

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 157–161 (2003)  
 © 2003 Blackwell Verlag, Berlin  
 ISSN 0005-9366

Eingegangen am 8. 9. 2002  
 Angenommen am 9. 10. 2002

<sup>1</sup>Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. (FZMB), Bad Langensalza; <sup>2</sup>Klinik für Experimentelle Rheumatologie und klinische Immunologie, Labor für Tissue Engineering, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

## Tissue Engineering: Neue Behandlungsansätze bei Knorpelveränderungen bei degenerativen Gelenkerkrankungen des Pferdes – erste Ergebnisse einer Langzeitstudie

Tissue Engineering: New treatment of cartilage alterations in degenerative joint diseases of the horse – preliminary results of a long term study

D. Barnewitz<sup>1</sup>, A. Evers<sup>2</sup>, J. Zimmermann<sup>2</sup>, I. Wilke<sup>1</sup>, C. Kaps<sup>2</sup>, M. Sittinger<sup>2</sup>

**Zusammenfassung:** Degenerative Fesselgelenkveränderungen der Vordergliedmaße werden oft bei Pferden diagnostiziert. Der hyaline Knorpel hat nur ein begrenztes Regenerationsvermögen und die tierärztliche Behandlung ist oft erfolglos, so daß schließlich die Pferde meist nicht mehr im Sport einsetzbar sind. Um eine autologe Knorpel-Reparatur-Methode zu etablieren, setzten wir künstliche Läsionen (Durchmesser 8 mm) in die Fesselgelenke der Vordergliedmaße bei drei Pferden. Diese Defekte wurden mit autologen Chondrozyten-Implantaten verschlossen, welche mit Titan-Faden-Ankern im Knochen fixiert wurden. Nach 3, 12 und 24 Monaten wurden arthroskopisch Biopate entnommen. Ein Pferd wurde nach 9, ein weiteres nach 24 Monaten euthanasiert. Das Reparaturgewebe wurde histologisch untersucht und mittels biochemischer Analyse die Knorpel-typischen Substanzen Hydroxyprolin und Glykosaminoglykan bestimmt. Nach 9 Monaten wurde mittels Elektronenmikroskopie die Integration des Implantats in den nativen Knorpel aufgezeigt. Nach 24 Monaten zeigten histologische Färbungen, daß die Morphologie des Knorpelreparaturgewebes der des umgebenden nativen Gewebes ähnlich ist. Die biochemische Auswertung der Matrixmoleküle zeigte die Zusammensetzung eines hyalin-ähnlichen Knorpels im autologen Tissue Engineering Chondrozyten-Transplantat.

**Schlüsselwörter:** Pferd, degenerative Gelenkknorpelveränderungen, Tissue Engineering, Titan-Faden-Anker, Hydroxyprolin, Glykosaminoglykan.

**Summary:** Degenerative alterations in fetlock joints of the forelimb are common diagnoses for horses. The hyaline cartilage has a low capacity to regenerate and the treatment by veterinarians is often insufficient. As a final result, horses with articular cartilage defects are often not able to take part in competitions anymore. To establish an autologous cartilage repair method, we set artificial lesions (8 mm in diameter) into the fetlock joints of the forelimb of three horses. These defects were closed with autologous chondrocyte implants, which were fixed with titan-suture-anchors. After 3, 12 and 24 months, biopsies were taken by arthroscopy. One horse was euthanized after 9, another one after 24 months. The repair tissue was examined histologically and by biochemical analysis of hydroxyproline and glycosaminoglycan, which are typical cartilage related substances. After 9 months, the integration of the implant into native cartilage was demonstrated by electron microscopy. After 24 months, histological staining showed a similar morphology of the cartilage repair tissue compared with the surrounding native cartilage. Biochemical analysis of typical cartilage matrix molecules revealed formation of hyaline-like cartilage within tissue engineered autologous chondrocyte transplants.

**Keywords:** Horse, degenerative alterations of articular cartilage, tissue engineering, titan-suture-anchor, hydroxyproline, glycosaminoglycan.

