in verschiedenen Zuständen

Der Zellkern eines Chondrozyten in intaktem Knorpel wird lichtmikroskopisch betrachtet als rund bis oval beschrieben.(16) Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine weniger homogene Kernform, Untersuchungen älterer Chondrozyten zeigen gelappte und unregelmäßige Kerne.(96)

Durchläuft ein Chondrozyt die Apoptose zeigen sich elektronenmikroskopisch sichtbare Kernveränderungen. In frühen Stadien weicht das Chromatin Richtung Kernmembran. Im nächsten Schritt formt es kompakte, große Flecken. In der Spätphase ist der gesamte Kern homogen verdichtet.(97)

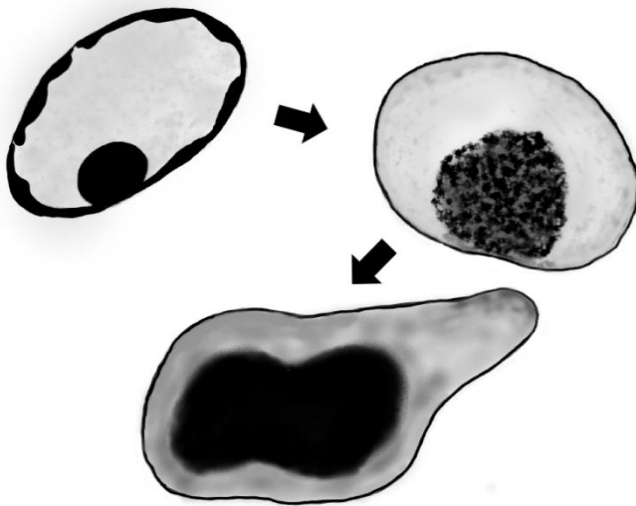


Abbildung 4: Stufen der Apoptose; Zeichnung nach elektronenmikroskopischen Bildern aus einer Arbeit von Battistelli et al. (97)

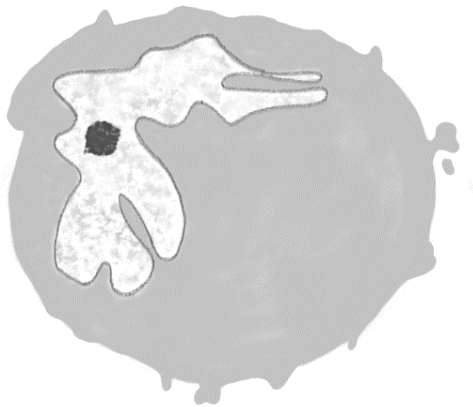


Abbildung 5: Chondrozyt in dreidimensionaler Zellkultur, zu beachten ist der gelappte Nukleus; Zeichnung nachelektronenmikroskopischen Bildern aus einer Arbeit von Battistelli et al. (97)

In vivo zeigen sich selten Chondrozyten mit den klassischen Zeichen der Apoptose, hier ist häufiger eine Art des programmierten Zelltods beschrieben, die Roach et al. als Chondroptose bezeichnen. Sie hat den Vorteil, im Gegensatz zur Apoptose, nicht von Phagozytose abhängig zu sein, was bei der Lage der Chondrozyten in Lacunen praktisch erscheint. Wie bei der Apoptose verdichtet sich das Chromatin und der Kern schrumpft. Das Chromatin bildet aber keine großen soliden Ablagerungen, sondern kleinere, im Kern verteilte. Der Kern chondroptotischer Chondrozyten zeigt sich oft gelappt. Unter statischer Belastung verändern sich Zell- und Kernform, was mit veränderter Syntheseleistung der Zellen korreliert.(95,98) Chondrozyten aus dreidimensionalen Kultursystemen zeigten teilweise runde, teilweise stark gelappte Kerne.(97,99–101)

1.5 Virtuelle Mikroskopie und automatische Bildauswertung

Anzahl, Form und weitere morphologische Aspekte der Zellkerne eines Gewebes geben Auskunft über dessen Zustand. Veränderungen dieser Komponenten in verschiedenen Stadien des Zellzyklus, im Rahmen der Zellalterung, so wie bei Erkrankungen und als Reaktion auf Medikamentengabe führen zu lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen des Zellkerns.(102,103) Quantifiziert man diese Variablen können Vergleiche zwischen Proben angestellt werden. Die pathologische Auswertung eines Präparats beruht auf deskriptiven Aspekten mit dem Nachteil der Subjektivität und hohem Zeitaufwand.(104–106) Mit zunehmendem technischen Fortschritt, sowohl im Bereich der Digitalisierung histologischer Präparate, als auch der automatischen Bildanalyse, entstehen neue Möglichkeiten der Quantifizierung und Objektivierung histologischen Materials.(104)

1.5.1 Digitale Präparate und virtuelle Mikroskopie

Die *Whole-Slide* Scanner ermöglichen es ganze Präparate zu digitalisieren und sowohl in Bildbearbeitungsprogrammen zu markieren und zu bearbeiten als auch in hoher Bildqualität für automatische Bildanalysen zu nutzen. Die Präparate können außerdem beispielsweise in einer Cloud gespeichert werden, was den Zugriff von verschiedenen Standorten aus ermöglicht. Für die Diagnostik bedeutet dies größere örtliche und zeitliche Flexibilität bei der Anforderung von Zweitmeinungen oder Spezialisten. Für die Forschung erleichtert es die Zusammenarbeit über große Distanzen, ohne die Risiken des Transports. Präparate können gleichzeitig mikroskopiert werden, was den Austausch und die Diskussion neuer Erkenntnisse erleichtert.(104) Ein weiterer Vorteil durch das digitale Format ist, dass ein einzelnes Präparat in der digitalen Mikroskopie für unbegrenzt viele Studenten zugänglich gemacht werden kann. Dies erspart die mühsame und zeitaufwendige Zusammenstellung von Präparatkästen mit gleichwertigen Präparaten. Auch seltene Pathologien können so leichter für alle zur Mikroskopie bereitgestellt werden.(104,107) Schwierig und kostspielig bleibt bislang der Umgang mit den großen Datenmengen. (104)

Die entscheidende Frage für den zukünftigen Stellenwert der digitalisierten Präparate ist die nach der Vergleichbarkeit in der Qualität der Diagnostik. Präparate müssen in

gescannter Form mindestens genauso gut und bequem beurteilbar sein wie sie es lichtmikroskopisch sind.(104) Für mehrere Bereiche, unter anderem Pathologien der Mamma und Dermatologie, wurden bereits Studien zum Vergleich der Intra- und Interobserverreliabilität der virtuellen Mikroskopie mit der konventionellen Lichtmikroskopie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine gute Vergleichbarkeit. (108–110)

1.5.2 Automatische Bildanalyse

Im Hinblick auf therapierelevante Klassifikationen, besonders in der Tumorpathologie, ist eine hohe Interraterreliabilität erstrebenswert, verschiedene Untersucher sollen also auf ein möglichst gleiches Ergebnis kommen. Vorgegebene Bildverarbeitungsschritte und automatische Bildanalyse sollen dies erleichtern, indem sie Ergebnisse quantifizieren und so die Einteilung in definierte Kategorien ermöglichen.(104,106) Technische Grundlage der automatischen Bildanalyse sind künstliche neuronale Netzwerke, die dem Konzept des menschlichen Denkens und Lernens nachempfunden sind und die Mustererkennung. Die für die digitale Pathologie relevante Unterform der künstlichen neuronalen Netzwerke ist das sogenannte *Deep Learning*. Die Funktionsweise des *Deep Learning* basiert auf einer Vielzahl aufeinander aufbauender Verarbeitungsschichten. Für den Nutzer sichtbar ist dabei die Input-Schicht, in die er seine Daten eingibt und die Output-Schicht, die der Algorithmus nach Verarbeitung auf mehreren hundert *hidden Layers*, also für den Nutzer nicht sichtbaren Schichten, zurückgibt. Speziell für die Analyse von Bildmaterial eignen sich sogenannte *Convolutional Neural Networks* (CNN).(111,112) CNNs bestehen aus convolutional layers und pooling layers, wobei erstere in Form von Filtern nach bestimmten Eigenschaften in Rasterausschnitten des ursprünglichen Bildes suchen und zweitere Eigenschaften zusammenfassen, um die Menge an Daten zu reduzieren.(113) Ein weiterer wichtiger Bestandteil der automatischen Bildanalyse ist die semantische Segmentierung die jedes Pixel einer Klasse zuordnet und so eine Einteilung in Bildbestandteile, zum Beispiel Zellkerne und Stroma, möglich macht. Um diese Klassen unterscheiden zu können, muss das CNN sie erst erlernen. Hierfür ist die manuelle Markierung von Datensätzen nötig.(111)

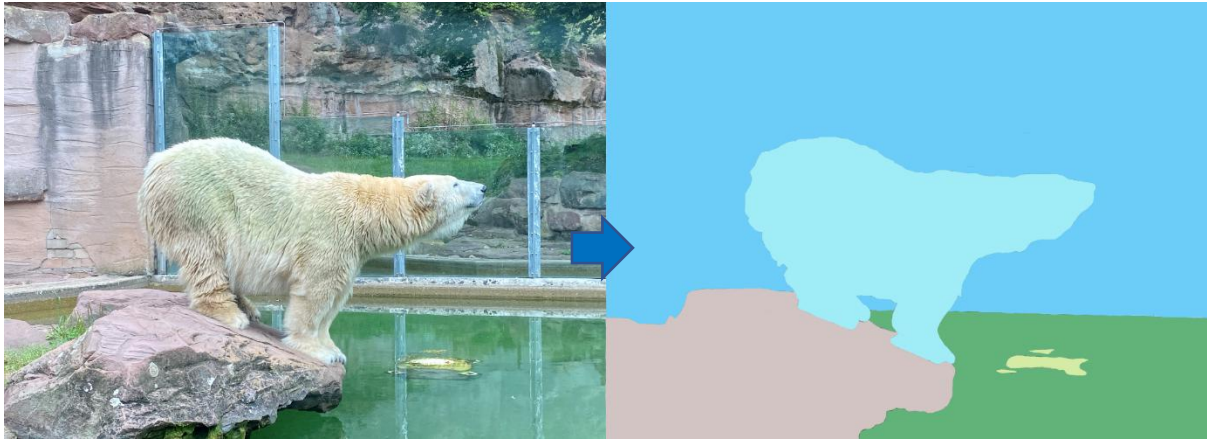


Abbildung 6: Semantische Segmentierung: Aufteilung des Bildes in Eisbär, Wasser, Seerosen, Stein und Hintergrund

1.6 Fragestellung

Die aktuelle Literatur gibt Hinweise darauf, dass die sphäroidbasierte ACT einen günstigen Einfluss auf den morphologischen Outcome hat. Daher soll in der vorliegenden Arbeit die Morphologie der Sphäroide histologisch und ultrastrukturell untersucht und mit neuen Methoden der Bildanalyse evaluiert werden, um das Verständnis möglicher Strukturmerkmale für eine gute Regeneration zu verbessern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Bei den verwendeten Proben handelt es sich um bei der sphäroidbasierten ACT überschüssige Sphäroide. Aufgrund der geringen Häufigkeit dieses Eingriffes wurden die Proben über einen längeren Zeitraum gesammelt und im Januar 2019 zusammengefasst bearbeitet. Überschüssige Sphäroide konnten bei 15 Patienten sichergestellt werden, wobei bei drei Patienten jeweils zwei getrennte Applikationsspritzen eingeschickt wurden. Die Sphäroide kamen teilweise in Formalin gespritzt, teilweise noch in der Applikationsspritze und in dieser in Formalin getaucht aus der orthopädisch-traumatologischen Praxis (OTP) Mainz. Die Proben waren mit einer Identifikationsnummer versehen und wurden in zufälliger Reihenfolge geöffnet, eingebettet und mit einer Probennummer nach aufsteigender Reihenfolge versehen. Waren in einem Probengefäß zwei einzelne Spritzen wurden diesen zufällig der Zusatz „A“ und „B“ zugeteilt. Alle einzelnen oder nicht mehr in einer Applikationsspritze befindlichen Proben wurden mit dem Zusatz „A“ versehen. Die HE-Präparate wurden mit „HE#-Nummer des Patienten-“ gekennzeichnet. Die Semidünnschnittpräparate wurden mit der Nummer des Patienten und dem Zusatz A1/A2/A3 versehen, um die einzelnen Sphäroide zu benennen.

2.1.2 Geräte und Materialien

2.1.2.1 Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Technische Daten	Hersteller/Lieferant
Einbettautomat	Reichert-Jung Lynx Microscopy Tissue Processor	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Heizschrank	Julabo WS 100	JULABO GmbH Seelbach, Deutschland
Heizplatte	Präzitherm	Störk-Tronic, Störk GmbH & Co. KG Stuttgart, Deutschland
Ph-Meter	WTW pH537	WTW Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG.
Waage	Sartorius	Sartorius AG

		Göttingen, Deutschland
Diamantmesser	Histo DiATOME 6mm 45°	Diatome
Diamantmesser	Ultra DiATOME 3mm 45°	Diatome
Lichtmikroskop	Leitz LABORLUX S	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Stereolupe	Leica WILD M3Z	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Ultramikrotom	Reichert Ultracut S	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
PreciPoint Mikroskop und Scanner	M8	PreciPoint GmbH Freising, Deutschland
Scanner	Pannoramic 250	3DHISTECH Ltd. Budapest, Ungarn
Transmissions-Elektronenmikroskop	Leo 912 AB	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Entwässerungsautomat	Leica ASP300S	Leica Biosystems Wetzlar, Deutschland
Ausgießstation	Thermo Scientific HistoStar	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts
Färbeautomat	Tissue-Tek Glas und Tissue-Tek Prisma	Sakura FineTechnical Co. Ltd. Tokyo, Japan
Wasserbad	pfmmedical	Pfmmedical AG Köln, Deutschland
Kälteplatte	PARA COOLER A	Weinkauf Medizintechnik Hallerndorf, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica AS HistoCore AUTOCUT	Leica Biosystems Wetzlar, Deutschland
Färbeautomat IH	VENTANA BenchMark ULTRA	Roche Deutschland Holding GmbH Grenzach-Wyhlen, Deutschland

2.1.2.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Material	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Deckgläser	6311567	Menzel
Objektträger		LABOCON

Objektträger		Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH Edermünde Deutschland
Objektträger SuperFrost Plus	LA-03/0060	Thermo Scientific Menzel-Gläser
Pinzette	0103-7-P0	Dumont
Rasierklingen	72004	Sience-Services; München
Filterpapier Nr. 597 70mm	10311808	Whatman
Filterpapier Nr. 4 70mm	1004-070	Thatman
Becherglas 25ml	2131120	Schott
Becherglas 50ml	2131121	Qualilab
Becherglas 100ml	2131122	Qualilab
Becherglas 250ml	2131124	Qualilab
Becherglas 600ml	2131126	Qualilab
Becherglas 1000ml	2131128	Qualilab
Petrischale 80mm Glas	391-0577	VWR
Pasteurpipette 150mm	612-1701	VWR
Kupfergrids 200 Mesh	T200H-Cu	Sience-Services, München

2.1.2.3 Verwendete Reagenzien

Reagenz	Produkt Nr.	Hersteller/ Lieferant
Aqua bidest.		Herstellung durch das Institut der Pathologie Regensburg mit Geräten der Quarztechnische Werkstätten GmbH
Natriumcacodylat 3 hydrat	12310	EMS
Saccharose	21600	EMS
Glutaraldehyd-Lösung 25%	16400	EMS
Paraformaldehyd	19200	EMS
Magesiumchlorid-6-hydrat	105833	Merck
Calciumchlorid-dihydrat	102382	Merck
Osmiumtetroxid	19110	EMS
Ethanol	32205	Sigma Aldrich
1,2-Propylenoxid	110205	Sigma Aldrich
Embed-812	14900	EMS
DDSA	13710	EMS
NMA	19000	EMS
DMP-30	13600	EMS

Toludinblau	R1727	AGAR Scientific (PLANO)
Natriumtetraborat-10-hydrat	770	Poysciences
Fuchsin	635	Poysciences
Uranylacetat Dihydrate	73943	Sigma Aldrich (Fluka)
Urostatin 2	16705530	LEICA
Shandon Cytolock Reagenz #1	52287	Thermo scientific
Shandon Cytolock Reagenz #2	52288	Thermo scientific
Agarose (low melting)	15517030	Invitrogen
HCl-Alkohol 0,22%		
Isopropanol 100%	ISOP-5000-100-1	Liquid Production GmbH
Eosin G	115935	Merck
Meyers Hämaunlösung	109249	Merck
Perjodsäure	20593	VWR
Pikrofuchsin	2,00E-050	Waldeck
Ammoniumsulfid	105442	Merck
Eisen-Hämatoxylin Weigert A	0	Waldeck
Eisen-Hämatoxylin Weigert B	2,00E-52	Waldeck
Kaliumhexacyanoferrat	104973	Sigma
Kernechtrot	115939	Merck
Resorcin-Fuchsin	2,00E-030	Waldeck
Schiff's Reagenz	109.034	Merck
Xylol	10293	VWR

2.1.2.4 Software

Software	Download	Hersteller
CaseViewer		3DHISTECH Kft. Budapest, Ungarn
CaseViewer 2.4 (64-bit version) for Windows		3DHISTECH Kft. Budapest, Ungarn
ViewPoint		PreciPoint GmbH Freising, Deutschland
ViewPoint Light	https://www.precipoint.com/microscopy-software/viewpoint/	PreciPoint GmbH Freising, Deutschland
ConvertPoint online		PreciPoint GmbH Freising, Deutschland

QuPath-0.2.1	https://github.com/qupath/qupath/releases/tag/v0.2.1	Open source Software
Omero		Open source Software
Segmentation of grey regions using Color Thresholding		
Instance Segmentation of nuclei regions using Mask-RCNN based on ResNet-50 and FPN		

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebepräparation

Die Präparation der Proben erfolgte nach den im Qualitätsmanagement geregelten Arbeitsanweisungen des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg. Alle Probengefäße wurden geöffnet. Das Gewebematerial befand sich in Formalin, teilweise noch im Applikator in Formalin getaucht. Entsprechend des Mikroskopiehandbuchs wurde der Inhalt ganz entnommen und jeweils drei Sphäroide, mit Ausnahme von Patient 15 bei diesem nur zwei aufgrund der geringen Gesamtzahl, für die TEM getrennt weiterverarbeitet. Das restliche Material wurde für die Einbettung in Paraffin vorbereitet.

2.2.1.1 Histologische Präparation

Für die Anfertigung histologischer Präparate wurden die Sphäroide, nach Abzug von mindestens zwei aber höchstens sechs für die TEM, mit Shandon Cytolock Reagenz #1 und #2 umschlossen, um einen Verlust der Sphäroide aus den Kapseln zu verhindern. Die eingeschlossenen Sphäroide wurden in beschriftete Kapseln gegeben und nach der allgemeinen Arbeitsanweisung des Instituts für Pathologie Regensburg weiterbehandelt. Die Kapseln wurden in die Probenkammer des Entwässerungsautomaten gegeben und nach folgenden Schritten entwässert und in Paraffin eingebettet:

Position	Reagenz	Temperatur °C	Zeit Std : Min
1	Formaldehyd 4%	35	01:30
2	Ethanol 70%	35	00:30
3	Ethanol 90%	35	01:00
4	Ethanol 100%	35	00:50
5	Ethanol 100%	35	00:50
6	Ethanol 100%	35	00:50
7	Ethanol 100%	35	01:10
8	Xylol	35	00:50
9	Xylol	35	00:50
10	Xylol	35	01:00
11	Paraffin	60	00:30
12	Paraffin	60	00:30
13	Paraffin	60	00:30
14	Paraffin	60	00:30

Nach der Entwässerung wurden die Proben zu Paraffinblöckchen ausgegossen und anschließend gekühlt. Die Blöckchen werden mit Rotationsmikrotom angeschnitten. Vor dem Aufbringen auf den Objektträger wurden die Schnitte in einem warmen Wasserbad gestreckt, um Gewebefaltungen zu vermeiden. Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin erfolgte im Färbeautomaten. Nach erfolgreicher Färbung wurden die Präparate automatisch eigedeckelt.

2.2.1.2 Präparation für die TEM

Für die TEM wurden pro Patienten mindestens zwei Sphäroide in gepuffertes Glutaraldehyd gegeben. Aufgrund der geringen Größe der Proben wurden die einzelnen Sphäroide vor der Einbettung in Kunststoff in 4%-ige low-melting Agarose eingeschlossen und diese dann zugeschnitten. Die so entstandenen „Gelblöckchen“ wurden in Zellstoff eingeschlagen, um einen Verlust von Probenmaterial zu verhindern. Für die Einbettung wurden diese in die Probenkörbe des LYNX-Gewebeprozessors gegeben und ihre Position im ZEM-Probenprotokoll dokumentiert. Die bestückten Probenkörbe durchlaufen im Gewebeprozessor folgende Medien:

Vial	Medium	Zeit
1	Cacodylat-Puffer 0,1 M	30
2	Cacodylat-Puffer 0,1 M	30
3	1% Osmiumtetroxid in Cacodylat-Puffer 0,1 M (1+1)	120
4	Cacodylat-Puffer 0,1 M	10
5	Aqua bidest.	10
6	Aqua bidest.	10
7	Aqua bidest.	10
8	50% Ethanol	15
9	70% Ethanol	15
10	90% Ethanol	15
11	95% Ethanol	15
12	100% Ethanol	15
13	100% Ethanol	15
14	100% Ethanol	15
15	1,2-Propylenoxid	30
16	1,2- Propylenoxid	30
17	1,2 Propylenoxid + EPON (1+1)	3 Std.
18	EPON (rein)	10-15 Std.

Nach Einbettung folgt die Herstellung von EPON-Blöckchen. Die Proben wurden aus dem Zellstoff gewickelt, in CHIEN-Einbettförmchen transferiert und die EM-Nr. sichtbar in der Form platziert. Wichtig ist, dass sowohl die Einbettförmchen als auch die gedruckten EM-Nr. vorgetrocknet wurden, da Restfeuchtigkeit das Aushärten der EPON-Blöckchen stört. Aus diesem Grund muss auch das gefroren gelagerte EPON frühzeitig aufgetaut und etwaig vorhandenes Kondenswasser entfernt werden. Die Probenförmchen wurden mit flüssigem EPON ausgegossen und zum Aushärten für zwei Tage bei 60 °C in den Wärmeschrank gestellt. Nach abgeschlossener Wärme-Polymerisation konnten die EPON-Blöckchen aus den Einbettförmchen gelöst und für das Anfertigen von Semi- und Ultradünnschnitte am Ultramikrotom zugetrimmt werden. Hierfür wurde mit einer Rasierklinge überflüssiger Kunststoff um das Probenmaterial

entfernt. Mit einem Diamantmesser wurden im nächsten Schritt 0,75 µm dicke Schnitte, sogenannte Semidünnschnitte, hergestellt, die vom Wasserbad des Ultramikrotoms mit einem Glasstab auf einen Objektträger übertragen wurden. Diese wurden anschließend auf einer Heizplatte bei 80 °C angetrocknet. Die vollständig getrockneten Schnitte wurden mit Toluidinblau und basischem Fuchsin angefärbt und mit Epon bedeckt. Darauf wurde ein Deckglas gegeben und das Präparat zwei Tage bei 60 °C im Wärmeschrank ausgehärtet.

Mit einem Ultra-Diamantmesser wurden 60-80 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt. Diese wurden noch im Wasserbad des Ultramikrotoms mit einem in Chloroform getränktem Holzstäbchen bedampft. Mit einer in eine Glaspipette eingeschmolzenen Wimper wurden je zwei Ultradünnschnitte pro Block auf Grids aufgezogen. Zum Trocknen wurden die Grids auf Filterpapier in eine Glas-Petrischale gelegt. Um den ultra-geschnittenen Bereich der Proben einschätzen zu können wurden pro Blöckchen zwei weitere Semidünnschnitte wie oben beschrieben angefertigt und gefärbt.

Die luftgetrockneten Ultradünnschnitte wurden durch das Anlagern von Schwermetall-Ionen kontrastiert. Dafür wurden die Grids eines Blocks zuerst 10 Minuten mit der mit dem Schnitt bezogenen Seite nach unten auf einen Tropfen 2%-ige, wässrige Uranylacetat-Lösung und im Anschluss ebenfalls 10 Minuten auf die gleiche Art und Weise auf einen Bleicitrat-Tropfen gelegt. Jeweils nach diesen 10 Minuten wurden die Grids durch vorsichtiges Eintauchen in Aqua bidest. gespült und die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt. Danach wurden die Ultradünnschnitte luftgetrocknet.

2.2.2 Auswertung der histologischen und Semidünnschnitt-Präparate

Alle Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop gesichtet und auf Menge, Zustand und Verwertbarkeit des Probenmaterials analysiert. Um eine Aussage über die Auswertbarkeit eines Sphäroids im Hinblick auf die einzelnen in dieser Arbeit untersuchten Kriterien zu treffen, wurden die Sphäroide als „intakt“, „ganz“ oder „Rest“ klassifiziert. Als „intakt“ wurden jene Sphäroide gewertet, welche nach außen deutlich und durchgehend abgegrenzt sind. Als „ganz“ wurden die Sphäroide definiert, welche zwar in Abschnitten weniger klar begrenzt sind, aber soweit erhalten sind, dass sie für die Auswertung der Größe und des Kernmatrixverhältnisses geeignet erscheinen. Als

„Rest“ wurden die Sphäroide bezeichnet, die offensichtlich stark beschädigt wurden und nur Teilstücke eines Sphäroids darstellen.

2.2.2.1 Kernanzahl

Die HE Präparate HE #8 bis einschließlich HE#13A und alle Semidünnschnitt Präparate wurden mit dem Precipoint M8 in 40-facher Vergrößerung gescannt. Zwischen den HE-Präparaten und den Semidünnschnitten der gleichen Patientenproben wurde ein Vergleich der zusehenden Zellstrukturen aufgestellt. Die Zellkerne in den Semidünnschnitt-Präparaten wurden mit der PreciPoint ViewPoint Software ausgezählt. Sie wurden nach den folgenden Kriterien in drei Kategorien eingeteilt:

Schwarz: Kern über gesamten Umfang klar von der umliegenden Matrix abgegrenzt, Farbe homogen, Form rund bis oval

Pink: Kernmembran deutlich von der umliegenden Matrix abgegrenzt, Chromatin komplett an die Kernmembran angelagert und kondensiert

Blau: mind. Hälfte des Umfangs klar von der umliegenden Matrix abgegrenzt, Farbe inhomogen und/oder Form mit starken Abweichungen von rund-oval

Die zuvor in den nach Farben benannten Kategorien gezählten Zellkerne wurden in einem späteren Schritt stichprobenartig ultrastrukturell in der Elektronenmikroskopie untersucht und die Verteilung des Chromatins als namensgebendes Merkmal gewählt. Im Folgenden entsprechen in der Kategorie „Schwarz“ gezählte Zellkerne nicht-kondensierten, in der Kategorie „Pink“ gezählte Zellkerne kondensierten und in der Kategorie „Blau“ gezählte Zellkerne irregulären Zellkernen.

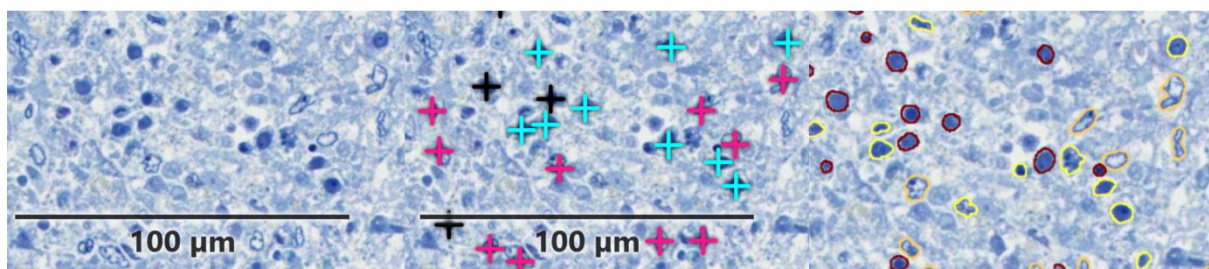


Abbildung 7 Ausschnitt aus Präparat 011-A3; in a und b jeweils 40fache Vergrößerung in Viewpoint; a: Annotationen ausgeblendet b: Annotationen eingeblendet c: etwa gleicher Ausschnitt aus QuPath

Bei sehr kleinen Kernen wurde mit „Line-Annotation“ der größte Durchmesser gemessen und der Kern bei einem Durchmesser größer oder gleich $3\mu\text{m}$ mitgezählt. Der Grenzwert von ca. $3\mu\text{m}$ wurde ermittelt, indem in den Präparaten 001-A2, 002-A3, 003-A1 und 004-A1 sowohl als annähernd rund, sowie als länglich gewertete Zellkerne vermessen wurden. Bei als rund gewerteten Zellkernen wurde der Durchmesser ausgemessen, bei länglichen jeweils die Breite und Länge. Der geringste Durchmesser für noch deutlich als Zellkern zu erkennenden Strukturen liegt bei ca. $3,2\mu\text{m}$.