### Einleitung

Degenerative Gelenkerkrankungen, definiert als Endstadium progressiver krankhafter Veränderung des Gelenkknorpels verbunden mit Veränderungen des Knochens und der Weichteilgewebe des Gelenks, sind häufig beim Pferd zu diagnostizieren. Abhängig von der Nutzungsart der Pferde sind Schädigungen an verschiedenen Gelenken zu finden. Je nach Grad der Erkrankung treten Schmerz, Dysfunktion, Steifheit der Weichteile, erhöhter intraartikulärer Druck und mechanische Behinderung auf. Degenerative Knorpelveränderungen als Folge von Überbelastungsreaktionen (Mac Kay-Smith, 1962; Raker et al., 1966; Vachon et al., 1986) spielen in der Ätiologie der Erkrankung bei Sportpferden eine weitaus bedeutendere Rolle als die

altersbedingte Degeneration oder die Unterbelastung. Die oberflächlichen Läsionen heilen nicht, obwohl die Chondrozyten ihre Aktivität erhöhen und auch die Protein- und Glykosaminoglykansynthese zunimmt. Bei den tiefen Defekten bildet sich – ausgehend vom Gelenkrand bzw. von den subchondralen Markspalten – Granulationsgewebe, das zu fibrösem und anschließend zu unvollständigem hyalinen Knorpel umgeformt wird (Brcuer und Becker, 1984; Grant, 1976). Der minderwertige Ersatzknorpel enthält, im Gegensatz zu dem im gesunden Knorpel vorkommenden Kollagen Typ II, vor allem den Fasertyp I (Nixon, 1993). Durch die mangelnden mechanischen Eigenschaften des Ersatzknorpels ist das Gelenk reduziert belastungsstabil. Mit Hilfe der neuen Behandlungsansätze des Tissue Engineering (Thiesen et al., 2000) kann bei betroffenen Pferden

mit intensivem Sporteinsatz die Bildung von minderwertigem Ersatzknorpel minimiert werden.

## Material und Methode

### Tiere und Knorpelgewinnung

Im Rahmen dieser Studie wurden bei drei klinisch gesunden, zweijährigen Haflinger-Wallachen natives Knorpelgewebe aus dem Talokruralgelenk entnommen. Die Entnahmen erfolgten arthroskopisch unter Allgemeinanästhesie (Isofluran-Inhalationsnarkose) aus dem randständigen, unbelasteten Bereich des lateralen Rollkamms. Die Operation verlief bei allen drei Pferden komplikationslos. Die postoperative Behandlung erfolgte über drei Tage antiphlogistisch (Finadyne, 1,1 mg/kg KM, i.v.) und antibiotisch (Procain-Benzylpenicillin, 10 000 I.E./kg KM, i.m.). Zur Serumgewinnung wurden aus der Vena jugularis 100 ml Vollblut entnommen.

### Zellisolierung und Transplantatherstellung

Nach erfolgter Knorpelentnahme wurden die Chondrozyten mittels einer von Sittinger et al. (Sittinger et al., 1994) beschriebenen biotechnologischen Verfahrensweise isoliert. Die Zellen wurden mit einer initialen Dichte von 20 000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und mit RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Zellkulturmedium mit 10 % Pferdeserum, 5 % FCS (Fetal Calf Serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht, wurden sie mittels Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) abgelöst und subkultiviert. Nach drei bis vier solcher Passagen innerhalb von fünf Wochen hatte sich die Gesamtzellzahl verzwanzig- bis verdreißigfach. Die Zellen wurden in LMP (low melting point)-Agarose (Sigma Aldrich, Taufkirchen) aufgenommen und in bioresorbierbare, im Durchmesser 8 mm große Polyglactin/Polydioxanon-Vliese (Ethisorb®, Ethicon, Norderstedt) eingebracht (Rotter et al., 1998). Diese wurden bis zur Transplantation im modifizierten Ham's-F12-Medium (Biochrom, Berlin) über drei Wochen kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

### Transplantation

Die Arthrotomie erfolgte im dorso-lateralen Fesselgelenksbereich circa 1 cm lateral des palpierbaren Verticillus. Mittels einer circa 3 cm langen horizontalen Schnittführung wurde das Gelenk eröffnet. Die Defektsetzung im Knorpel des Röhrlbeincondylus erfolgte mit Hilfe einer 8 mm Biopsiestanze. Das Knorpelgewebe wurde bis auf den Knochen abgetragen.