Vergleichend wurden die Kerne mit einem Algorithmus gezählt. Um die verschiedenen Kernformen in den Algorithmus zu integrieren wurden die im vmic Format gescannten Bilddateien mit der ConvertPoint Online Software in ein Svs Format umgewandelt. Die Svs Dateien wurden in QuPath geladen und die Zellkerne der verschiedenen Kategorien durch Umkreisen markiert. Die so generierten Daten wurden genutzt, um die künstlichen neuronalen Netzwerke des Algorithmus im Rahmen des *Deep Learning* zu trainieren. Der Algorithmus wurde so konzipiert, jedes Pixel einer Kategorie zuzuteilen (*semantic segmentation*). Wurden dem neuronalen Netzwerk genug Beispiele vorgegeben, können neue Bilder der gleichen Art automatisch verarbeitet werden. Um den Algorithmus zu trainieren mussten alle sich bei hoher Vergrößerung vom Hintergrund abhebenden Strukturen markiert werden. Da einige dieser Strukturen zu klein sind, um mit Sicherheit als Kern gezählt zu werden, wurde in den elektronenmikroskopischen Bildern ein Schwellenwert ermittelt, ab dem ein Kern sicher als solcher zu erkennen ist. Hierfür wurden von vier Sphäroiden jeweils allen in einer Masche des Grids liegenden Zellkerne ausgemessen. Der kleinste Durchmesser, bei dem ein Kern noch deutlich als solcher zu erkennen war wurde genutzt, um die minimale Fläche einer zu zählenden Struktur zu berechnen. Alle Strukturen die diese minimale Fläche nicht ausfüllen, wurden bei der Zählung vom Algorithmus herausgefiltert.

2.2.2.2 Kern zu Matrixverhältnis

Für alle Semidünnschnitt-Präparate wurde die Anzahl der Kerne der jeweiligen Kategorie sowie die Gesamtzahl der Kerne je auf $100.000\mu\text{m}^2$ berechnet.

2.2.2.3 Größe

Die Fläche der Sphäroide wurde in der ViewPoint Software gemessen. Das Präparat wurde auf dem Microsoft Surface Studio geöffnet und komplett, möglichst in 40facher Vergrößerung, auf dem Bildschirm dargestellt. Es wurde die Option „Counting Annotation“ gewählt und die Außengrenze des Präparats mit dem Microsoft Surface Pen nachgefahren.

2.2.2.4 Zellkernform

Die Form der Zellkerne wurde mit Hilfe des bereits unter 3.2.2.1 erwähnten Algorithmus ausgewertet. Hierbei wurde jeder erkannte Zellkern dahingehend beurteilt, wie nahe seine Form der eines Kreises kommt. Der Wert „0“ entspricht hierbei einem Kreis. Je näher der Wert gegen 1 tendiert, desto flacher ist das Oval. Übertragen auf die Zellkerne entspricht ein Zellkern mit dem zugeordneten Wert „0“ einem im Anschnitt runden Zellkern, während ein Zellkern mit dem Wert „0,6“ im Anschnitt flach oval ist. Betrachtet wird die Formverteilung der Zellkerne je nach zugeordneter Kategorie. Label „0“ entspricht den nicht-kondensierten Zellkernen, Label „1“ den kondensierten Zellkernen und Label „2“ den irregulären Zellkernen.

2.2.2.5 Superfizialschicht

In jedem Sphäroid wurde ca. die halbe Zirkumferenz mit der „Counting Annotation“ in ViewPoint markiert. Dabei wurde ein möglichst gut erhaltener Abschnitt gewählt, um die Chance auf eine mögliche Bewertung als Sphäroid ohne Merkmale einer Superfizialschicht durch Veränderung der Oberfläche in der Präparation zu verringern. Der gewählte Abschnitt wurde dann in Hinblick auf eine als im Kontrast etwas dunkler blaue, durchgängige Schicht an der Oberfläche und das Vorhandensein deutlich abgeflachter Zellkerne in den oberflächennahen 10 µm untersucht. War die soeben beschriebene Schicht in mehr als ca. einem Viertel der Gesamtzirkumferenz vorhanden wurde dieser Aspekt als Hinweis auf die Bildung einer Superfizialschicht gewertet. Mindestens 5 deutlich abgeflachte Zellkerne im untersuchten Bereich wurden als weiteres hinweisendes Kriterium gewertet.

2.2.2.6 Lipideinlagerungen

Alle Sphäroide, in denen in 40facher Vergrößerung grau-grünliche Einlagerungen auffielen, wurden mit Hilfe eines Schwellenwertverfahrens (Segmentation of grey

regions using Color Thresholding) basierend auf einem gewählten Farbspektrum auf den Anteil dieser Einlagerungen an der Gesamtfläche untersucht.

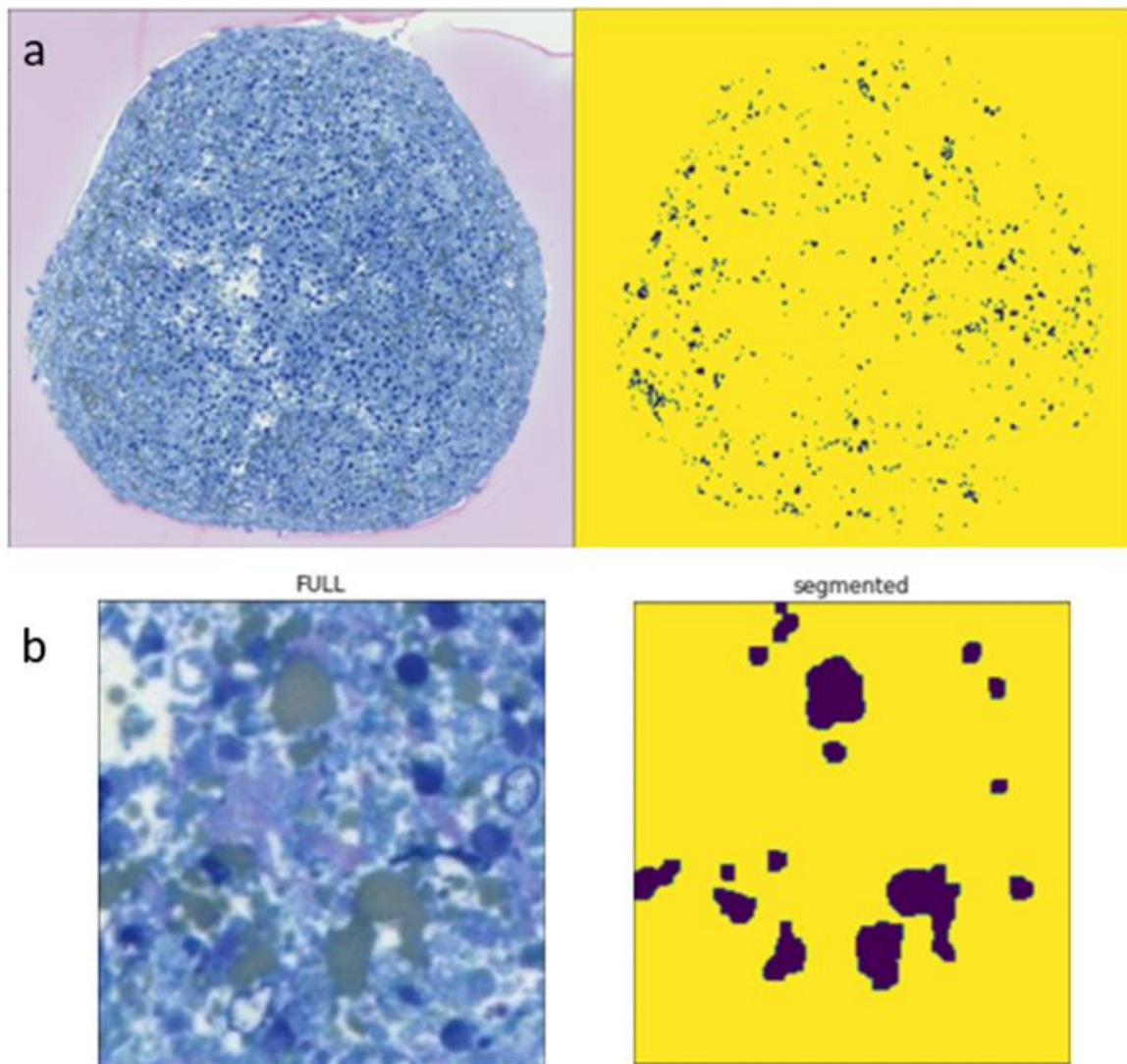


Abbildung 8: Präparat 012-A1 in a Gesamtübersicht vor und nach Segmentierung; in b vergrößerter Ausschnitt zur besseren Darstellung

2.2.3 Auswertung der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder

Die Präparate 001-A1, 002-A3, 003-A1, 004-A1, 004-B3, 005-A1, 006-A1, 006-B2 und 008-A1 wurden im mit dem Transmissionselektronenmikroskop gesichtet und einzelne Strukturen in höherer Vergrößerung dargestellt. In den hierbei entstandenen Bildern

wurden die klar erkennbaren Zellkerne vermessen. Die Chromatinanordnung wurde mit TEM Aufnahmen anderer Arbeiten verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

3.1.1 Evaluation des Materials in Paraffin und Epon Präparaten

In der Lichtmikroskopie der HE Präparate zeigen sich Sphäroide sehr variablen Zustands. In den Anschnitten von sieben der 15 Patienten (8/18 Präparate) finden sich Anschnitte, welche in Form und Größe mit vollständig erhaltenen Sphäroiden korrelieren. (Abb. 9)

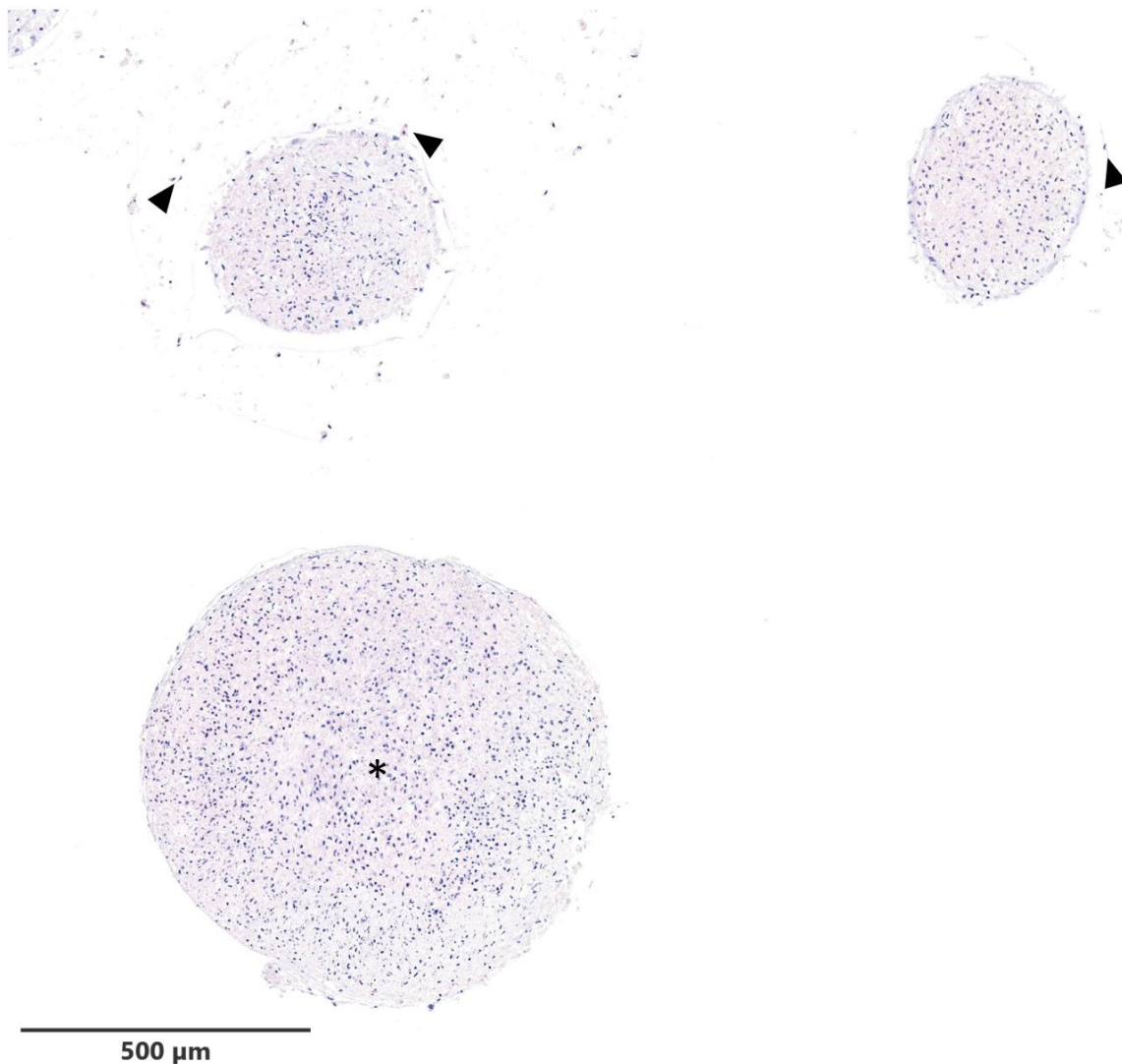


Abbildung 9: Präparat HE#9 in 10facher Vergrößerung: Histologische Darstellung HE gefärbter Chondrozytensphäroide. Komplette angeschnittener Sphäroid (*) Mit gut abgegrenzter Zellularität, bestehend aus zentral gelegenen runden und peripher abgeflachten Chondrozyten. Die kleineren Sphäroide sind nicht komplett angeschnitten und weisen in der Umgebung der Sphäroide versprengte Zellkerne (Pfeilspitzen) auf.

In diesen Präparaten zeigen sich die Sphäroide unterschiedlich tief angeschnitten, was in Abbildung 9 und 10 in der deutlich unterschiedlichen Größe der Anschnittsfläche sichtbar wird. Abbildung 9, 10 und 11 lassen auch Unterschiede in der Abgrenzung der Sphäroide der jeweiligen Patienten erkennen, die Anzahl der in der Umgebung der Sphäroide angeschnittenen Zellkerne variiert sowohl innerhalb

eines Präparats (Abb. 9 Pfeile), als auch zwischen den Präparaten verschiedener Patienten (Abb. 9 und 10 Pfeile). In den Präparaten von vier Patienten (6/18 Präparate) sind Gewebereste erkennbar, die im Färbeverhalten mit den erhaltenen Proben übereinstimmen, die vom Hersteller beschriebene Form der Sphäroide vor Implantation aber nicht aufweisen (Abb.11). In vier Fällen (4/18 Präparate) konnte auch nach erneutem Anschnitt kein Sphäroid im Präparat nachgewiesen werden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht aller Präparate jedes Patienten (001-015).

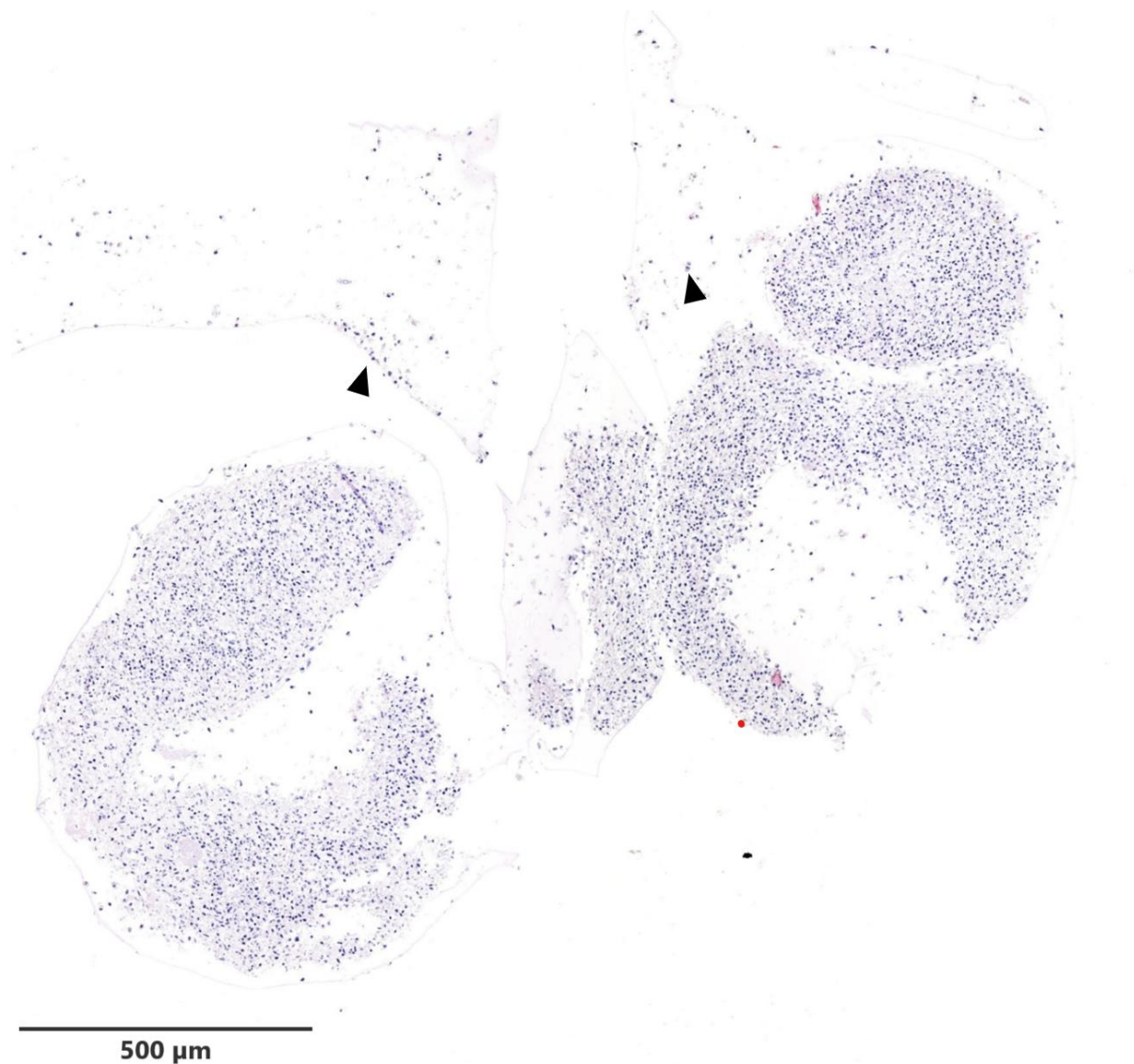


Abbildung 10: Präparat HE#10 in 10facher Vergrößerung. Es zeigen sich Anschnitte von Sphäroiden, deren Form nicht erhalten ist, allerdings Rückschlüsse auf eine mögliche Form vor Präparation zulässt. Einzelne, in der Umgebung der Sphäroide versprengte Zellkerne (Pfeile)

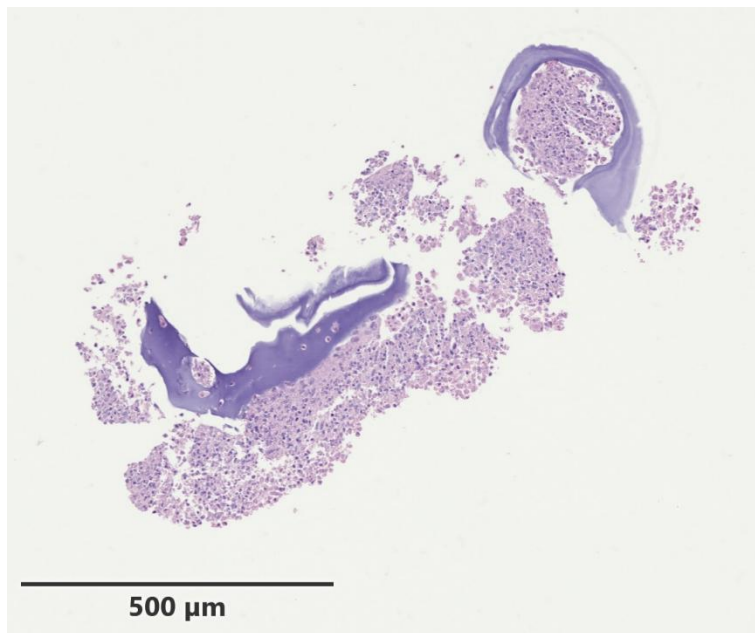


Abbildung 11: Präparat HE#11 in 10facher Vergrößerung. Das Präparat zeigt Gewebereste, die sich in Form, Abgrenzung und Verteilung nicht definitiv einem oder mehreren Sphäroiden zuordnen lassen.

Tabelle 2: Auflistung der Präparate und des Zustands der einzelnen Sphäroide. Grün gekennzeichnete Präparate sind für die Auswertung verwertbar. In jeder Zeile findet sich folgend auf die Kennzeichnung des Präparats (Bei Patient 004, 006 und 013 je zwei Applikatoren, jeweils mit A und B gekennzeichnet) eine Zusammenfassung des Materials im HE Präparat, sowie eine Beschreibung des Zustandes der für die Elektronenmikroskopie eingebetteten Sphäroide des jeweiligen Patienten. Grün markierte Präparate enthalten mindestens einen ganzen Sphäroid, der im Hinblick auf Größe und Abgrenzung beurteilbar ist. Ein für die Elektronenmikroskopie präparierter Sphäroid wurde als „intakt“ gewertet, wenn er durchgehend deutlich abgegrenzt war, als „ganz“, wenn der Sphäroid vermutlich komplett erhalten, also die Kriterien Zellkernzahl und Fläche in etwa wie bei einem intakten Sphäroid auswertbar sind, aber nicht durchgehend deutlich abgegrenzt ist.

Probe	HE	Semidünnschnitt
001-A	leer	A1: Rest A2: intakt A3: intakt
002-A	Reste	A1: intakt A2: Rest A3: intakt
003-A	ganze Sphäroide	A1: ganz A2: ganz A3: Reste
004-A	Reste	A1: intakt A2: ganz A3: intakt
004-B	ganze Shäroide	B1: ganz B2: ganz B3: intakt
005-A	leer	A1: Rest A2 ganz A3: ganz
006-A	Reste	A1: ganz A2: intakt A3: ganz
006-B	Reste	B1: Rest B2: ganz B3: ganz

007-A	leer/ einzelne Zellen	A1: ganz A2: ganz A3: ganz
008-A	ganze Sphäroide, aber nicht intakt	A1: intakt A2: ganz A3: Reste
009-A	ganze Sphäroide	A1: Rest A2: ganz A3: ganz
010-A	ganze Sphäroide	A1: Rest A2: Rest A3: ganz
011-A	Reste	A1: ganz A2: intakt A3: intakt
012-A	ganze Sphäroide	A1: intakt A2: intakt A3: intakt
013-A	ganze Sphäroide	A1: intakt A2: intakt A3: intakt
013-B	ganze Sphäroide	B1: ganz B2: Rest B3: ganz
014-A	Reste	A1: Rest A2: ganz A3: Rest
015-A	leer	A1: ganz A2: nicht beurteilbar

In der lichtmikroskopischen Evaluierung der Semidünnschnitte konnte von jedem Patienten mindestens ein, in Form und Größe mit den Präparaten vor Einbettung korrelierender, Sphäroid untersucht werden. In sieben von 18 Fällen waren jeweils alle drei für die Elektronenmikroskopie aufbereiteten Präparate des jeweiligen Patienten weder vor noch während der Einbettung offensichtlich beschädigt und konnten somit in alle Auswertungskategorien miteinbezogen werden. Abbildung 12 zeigt beispielhaft die Anschnitte der drei für die Elektronenmikroskopie präparierten Sphäroide des Patienten 008. Es lassen sich in allen drei Semidünnschnitten Rückschlüsse auf die Form, Größe und Zelldichte, sowie die Zellstruktur in verschiedenen Abschnitten des Präparates ziehen.

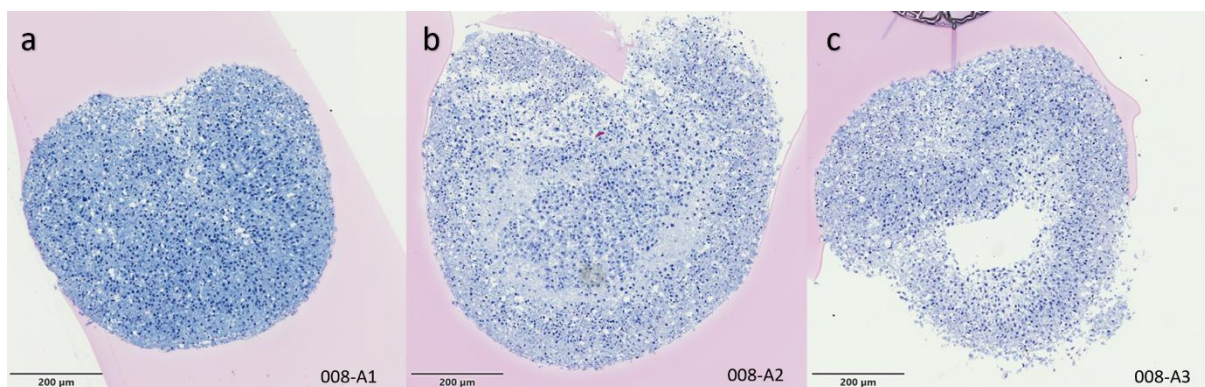


Abbildung 12: Semidünnschnitte der EM Präparate des Patienten 008 in 20facher Vergrößerung. Vollständiger und glatt abgegrenzter Sphäroid in a. b Leichte Auflockerung der Begrenzung des Sphäroids im oberen rechten Quadranten, bei erhaltener Beurteilbarkeit auf Form und Größe. c keine klare Begrenzung des Sphäroids in den unteren beiden Quadranten, eingeschränkte Beurteilbarkeit der Größe.

Im lichtmikroskopischen Vergleich der HE- und Semidünnschnittpräparate sind in deutlich mehr Semidünnschnitten (18/18 Applikatoren) ganze und gut beurteilbare Sphäroide als in HE-Präparaten (8/18 Applikatoren). Zudem zeigen sich in den Semidünnschnittpräparaten weniger starke Schwankungen der Größe durch eine besser kontrollierbare Tiefe des Anschnittes.

3.1.2 Ergebnisse der morphologischen Evaluation anhand der Semidünnschnittpräparate

3.1.2.1 Größe

Die angeschnittene Fläche der Sphäroide, die als ganz gewertet wurden, beträgt zwischen 128.852,53 μm^2 (014-A2) und 526.278,6 μm^2 (009-A2). Die durchschnittliche Fläche aller als ganz oder intakt bewerteten Sphäroide beträgt 299.662,816 μm^2 . Die Differenz der Flächen zwischen den Sphäroiden eines Patienten beträgt zwischen 1.875,6 μm^2 bei Patient 001 und 180.953,22 μm^2 bei Patient 013.

Tabelle 3 Größe der Sphäroide in μm^2 gemessen in 40facher Vergrößerung mit ViewPoint. In Klammern angegeben die Vergrößerung in der gemessen wurde, wenn 40fach nicht möglich war. Die Differenz gibt jeweils den Größenunterschied in μm^2 zwischen dem größten und kleinsten als ganz klassifizierten Sphäroid des Patienten an.