Zur Fixation des mit Chondrozyten beladenen Polyglactin/Polydioxanon-Vlieses wurden in vier Bohrungen mit einem Durchmesser von 2,0 mm Titanfadenanker (Mitek® Mini-Quick-Anchor-Plus) mit einem Durchmesser von 1,5 mm implantiert. Das zum Fadenankersystem gehörige Nahtmaterial ist durch resorbierbaren Polyglactin-Faden der Stärke 1,5 metric (Vicryl®, Ethicon, Norderstedt) ersetzt worden. Anschließend wurde die Arthrotomiewunde verschlossen und durch einen Verband geschützt.

Postoperativ verabreichten wir den Pferden über fünf Tage nichtsteroidale Antiphlogistika (Finadyne, 1,1 mg/kg KM, i.v.) und Antibiotika (Procain-Benzylpenicillin, 10 000 I.E./kg KM, i.m.). Verbandswechsel erfolgten am zweiten und siebten postoperativen Tag. Am 10. Tag nach der Operation wurden die Hautfäden gezogen. Nach dem Ziehen der Fäden erhielten die Pferde für weitere 20 Tage Boxenruhe gefolgt von kontrollierter Schrittbewegung über 14 Tage. In den nachfolgenden zwei Wo-

chen wurden die Pferde tagsüber in kleine Ausläufe (Paddocks) verbracht. Dem schloß sich ganztägiger Weidegang an.

## Auswertung

Um die Integration des Transplantats in das Gelenk und die Ausprägung der Reifung einer hyalinen Knorpelmatrix zu beurteilen, wurden bei den Pferden zunächst nach 3 Monaten, ferner bei Pferd I nach 12 Monaten und bei Pferd II nach 24 Monaten arthroskopisch Biopate entnommen, die sowohl histopathologisch als auch biochemisch untersucht wurden. Nach neun Monaten konnte vom Gelenktransplantat des Pferdes III eine Elektronenmikroskopische Aufnahme angefertigt werden. Die Auswertung nach 24 Monaten bei Pferd I erfolgte nach Euthanasie und Präparation des entsprechenden Gelenkdefekterreichs.

Die pathohistologischen Aussagen wurden nach Anfertigung von Dünnschnitten getroffen, die mit Giemsa (zur Darstellung des Knorpelgewebes) und Alzianblau (Anfärbung der Proteoglykane) zur Charakterisierung des Zellgewebes behandelt wurden.

Den Gehalt des in den Kollagenfasern vorkommenden Hydroxyprolins bestimmte man mittels HPLC (high performance liquid chromatography) und Fluoreszenzdetektion nach saurer Hydrolyse der Biopate in 6N HCl bei 110 °C für 24 Stunden (Frisbie und Nixon, 1997). Das Hydrolysat wurde mit NaOH neutralisiert, verdünnt mit destilliertem Wasser und mittels Boratpuffer, pH = 9,5 derivatisiert. Die Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts erfolgte nach Verdau des Biopates mit Papain für 4 Stunden bei 60 °C, anschließender Reaktion mit 1,9-Dimethylmethylen-Blau und photometrischer Messung (Bardale et al., 1986). Die Quantifizierung des Gehaltes an Hydroxyprolin und Glykosaminoglykan erfolgte vergleichend zu nativen Knorpelproben bezogen auf das Naßgewicht der Biopate.

## Ergebnisse

### Postoperativer Verlauf

Das Allgemeinbefinden der drei Pferde war post operationem ungestört. Pferd II zeigte am dritten bis fünften Tag eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur. Alle Pferde wiesen in den ersten 10 Tagen nach der Operation eine geringgradige Stützbeinlahmheit im Schritt auf, die sich auch nach dem Absetzen der nichtsteroidalen Antiphlogistika am fünften Tag nicht verstärkte. Nach weiteren 10 bis 14 Tagen war keine Lahmheit im Schritt mehr erkennbar. Zu Beginn der Ganztagsweide zeigte Pferd III eine geringgradige Stützbeinlahmheit im Trab, welche bestehen blieb. Die Pferde I und II waren zu Beginn der Ganztagsweide lahmfrei. Die Pferde I und III mußten infolge nicht mit dieser Studie in Zusammenhang stehender Erkrankungen (Schulterfraktur, Kolik) euthanasiert werden. Pferd II befindet sich in Nutzung als Freizeitpferd.

Tabelle 1  
Bestimmung des Hydroxyprolin- und Glykosaminoglykangehalts

	Hydroxyprolinegehalt [ng/mg Naßgewicht]	Glykosaminoglykan [mg/mg Naßgewicht]
nativer Knorpel	370–430 (100 %)	4,8–5,5 (100 %)
Transplantat 3 Monate	162 (40,5 %)	2,8 (54,9 %)
Transplantat 12 Monate	342 (85,5 %)	4,4 (86,3 %)
Transplantat 24 Monate	351 (87,8 %)	4,4 (86,3 %)

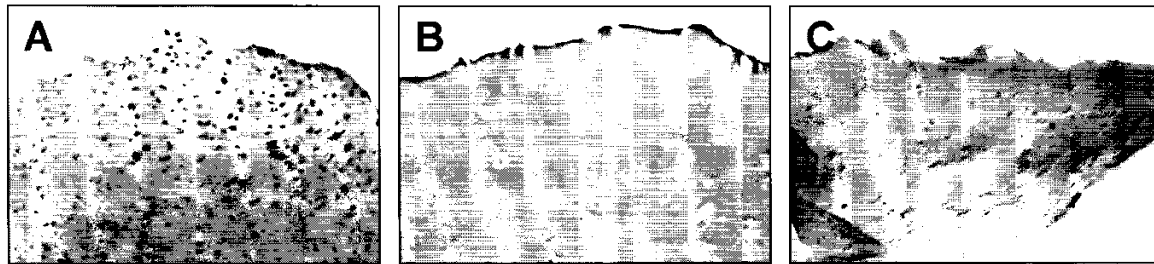


Abb. 1. Knorpeltransplantat (Biopat), Alzianblau-Färbung, 100fache Vergrößerung.  
 1A: 3 Monate – homogene Zellverteilung; schwache Anfärbbarkeit aufgrund geringen Proteoglykangehalts  
 1B: 12 Monaten – Abnahme der Chondrozytenzahl; Erhöhung des Proteoglykangehalts  
 1C: 24 Monaten – stärkere Färbung weist auf höheren Proteoglykangehalt hin



Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Gelenk-Präparation nach 9 Monaten.

- Kno subchondraler Knochen  
 K nativer Knorpel  
 \* Präparationsartefakt  
 ➤ scharfe Abgrenzung Transplantat – Knochen  
 ➔ Übergang Transplantat zum nativen Knorpel

### Makroskopische, biochemische und histologische Auswertung

Im Rahmen der Arthroskopie bzw. nach Präparation der Gelenke der euthanasierten Pferde konnte eine makroskopische Bewertung der Transplantatoberfläche erfolgen. Im Laufe der Zeit nahm die Defektdeckung zu, jedoch stellte sich zu keinem Zeitpunkt eine völlig glatte Oberflächenstruktur dar.

Die Qualität der Knorpelmatrix mit zunehmendem Gehalt an Glycosaminoglykan und Hydroxyprolin wird in Tabelle 1 gezeigt. Durchschnittlich konnten im nativen Knorpelgewebe 370–430 ng/ml Hydroxyprolin und 4,8–5,5 mg/mg Glykosaminoglykan nachgewiesen werden. Nach Implantation der künstlich hergestellten Knorpelgewebe und dreimonatiger Reifung betragen die Hydroxyprolinwerte 40% vom Gehalt des nativen Knorpels. Erst nach 12 Monaten wurde ein 85%iger Gehalt an Hydroxyprolin erreicht. Die Evaluation des nach 24 Monaten entnommenen Knorpels ergab nur noch einen geringen Anstieg um 2% auf 87%. Die Bestimmung von Glykosaminoglykan zeigte einen ähnlichen Anstieg: Nach drei Monaten lag der Gehalt bei 54% des natürlichen Knorpels und nach neun weiteren Monaten erreichte er 86%. Nach 24 Monaten war kein weiterer Anstieg zu vermerken.