Probe	A/B1	A/B2	A/B3	Differenz
001A	192.096,83	271.487,94	269.612,34	1.875,6
002A	220.590,99	119.541,39	247.648,65	27.057,66
003A	274.432,65	231.645,31	373.706,78	42.187,34
004A	376.777,51	331.174,78	353.517,58	45.602,73
004B	273.044,27	320.736,76	312.089,08	47.692,49
004A und B				103.733,24
005A	262.732,38	466.812,74	381.864,56	84.948,18
006A	223.034,59	256.568,39	238.914,77	33.533,8
006B	84.137,14	220.926,78	206.976,68	13.950,1
				49.591,71
007A	273.848,88	335.900,57	343.723,43	69.874,55
008A	323.987,61	471.255,38 (37x)	361.923,62	147.267,77
009A	355.614,85	526.278,6 (32x)	376.404,66 (37x)	149.873,94
010A	515.000,41 (30x)	208.745,55 (35x)	331.768,64	/
011A	311.828,90	320.557,36	378.665,88	66.836,98

012A	273.732,90	277.542,78	306.273,08	32.540,18
013A	315.165,99	244.666,51	210.643,54	104.522,45
013B	134.212,77	Rest	261.120,40	126.907,63
				180.953,22
014A	215.668,31	128.852,53	20.439,41	/
015A	362.225,87	778.328,06 (25x)	/	/

3.1.2.2 Form

Die Sphäroide weisen alle im Anschnitt eine annähernd runde Form auf. Auch bei den nicht erhaltenen Sphäroiden lässt sich erkennen, dass sie Teil einer Kugel waren, entweder weil sie eine klare halbrunde Form zeigen (Präp. 001-A1 und 002-A2 (3/53 Präparate)), oder weil sie entlang von Bereichen mit geringerer Zellkerndichte bei der Präparation aufgefaltet wurden (Präp. 005-A1, 007-A1 010-A1(3/53 Präparate)) Abb. 13c. Diese weniger zellkerndichten Bereiche lassen sich auch in vollständig erhaltenen Präparaten deutlich erkennen (Präp. 008-A1, 009-A3 (2/53 Präparate)) Abb.13d.

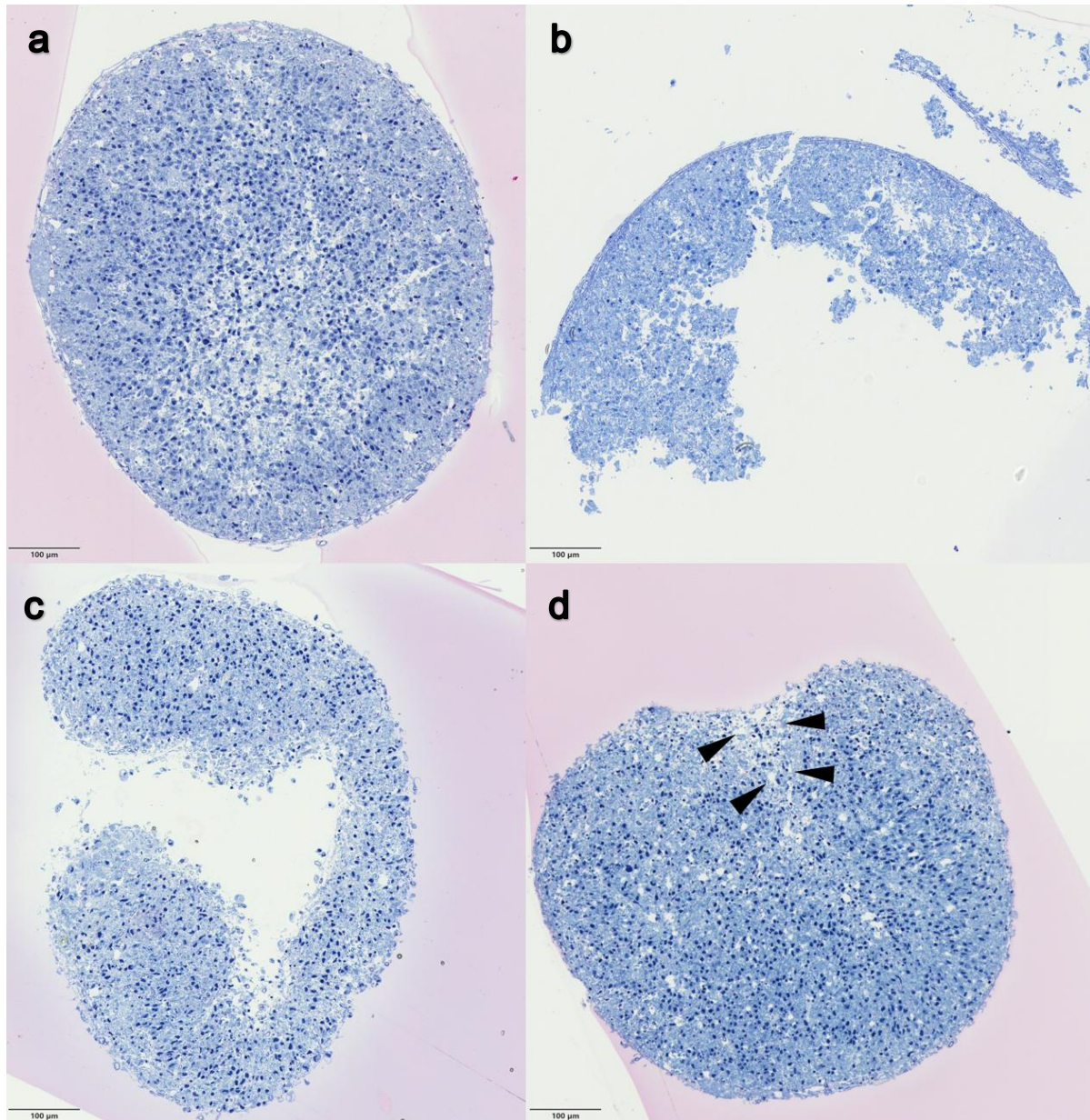


Abbildung 13: Übersicht verschiedener Formmerkmale, Präparate alle in 40-facher Vergrößerung.

a: 004-A1: intaktes Sphäroid mit im Anschnitt runder Form

b: 001-A1: Reste eines Sphäroids die eine ursprünglich runde Form nahelegen

c: 005-A1: entlang struktureller Schwachstellen aufgefalteter Sphäroid

d: 008-A1 Pfeilspitzen weisen auf vermutete Schwachstelle eines annähernd runden Sphäroids

3.1.2.3 Morphologische Hinweise auf die Bildung einer Superfizialschicht

Einige Präparate (n = 36/54) weisen morphologische Merkmale auf, die für die Bildung einer Superfizialschicht an der Oberfläche der Sphäroide sprechen. Diese Merkmale sind abgeflachte Zellkerne und eine abgrenzende Schicht, welche dem Sphäroid nach außen aufliegt. Bei 13 der 15 Patienten war die Qualität des Präparats ausreichend, um die Strukturmerkmale sinnvoll zu untersuchen. Die Patienten 001, 011 und 012 weisen die jeweiligen Merkmale in allen untersuchten Sphäroiden auf. Sieben von 13 Patienten zeigen in jedem untersuchten Sphäroid mindestens eines von beiden Kriterien. Bei fünf der auswertbaren Patienten zeigt je ein Sphäroid keins der beiden Merkmale. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die vorhandenen Strukturmerkmale im jeweiligen Präparat.

Tabelle 4: Hinweisende Merkmale auf eine Superfizialschicht: Flache Zellkerne / Durchgängige Abgrenzung; (+ entspricht mehr als 5 flache Zellkerne auf ca. halbe Zirkumferenz/ durchgängige Schicht über mindestens ca. halbe Zirkumferenz mind. einlagig erhalten; ~ entspricht Schicht deutlich über ca. ¼ der Zirkumferenz erhalten); Ergebnis bei Probe 010-A Sphäroid A2 eingeschränkt verwertbar; Die Präparate der Patienten 14 und 15 sind aufgrund schlecht abgrenzbarer Kernstrukturen nicht auswertbar.

Probe	A/B 1 Flache Zellkerne / Durchgängige Abgrenzung	A/B 2 Flache Zellkerne / Durchgängige Abgrenzung	A/B 3 Flache Zellkerne / Durchgängige Abgrenzung
001-A	+ / +	+ / +	+ / +
002-A	+ / +	- / -	+ / -
003-A	+ / -	+ / ~	+ / +
004-A	+ / +	+ / ~	+ / +
004-B	- / -	- / ~	+ / +
005-A	- / -	+ / ~	+ / -
006-A	- / ~	+ / +	- / ~
006-B	—	- / -	- / ~
007-A	- / -	+ / -	- / -
008-A	+ / +	- / ~	- / -
009-A	- / +	- / +	- / +
010-A	- / -	(- / -)	+ / ~
011-A	+ / +	+ / +	+ / +
012-A	+ / +	+ / +	+ / +
013-A	+ / +	+ / +	- / +
013-B	- / +	—	- / -
014-A	—	—	—
015-A	—	—	/

3.1.2.4 Evaluation der strukturellen Zusammensetzung der Sphäroide

In den Präparaten 002-A1 und 002-A3, 006-A1, 008-A3, 011-A1 und -A2 (6/53 Präparate) zeigt sich eine Bildung von Rissen beziehungsweise einer zentralen Aushöhlung der Sphäroide. Die Abgrenzung der Sphäroide nach außen ist vollständig oder fast vollständig erhalten, die Sphäroide kaum deformiert, im Inneren finden sich zell- und matrixfreie Bereiche (Abb.14 und 15). Bei den insgesamt stark beschädigten Präparaten (001-A1, 002-A2, 003-A3, 005-A1, -A3, 006-B1, 009-A1, 010-A1, -A2, 013-B2 und 014-A1 (11/53 Präparate)) lässt sich nicht sagen, ob zu einem früheren Zeitpunkt im jeweiligen Sphäroid diese oder ähnliche Auffälligkeiten zu sehen waren (Abb. 16).

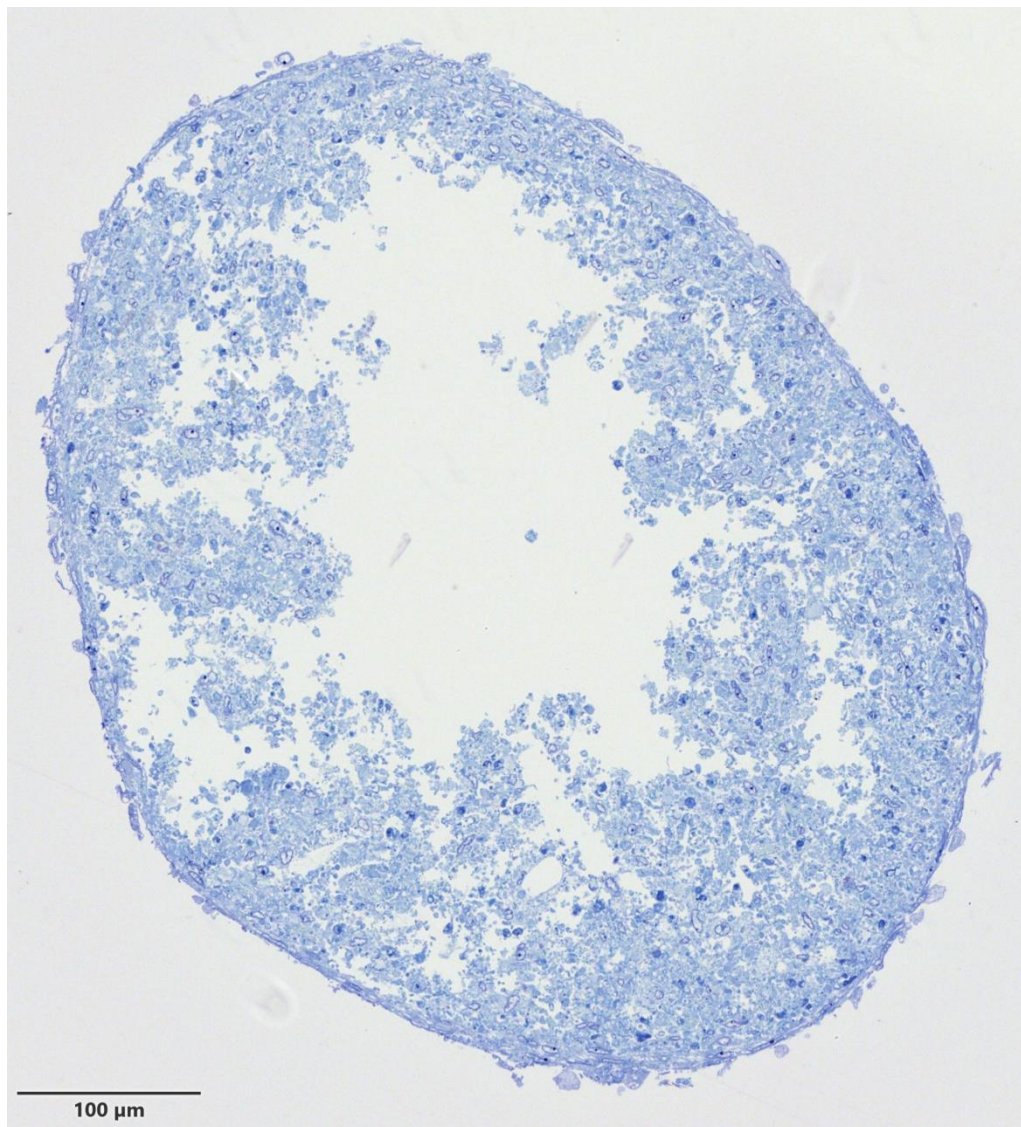


Abbildung 14: Präparat 002-A1 40fache Vergrößerung. Das Präparat zeigt eine zentrale Aussparung, wobei das Präparat durchgängig abgegrenzt erscheint.

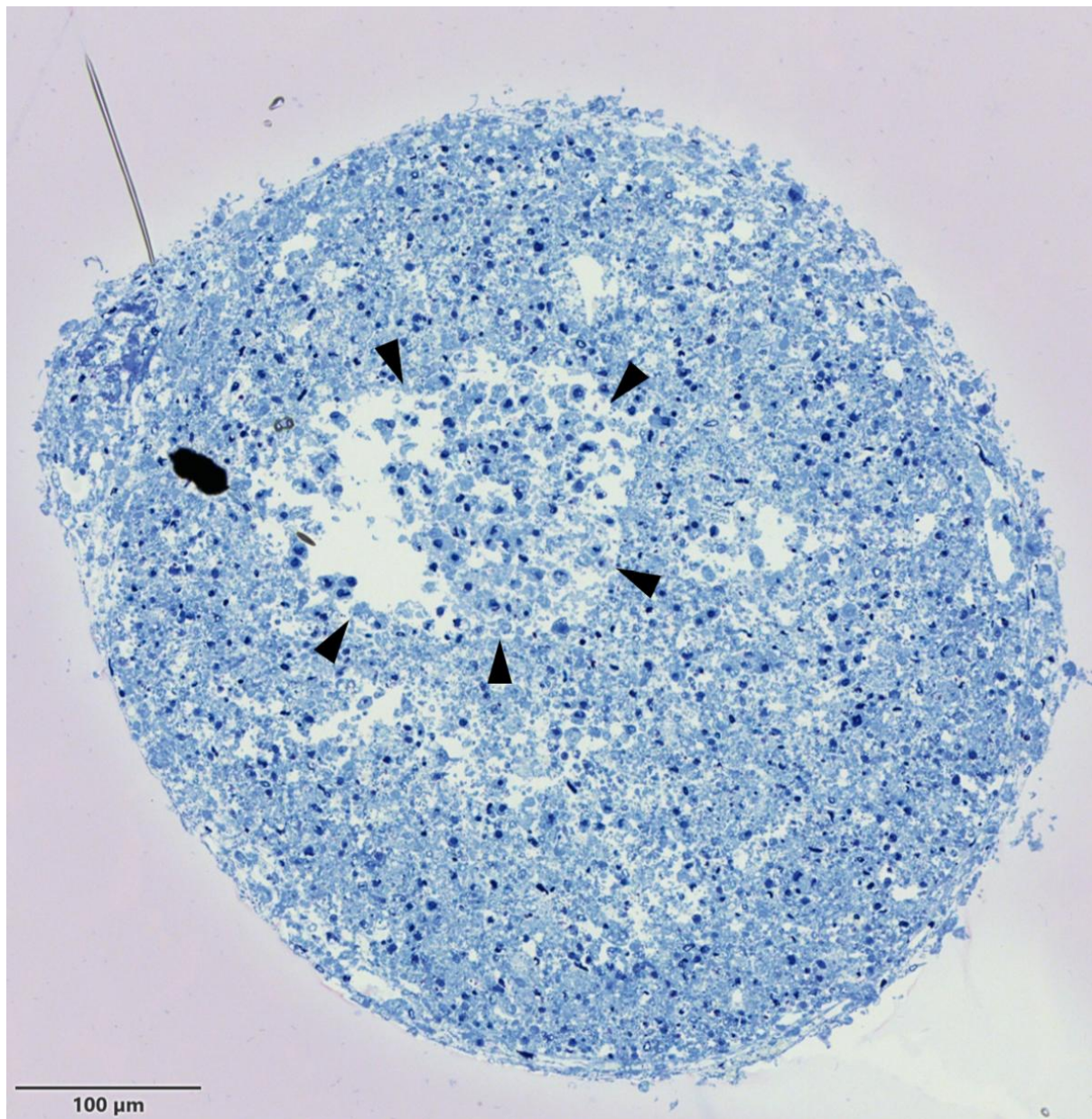


Abbildung 15: Präparat 006-A1 in 40facher Vergrößerung. Die Pfeilspitzen weisen auf eine Grenze entlang derer ein Teil der Zellen nicht stabil mit dem Gesamtpräparat verbunden ist. Der Sphäroid zeigt sich gut abgrenzbar, die annähernd glatte Berandung lässt keine Verfälschung der Form- und Größenauswertung vermuten.

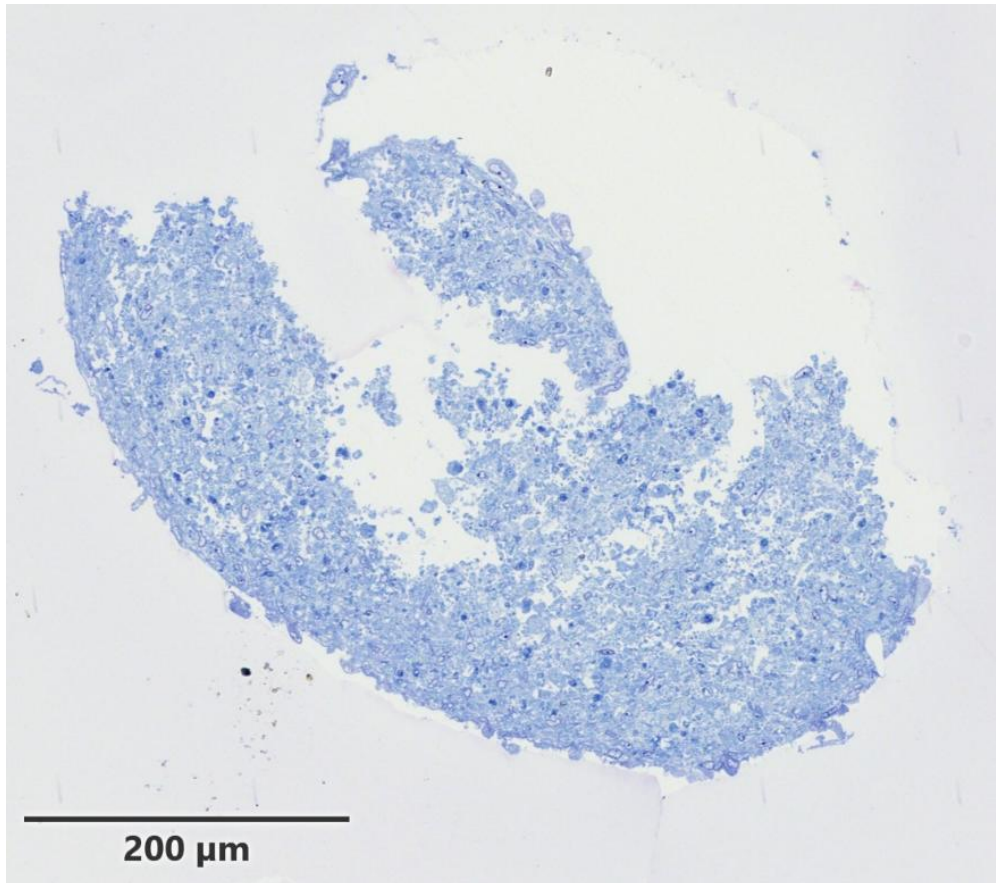


Abbildung 16: Präparat 002-A2 in 20facher Vergrößerung. Teile der Oberfläche des Sphäroids sind erhalten, die ursprüngliche Größe und eventuelle, vor Präparation bereits vorhandene, strukturelle Auffälligkeiten lassen sich nicht sicher evaluieren.

3.1.2.5 Lipideilagerungen

In der lichtmikroskopischen Untersuchung der Semidünnschnitte zeigen sich in einigen Präparaten grau bis grau-grüne Einlagerungen. Diese Anfärbung in der Lichtmikroskopie ist charakteristisch für Lipideinlagerungen, was ergänzend in der ultrastrukturellen Untersuchung mit Hilfe der TEM bestätigt werden konnte. Besonders ausgeprägt sind diese bei Patient 009, 012 und 014. Die Lipideinlagerungen zeigen sich bei allen betroffenen Präparaten über den gesamten Sphäroid verteilt, nie nur in einem Quadranten oder rein auf das Zentrum oder den randständigen Bereich konzentriert. Abbildung 18 und 19 zeigen exemplarisch die Verteilung der Lipide. Auch wird deutlich, dass in Präparat 011-A3 die Lipide in deutlich kleineren Tröpfchen formiert sind, während sie in Präparat 012-A2 deutlich größere Ansammlungen bilden.

Tabelle 5: Prozentanteil der Lipideinlagerungen an der Gesamtfläche der Präparate

Präparat	Lipideinlagerung/ Gesamtfläche [%]
003-A1	0,90
006-B3	0,95
007-A1	1,64
007-A2	0,22
007-A3	0,53
009-A1	6,73
009-A2	7,37
009-A3	6,38
010-A2	0,54
011-A1	0,99
011-A2	1,95
011-A3	3,35
012-A1	3,59
012-A2	6,91
012-A3	7,72
013-A1	0,90
013-A2	7,20
013-A3	2,31
013-B1	1,20
013-B3	2,93
014-A1	3,22
014-A2	4,04
014-A3	5,74

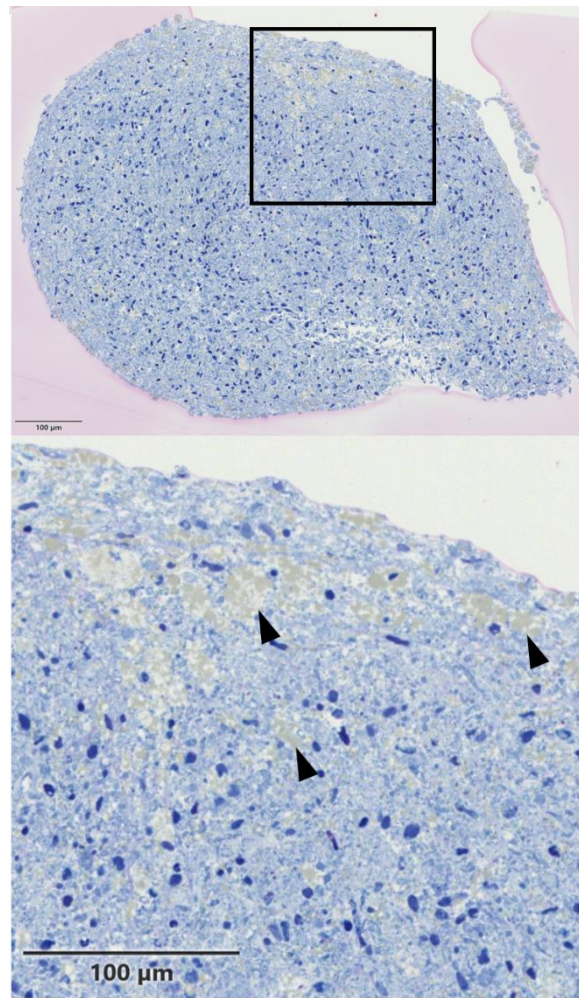


Abbildung 17: Präparat 009-A3 jeweils in 40facher Vergrößerung, Balken jeweils 100 µm. Das schwarze Quadrat im oberen Bild gibt den Ausschnitt des unteren Bildes an. Die schwarzen Pfeile weisen auf Lipidablagerungen

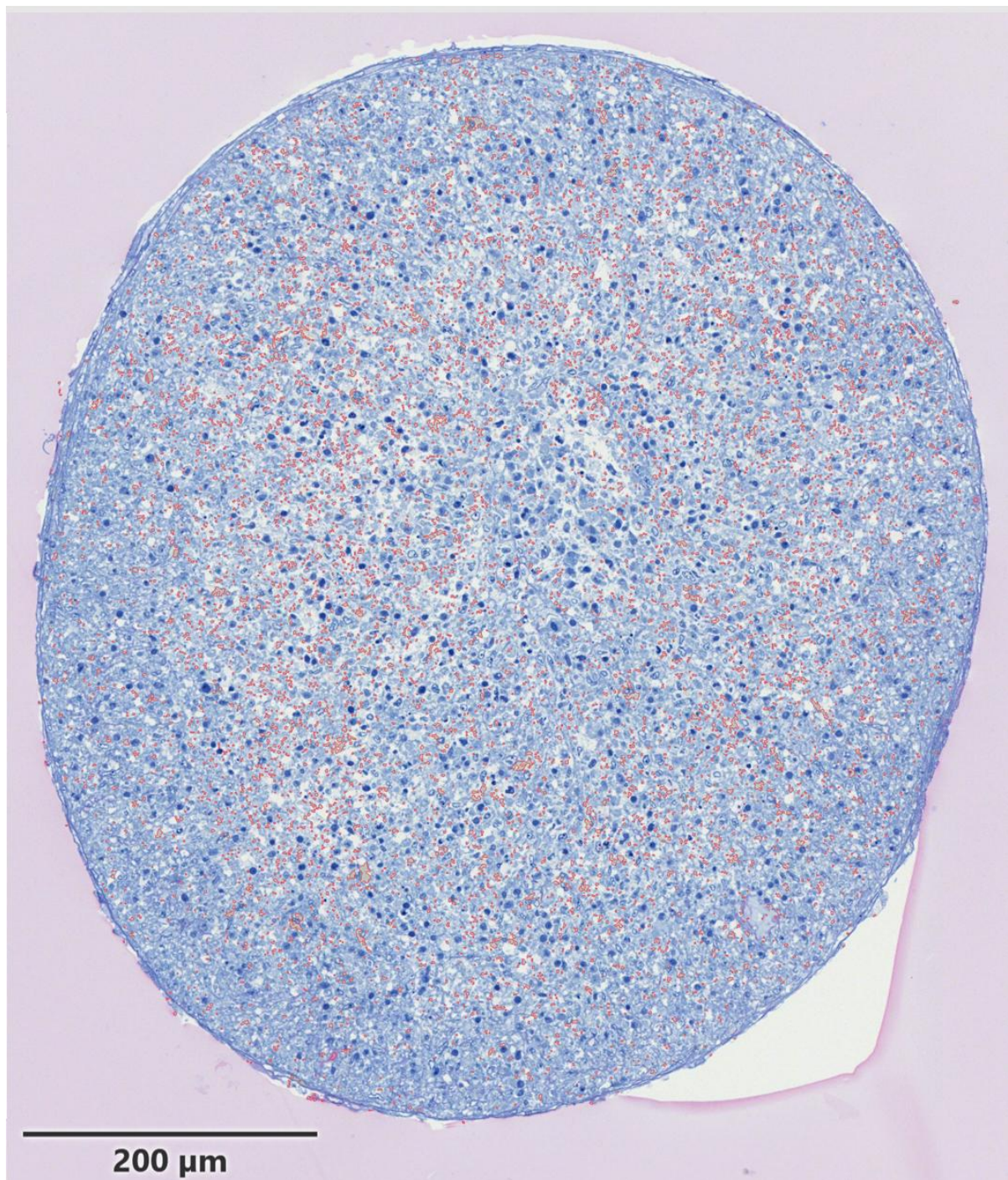


Abbildung 18 Präparat 011-A3. Die roten Markierungen zeigen, die vom Algorithmus identifizierten, Lipideinlagerungen. Die Verteilung der Lipide erscheint in diesem Präparat feinfleckig.