Nach 3, 12 und 24 Monaten wurden Biopate entnommen und histologisch beurteilt (Abb. 1). Nach 3 Monaten (Abb. 1A) ist die Knorpelmatrix noch wenig ausgeprägt. Proteoglykane sind mittels Alzianblau-Färbungen kaum darzustellen. Die Verteilung der zahlreichen vitalen Chondrozyten ist homogen. Nach 12 Monaten (Abb. 1B) läßt sich die Proteoglykan-haltige Matrix verstärkt anfärben, die Zellzahl erscheint reduziert. Die nach 24 Monaten (Abb. 1C) angefertigte Färbung deutet auf eine verstärkte hyalin-ähnliche Knorpelmatrix bei geringerer Zelldichte hin.

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme (Abb. 2), die nach neun Monaten angefertigt werden konnte, zeigt eine vergleichbare Oberflächenstruktur des Knorpelregenerats zum umgebenden Knorpel. Der Übergang vom nativen Knorpel zum Transplantat verdeutlicht dessen lückenlose Integration. Die Auftreibungen des Transplantats sind als Präparationsartefakte zu interpretieren. Im Gegensatz zum nahtlosen Übergang vom nativen Knorpel zum Knochen ist eine helle Grenzlinie zwischen Knorpeltransplantat und subchondralem Knochen deutlich auszumachen.

Die Präparation des Metacarpus mit seinem artikulären Knorpel und subchondralem Knochengewebe in toto (Abb. 3) verdeutlicht den charakteristischen Aufbau nativen Gelenkknorpels in Knorpelschicht, mineralisiertem Knorpel und subchondralem Knochen. Die Abbildung 3A stellt die natürliche Knorpelmatrix in dunkelblauer Färbung dar. Die Chondrozyten sind säulenförmig in paralleler Längsrichtung angeordnet. In der stärkeren Vergrößerung der Aufnahme vom nativen Knorpel (Abb. 3B) ist ersichtlich, daß diese Säulen aus Zellgruppen zu je zwei bis drei Chondrozyten bestehen. Der Übergang vom Knorpel zu mineralisiertem Knorpel ist scharf abgegrenzt. Die Aufnahme des Transplantats nach 24monatiger Reifung zeigt aufgrund des geringeren Gehalts an Knorpelmatrixmolekülen eine hellblaue Färbung. Ferner ist eine leicht divergierende Parallelität der Chondrozytensäulen nachweisbar. In der stärkeren Vergrößerung kann man die diese Säulen bildenden Zellgruppen zu je zwei bis drei Chondrozyten erkennen. Der Übergang vom Transplantat zum mineralisierten Knorpel erscheint scharf abgegrenzt.

### Diskussion

Pferde sind durch Haltung und Nutzung besonderen Belastungen ausgesetzt, welche die Entstehung von degenerativen Gelenkerkrankungen begünstigen. Abhängig von der Nutzungsart treten pathologische Veränderungen an verschiedenen Gelenkstrukturen auf. Schäden des Gelenkknorpels sind in der Regel

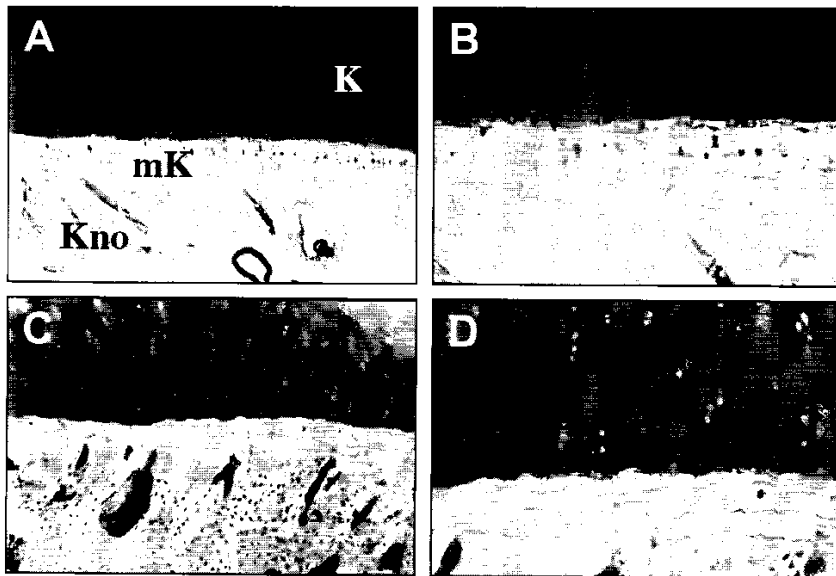


Abb. 3. Präparation nach 24 Monaten: Giemsa-Färbung.

**3A:** nativer Knorpel, 100fache Vergrößerung; in der gut ausgeprägten Knorpelmatrix (dunkelblau) ist die säulenförmige, parallele Anordnung der Chondrozyten erkennbar; K Knorpel, mK: mineralisierter Knorpel, Kno: Knochen

**3B:** nativer Knorpel, 200fache Vergrößerung; die Knorpelzellsäulen sind zusammengesetzt aus Zellgruppen zu 2–3 Chondrozyten; der Übergang Knorpel zu mineralisiertem Knorpel ist scharf abgegrenzt

**3C:** Transplantat nach 24 Monaten 100fache Vergrößerung; die Knorpelmatrix stellt sich schwächer blau an gefärbt dar; die säulenförmige, parallele Längsanordnung der Chondrozyten ist leicht divergierend

**3D:** Transplantat nach 24 Monaten 200fache Vergrößerung; die Knorpelzellsäulen setzen sich aus Gruppen von 2 bis 3 Zellen zusammen; der Übergang Transplantat zu mineralisiertem Knorpel ist scharf abgegrenzt

vergesellschaftet mit Veränderungen anderer Gelenkstrukturen (McIlwraith, 1989). Da der Gelenkknorpel nicht innerviert ist (Breuer und Becker, 1984), werden Dysfunktion und Schmerz erst durch die Weichteilschädigungen hervorgerufen. Besonders die pathologischen Veränderungen der Synovialmembran komplizieren entstandene Knorpelschäden. Durch die rechtzeitige Behandlung der Weichteilschädigungen können Gelenkerkrankungen positiv beeinflusst werden (McIlwraith, 1989). Eingesetzt werden beispielsweise Natriumhyaluronidate, Glukokortikoide, nichtsteroidale Antiphlogistika, Dimethylsulfoxid, Peroxiddismutase und polysulfatierte Glucosaminoglycane. In therapeutischen Arthroskopien werden Defekte im Knorpel kürziert, vorhandene freie Gelenkkörper entfernt, Weichteilschäden geglättet sowie hypertrophische Synovialmembranen abgetragen. Knorpelschädigende Entzündungsmediatoren können durch Gelenkspülungen entfernt werden. Die Radiosynoviosentese wird auch in der Pferdemedizin bei Gelenkerkrankungen angewendet. Unterstützend kommen orthopädische Beschläge, Belastungsreduktion, physiotherapeutische und physikalische Maßnahmen zum Einsatz.

Die Bildung von Faserknorpel als Defektheilung bei Knorpelschäden führt trotz aller Therapieansätze zu reduzierter Belastungsstabilität der betroffenen Gelenke. Um die Bildung von Faserknorpel zu verhindern, sind in der Human- und Pferdemedizin Verfahren entwickelt worden, mit deren Hilfe hyaliner Knorpel in Defekte transplantiert werden kann. Bei den bisher angewendeten Transplantationsmethoden werden zum Beispiel Chondrozytensuspensionen in den mit einem Periostlappen überdeckten Defektbereich injiziert (Autologe Chondrozyten Transplantation, ACT) (Brittberg et al., 1994). Dabei entsteht ein weitgehend aus Faserknorpel und Bindegewebe bestehendes Knorpelregenerat. Bei einer anderen Methode werden Knorpel-Knochen-Zylinder als OATS (Osteochondral Autograft Transfer System) aus randständigen Gelenkarealen in den belasteten Defektbereich transplantiert (Bobic, 1996). Diese auch als Mosaik-Plastik bezeichnete Methode (Hangody et al., 1997) füllt einen bestehenden Defekt durch mehrere Knorpel-Knochen-Zylinder mosaikartig aus. Letztere Methode wurde erfolgreich bei der Therapie von subchondralen Knochenzysten

angewendet (Bodo et al., 2000). Nachteil dieser Methode ist der zwischen den Knorpel-Knochen-Zylindern entstehende Spalt, der Ausgangspunkt für weitere Knorpelschäden werden kann (Horas et al., 2000).