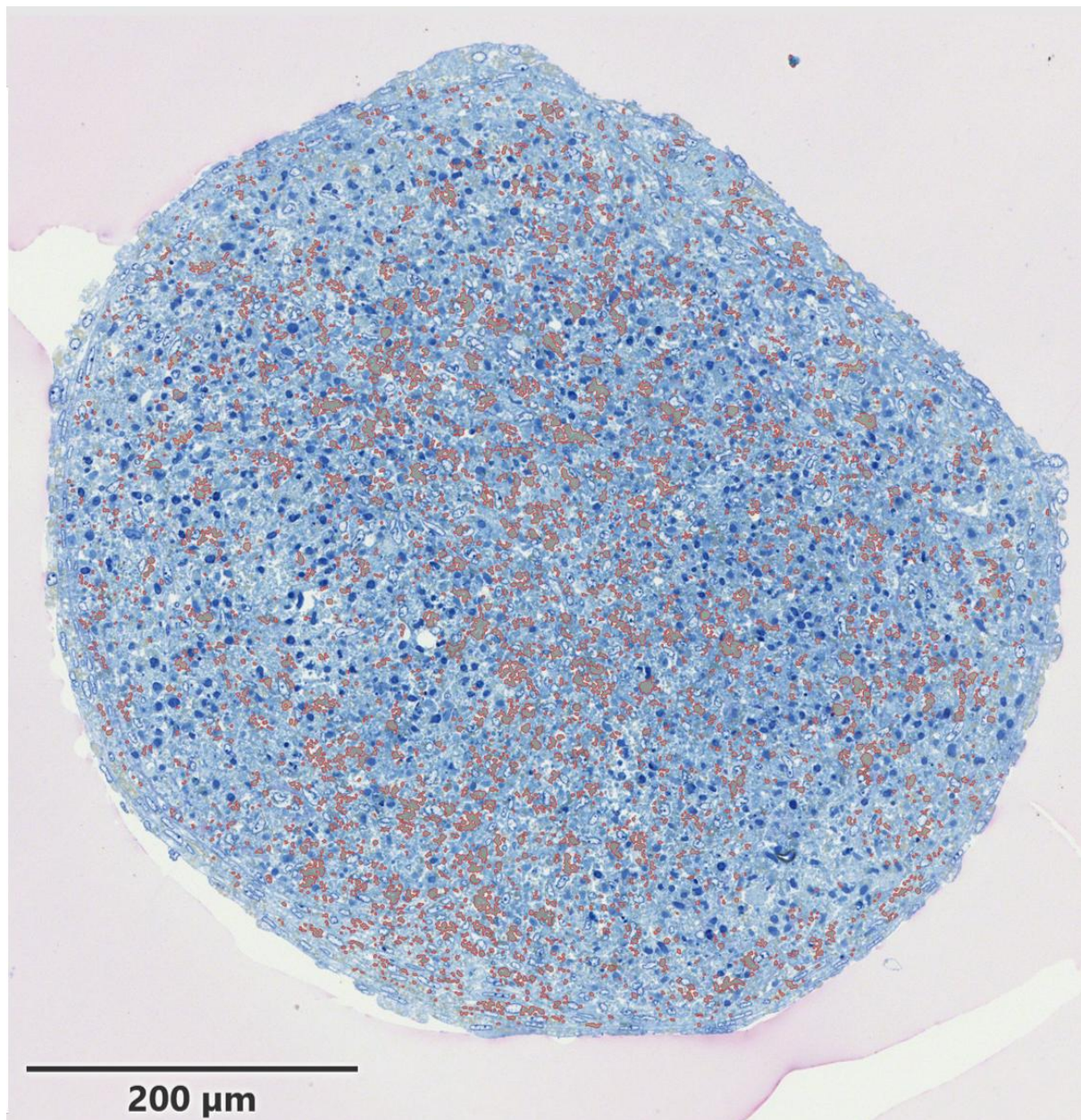


Abbildung 19: Präparat 012-A2 Die roten Markierungen zeigen, die vom Algorithmus identifizierten, Lipideinlagerungen. Die Lipideinlagerungen in diesem Präparat erscheinen großflächiger und konfluierend.

3.1.3 Evaluation morphologischer und quantitativer Aspekte der Zellkerne

Die lichtmikroskopische Evaluierung der Zellkerne in den HE-Präparaten zeigt sich inhomogen präsentierende Zellkerne (Abb. 20, linkes Bild). Aufgrund des Färbeverhaltens der Kerne lässt sich auf eine unterschiedliche Verteilung des Chromatins schließen (Abb. 20 linkes Bild, Kreis), durch die Dicke des Anschnittes ist allerdings eine hohe Anzahl an Kernen angetroffen und der einzelne Zellkern in Bezug auf seine Struktur schwer zu beurteilen.

In den Semidünnschnittpräparaten lassen sich die Zellkerne deutlicher voneinander abgrenzen. Die Verteilung des Chromatins ist besser zu erkennen (Abb. 20). Für eine

Kategorisierung, das Auszählen in der jeweiligen Kategorie und die Vermessung der Zellkerne sind die Semidünnschnitte den HE-Präparaten vorzuziehen.

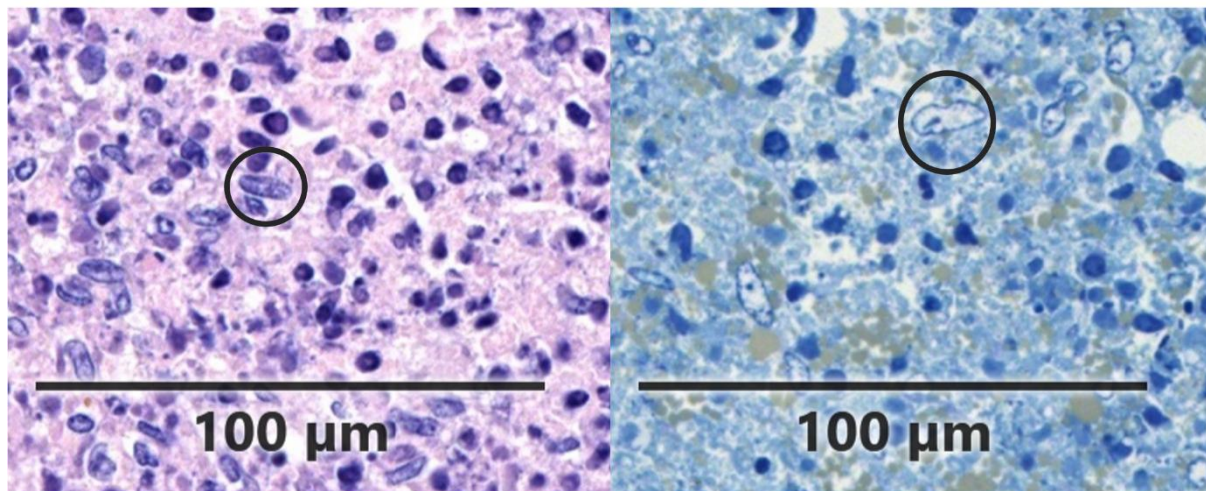


Abbildung 20: Ausschnitt aus HE#12 und 012-A2-2, 40fache Vergrößerung – Zellkerne mit vermutlich entlang der Kernmembran kondensiertem Chromatin (Kreise) lassen sich besser im Semidünnschnitt erkennen

3.1.3.1 Zellkern zu Matrixverhältnis

Die Evaluierung der gezählten Zellkerne, sowohl manuell mit Hilfe von ViewPoint als auch mit dem Algorithmus, ergab deutliche Unterschiede in allen Kategorien. Betrachtet man die Ergebnisse der Zählungen im Vergleich fällt auf, dass die Zählung des Algorithmus immer eine höhere Gesamtzahl an Kernen ergibt. In den Kategorien „nicht-kondensiert“ und „kondensiert“ zählt der Algorithmus je nur in einem Fall (001-A3 bzw. 012-A1) weniger Zellkerne als die manuelle Auszählung ergab. In der Kategorie „irregulär“ zählt der Algorithmus in allen Fällen mehr Zellkerne als manuell gezählt wurden. In 35 von 47 ausgezählten Sphäroiden machen die Kerne der Kategorie „kondensiert“ die kleinste Fraktion aus. Die zwölf Fälle, in denen sie die größte oder zweitgrößte Fraktion ausmacht, verteilen sich auf die Patienten 001, 002, 003, 011 und 012. Tabelle 6 zeigt die Anzahl der in unterschiedlichen Kategorien gezählten Zellkerne, sowohl in ViewPoint als auch mit dem Algorithmus.

Tabelle 6: Anzahl der Zellkerne in einem Sphäroid. Die erste Zahl entspricht der mit ViewPoint ausgezählten Anzahl, die in Klammern angegebene Zahl, die der durch den Algorithmus ermittelten

Präparat	nicht-kondensiert	kondensiert	irregulär	Gesamt
001-A1-1	72 (77)	152 (199)	85 (49)	309 (325)
001-A2-1	184 (361)	205 (297)	156 (119)	545 (720)
001-A3-1	58 (51)	187 (237)	71 (62)	316 (350)
002-A1-1	14 (32)	151 (186)	58 (36)	223 (254)
002-A2-2	1 (15)	86 (99)	23 (31)	110 (145)
002-A3-1	11(76)	176 (355)	67 (87)	254 (518)
003-A1-1	98 (291)	224 (331)	133 (166)	455 (788)
003-A2-1	160 (202)	61 (115)	290 (268)	511 (585)

003-A3-1	110 (271)	315 (415)	134 (212)	559 (898)
004-A1-1	437 (449)	30 (53)	238 (481)	705 (983)
004-A2-1	205 (301)	37 (70)	307 (465)	549 (836)
004-A3-1	241 (525)	45 (82)	383 (437)	669 (1044)
004-B1-1	253 (402)	36 (48)	207 (356)	496 (806)
004-B2-1	149 (387)	44 (49)	257 (350)	450 (786)
004-B3-1	231(388)	36 (55)	171 (311)	438 (754)
005-A1-1	452 (772)	157 (202)	297 (270)	906 (1244)
005-A2-2	517 (668)	128 (192)	313 (636)	958 (1496)
005-A3-1	347 (451)	153 (182)	182 (361)	682 (994)
006-A1-2	153 (283)	12 (34)	185 (251)	350 (568)
006-A2-1	237 (320)	20 (39)	282 (434)	539 (793)
006-A3-2	206 (289)	15 (26)	151 (236)	372 (551)
006-B1-1	60 (100)	10 (13)	47 (63)	117 (176)
006-B2-2	151 (264)	48 (66)	147 (239)	346 (569)
006-B3-1	185 (259)	31 (43)	156 (232)	372 (534)
007-A1-2	470 (721)	11 (28)	402 (540)	883 (1289)
007-A2-2	628 (850)	102 (111)	398 (536)	1128 (1497)
007-A3-1	297 (565)	29 (66)	221 (507)	547 (1138)
008-A1-1	542 (950)	34 (40)	376 (402)	952 (1392)
008-A2-2	261 (507)	131 (157)	422 (780)	814 (1444)
008-A3-2	304 (476)	44 (56)	286 (545)	634 (1077)
009-A1-2	380 (491)	1 (13)	248 (325)	629 (829)
009-A2-1	303 (565)	7 (18)	340 (468)	650 (870)
009-A3-2	386 (658)	6 (9)	338 (296)	730 (963)
010-A1-2	559 (1327)	75 (89)	629 (600)	1263 (2016)
010-A2-1	280 (526)	75(69)	236 (323)	591 (918)
010-A3-2	406	83	568	
011-A1-2	63 (233)	257 (313)	125 (213)	445 (759)
011-A2-1	28 (209)	338 (509)	80 (172)	446 (890)
011-A3-1	142 (455)	169 (306)	208 (317)	519 (1078)
012-A1-1	310 (479)	210 (206)	288 (285)	808 (970)
012-A2-2	94 (451)	534 (546)	312 (216)	940 (1213)
012-A3-1	107 (557)	313 (408)	347 (308)	767 (1273)
013-A1-1	460 (699)	39 (40)	298 (419)	797 (1158)
013-A2-1	267 (414)	26 (35)	145 (336)	438 (785)
013-A3-1	140 (291)	14 (25)	94 (163)	248 (479)
013-B1-1	112 (182)	12 (16)	113 (155)	237 (353)
013-B2-1	Rest			
013-B3-1	183 (268)	30 (34)	186 (340)	399 (642)

Ein weiterer untersuchter Faktor ist die Anzahl der Kerne pro 100.000 μm^2 . Die Ergebnisse zeigen eine Gesamtzahl von Zellkernen zwischen 92 (Präparat 002-A2-2) und 345 (Präparat 005-A1-1) pro 100.000 μm^2 . Das entspricht einer Differenz um den Faktor 3,75. Die folgende Tabelle zeigt die jeweils aus der manuellen Zählung errechneten Werte.

Tabelle 7: Errechnetes Kern zu Matrixverhältnis. Anzahl der Kerne jeder Kategorie pro 100.000 μm^2

Präparat	Nicht-kondensiert	kondensiert	irregulär	Gesamtzahl
001-A1-1	37,48	79,13	44,25	160,86
001-A2-1	67,77	75,51	57,46	200,74
001-A3-1	21,51	69,36	26,33	117,2
002-A1-1	6,35	68,45	26,29	101,09
002-A2-2	0,84	71,94	19,24	92,02
002-A3-1	4,44	71,07	27,05	102,56
003-A1-1	35,71	81,62	48,46	165,79
003-A2-1	69,07	26,33	125,19	220,59
003-A3-1	29,43	84,29	35,86	149,58
004-A1-1	115,98	7,96	63,17	187,11
004-A2-1	61,90	11,17	92,70	165,77
004-A3-1	68,17	12,73	108,34	189,24
004-B1-1	92,66	13,18	75,81	181,65
004-B2-1	46,46	13,72	80,13	140,31
004-B3-1	74,02	11,54	54,79	140,35
005-A1-1	172,04	59,76	113,04	344,84
005-A2-2	110,75	27,42	67,05	205,22
005-A3-1	90,87	40,07	47,66	178,6
006-A1-2	68,60	5,38	82,95	156,93
006-A2-1	92,37	7,80	109,91	210,08
006-A3-2	86,22	6,28	63,20	155,7
006-B1-1	71,31	11,89	55,86	139,06
006-B2-2	68,35	21,73	66,54	156,62
006-B3-1	89,38	14,98	75,37	179,71
007-A1-2	171,63	4,02	146,80	322,45
007-A2-2	186,96	30,37	118,49	335,82
007-A3-1	86,41	8,44	64,30	159,15
008-A1-1	167,29	10,49	116,05	293,83
008-A2-2	55,38	27,80	89,55	172,73
008-A3-2	84,00	12,16	79,02	175,18
009-A1-2	106,86	0,28	69,74	176,88
009-A2-1	57,57	1,33	64,60	123,5
009-A3-2	102,55	1,59	89,80	193,94
010-A1-2	108,54	14,56	122,14	245,24
010-A2-1	134,13	35,93	113,06	283,12
010-A3-3	122,37	25,02	171,20	318,41
011-A1-2	20,20	82,42	40,09	142,71
011-A2-1	8,73	105,44	24,96	139,13
011-A3-1	37,50	44,63	54,93	137,06
012-A1-1	113,25	76,72	105,21	295,18
012-A2-2	33,87	192,40	112,42	338,69
012-A3-1	34,94	102,20	113,30	250,44
013-A1-1	145,95	12,37	94,55	252,87
013-A2-1	109,13	10,63	59,26	179,02
013-A3-1	66,46	6,65	44,63	117,74

013-B1-1	83,45	8,94	43,28	135,67
013-B2-1	/	/	/	
013-B3-1	70,08	11,49	71,23	152,8

3.1.4 Zellkernmerkmale

3.1.4.1 Zellkerngröße

Die Auswertung der durchschnittlichen Zellkerngröße ergab, dass die Zellkerne der Kategorien „kondensiert“ und „irregulär“ in allen Präparaten durchschnittlich größer sind als die der Kategorie „nicht-kondensiert“. Die Zellkerne der Kategorie „kondensiert“ sind mit Ausnahme von drei Präparaten (004-A1, 006-A2 und 013-B1) durchschnittlich größer als die der Kategorie „irregulär“. Die durchschnittliche Kerngröße in der Kategorie „nicht-kondensiert“ variiert zwischen 7,49 μm^2 (002-A1) und 20,52 μm^2 (012-A1), in der Kategorie „kondensiert“ zwischen 16,57 μm^2 (006-A2) und 33,48 μm^2 (012-A2) und in der Kategorie „irregulär“ zwischen 17,21 μm^2 (013-A2) und 25,09 μm^2 (004-A1). Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die durchschnittliche Zellkerngröße in allen Präparaten.

*Tabelle 8: Durchschnittliche Größe der Zellkerne einer Kategorie in μm^2 (Ergebnisse des Algorithmus)
Das Präparat 013-B2 und alle Präparate der Patienten 14 und 15 wurden aus Gründen entweder zu geringer Materialmenge oder zu schlecht abgrenzbarer Zellkernstrukturen nicht ausgewertet.*

Präparat	nicht-kondensiert	kondensiert	irregulär
001-A1-1	14,75	28,07	24,15
001-A2-1	14,62	27,52	20,36
001-A3-1	11,09	32,88	22,70
002-A1-1	7,49	29,58	20,93
002-A2-2	8,54	33,10	22,48
002-A3-1	8,20	26,73	21,93
003-A1-1	11,85	24,57	20,91
003-A2-1	12,04	25,03	20,23
003-A3-1	12,73	28,93	22,38
004-A1-1	19,21	22,59	25,09
004-A2-1	15,49	25,88	21,58
004-A3-1	17,26	24,04	23,26
004-B1-1	15,40	23,73	20,78
004-B2-1	16,21	22,92	20,74
004-B3-1	16,64	26,76	21,45
005-A1-1	18,11	28,09	21,37
005-A2-2	16,91	24,77	21,30
005-A3-1	17,62	27,93	22,38
006-A1-2	11,70	19,19	17,92
006-A2-1	12,33	16,57	17,63
006-A3-2	15,23	22,77	20,50
006-B1-1	13,13	25,17	19,91
006-B2-2	12,86	20,25	18,28
006-B3-1	14,50	22,49	20,20
007-A1-2	17,35	28,61	21,16

007-A2-2	19,48	27,74	22,67
007-A3-1	19,42	26,39	23,86
008-A1-1	18,08	25,17	20,90
008-A2-2	12,92	23,88	19,97
008-A3-2	15,12	24,35	20,07
009-A1-2	17,80	24,78	22,70
009-A2-1	15,14	22,13	21,39
009-A3-2	18,53	23,76	22,72
010-A1-2	17,99	28,05	22,20
010-A2-1	17,23	24,48	20,69
010-A3-3	17,87	27,22	22,19
011-A1-1	14,47	28,10	22,20
011-A2-1	12,75	29,69	24,48
011-A3-1	14,59	25,10	20,99
012-A1-1	20,52	33,17	24,22
012-A2-2	17,02	33,48	22,39
012-A3-1	16,29	28,88	21,66
013-A1-1	16,98	24,22	20,97
013-A2-1	13,43	21,65	17,21
013-A3-1	13,86	21,33	19,42
013-B1-1	14,75	19,91	20,89
013-B3-1	13,97	19,73	19,13

3.1.4.2 Zellkernform

Betrachtet man die Zellkerne in den Sphäroiden lichtmikroskopisch fällt eine Varianz der Zellkernform auf einem Spektrum von länglichoval bis rund auf. Der Einsatz des Algorithmus macht eine genauere Angabe über die Form der Zellkerne und deren Häufigkeit im jeweiligen Präparat möglich. Ein Zellkern mit dem zugeordneten Wert „0“ entspricht einem im Anschnitt runden Zellkern, während ein Zellkern mit dem Wert „0,8“ im Anschnitt flach oval ist. Betrachtet wird die Formverteilung der Zellkerne je nach zugeordneter Kategorie. Label „0“ entspricht den nicht-kondensierten Zellkernen, Label „1“ den kondensierten Zellkernen und Label „2“ den irregulären Zellkernen. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die graphische Darstellung der Formverteilung der Zellkerne in den Präparaten 001-A1, 001-A2 und 001-A3. Die weiteren Grafiken finden sich im Anhang.

In der Zusammenschau der Formverteilung zeigt sich, dass in allen untersuchten Fällen über der Hälfte aller Zellen eines Präparates eine Exzentrizität von 0,5 oder höher zuzuordnen ist. Eindeutig zeigt sich auch, dass Zellen der Kategorie „kondensiert“ ihr Maximum an Zellen bei höheren Werten für Exzentrizität zeigen als Zellen der beiden anderen Gruppen. In 36 von 46 Fällen liegt die höchste Anzahl an Zellen eines Exzentrizitätswertes im Bereich 0,8-1,0. Es zeigt sich ein charakteristischer treppenförmiger Anstieg der Anzahl an Zellkernen pro Exzentrizitätswert von 0 zu 1 (Abb. 21, Anhang). In der Gruppe der irregulären Zellkerne ist dies nur in 6 von 46 Sphäroiden, in der Gruppe der nicht-kondensierten Zellkerne in 0 von 46 Sphäroiden der Fall. Die Form der kondensierten Zellkerne

weicht also stärker von der eines Kreises ab als die der Kategorien „nicht-kondensiert“ und „irregulär“.

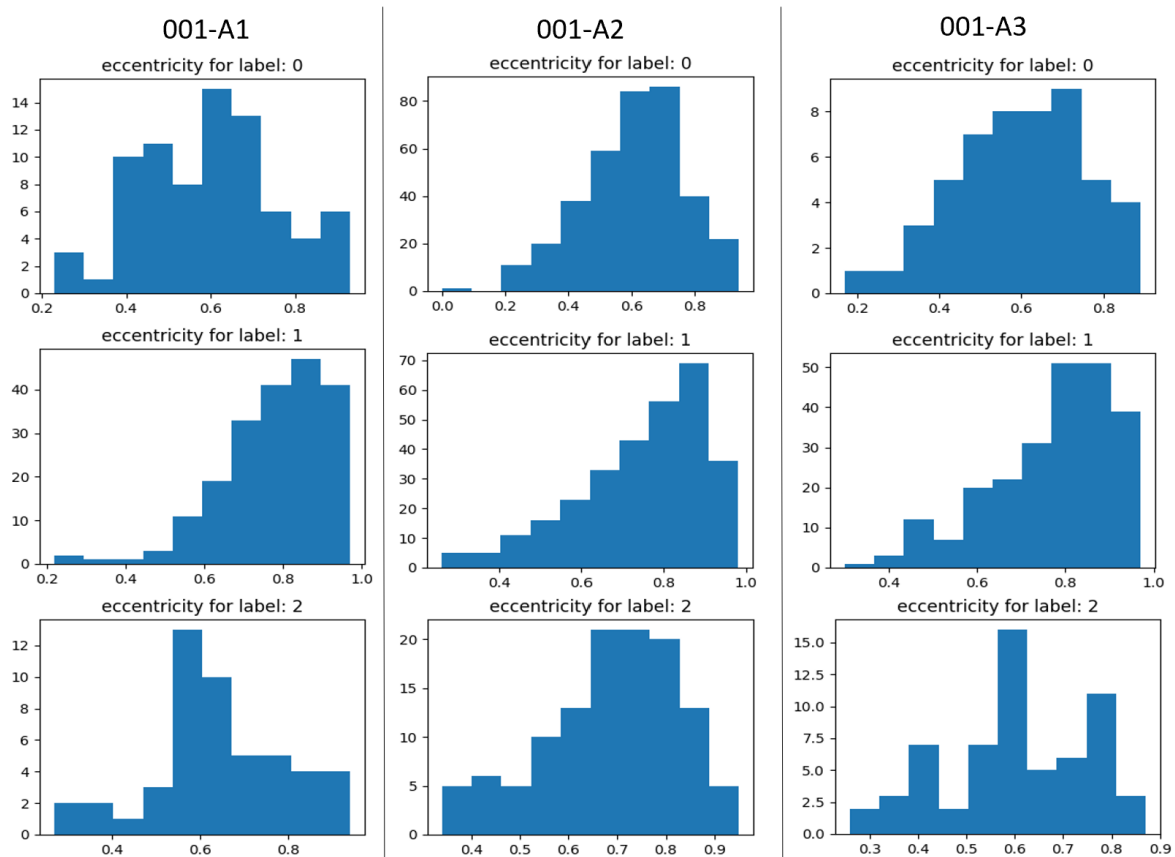


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Anzahl und Verteilung der Zellkernform in den Präparaten 001-A1, 001-A2 und 001-A3. Zellkerne mit einer Exzentrizität von Null sind rund, Zellkerne mit einer Exzentrizität von 0,8 flach-oval. Die Zellkerne pro Exzentrizitätswert für Label 1 steigen treppenförmig an.

3.2 Transmissionselektronenmikroskopische Merkmale

3.2.1 Veränderungen des Chromatins

Die ultrastrukturelle Analyse der Sphäroide zeigte korrelierend mit den histologischen Ergebnissen heteromorphe Zellkerne. Ultrastrukturell ließen sich die einzelnen Gruppen jedoch feiner differenzieren und weiteren Untergruppen zuordnen. Die folgenden Bilder (Abbildung 21- 26) zeigen charakteristische Veränderungen des Chromatins, wie sie in unterschiedlicher Ausprägung in allen elektronenmikroskopisch untersuchten Präparaten zu finden sind. Abbildung 22 zeigt exemplarisch den Zustand eines Präparates, sowie morphologisch unterschiedliche Zellkerne. Die Zellkerne lassen sich morphologisch in drei Gruppen unterteilen, wobei zwei dieser in Abbildung 22 deutlich abgrenzbar sind (1 und 2). Die mit 1 markierte Zellgruppe zeichnet sich durch aufgelockertes Chromatin bei unscharf abgrenzbarem Nukleolus aus. Die Zellkerne sind klar von der umgebenden Matrix abgrenzbar. Eine 10.000fache Vergrößerung eines solchen Zellkerns zeigt Abbildung 23. Die mit 2 markierte Zellgruppe weist kondensiertes Chromatin auf, welches sich entlang der

Kernmembran anlagert. In Abbildung 24 stellt sich ein Zellkern dieser Gruppe mit scharf abgrenzbarem Nukleolus dar. Abbildung 25 zeigt einen Zellkern der dritten Gruppe, charakterisiert durch elektronendichtes, kondensiertes Chromatin, welches flächig im Zellkern zu finden ist.

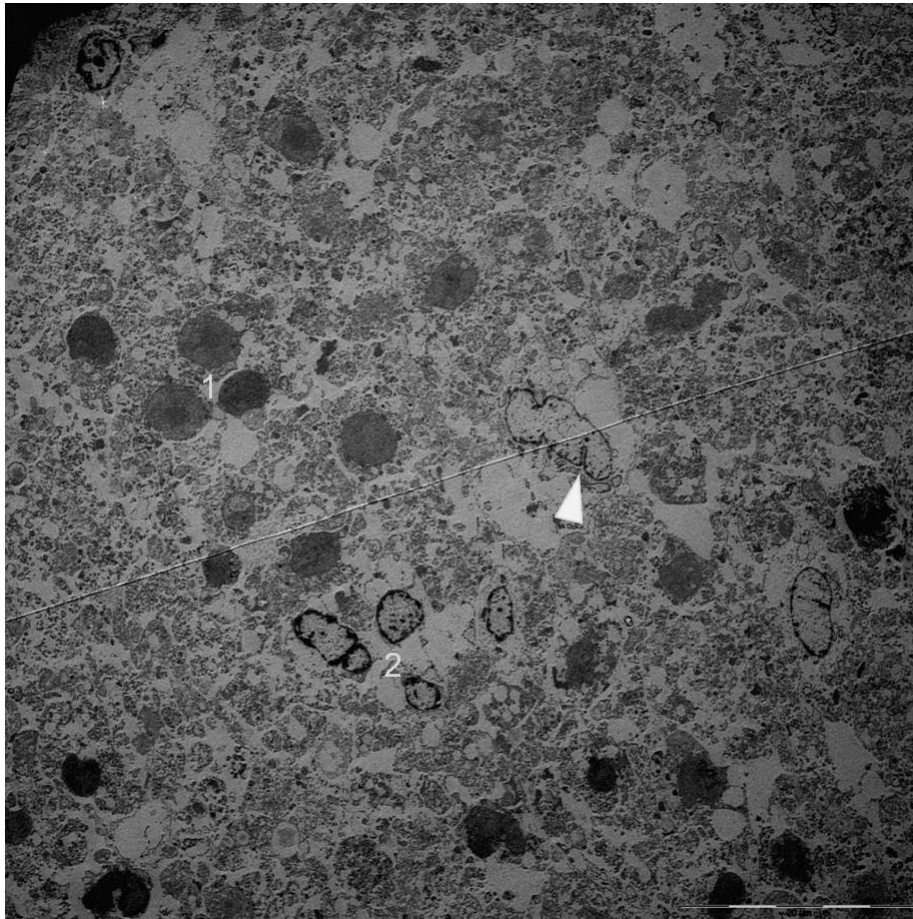


Abbildung 22: Aus Präparat 001-A2, 1250fache Vergrößerung. Heterogene Zellkerne mit teils kondensiertem Chromatin. Keine Abgrenzung der Zellwände oder Zell-Zellkontakte möglich. Auffaltung der Kernmembran erkennbar (Pfeilspitze). Zellkerne mit aufgelockertem, homogen verteiltem Chromatin (1). Zellkerne mit kompakt kondensiertem Chromatin (2).

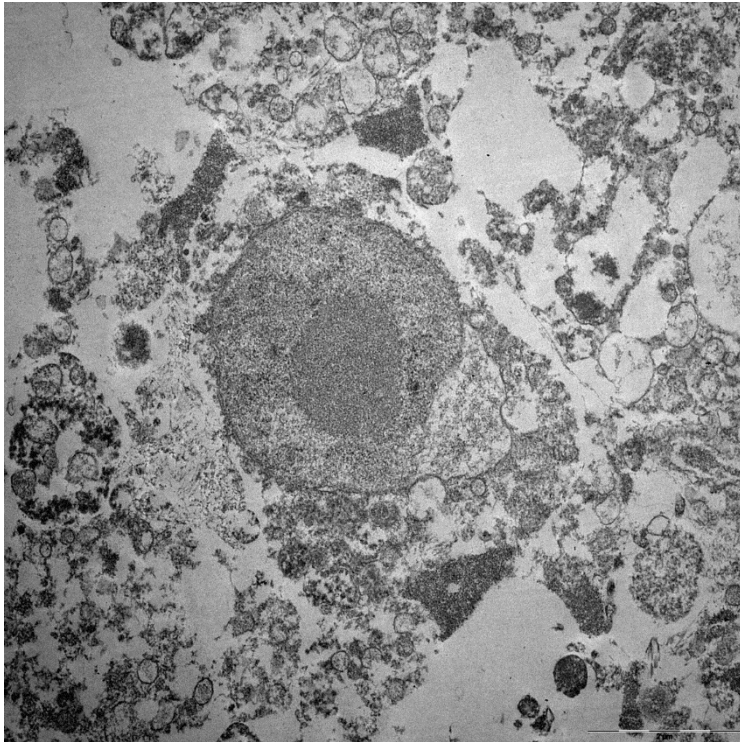


Abbildung 23: Aus Präparat 001-A2 10.000fache Vergrößerung. Geringfügig kondensiertes Chromatin, sichtbarer Nucleolus. Zellwand und Zellorganelle nicht vollständig erhalten.

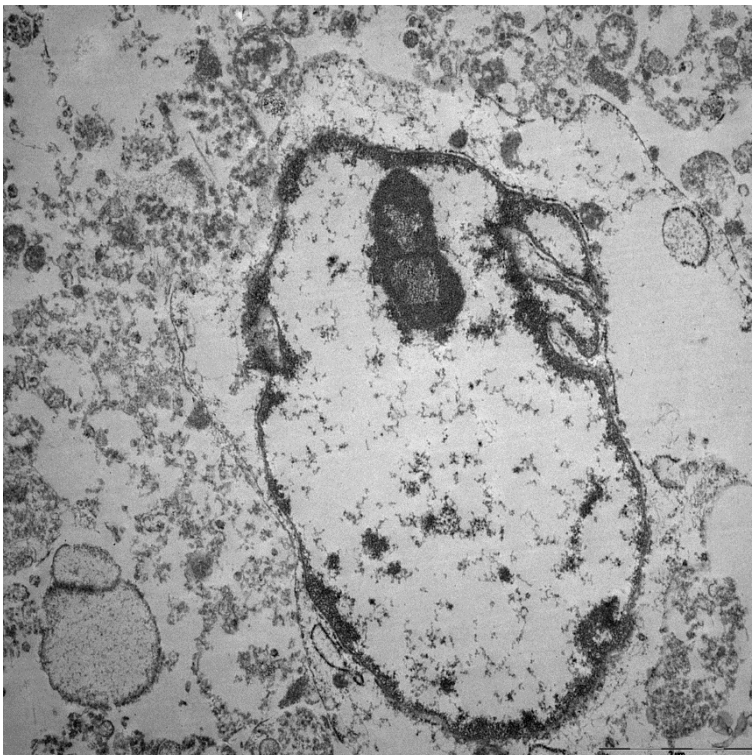


Abbildung 24: Aus Präparat 001-A2 10.000fache Vergrößerung. Kondensiertes Chromatin entlang der Kernmembran, sichtbarer Nucleolus.

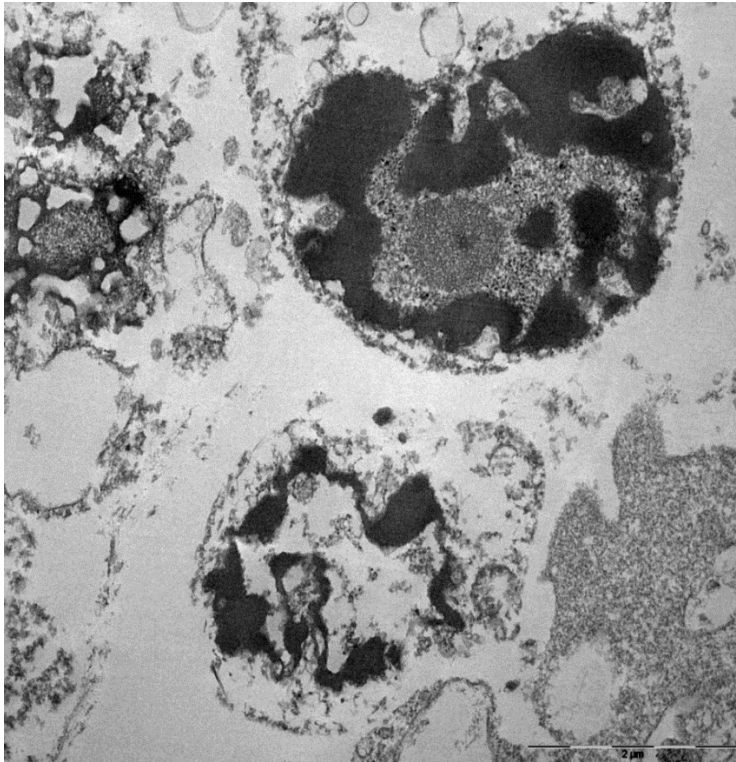


Abbildung 25: Aus 006-A1, 10.000fache Vergrößerung. Fleckig, elektronendicht kondensiertes Chromatin erkennbar

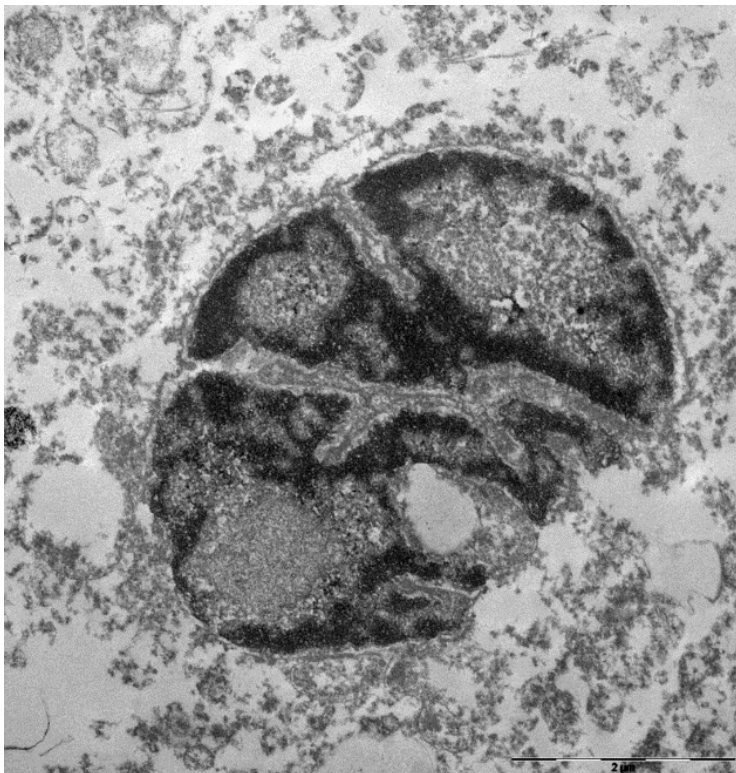


Abbildung 26: Zellkern in Präparat 008-A1 10.000fache Vergrößerung. Das Chromatin zeigt sich an der Kernmembran kondensiert. Die Morphologie weist Ähnlichkeiten mit der von Chondrozyten nach Hyperthermie oder Behandlung mit Staurosporin auf (99)

3.2.2 Exemplarische Betrachtung der ultrastrukturell erkennbaren Zellkernform

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Sphäroide macht eine genauere Betrachtung der Form der Zellkerne möglich. Eine Auffaltung der Kernmembran, welche in der Lichtmikroskopie nicht darstellbar ist, lässt sich hier als weiteres Analysemerkmal nutzen. In Abbildung 22 lässt sich eine Auffaltung der Kernmembran erkennen (Pfeilspitze).

3.2.3 Zustand der Zellorganelle, Zell-Zellkontakte und der Extrazellulären Matrix

Eine eindeutige Abgrenzung einzelner Zellorganelle sowie der Zell-Zellkontakte ist nicht möglich. Dies lässt sich vermutlich auf die initiale Fixierung mit Formalin und auf das Belassen der Chondrozytensphäroide in den Applikatorspritzen zurückführen.

3.2.4 Lipideinlagerungen

Die schon in der Lichtmikroskopie der Semidünnschnitte auffallenden grauen, teils eingesprenkelten, teils flächigen Einlagerungen stellten sich in der ultrastrukturellen Analyse als gut abgrenzbare Lipideinlagerungen dar. Abbildung 27 zeigt diese in Präparat 004-A1.

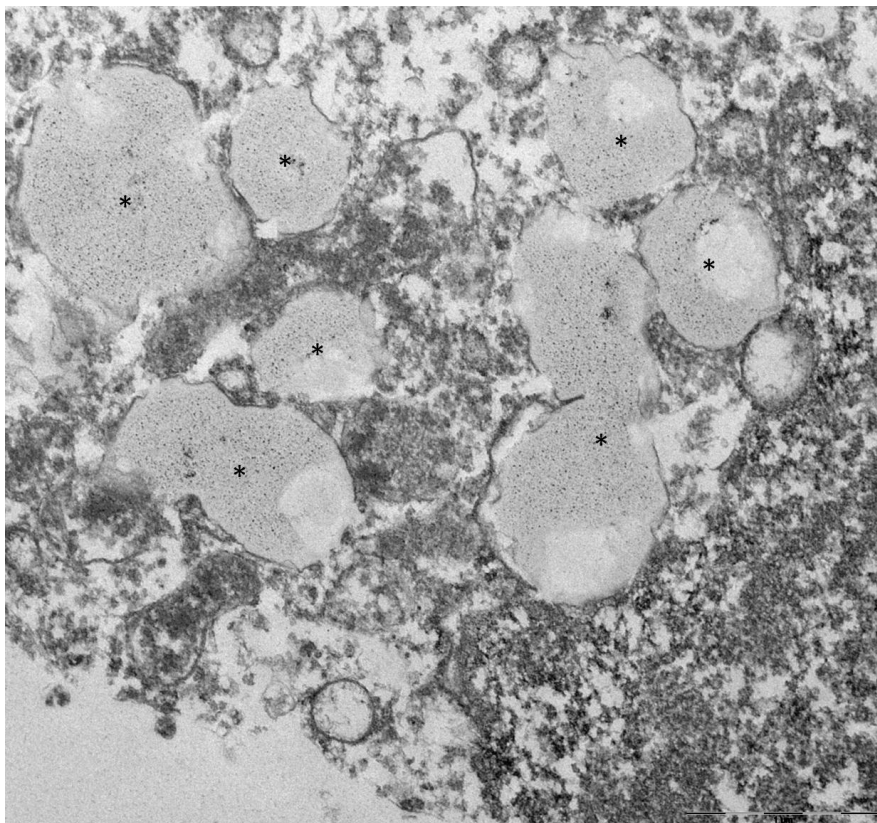


Abbildung 27 Präparat 004-A1 in 20.000facher Vergrößerung. Lipidtropfen mit * markiert.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt sowohl grundlegende Erkenntnisse über den notwendigen Umgang mit chondrozytären Sphäroiden, um optimal auswertbare Präparate zu erhalten, als auch wichtige Hinweise auf Differenzen in den Strukturmerkmalen zwischen den Sphäroiden unterschiedlicher Patienten. Des Weiteren bezieht sie neue Methoden der digitalen Auswertung mit ein und zeigt deren Wert sowohl durch zusätzlich auswertbare Parameter als auch durch die Vermeidung einer Stichprobenverzerrung.

Ein grundlegendes Ergebnis dieser Arbeit ist die essenzielle Notwendigkeit einer optimalen Fixierung der Sphäroide direkt nach Öffnung der Applikatoren, um alle Vorteile der Semidünnschnittpräparate ausschöpfen zu können.

In der Sichtung des auswertbaren Materials wird deutlich, dass durch die Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie in Form von Semidünnschnittpräparaten deutlich besser auszuwertende und zu vergleichende Präparate entstehen. Dies ist vorwiegend den unterschiedlichen Einbettmethoden geschuldet. Die geringe Größe (ca. 600-700µm Durchmesser) der Sphäroide macht das exakte Anschneiden in den im Verhältnis großen Paraffinblöcken schwierig. Im Gegensatz dazu lässt sich ein einzelner Sphäroid gut in der Spitze eines CHIEN-Einbettförmchens platzieren und ist so im Anschnitt gut zu treffen. Leere Präparate und dadurch nötig werdende erneute Anschnitte mitsamt aller folgenden Präparationsschritte werden also durch das vorrangige Verwenden der in Epon eingebetteten Proben vermieden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass jeder Sphäroid genutzt werden kann und so von vornherein eine geringe Anzahl der Sphäroide für die strukturellen Untersuchungen ausreicht. Dies ist von besonderer Relevanz, da für die Erzeugung der Sphäroide, wie unter 2.3.3 beschrieben, gesunde Zellen des Patienten entnommen werden müssen. Eine Nutzung einzelner Sphäroide zur Qualitätskontrolle vor Implantation muss daher gründlich abgewogen werden und sollte so wenig patienteneigene Zellen wie möglich erfordern.

Die in der Aufbereitung der Sphäroide für die elektronenmikroskopische Beurteilung entstehenden Semidünnschnitten zeigen im Hinblick auf die Beurteilung der Sphäroide in der Lichtmikroskopie einige Vorteile gegenüber der Paraffinpräparate. Sie sind mit einer Schichtdicke von 0,75µm deutlich dünner als die 3 µm dicken

Paraffinschnitte. Dies ermöglicht die, in den Ergebnissen gezeigte, verbesserte Wahrnehmung einzelner Strukturmerkmale. Besonders die Kerne, in welchen das Chromatin entlang der Kernmembran kondensiert ist, sind so deutlich besser zu erkennen.

Ein weiterer Vorteil der Semidünnschnitte gegenüber den HE gefärbten Paraffinpräparate ist die gute Erkennbarkeit und, mit Hilfe des Algorithmus, Quantifizierbarkeit der Lipideinlagerungen, die in einigen der Präparate erkennbar sind. Es ist keine gesonderte Anfärbung notwendig, was bei den sehr kleinen Präparaten einen weiteren Anschnitt erspart. Zudem besteht die Möglichkeit die genaue Struktur dieser Lipideinlagerungen in der TEM zu charakterisieren. Auch ist bei einer alleinigen Verwendung der Semidünnschnitte, sowohl für die Lichtmikroskopie als auch die ultrastrukturelle Analyse, eine Untersuchung einzelner Kerne mit beiden Methoden möglich. Bei guter Korrelation der schon in der Lichtmikroskopie erkennbaren Merkmale mit elektronenmikroskopischen und klar definierten Qualitätsmarkern könnte langfristig die zeitintensivere Elektronenmikroskopie nicht mehr in jedem Fall nötig sein.

Einer der in der vorliegenden Arbeit herausgearbeiteter Unterschied zwischen den Chondrozytensphäroiden unterschiedlicher Patienten ist die Größe. Da eine dreidimensionale Vermessung der einzelnen Sphäroide nicht vorgenommen wurde, wurde als Parameter die Größe der Anschnittsfläche der Sphäroide die als ganz gewertet wurden verwendet. Diese bewegt sich zwischen 134.212,77 (013B1) und 526.278,6 μm^2 (009A2), wobei sich die Anzahl der Kerne pro 100.000 μm^2 mit 135,67 (013B1) und 123,5 (009A2) nahe beieinander liegen. Bei Patient 9 liegen alle Sphäroide, die als Semidünnschnitte vorliegen, über der durchschnittlichen Fläche von 299.662,82 μm^2 . Bei Patient 13 liegen alle Präparate aus Spritze B darunter und aus Spritze A nur einer leicht über dem Durchschnittswert (013A1: 315.165,99 μm^2). Die Abweichung in der Größe der Anschnittsfläche der Sphäroide eines Patienten schwankt zwischen 1.875,6 μm^2 und 180.953,22 μm^2 . Im Durchschnitt liegt sie bei 79.728,36 μm^2 . Diese Schwankungen könnten dadurch zu erklären sein, dass beim Anschneiden der Sphäroide nicht in etwa der Bereich mit dem größten Umfang getroffen wurde. Da aber die Abweichungen zwischen den Präparaten eines Patienten deutlich geringer ist als die Abweichung zwischen den Patienten 013 und 009, liegt nahe, dass diese unterschiedlich große Sphäroide ausgebildet haben. Ursula Anderer

und Jeanett Libera beschreiben in ihrer Arbeit eine Größenbandbreite von 350-500 μm nach zwei Wochen der humanen Chondrozyten in Kultur.(81) Das würde eine Anschnittsfläche von ca. 96.211,275- 196.349,541 μm^2 bedeuten. Auch hier zeigt sich also ein deutlicher Unterschied in der Größe der Sphäroide. Da wie bereits gezeigt die Kerndichte zwischen Präparaten sehr unterschiedlicher Größe nicht stark unterschiedlich ist, scheint ein größerer Durchmesser nicht zwangsläufig ein Indikator für eine hohe Fähigkeit ECM zu bilden zu sein. Fraglich ist nun, warum Patienten unterschiedlich große Sphäroide ausbilden und ob die Größe der Aggregate eine Auswirkung auf das Outcome der Patienten hat.

Die Kerndichte pro 100.000 μm^2 unterliegt mit 92,02 bis 344,84 großen Schwankungen, was die Frage aufwirft ob und wenn, wie die Kerndichte mit einem optimalen Ausgleich des Defekts korreliert. Eine geringe Dichte an Zellkernen könnte hinweisend auf eine ausgeprägtere Fähigkeit der Chondrozyten sein, ECM zu bilden und liegt näher am physiologischen Bild des hyalinen Knorpels.(15,16) E. B. Hunziker et al. zeigten eine durchschnittliche Zelldichte über alle Schichten von 188 Chondrozyten pro mm^2 .(17) Eine geringere Kerndichte könnte aber auch auf ein vergrößertes Zellvolumen zurückzuführen sein. Grund hierfür könnten zum Beispiel osmotisch suboptimale Bedingungen sein.(114) Um den Zustand der Zellen und die Zusammensetzung der ECM zu beurteilen ist eine erneute Untersuchung der Ultrastruktur an optimal fixierten Proben nötig.

Einige Präparate (siehe Tabelle 4) zeigen histologische Merkmale, die für die Ausbildung einer Superfizialschicht an der Oberfläche der Sphäroide sprechen. Hierzu zählen die abgeflachten Zellkerne und eine klar abgrenzbare Schicht nach außen.(10,11) Die in den Semidünnschnittpräparaten auffallende durchgängige Schicht könnte für mehrere Lagen parallel angeordneter Kollagenfasern sprechen, wie sie unter physiologischen Bedingungen in der Superfizialschicht zu finden sind. Schon Anderer und Libera beschreiben in ihrem Paper abgeflachte Zellen in der äußersten Schicht ihrer Präparate und ziehen einen Vergleich zum physiologischen Bau gesunden Gelenkknorpels. Sie wiesen Kollagen I und II im Außenbereich der Sphäroide nach.(81) Anderer und Libera beschreiben darüber hinaus das Verhalten dieser Zellen im Kontakt mit dem Knorpeldefekt beziehungsweise der Oberfläche anliegender Sphäroide. In beiden Fällen runden sich die abgeflachten Zellen der Kontaktzone ab, was darauf schließen lässt, dass die Chondrozyten durch Signale

ihrer Umgebung zu Veränderungen ihrer Kern- und Zellstruktur angeregt werden.(81) Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass diese Strukturmerkmale nicht bei allen Patienten vorhanden sind. Geht man davon aus, dass diese Zellen aber zur Adhäsion im Defekt beitragen und wesentlich den Aufbau der Gelenkoberfläche prägen, ist es sinnvoll in einer Folgestudie die Patienten mit und ohne diese Merkmale nachzuverfolgen.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Sphäroide im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass mehrere Präparate eine Riss- und Lochbildung im Zentrum aufweisen. Morphologisch weisen diese Auffälligkeiten Ähnlichkeiten mit den in fetalem Rinderserum kultivierten Sphäroiden in der Arbeit von Anderer und Libera auf.(81) Mehrere Punkte sprechen gegen eine mangelnde Ernährung des Zentrums durch Diffusion als Grund für die Instabilitäten. Zum einen sind Chondrozyten, im Gegensatz zu Zellen anderer Gewebe, für ein Überleben unter bradytrophen Bedingungen ausgelegt, zum anderen zählen die am stärksten betroffenen Präparate (002-A1 und -A3) zu den Präparaten mit unterdurchschnittlich kleiner Anschnittsfläche.(15,16) Bei den anderen betroffenen Patienten existieren jeweils größere Sphäroide ohne dieses Charakteristikum. Anderer und Libera schlussfolgern, dass die die Strukturelle Instabilität, der in fetalem Rinderserum kultivierten Sphäroide, mit einer veränderten Zusammensetzung der Seren in Bezug auf Hormone, Wachstumsfaktoren und xenogener Proteine zusammenhängt.(81) Bezieht man diese These auf die vorliegenden in autologem Serum kultivierten Sphäroide liegt nahe, dass im Falle mancher Patienten die Zusammensetzung des autologen Serums nicht die optimalen Voraussetzungen für das Überleben der Chondrozyten und die Bildung stabiler ECM hat.

Ein weiteres Ergebnis ist ein deutlicher Unterschied in der Menge eingelagerter Lipide zwischen den Patienten. Auffallend ist, dass von den neun betroffenen Patienten bei sechs alle Sphäroide in den Semidünnschnittpräparaten betroffen sind (Präparat 013-B2 kann aufgrund der geringen Restmenge Zellen nicht gewertet werden). Die übrigen drei Patienten sind mit einem Anteil der Lipide von unter einem Prozent der Gesamtfläche gering betroffen. Ein höherer Anteil an Lipideinlagerungen scheint also abhängig von patienteneigenen Faktoren zu sein. Aufgrund der eingeschränkten Beurteilbarkeit der elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich nicht abschließend festlegen, ob es sich um intra- oder extrazelluläre Lipide handelt.

Intrazelluläre Lipide sind in größerer Menge in Chondrozyten der tiefen Zone vertreten, extrazelluläre in der Umgebung von Chondrozyten in oberflächennahen Schichten.(115) Eine Vermehrung cholesterinhaltiger und fettsäurehaltiger extrazellulärer Lipidtröpfchen ausschließlich in der Superfizialschicht ist charakteristisch für die Osteoartrose.(116,117) Bakker, Eijkel et al. setzen dies in Zusammenhang mit einem veränderten Sauerstoffanteil im Gelenk.(117) Da sowohl die zonale Gliederung als auch der unter der Kultivierung verfügbare Sauerstoffanteil nicht exakt den physiologischen Bedingungen entsprechen, kann aus der vorliegenden Lipidverteilung kein Rückschluss auf die Art oder den Zustand der Zellen geschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit, die nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, ist die Bildung von Adipozyten aus pluripotenten Zellen. Pluripotente Zellen mit für Stammzellen typischen Eigenschaften und der Fähigkeit zur chondrogenen, osteogenen und adipogenen Ausdifferenzierung konnten in mehreren Studien in hyalinem Knorpel nachgewiesen werden. Es liegt also nahe, dass sich zumindest geringe Mengen pluripotenter Zellen im ursprünglich entnommenen Material befinden (24,118) Alsalameh, Amin et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine Adipogenese der aus dem menschlichen hyalinen Knorpel entnommenen pluripotenten Zellen unter Zugabe von 500 μ M Methylisobutylxanthine, 1 μ M Dexamethasone, 60 μ M Indomethacin, and 5 μ g/ml Insulin über eine Dauer von vier Wochen. Im Rahmen ihrer Differenzierung zu Adipozyten zeigten die pluripotenten Zellen eine Bildung von Lipidvakuolen. Eine Kultivierung unter diesen Bedingungen für länger als 5-6 Wochen führte allerdings zum Zelltod. Alsalameh, Amin et al. konnten auch zeigen, dass die Anzahl der pluripotenten Zellen in von Arthrose betroffenem Knorpel erhöht ist.(118) Battistelli et al. beschreiben ein vermehrtes Auftreten von Lipidtröpfchen im Zytoplasma in dreidimensionalen Chondrozytenkulturen. Sie schreiben dies einer Plastizität ähnlich mesenchymaler Zellen zu, welche Chondrozyten nach Zugabe von Wachstumsfaktoren zeigen.(97) Ob die von starken Lipideinlagerungen betroffenen Patienten zum Zeitpunkt der Zellentnahme bereits eine beginnende Arthrose aufweisen und eine die Adipogenese begünstigende Zusammensetzung des für die Kultivierung verwendeten autologen Serums zeigen und wenn ja, wie dieses beeinflusst werden kann, muss in folgenden Studien gezeigt werden. Ein weiterer zu untersuchender Aspekt wäre die Menge an pluripotenten Zellen im für die folgende Transplantation entnommenen Knorpel in

Zusammenhang mit der Struktur der daraus entstehenden Sphäroide, sowie mit dem Patienten Outcome.

Das Auftreten von Zellkernen schon lichtmikroskopisch erkennbarer unterschiedlicher Morphologie, wurde anhand einiger Parameter eingehend untersucht. Eine der betrachteten Variablen ist die durchschnittliche Zellkerngröße der jeweiligen Kategorie. Die Größe der Nuklei ist abhängig von mehreren Faktoren und lässt Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen zu. Sind die Zellen hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt, schrumpfen Zelle und Zellkern, unter hypoosmotischen Bedingungen nimmt das jeweilige Volumen zu.(114) Des Weiteren zeigen Chondrozyten aus von Arthrose betroffenen Bereichen vergrößerte Zellkerne.(119) Befindet sich ein Zellkern allerdings in einer späten Phase der Apoptose zeigt er sich verkleinert.(97) Sinnvolle Rückschlüsse aus der Auswertung der durchschnittlichen Zellkerngröße lassen sich also bevorzugt in Zusammenschau mit elektronenmikroskopisch erhobenen Parametern, wie der Verteilung des Chromatins, ziehen.

Die lichtmikroskopisch auffallenden Unterschiede in der Zellkernform zwischen den, aufgrund der Organisation des Chromatins in unterschiedliche Gruppen unterteilten, Zellkernen wurden mit Hilfe des Algorithmus auf ihre Formabweichung von einer runden Form untersucht. Es zeigt sich eine besonders starke Abweichung in der Gruppe der kondensierten Zellkerne. Diese fallen Lichtmikroskopisch wie bereits diskutiert besonders im oberflächlichen Bereich der Sphäroide auf und können als Hinweis auf die Ausbildung einer Superfizialschicht gewertet werden.(10,11) Die Untersuchung der Verteilung der Zellkernformen in verschiedenen Zonen der Sphäroide mit Hilfe der automatischen Bildanalyse könnte in folgenden Studien helfen diese Beobachtung zu objektivieren. Eine dezidierte Aussage über die Ursache dieser Zellkernform insbesondere in Bezug auf die Verteilung des Chromatins lässt sich ohne weitere, umfassendere ultrastrukturelle und funktionelle Analysen nicht treffen. Die im Rahmen dieser Arbeit mögliche ultrastrukturelle Untersuchung der Form der Zellkerne lässt nur in geringem Ausmaß Rückschlüsse auf den Zustand der Chondrozyten zu. Wichtig für die Betrachtung der in Sphäroiden kultivierten Chondrozyten erscheint, dass eine mehrfach gelappte Zellkernform ein typisches Merkmal als gesund gewerteter Chondrozyten in dreidimensionalen Kulturen ist.(97,99,100) Wie auch die durchschnittliche Zellkerngröße ist die ultrastrukturell untersuchte Form der Zellkerne

gemeinsam mit weiteren Faktoren wie der Verteilung des Chromatins, sowie der Ausprägung der Zellorganelle und der Syntheseleistung zu betrachten, weshalb eine weiterführende Untersuchung der Sphäroide unter optimalen Fixierungsbedingungen sinnvoll erscheint.

Lichtmikroskopisch lassen sich nicht nur die bereits in vorangegangenen Abschnitten diskutierten unterschiedlichen Zellkernformen und deren Varianz in ihrer Größe erkennen, sondern bereits Hinweise auf unterschiedliche Zustände des Chromatins in den Zellkernen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen machen es möglich diese genauer zu charakterisieren und dadurch auch weitreichendere Rückschlüsse aus den Semidünnschnitten zu ziehen. Die in Kategorie „kondensiert“ gezählten Kerne korrelieren in der TEM mit deutlich erkennbar kondensiertem Chromatin, wie es von Pascarelli et al. als für gesunde Chondrozyten bezeichnend beschrieben wird.(119) Gleichzeitig zeigt sich teilweise eine leichte randständige Kondensierung des Chromatins, was für eine frühe Phase der Apoptose sprechen könnte.(97) Kerne der Kategorie „nicht-kondensiert“ und „irregulär“ zeigen in der TEM weniger homogene Korrelate. In manchen Fällen zeigt sich eine fleckige, elektronendichte Verteilung des Chromatins (Abb.25 und 26), wie sie von Battistelli et al. für Chondrozyten nach Hyperthermie und Behandlung mit Staurosporin - einer chemischen Verbindung aus der Gruppe der Indolcarbaazole, eingesetzt zur Induktion von Apoptose - dokumentiert wurde und für Chondroptose spricht.(99) Ob dies an der primären Fixierung der Präparate liegt, oder ob die Chondrozytensphäroide bereits vorher Stress ausgesetzt waren, lässt sich nicht abschließend klären. Besonders in diesen Fällen wäre eine Nachverfolgung der Patienten von großem Interesse.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war die Implementierung und der Vergleich digitaler Auswertungsmethoden. Alle Präparate in Form digitaler Dateien einsehen zu können erwies sich als Vorteil, da nicht dauerhaft ein Lichtmikroskop benötigt wurde und der Arbeitsplatz flexibel gewählt werden konnte. Auch die Markierung von Zellkernen oder Bildausschnitten wurde somit erleichtert und gesetzte Markierungen bleiben nachvollziehbar dokumentiert. Einige Aspekte der Auswertung, wie beispielsweise die exakte Angabe der Anschnittsfläche der einzelnen Sphäroide (Tabelle 2) und die daraus errechneten Werte des Zellkern zu Matrix Verhältnisses (Tabelle 6) wurden durch die Bearbeitung der Scans mit der ViewPoint Software möglich, beziehungsweise deutlich erleichtert.

In der Auswertung der Zellkernanzahl mittels automatischer Bildanalyse zeigt sich eine noch eindeutig bestehende Diskrepanz in manuell ausgezählten und mittels Algorithmus ausgezählten Zellkernen (Tabelle 5). Diese beruht vermutlich mitunter auf der unterschiedlichen Intensität der Anfärbung und könnte durch eine größere Anzahl an für den Algorithmus als Lerngrundlage markierten Bildern verringert werden. Je höher die Anzahl an zukünftig zu analysierender Bilder gleicher Art, desto geringer wird der Zeitaufwand der für das Trainieren des Algorithmus benötigt wird, im Verhältnis zur Zeitersparnis durch die automatische Bildanalyse. Eine Nutzung der automatischen Bildanalyse unter den Aspekten der Genauigkeit und Zeitersparnis zeigt sich also besonders bei sehr hoher Präparatanzahl, sehr geringen Unterschieden in der Anfärbung der Präparate und möglichst eindeutig abgrenzbaren Strukturen. Sehr gut lässt sich dies an der Bestimmung der Menge und Verteilung der Lipide erkennen, welche sich farblich im Präparat deutlich vom restlichen Gewebe unterscheiden (Abbildung 17). Die Aussagekraft der automatischen Bildanalyse in der vorliegenden Arbeit ist durch die geringe Anzahl an Präparaten, deren unterschiedlich erhaltene Qualität und die geringe Größe der zu untersuchenden Strukturen eingeschränkt, erweist sich aber trotzdem als wertvoll. Insbesondere die Erfassung von durchschnittlicher Zellkerngröße (Tabelle 7) und Zellkernform (Abbildung 21) aller Zellkerne und nicht nur einzelner Stichproben, wäre ohne automatische Bildanalyse nicht möglich gewesen. Die Formanalyse aller betrachteten Zellkerne lässt eine eindeutige Quantifizierbarkeit subjektiv wahrgenommener Zellkerneigenschaften zu und erhöht so die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit. Positiv zur Qualität der Ergebnisse trägt auch die Eliminierung der Stichprobenverzerrung durch die Erfassung aller Zellkerne in allen Proben bei, die durch die Hinzunahme des Algorithmus möglich wird.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war eine eingehende Auseinandersetzung mit autologen Chondrozytensphäroiden im Hinblick auf Untersuchungsmöglichkeiten, Optionen der Qualitätskontrolle und moderne Möglichkeiten der automatischen Bildanalyse.

Wichtige Ergebnisse dieser Arbeit zeigen sich schon im ersten Umgang mit den Chondrozytensphäroiden. Es lässt sich eine deutliche Überlegenheit der Einbettung der Sphäroide in Epon gegenüber herkömmlichen Paraffinblöcken feststellen. Des Weiteren ist die lichtmikroskopische Analyse der Semidünnschnitte aufgrund der geringeren Schichtdicke den Paraffinpräparaten vorzuziehen.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Sphäroide zeigen sich deutliche Größenunterschiede, Unterschiede in der erhaltenen Struktur der Sphäroide, sowie ein schwankendes Ausmaß an eingelagerten Lipiden. In Bezug auf diese Parameter lässt sich ohne weitere Patientendaten, beispielsweise Patientenalter, Fitnesslevel, Vorerkrankungen, Grad der Arthrose und genaue Diagnostik des jeweiligen autologen Serums kein Zusammenhang erkennen. Auch lässt sich keine Aussage über eine Relevanz für das Outcome des jeweiligen Patienten treffen.

Die Beobachtung einer Struktur ähnlich der Superfizialschicht gesunden Knorpels an der Oberfläche mancher Sphäroide ist ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit, welche von einer Untersuchung des Outcomes der Patienten profitieren könnte.

Die Unterschiede in der Höhe der Zellkerndichte in den Sphäroiden unterschiedlicher Patienten wirft Fragen nach der Menge, Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix auf. Diese könnten in einer umfassenden ultrastrukturellen und funktionellen Analyse, welche die produzierte extrazellulären Matrix in Korrelation mit dem Zustand der Zellkerne eingehend beleuchtet, weiter untersucht werden. So könnte ein Zusammenhang zwischen Zellkerndichte und optimalen Präimplantationsbedingungen der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden.

Um das gesamte Spektrum der ultrastrukturellen Untersuchung der Sphäroide mittels Transmissionselektronenmikroskopie nutzen zu können, ist eine optimale Fixierung der Sphäroide essenziell. Sie bietet allerdings eine gute Ergänzung zur Lichtmikroskopie, indem sie eine genauere Betrachtung der schon in der Lichtmikroskopie unterschiedlich erscheinenden Zellkerne möglich macht.

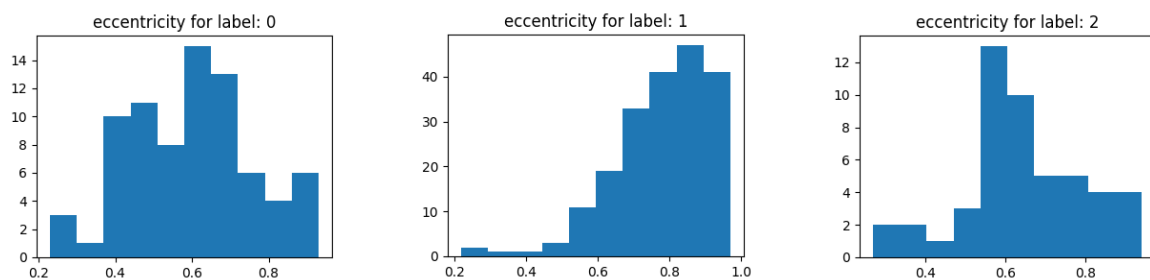
Die in dieser Arbeit genutzten Methoden der Digitalisierung der Präparate erwiesen sich als äußerst hilfreich und erhöhten die Auswertungsmöglichkeiten. Besonders in den Bereichen der Flächenvermessung, sowie in der Dokumentation zeigten sich Vorteile gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie.

Die automatische Bildanalyse eröffnete ein neues Spektrum an Analysemöglichkeiten, insbesondere durch die Möglichkeit alle zu untersuchenden Strukturen in allen vorliegenden Präparaten zu erfassen. Eine Stichprobenverzerrung wird so vermieden. Des Weiteren ermöglicht sie die Hinzunahme neuer Auswertungsparameter, wie beispielsweise die Form und Größe jedes einzelnen Zellkernes.

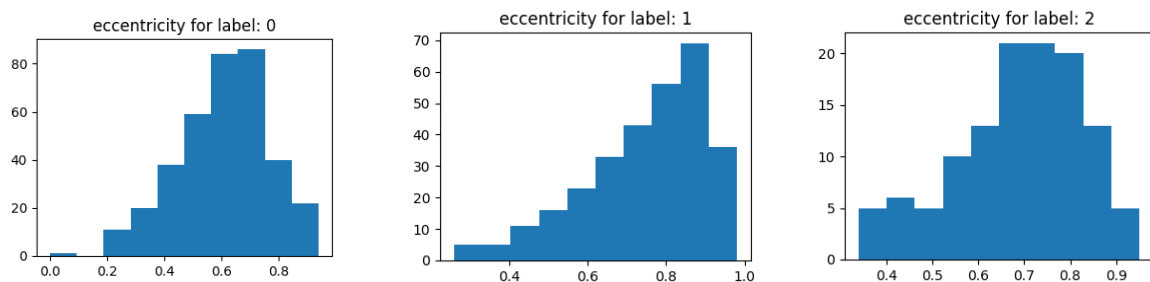
7. Anhang

Graphische Darstellung der Formverteilung der Zellkerne in den einzelnen Präparaten. Betrachtet man die Zellkerne in den Sphäroiden lichtmikroskopisch fällt eine Varianz der Zellkernform auf einem Spektrum von länglichoval bis rund auf. Der Einsatz des Algorithmus macht eine genauere Angabe über die Form der Zellkerne und deren Häufigkeit im jeweiligen Präparat möglich. Ein Zellkern mit dem zugeordneten Wert „0“ entspricht einem im Anschnitt runden Zellkern, während ein Zellkern mit dem Wert „0,8“ im Anschnitt flach oval ist. Betrachtet wird die Formverteilung der Zellkerne je nach zugeordneter Kategorie. Label „0“ entspricht den nicht-kondensierten Zellkernen, Label „1“ den kondensierten Zellkernen und Label „2“ den irregulären Zellkernen.

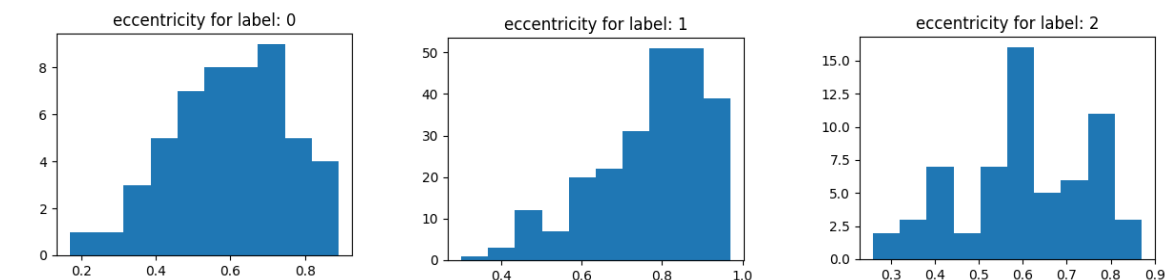
001-A1-1



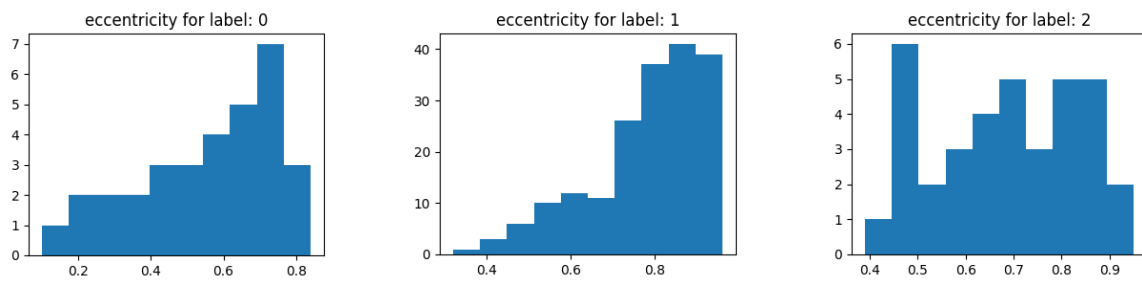
001-A2-1



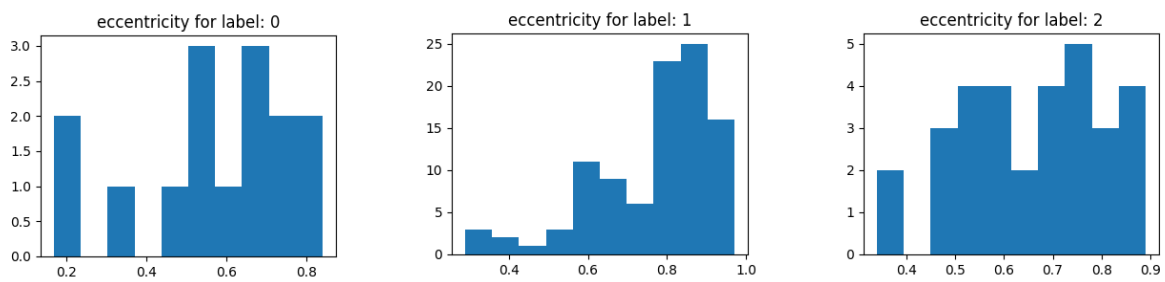
001-A3-1



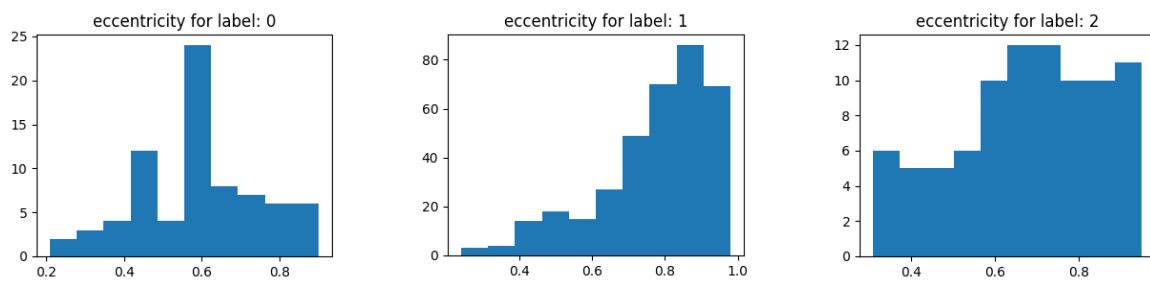
002-A1-1



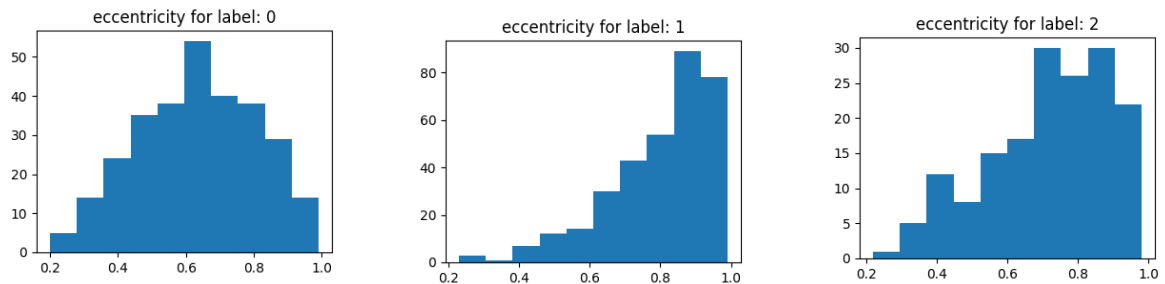
002-A2-1



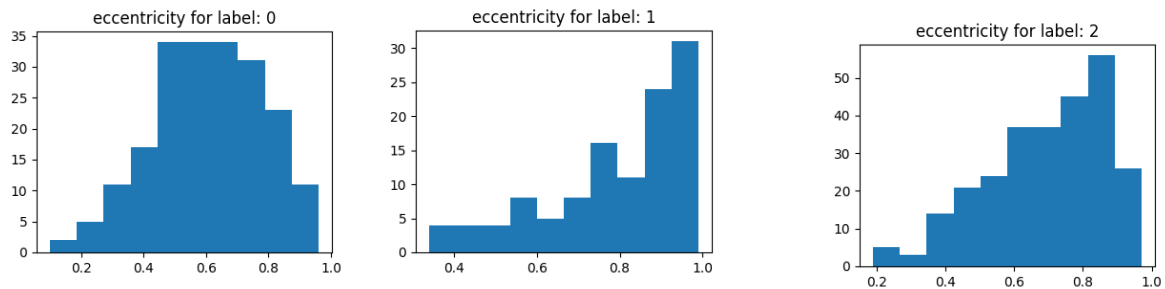
002-A3-1



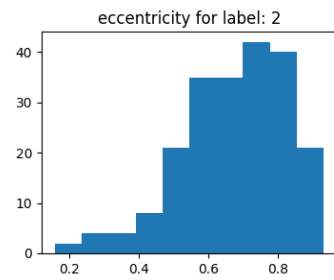
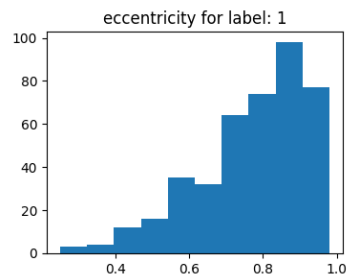
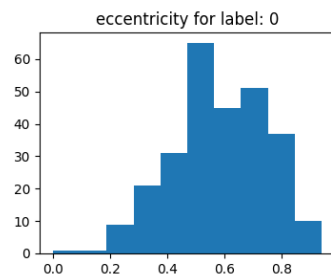
003-A1-1



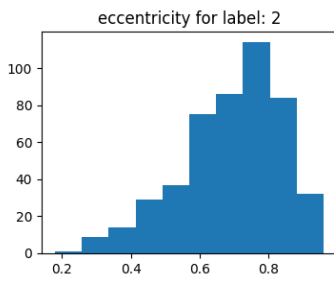
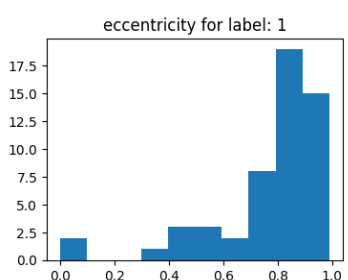
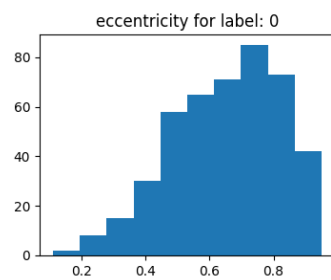
003-A2-1



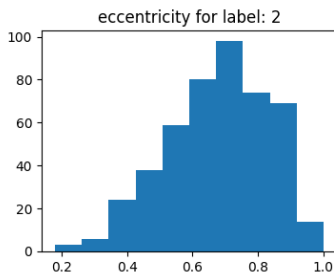
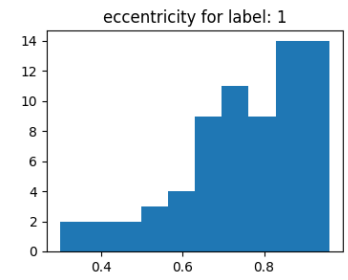
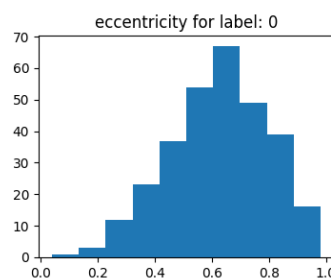
003-A3-1



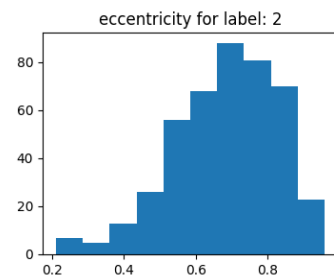
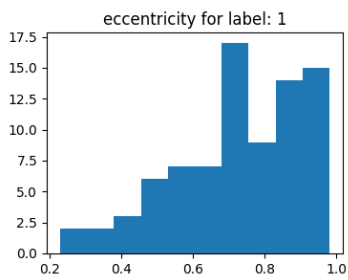
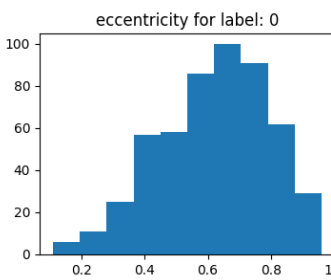
004-A1-1



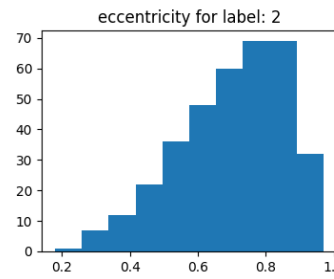
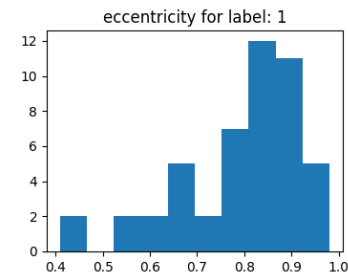
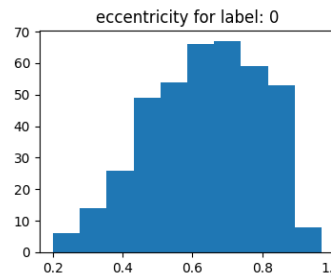
004-A2-1



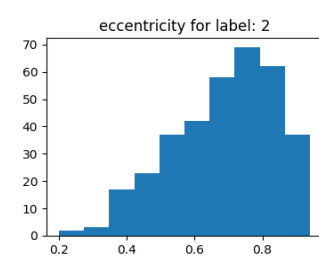
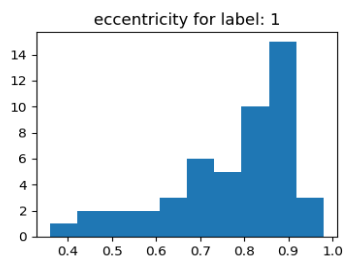
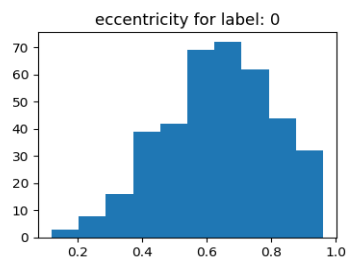
004-A3-1



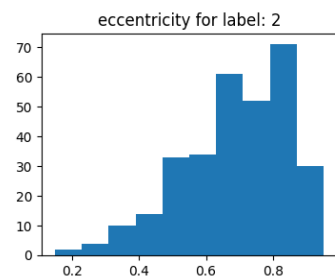
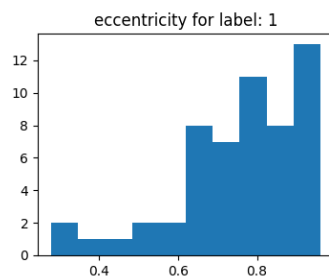
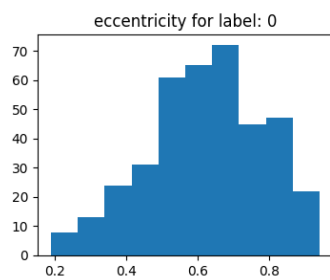
004-B1-1



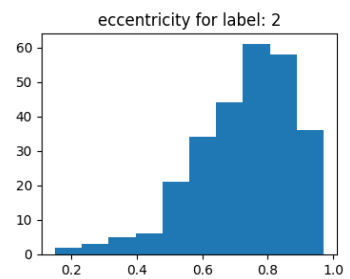
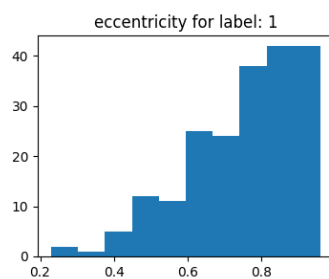
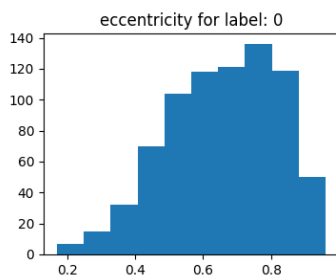
004-B2-1



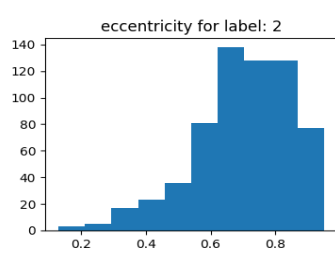
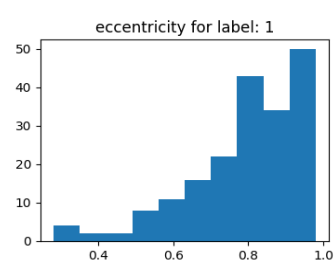
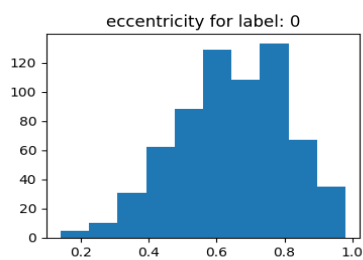
004-B3-1



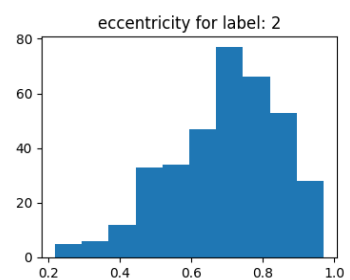
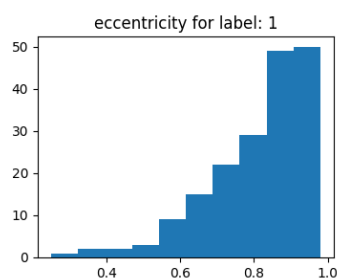
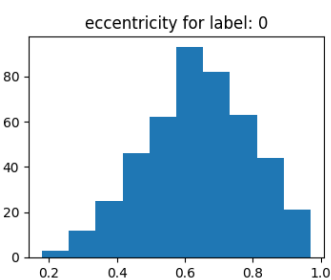
005-A1-1



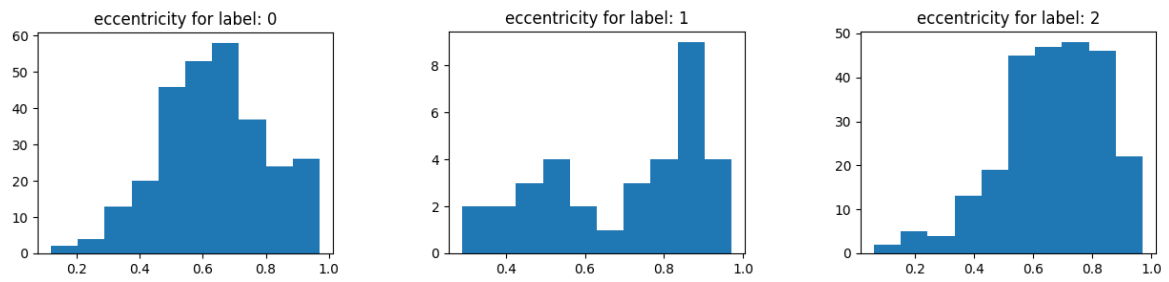
005-A2-2



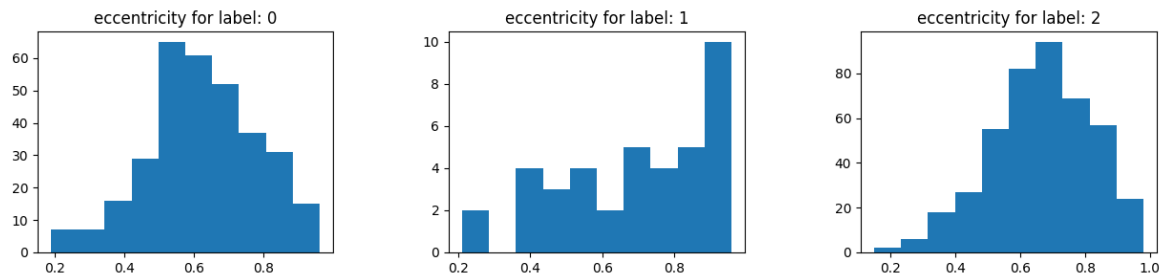
005-A3-1



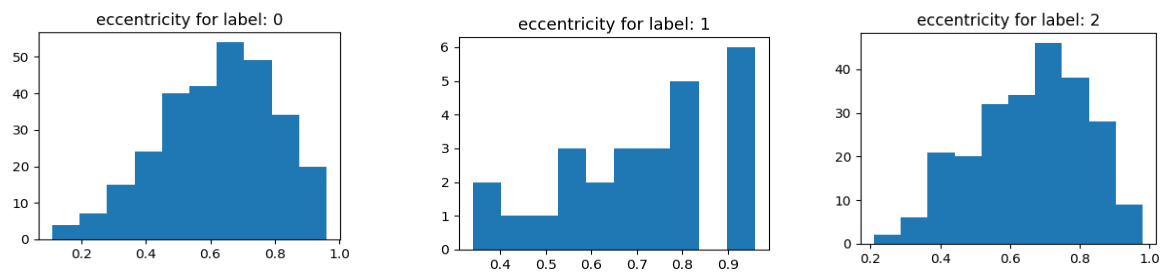
006-A1-1



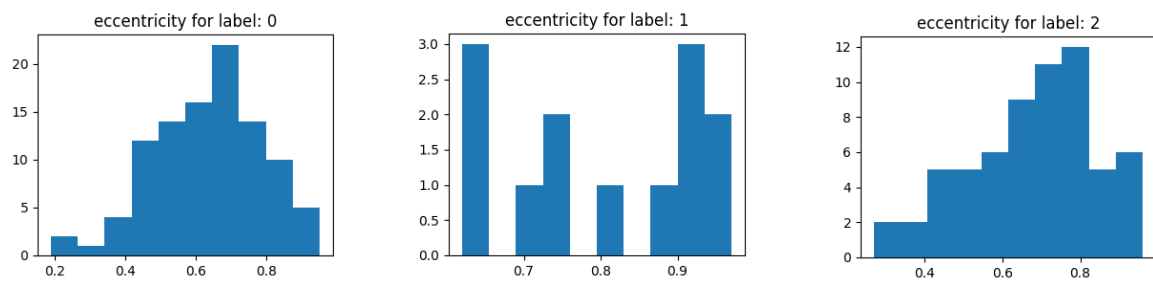
006-A2-1



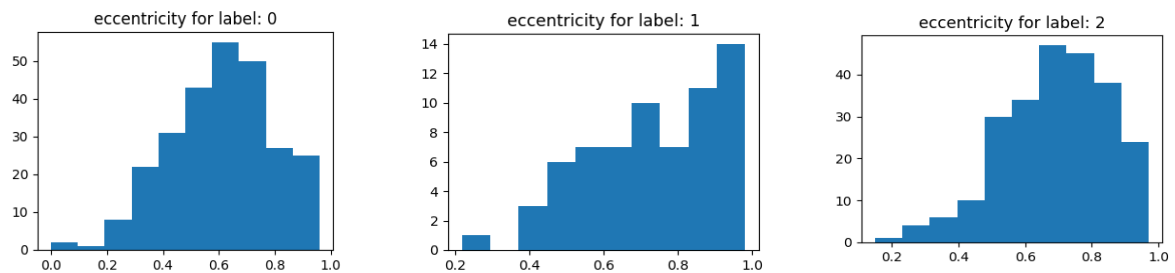
006-A3-2



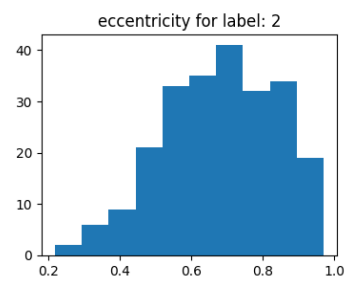
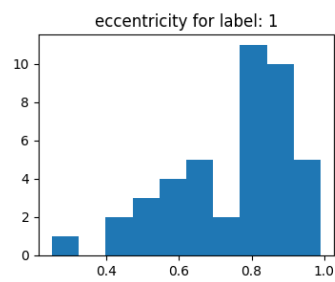
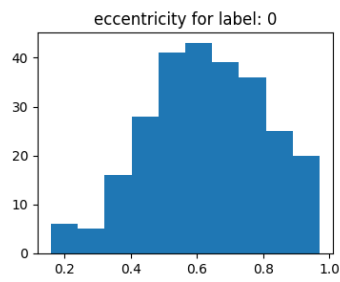
006-B1-1



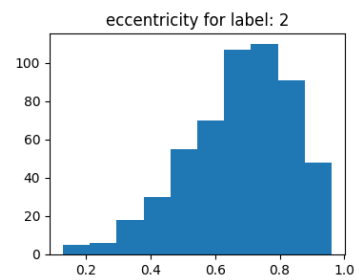
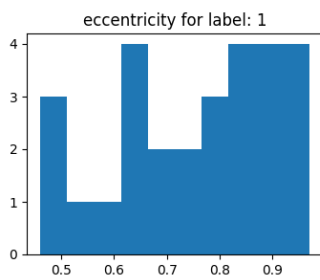
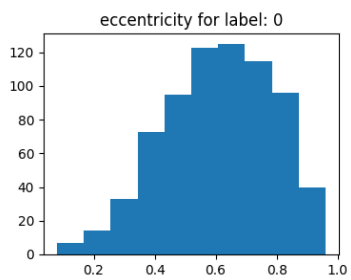
006-B2-2



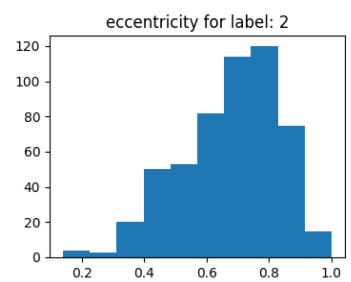
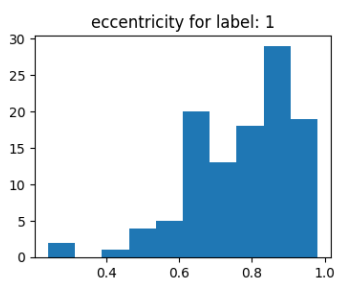
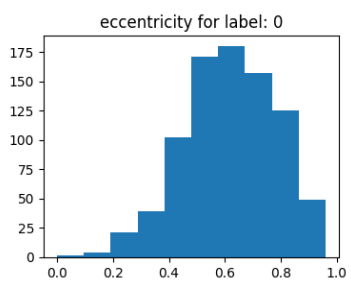
006-B3-1



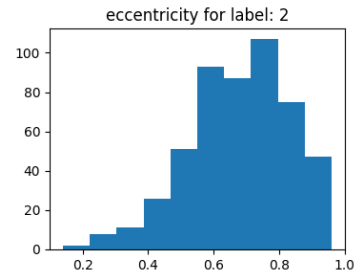
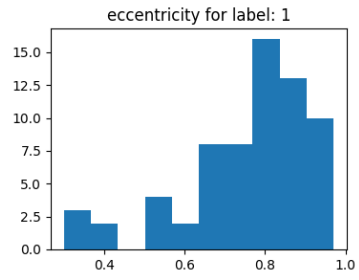
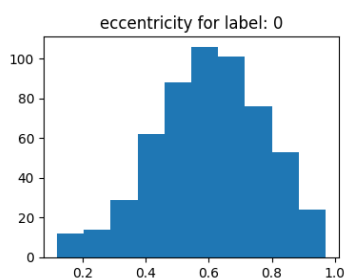
007-A1-2



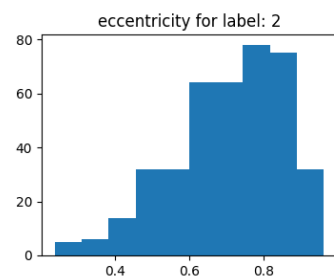
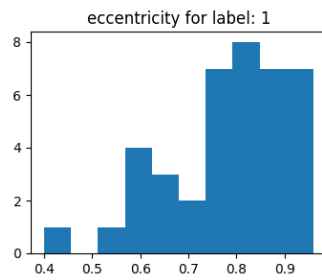
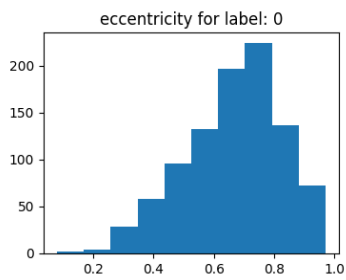
007-A2-2



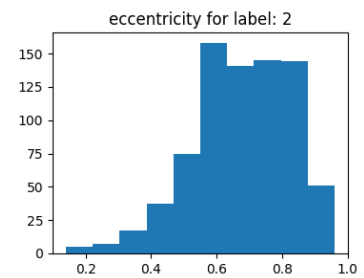
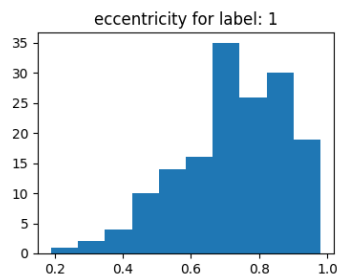
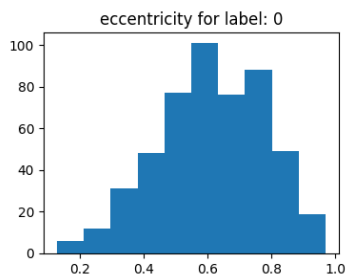
007-A3-1



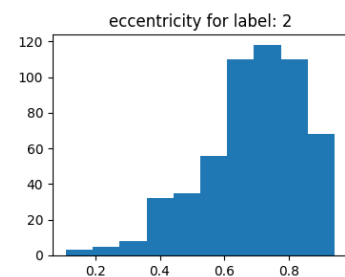
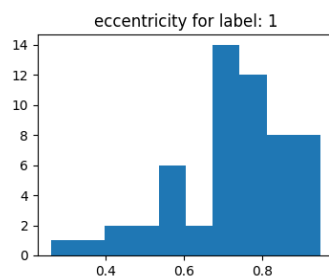
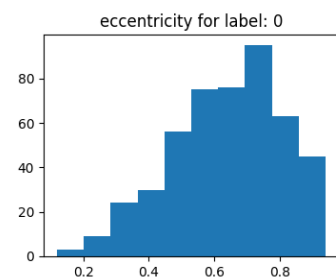
008-A1-1



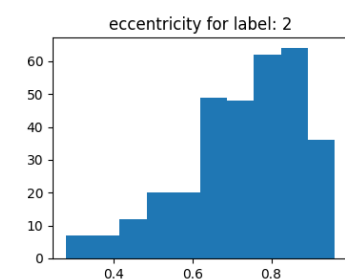
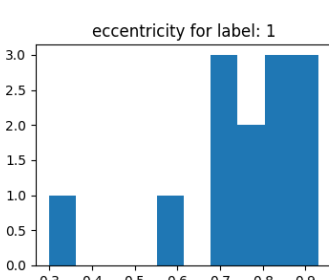
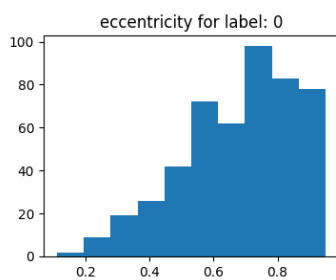
008-A2-2



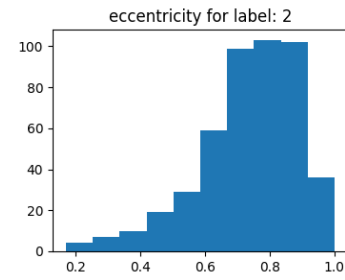
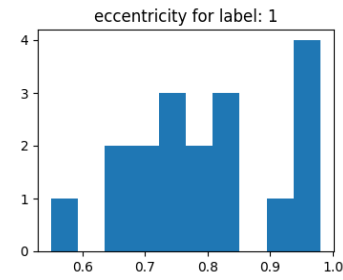
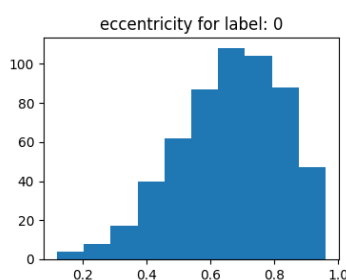
008-A3-2



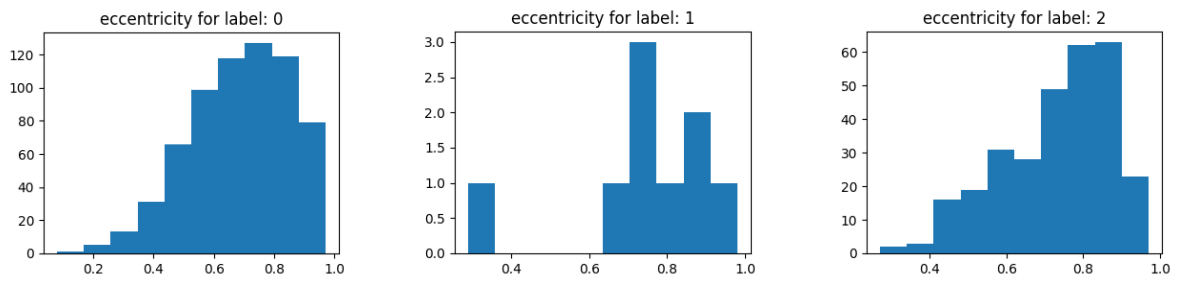
009-A1-2



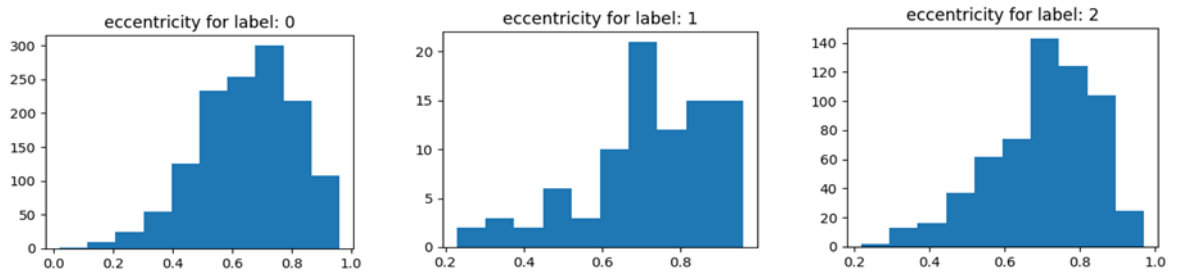
009-A2-1



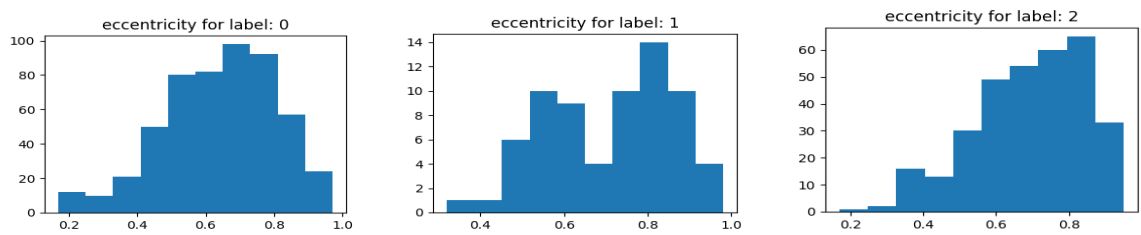
009-A3-2



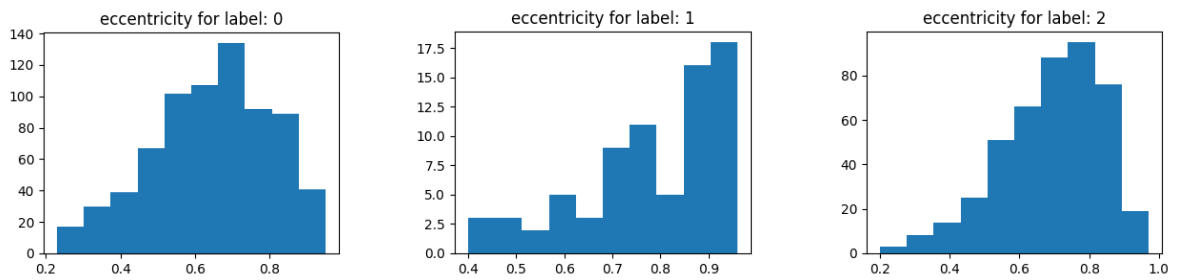
010-A1-2



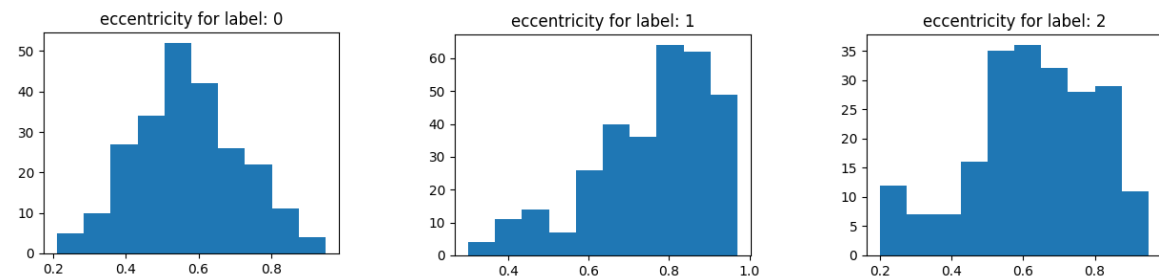
010-A2-1



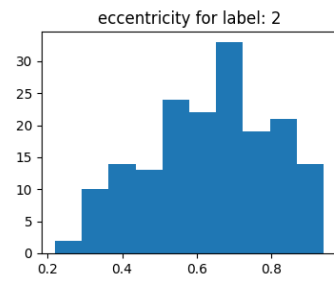
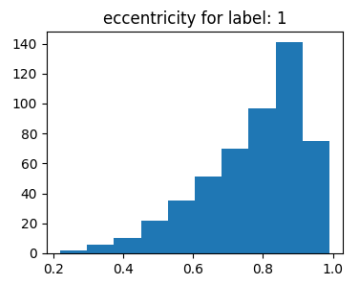
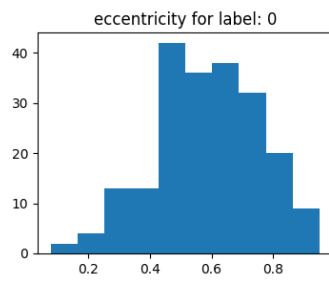
010-A3-3



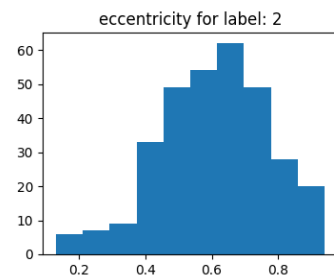
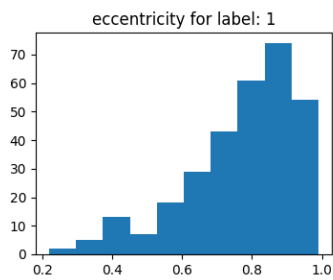
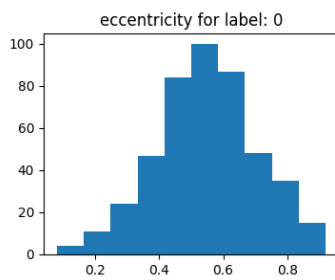
011-A1-1



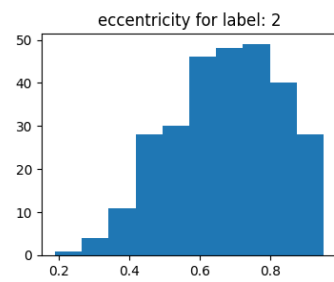
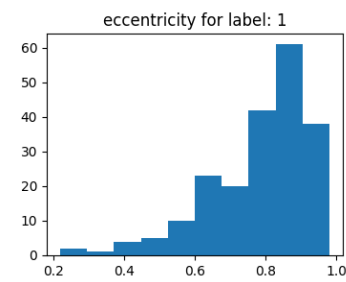
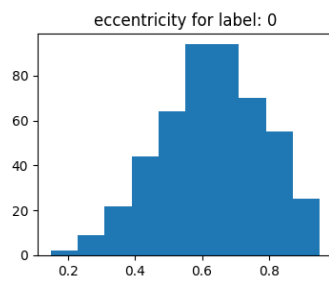
011-A2-1



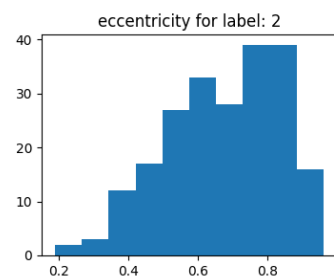
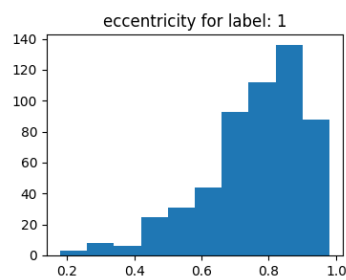
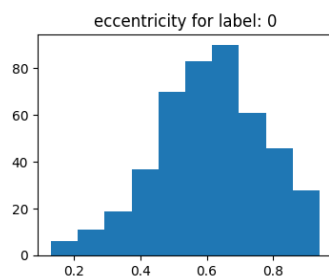
011-A3-1



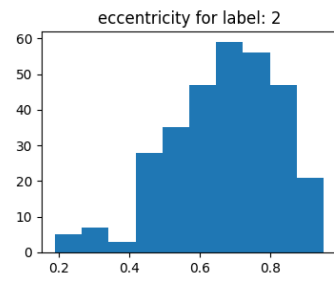
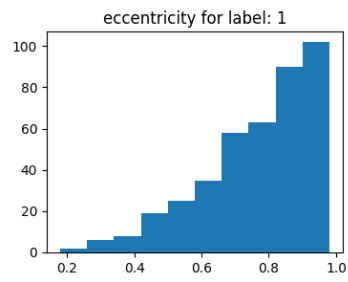
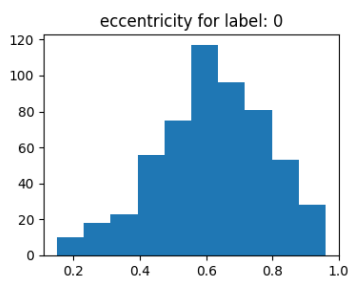
012-A1-1



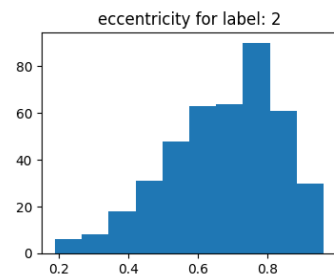
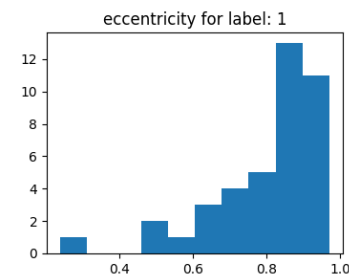
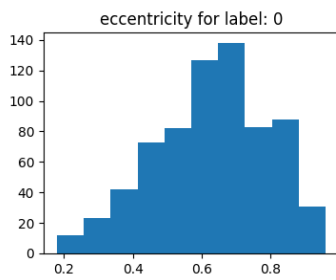
012-A2-2



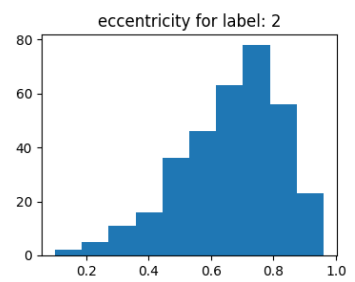
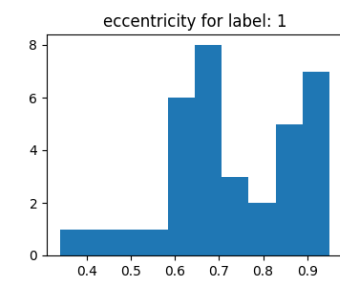
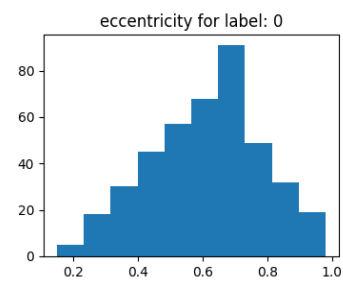
012-A3-1



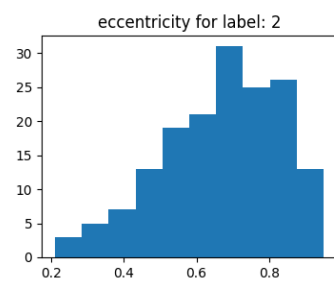
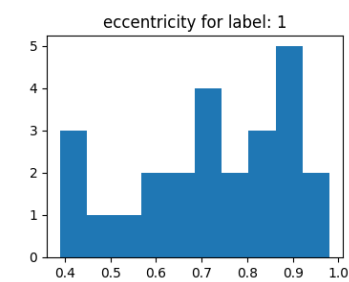
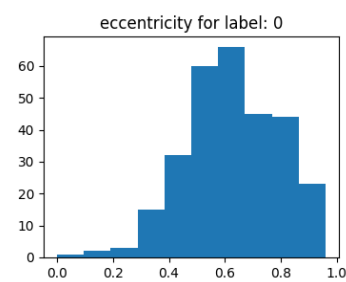
013-A1-1



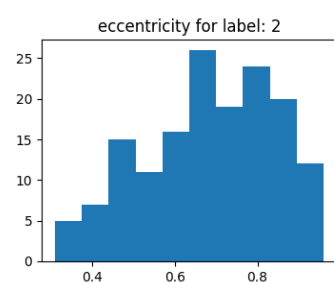
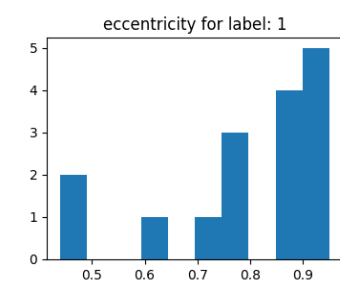
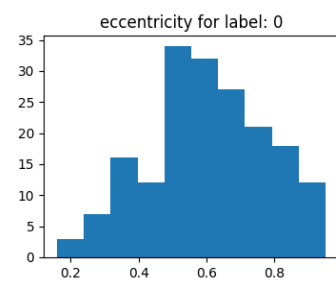
013-A2-1



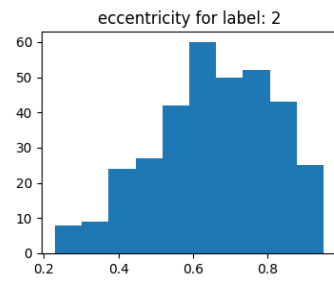
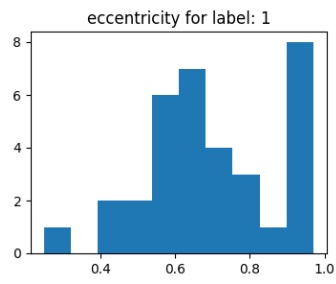
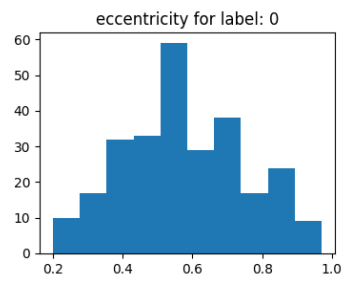
013-A3-1



013-B1-1



013-B3-1



8. Literaturverzeichnis

1. Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher, Markus Voll, Karl Wesker. Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 4th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
2. Kim Y, Lee KM, Koo S. Joint moments and contact forces in the foot during walking. *J Biomech*. 2018;7479–85. doi:10.1016/j.jbiomech.2018.04.022 Cited in: PubMed; PMID 29735264.
3. Cook SG, Guan Y, Pacifici NJ, Brown CN, Czako E, Samak MS, Bonassar LJ, Gourdon D. Dynamics of Synovial Fluid Aggregation under Shear. *Langmuir*. 2019;35(48):15887–96. doi:10.1021/acs.langmuir.9b02028 Cited in: PubMed; PMID 31608639.
4. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol*. 2018;71-7251–69. doi:10.1016/j.matbio.2018.05.005. Cited in: PubMed; PMID 29803938.
5. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomater Sci*. 2016;4(5):734–67. doi:10.1039/c6bm00068a Cited in: PubMed; PMID 26923076.
6. Prof. Dr. Herwig Imhof, MD, Irene Sulzbacher, MD, Stefan Grampp, MD, Christian Czerny, MD, Soraya Youssefzadeh, MD, and Prof. Dr. Franz Kainberger, MD. Subchondral Bone and Cartilage Disease: A Rediscovered Functional Unit. *Invest Radiol*;2000(35):581–8.
7. D. L. Gardner. Problems and paradigms in joint pathology. *Journal of Anatomy*. 1994;(184):465–76.
8. David Eyre. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. 2002;(4):30–5.
9. Wang F, Ying Z, Duan X, Tan H, Yang B, Guo L, Chen G, Dai G, Ma Z, Yang L. Histomorphometric analysis of adult articular calcified cartilage zone. *J Struct Biol*. 2009;168(3):359–65. doi:10.1016/j.jsb.2009.08.010 Cited in: PubMed; PMID 19723582.
10. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med*. 2017;36(3):413–25. doi:10.1016/j.csm.2017.02.001 Cited in: PubMed; PMID 28577703.
11. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJR, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 6):889–97. doi:10.1242/jcs.00912 Cited in: PubMed; PMID 14762107.
12. Kumar P, Oka M, Toguchida J, Kobayashi M, Uchida E, Nakamura T, Tanaka K. Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. *Journal of Anatomy*. 2001;199(Pt 3):241–50. doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19930241.x Cited in: PubMed; PMID 11554503.
13. Ye H, Han M, Huang R, Schmidt TA, Qi W, He Z, Martin LL, Jay GD, Su R, Greene GW. Interactions between Lubricin and Hyaluronic Acid Synergistically Enhance Antiadhesive Properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(20):18090–102. doi:10.1021/acsami.9b01493 Cited in: PubMed; PMID 31026132.
14. Lee Y, Choi J, Hwang NS. Regulation of lubricin for functional cartilage tissue regeneration: a review. *Biomater Res*. 2018;229. doi:10.1186/s40824-018-0118-x Cited in: PubMed; PMID 29568558.
15. Phull A-R, Eo S-H, Abbas Q, Ahmed M, Kim SJ. Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview. *Biomed Res Int*. 2016;20161879837. doi:10.1155/2016/1879837 Cited in: PubMed; PMID 27631002.
16. Zhen Lin, Craig Willers, Jiak Xu, and Prof. Ming-Hao Zheng. The Chondrocyte: Biology and Clinical Application.

17. Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann H-J. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(7):564–72. doi:10.1053/joca.2002.0814 Cited in: PubMed; PMID 12127837.
18. POOLE CA. Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anatomy*. 1997;191(1):1–13. doi:10.1046/j.1469-7580.1997.19110001.x
19. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol*. 2014;3925–32. doi:10.1016/j.matbio.2014.08.009 Cited in: PubMed; PMID 25172825.
20. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J. Orthop. Res*. 1987;5(4):509–22. doi:10.1002/jor.1100050406 Cited in: PubMed; PMID 3681525.
21. Zhang Z. Chondrons and the pericellular matrix of chondrocytes. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(3):267–77. doi:10.1089/ten.teb.2014.0286 Cited in: PubMed; PMID 25366980.
22. Zhao Z, Li Y, Wang M, Zhao S, Zhao Z, Fang J. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homeostasis. *J Cell Mol Med*. 2020;24(10):5408–19. doi:10.1111/jcmm.15204 Cited in: PubMed; PMID 32237113.
23. Servin-Vences MR, Richardson J, Lewin GR, Poole K. Mechanoelectrical transduction in chondrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(5):481–8. doi:10.1111/1440-1681.12917 Cited in: PubMed; PMID 29359488.
24. Jiang Z, Yu S, Lin H, Bi R. Expression and function of cartilage-derived pluripotent cells in joint development and repair. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):111. doi:10.1186/s13287-020-01604-y Cited in: PubMed; PMID 32160923.
25. Vaughan-Thomas A, Young RD, Phillips AC, Duance VC. Characterization of type XI collagen-glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5303–9. doi:10.1074/jbc.M008764200 Cited in: PubMed; PMID 11084037.
26. Van C. Mow, Gerard A. Ateshian, Robert L. Spilker. Biomechanics of Diarthrodial Joints: A Review of Twenty Years of Progress. *Journal of Biomechanical Engineering* [Internet]. 1993 [cited 04/27/2020];(115):460–7. Available from: <http://biomechanical.asmedigitalcollection.asme.org>
27. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, Jay GD, Stewart M, Wang H, Warman ML, Carpten JD. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J. Clin. Invest*. 2005;115(3):622–31. doi:10.1172/JCI200522263
28. Pradal C, Yakubov GE, Williams MAK, McGuckin MA, Stokes JR. Lubrication by biomacromolecules: mechanisms and biomimetic strategies. *Bioinspir Biomim*. 2019;14(5):51001. doi:10.1088/1748-3190/ab2ac6 Cited in: PubMed; PMID 31212257.
29. Villalvilla A, Gómez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20793–808. doi:10.3390/ijms141020793 Cited in: PubMed; PMID 24135873.
30. Jay GD, Torres JR, Warman ML, Laderer MC, Breuer KS. The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6194–9. doi:10.1073/pnas.0608558104 Cited in: PubMed; PMID 17404241.
31. Wierzbolski K, Mischczak A. Mathematical principles and methods of biological surface lubrication with phospholipids bilayers. *BioSystems*. 2019;17832–40. doi:10.1016/j.biosystems.2018.11.002 Cited in: PubMed; PMID 30448537.

32. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(402):21–37. doi:10.1097/00003086-200209000-00004 Cited in: PubMed; PMID 12218470.
33. Kurz B, Jin M, Patwari P, Cheng DM, Lark MW, Grodzinsky AJ. Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J. Orthop. Res.* 2001;19(6):1140–6. doi:10.1016/S0736-0266(01)00033-X
34. Buckwalter JA, Brown TD. Joint Injury, Repair, and Remodeling. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;4237–16. doi:10.1097/01.blo.0000131638.81519.de
35. Repo RU, Finlay JB. Survival of articular cartilage after controlled impact. *J Bone Joint Surg Am.* 1977;59(8):1068–76. Cited in: PubMed; PMID 591538.
36. Torzilli PA, Grigiene R, Borrelli J, Helfet DL. Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content. *J Biomech Eng.* 1999;121(5):433–41. doi:10.1115/1.2835070 Cited in: PubMed; PMID 10529909.
37. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee.* 2007;14(3):177–82. doi:10.1016/j.knee.2007.02.001 Cited in: PubMed; PMID 17428666.
38. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J. Orthop. Res.* 2011;29(6):802–9. doi:10.1002/jor.21359 Cited in: PubMed; PMID 21520254.
39. Olson SA, Horne P, Furman B, Huebner J, Al-Rashid M, Kraus VB, Guilak F. The role of cytokines in posttraumatic arthritis. *J Am Acad Orthop Surg.* 2014;22(1):29–37. doi:10.5435/JAAOS-22-01-29 Cited in: PubMed; PMID 24382877.
40. Wang L-J, Zeng N, Yan Z-P, Li J-T, Ni G-X. Post-traumatic osteoarthritis following ACL injury. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):57. doi:10.1186/s13075-020-02156-5 Cited in: PubMed; PMID 32209130.
41. Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R229. doi:10.1186/ar3216 Cited in: PubMed; PMID 21194441.
42. Lieberthal J, Sambamurthy N, Scanzello CR. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(11):1825–34. doi:10.1016/j.joca.2015.08.015. Cited in: PubMed; PMID 26521728.
43. Brochhausen C, Grevenstein D, Mamilos A, Babel M, Eysel P. Histologische Diagnostik in der Gelenkpathologie in Zeiten rekonstruktiver Therapieverfahren – besondere Berücksichtigung der Knorpelschäden [Histological diagnostics in joint pathology due to increasing regenerative therapeutic strategies - special consideration for cartilage damage]. *Pathologe.* 2020;41(3):271–80. ger. doi:10.1007/s00292-020-00768-x Cited in: PubMed; PMID 32215684.
44. Jiménez G, Cobo-Molinos J, Antich C, López-Ruiz E. Osteoarthritis: Trauma vs Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2018;105963–83. doi:10.1007/978-3-319-76735-2_3 Cited in: PubMed; PMID 29736569.
45. Whittaker JL, Roos EM. A pragmatic approach to prevent post-traumatic osteoarthritis after sport or exercise-related joint injury. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2019;33(1):158–71. doi:10.1016/j.berh.2019.02.008 Cited in: PubMed; PMID 31431269.
46. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, Bridgett L, Williams S, Guillemin F, Hill CL, Laslett LL, Jones G, Cicuttini F, Osborne R, Vos T, Buchbinder R, Woolf A, March L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease

- 2010 study. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(7):1323–30. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204763 Cited in: PubMed; PMID 24553908.
47. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(7):437–41. doi:10.1038/nrrheum.2014.44 Cited in: PubMed; PMID 24662640.
 48. Madry H, Pape D. Autologe Chondrozytentransplantation [Autologous chondrocyte transplantation]. *Orthopade.* 2008;37(8):756–63. ger. doi:10.1007/s00132-008-1270-0 Cited in: PubMed; PMID 18551274.
 49. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 258–69. doi:10.2106/00004623-200300002-00008 Cited in: PubMed; PMID 12721346.
 50. Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med.* 1989;17(4):505–13. doi:10.1177/036354658901700410 Cited in: PubMed; PMID 2675649.
 51. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 Suppl):S362-9. doi:10.1097/00003086-200110001-00033 Cited in: PubMed; PMID 11603719.
 52. Schenker H, Wild M, Rath B, Tingart M, Driessen A, Quack V, Betsch M. Aktuelle Übersicht knorpelregenerativer Verfahren [Current overview of cartilage regeneration procedures]. *Orthopade.* 2017;46(11):907–13. ger. doi:10.1007/s00132-017-3474-7 Cited in: PubMed; PMID 28980022.
 53. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008;8777–95. doi:10.1093/bmb/ldn025 Cited in: PubMed; PMID 18676397.
 54. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med.* 2009;37(10):2053–63. doi:10.1177/0363546508328414 Cited in: PubMed; PMID 19251676.
 55. Redondo ML, Beer AJ, Yanke AB. Cartilage Restoration: Microfracture and Osteochondral Autograft Transplantation. *J Knee Surg.* 2018;31(3):231–8. doi:10.1055/s-0037-1618592 Cited in: PubMed; PMID 29396963.
 56. Medvedeva EV, Grebenik EA, Gornostaeva SN, Telpuhov VI, Lychagin AV, Timashev PS, Chagin AS. Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8). doi:10.3390/ijms19082366 Cited in: PubMed; PMID 30103493.
 57. Benthien JP, Behrens P. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC). A one-step procedure for retropatellar articular resurfacing. *Acta Orthop Belg.* 2010;76(2):260–3. Cited in: PubMed; PMID 20503954.
 58. Benthien JP, Behrens P. The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(8):1316–9. doi:10.1007/s00167-010-1356-1 Cited in: PubMed; PMID 21234543.
 59. Volz M, Schaumburger J, Frick H, Grifka J, Anders S. A randomized controlled trial demonstrating sustained benefit of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis over microfracture at five years. *Int Orthop.* 2017;41(4):797–804. doi:10.1007/s00264-016-3391-0 Cited in: PubMed; PMID 28108777.

60. Gille J, Meisner U, Ehlers EM, Müller A, Russlies M, Behrens P. Migration pattern, morphology and viability of cells suspended in or sealed with fibrin glue: a histomorphologic study. *Tissue Cell*. 2005;37(5):339–48. doi:10.1016/j.tice.2005.05.004 Cited in: PubMed; PMID 16009388.
61. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1993;9(3):318–21. doi:10.1016/s0749-8063(05)80428-1
62. Hangody L, Feczkó P, Bartha L, Bodó G, Kish G. Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391 Suppl):S328–36. doi:10.1097/00003086-200110001-00030 Cited in: PubMed; PMID 11603716.
63. Gracitelli GC, Moraes VY, Franciozi CE, Luzo MV, Belloti JC. Surgical interventions (microfracture, drilling, mosaicplasty, and allograft transplantation) for treating isolated cartilage defects of the knee in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;9CD010675. doi:10.1002/14651858.CD010675.pub2 Cited in: PubMed; PMID 27590275.
64. Brucker PU, Braun S, Imhoff AB. Mega-OATS-Technik--autogene Knorpel-Knochen-Transplantation als Salvage-Verfahren bei grossen osteochondralen Defekten am Femurkondylus [Mega-OATS technique--autologous osteochondral transplantation as a salvage procedure for large osteochondral defects of the femoral condyle]. *Oper Orthop Traumatol*. 2008;20(3):188–98. ger. doi:10.1007/s00064-008-1301-3 Cited in: PubMed; PMID 19169787.
65. Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 225–32. doi:10.2106/00004623-200300002-00004 Cited in: PubMed; PMID 12721342.
66. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889–95. doi:10.1056/NEJM199410063311401 Cited in: PubMed; PMID 8078550.
67. Welch T, Mandelbaum B, Tom M. Autologous Chondrocyte Implantation: Past, Present, and Future. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2016;24(2):85–91. doi:10.1097/JSA.0000000000000115 Cited in: PubMed; PMID 27135292.
68. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*. 2010;38(6):1117–24. doi:10.1177/0363546509357915 Cited in: PubMed; PMID 20181804.
69. Krill M, Early N, Everhart JS, Flanigan DC. Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Knee Cartilage Defects: A Review of Indications, Technique, and Outcomes. *JBJS Rev*. 2018;6(2):e5. doi:10.2106/JBJS.RVW.17.00078 Cited in: PubMed; PMID 29461987.
70. Ruta DJ, Villarreal AD, Richardson DR. Orthopedic Surgical Options for Joint Cartilage Repair and Restoration. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2016;27(4):1019–42. doi:10.1016/j.pmr.2016.06.007 Cited in: PubMed; PMID 27788899.
71. Gomoll AH, Probst C, Farr J, Cole BJ, Minas T. Use of a type I/III bilayer collagen membrane decreases reoperation rates for symptomatic hypertrophy after autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med*. 2009;37 Suppl 120S–23S. doi:10.1177/0363546509348477 Cited in: PubMed; PMID 19841142.

72. Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1259–71. doi:10.1177/0363546509346395 Cited in: PubMed; PMID 19966108.
73. Goyal D, Goyal A, Keyhani S, Lee EH, Hui JHP. Evidence-based status of second- and third-generation autologous chondrocyte implantation over first generation: a systematic review of level I and II studies. *Arthroscopy.* 2013;29(11):1872–8. doi:10.1016/j.arthro.2013.07.271 Cited in: PubMed; PMID 24075851.
74. Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF®11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials.* 2002;23(4):1187–95. doi:10.1016/s0142-9612(01)00236-8
75. Safran MR, Kim H, Zaffagnini S. The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16(6):306–11. doi:10.5435/00124635-200806000-00002 Cited in: PubMed; PMID 18524981.
76. Pavesio A, Abatangelo G, Borriero A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp.* 2003;249:203-17; discussion 229-33, 234-8, 239-41. Cited in: PubMed; PMID 12708658.
77. Tognana E, Borriero A, Luca C de, Pavesio A. Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs (Print).* 2007;186(2):97–103. doi:10.1159/000102539 Cited in: PubMed; PMID 17489021.
78. Becher C, Laute V, Fickert S, Zinser W, Niemeyer P, John T, Diehl P, Kolombe T, Siebold R, Fay J. Safety of three different product doses in autologous chondrocyte implantation: results of a prospective, randomised, controlled trial. *J Orthop Surg Res.* 2017;12(1):71. doi:10.1186/s13018-017-0570-7 Cited in: PubMed; PMID 28499391.
79. Jiang S, Guo W, Tian G, Luo X, Peng L, Liu S, Sui X, Guo Q, Li X. Clinical Application Status of Articular Cartilage Regeneration Techniques: Tissue-Engineered Cartilage Brings New Hope. *Stem Cells Int.* 2020;2020:5690252. doi:10.1155/2020/5690252 Cited in: PubMed; PMID 32676118.
80. Armoiry X, Cummins E, Connock M, Metcalfe A, Royle P, Johnston R, Rodrigues J, Waugh N, Mistry H. Autologous Chondrocyte Implantation with Chondrosphere for Treating Articular Cartilage Defects in the Knee: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. *Pharmacoeconomics.* 2019;37(7):879–86. doi:10.1007/s40273-018-0737-z. Cited in: PubMed; PMID 30426462.
81. Anderer U, Libera J. In vitro engineering of human autogenous cartilage. *J Bone Miner Res.* 2002;17(8):1420–9. doi:10.1359/jbmr.2002.17.8.1420 Cited in: PubMed; PMID 12162496.
82. Siebold R, Karidakis G, Feil S, Fernandez F. Second-look assessment after all-arthroscopic autologous chondrocyte implantation with spheroides at the knee joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(5):1678–85. doi:10.1007/s00167-015-3822-2 Cited in: PubMed; PMID 26704798.
83. Grevenstein D, Mamilos A, Schmitt VH, Niedermair T, Wagner W, Kirkpatrick CJ, Brochhausen C. Excellent histological results in terms of articular cartilage regeneration after spheroid-based autologous chondrocyte implantation (ACI). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020. doi:10.1007/s00167-020-05976-9 Cited in: PubMed; PMID 32277263.

84. Hoburg A, Niemeyer P, Laute V, Zinser W, Becher C, Kolombe T, Fay J, Pietsch S, Kuźma T, Widuchowski W, Fickert S. Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroid Technology Is Superior to Arthroscopic Microfracture at 36 Months Regarding Activities of Daily Living and Sporting Activities after Treatment. *Cartilage*. 2020;1947603519897290. doi:10.1177/1947603519897290 Cited in: PubMed; PMID 31893951.
85. Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthr Cartil*. 2011;19(7):779–91. doi:10.1016/j.joca.2011.02.010 Cited in: PubMed; PMID 21333744.
86. DiBartola AC, Everhart JS, Magnussen RA, Carey JL, Brophy RH, Schmitt LC, Flanigan DC. Correlation between histological outcome and surgical cartilage repair technique in the knee: A meta-analysis. *Knee*. 2016;23(3):344–9. doi:10.1016/j.knee.2016.01.017 Cited in: PubMed; PMID 26898766.
87. Riboh JC, Cvetanovich GL, Cole BJ, Yanke AB. Comparative efficacy of cartilage repair procedures in the knee: a network meta-analysis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2017;25(12):3786–99. doi:10.1007/s00167-016-4300-1 Cited in: PubMed; PMID 27605128.
88. Wylie JD, Hartley MK, Kapron AL, Aoki SK, Maak TG. What is the effect of matrices on cartilage repair? A systematic review. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(5):1673–82. doi:10.1007/s11999-015-4141-0 Cited in: PubMed; PMID 25604876.
89. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Ludvigsen TC, Løken S, Solheim E, Strand T, Johansen O. A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *J Bone Joint Surg Am*. 2016;98(16):1332–9. doi:10.2106/JBJS.15.01208 Cited in: PubMed; PMID 27535435.
90. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(10):2105–12. doi:10.2106/JBJS.G.00003 Cited in: PubMed; PMID 17908884.
91. Bekkers JEJ, Windt TS de, Raijmakers NJH, Dhert WJA, Saris DBF. Validation of the Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) for the treatment of focal cartilage lesions. *Osteoarthr Cartil*. 2009;17(11):1434–9. doi:10.1016/j.joca.2009.04.019 Cited in: PubMed; PMID 19454278.
92. Enea D, Cecconi S, Busilacchi A, Manzotti S, Gesuita R, Gigante A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(5):862–9. doi:10.1007/s00167-011-1639-1 Cited in: PubMed; PMID 21837476.
93. Stephens AD, Banigan EJ, Marko JF. Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2019;5876–84. doi:10.1016/j.ceb.2019.02.006 Cited in: PubMed; PMID 30889417.
94. Lammerding J. Mechanics of the nucleus. *Compr Physiol*. 2011;1(2):783–807. doi:10.1002/cphy.c100038 Cited in: PubMed; PMID 23737203.
95. Lee DA, Knight MM, F. Bolton J, Idowu BD, Kayser MV, Bader DL. Chondrocyte deformation within compressed agarose constructs at the cellular and sub-cellular levels. *J Biomech*. 2000;33(1):81–95. doi:10.1016/s0021-9290(99)00160-8
96. Stockwell RA. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1978;127–13. Cited in: PubMed; PMID 365896.

97. Battistelli M, Borzì RM, Olivotto E, Vitellozzi R, Burattini S, Facchini A, Falcieri E. Cell and matrix morpho-functional analysis in chondrocyte micromasses. *Microsc. Res. Tech.* 2005;67(6):286–95. doi:10.1002/jemt.20210 Cited in: PubMed; PMID 16173090.
98. Buschmann MD, Hunziker EB, Kim YJ, Grodzinsky AJ. Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 2)499–508. Cited in: PubMed; PMID 8838673.
99. Battistelli M, Salucci S, Olivotto E, Facchini A, Minguzzi M, Guidotti S, Pagani S, Flamigni F, Borzì RM, Falcieri E. Cell death in human articular chondrocyte: a morpho-functional study in micromass model. *Apoptosis.* 2014;19(10):1471–83. doi:10.1007/s10495-014-1017-9 Cited in: PubMed; PMID 25015553.
100. Ehlers E-M, Fuß M, Rohwedel J, Russlies M, Kühnel W, Behrens P. Development of a biocomposite to fill out articular cartilage lesions. Light, scanning and transmission electron microscopy of sheep chondrocytes cultured on a collagen I/III sponge. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 1999;181(6):513–8. doi:10.1016/S0940-9602(99)80055-7
101. Gille J, Ehlers E-M, Okroi M, Russlies M, Behrens P. Apoptotic chondrocyte death in cell-matrix biocomposites used in autologous chondrocyte transplantation. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 2002;184(4):325–32. doi:10.1016/S0940-9602(02)80047-4
102. Wu P-H, Gilkes DM, Phillip JM, Narkar A, Cheng TW-T, Marchand J, Lee M-H, Li R, Wirtz D. Single-cell morphology encodes metastatic potential. *Sci Adv.* 2020;6(4):eaaw6938. doi:10.1126/sciadv.aaw6938 Cited in: PubMed; PMID 32010778.
103. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 10):1477–86. doi:10.1242/jcs.037333 Cited in: PubMed; PMID 19420234.
104. Webster JD, Dunstan RW. Whole-slide imaging and automated image analysis: considerations and opportunities in the practice of pathology. *Veterinary pathology.* 2014;51(1):211–23. doi:10.1177/0300985813503570 Cited in: PubMed; PMID 24091812.
105. Skinner BM, Rathje CC, Bacon J, Johnson EEP, Larson EL, Kopania EEK, Good JM, Yousafzai G, Affara NA, Ellis PJI. A high-throughput method for unbiased quantitation and categorization of nuclear morphology†. *Biol Reprod.* 2019;100(5):1250–60. doi:10.1093/biolre/iox013 Cited in: PubMed; PMID 30753283.
106. Tang JR, Mat Isa NA, Ch'ng ES. Evaluating Nuclear Membrane Irregularity for the Classification of Cervical Squamous Epithelial Cells. *PLoS ONE.* 2016;11(10):e0164389. doi:10.1371/journal.pone.0164389 Cited in: PubMed; PMID 27741266.
107. Hamilton PW, Wang Y, McCullough SJ. Virtual microscopy and digital pathology in training and education. *APMIS.* 2012;120(4):305–15. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02869.x Cited in: PubMed; PMID 22429213.
108. Saco A, Ramírez J, Rakislova N, Mira A, Ordi J. Validation of Whole-Slide Imaging for Histopathological Diagnosis: Current State. *Pathobiology.* 2016;83(2-3):89–98. doi:10.1159/000442823 Cited in: PubMed; PMID 27099935.
109. Krishnamurthy S, Mathews K, McClure S, Murray M, Gilcrease M, Albarracin C, Spinosa J, Chang B, Ho J, Holt J, Cohen A, Giri D, Garg K, Bassett RL, Liang K. Multi-institutional comparison of whole slide digital imaging and optical microscopy for interpretation of hematoxylin-eosin-stained breast tissue sections. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(12):1733–9. doi:10.5858/arpa.2012-0437-OA Cited in: PubMed; PMID 23947655.

110. Nielsen PS, Lindebjerg J, Rasmussen J, Starklint H, Waldstrøm M, Nielsen B. Virtual microscopy: an evaluation of its validity and diagnostic performance in routine histologic diagnosis of skin tumors. *Hum Pathol.* 2010;41(12):1770–6. doi:10.1016/j.humpath.2010.05.015 Cited in: PubMed; PMID 20869750.
111. Wang S, Yang DM, Rong R, Zhan X, Xiao G. Pathology Image Analysis Using Segmentation Deep Learning Algorithms. *Am J Pathol.* 2019;189(9):1686–98. doi:10.1016/j.ajpath.2019.05.007 Cited in: PubMed; PMID 31199919.
112. Anwar SM, Majid M, Qayyum A, Awais M, Alnowami M, Khan MK. Medical Image Analysis using Convolutional Neural Networks: A Review. *J Med Syst.* 2018;42(11):226. doi:10.1007/s10916-018-1088-1 Cited in: PubMed; PMID 30298337.
113. LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning. *Nature.* 2015;521(7553):436–44. doi:10.1038/nature14539 Cited in: PubMed; PMID 26017442.
114. Irianto J, Swift J, Martins RP, McPhail GD, Knight MM, Discher DE, Lee DA. Osmotic challenge drives rapid and reversible chromatin condensation in chondrocytes. *Biophys J.* 2013;104(4):759–69. doi:10.1016/j.bpj.2013.01.006 Cited in: PubMed; PMID 23442954.
115. Mansfield JC, Winlove CP. Lipid distribution, composition and uptake in bovine articular cartilage studied using Raman micro-spectrometry and confocal microscopy. *J Anatomy.* 2017;231(1):156–66. doi:10.1111/joa.12624 Cited in: PubMed; PMID 28508410.
116. Cillero-Pastor B, Eijkel G, Kiss A, Blanco FJ, Heeren RMA. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal Chem.* 2012;84(21):8909–16. doi:10.1021/ac301853q Cited in: PubMed; PMID 22950553.
117. Bakker B, Eijkel GB, Heeren RMA, Karperien M, Post JN, Cillero-Pastor B. Oxygen-Dependent Lipid Profiles of Three-Dimensional Cultured Human Chondrocytes Revealed by MALDI-MSI. *Anal Chem.* 2017;89(17):9438–44. doi:10.1021/acs.analchem.7b02265 Cited in: PubMed; PMID 28727417.
118. Alsalamah S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism.* 2004;50(5):1522–32. doi:10.1002/art.20269 Cited in: PubMed; PMID 15146422.
119. Pascarelli NA, Collodel G, Moretti E, Cheleschi S, Fioravanti A. Changes in Ultrastructure and Cytoskeletal Aspects of Human Normal and Osteoarthritic Chondrocytes Exposed to Interleukin-1 β and Cyclical Hydrostatic Pressure. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26019–34. doi:10.3390/ijms161125936 Cited in: PubMed; PMID 26528971.

8. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Brochhausen-Delius für die Betreuung dieser Dissertation, selbst über die Distanzen Regensburg - Mannheim und Münster - Mannheim hinweg.

Ebenso bedanke ich mich bei Heiko Siegmund für seine Unterstützung, insbesondere während der praktischen Arbeit am Transmissionselektronenmikroskop.

Bei Vignesh Ramakrishnan möchte ich mich herzlich für die Entwicklung seines Algorithmus für die automatische Bildanalyse und seine Unterstützung im Bereich Informatik bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mir sowohl das Studium als auch die vorliegende Arbeit in dieser Form überhaupt erst ermöglicht haben und mir jederzeit beratend und ausgleichend zur Seite stehen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner „allerliebsten Lieblingsmitbewohnerin“ Hannah bedanken, die in der Kernphase dieser Arbeit inmitten der COVID-19-Pandemie allzeitbereit für Tanzpausen in unserer WG-Küche war.

9. Lebenslauf

Zur Person

Name Naemi Reyersbach
Geboren: 5. März 1997 in Regensburg

Berufserfahrung

Oktober 2023 – März 2025

Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Münster

April 2025 – Juni 2025

Assistenzärztin in der Klinik für Plastische und Ästhetische-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Caritas Krankenhaus St. Josef in Regensburg

Seit Juli 2025

Assistenzärztin in der Abteilung für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Regensburg

Bildungsweg

Schulabschluss: Abitur 2015 am Burkhart Gymnasium Mallersdorf-Pfaffenberg

Studium: seit Oktober 2016 Studium der Humanmedizin

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Herbst 2018
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Frühjahr 2022
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Frühjahr 2023