Bei der Methode des Tissue Engineering werden körpereigene Zellen in vitro vermehrt, auf bioresorbierbaren Trägermaterialien fixiert und dem Tier im Bereich des Knorpeldefekts ins Gelenk implantiert. Durch die Verwendung von autologem Material entfällt, wie auch bei dem ACT- und dem Mosaik-Plastik-Verfahren, die Gefahr einer Immunantwort auf das Transplantat. Schon früher konnte gezeigt werden, dass allein durch moderate Belastung des Gelenkknorpels der Glykosaminoglykan-, jedoch nicht der Kollagengehalt erhöht und somit die Qualität des Gelenkknorpels verbessert werden konnte (Brama et al., 2000; Van De Lest et al., 2002).

In unserer Studie wurde das hyalin-ähnliche Knorpelregenerat mit guter Einheilung in das umgebene Knorpelgewebe biochemisch und histologisch nach verschiedenen Reifungszeiten des Transplantats beurteilt. Die Methode des autologen Tissue Engineering erweitert zukünftig die Therapiemöglichkeiten degenerativer Gelenkerkrankungen in Kombination mit den etablierten Behandlungsstrategien. In weiteren Studien zu diesem Verfahren ist geplant, den zeitlichen Verlauf der Knorpelreifung im Transplantat noch näher zu beleuchten.

#### Literatur

- Bobic, V. (1996): Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **3**, 262–4.
- Bodo, G., L. Hangody, Z. Szabo, C. Peham, M. Schinzel, D. Girtler, P. Sotonyi (2000): Arthroscopic autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of subchondral cystic lesion in the medial femoral condyle in a horse. *Acta Vet. Hung.* **48**, 343–54.
- Brama, P. A., J. M. Tekoppele, R. A. Bank, A. Barneveld, F. C. Firth, P. R. van Weeren (2000): The influence of strenuous exercise on collagen characteristics of articular cartilage in Thoroughbreds age 2 years. *Equine Vet. J.* **32**, 551–4.
- Breuer, D., M. Becker (1984): Diagnose und Therapie der Arthropathien des Pferdes. *Collegium veterinarium* XV, 42–50.
- Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, I. Peterson (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with

- autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**, 889–95.
- Farndale, R. W., D. J. Buttle, A. J. Barrett (1986): Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 173–7.
- Frisbie, D. D., A. J. Nixon (1997): Insulin-like growth factor I and corticosteroid modulation of chondrocyte metabolic and mitogenic activities in interleukin 1-conditioned equine cartilage. *Am. J. Vet. Res.* **58**, 524–30.
- Grant, B. (1976): Repair mechanisms of osteochondral defects in equidae – a comparative study of untreated and X-irradiated defects. *Proc. 21<sup>st</sup> Ann. Meeting Am. Assoc. Equine Pract.* 95–114.
- Hangody, L., G. Kish, Z. Karpati, I. Szerb, R. Eberhardt (1997): Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: use of the mosaic-plasty technique – a preliminary report. *Foot Ankle Int.* **18**, 628–34.
- Horas, U., R. Schnettler, D. Pelinkovic, G. Herr, T. Aigner (2000): [Osteochondral transplantation versus autogenous chondrocyte transplantation. A prospective comparative clinical study]. *Chirurg* **71**, 1090–7.
- Mac Kay-Smith, M. (1962): Pathogenesis and pathology of equine osteoarthritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **141**, 1246.
- McIlwraith, C. (1989): Erkrankungen der Gelenke, Sehnen, Bänder sowie ihrer Hilfseinrichtungen. *Adam's Lahmheiten bei Pferden*. 4. Aufl. Verlag M & H Schaper, Alfeld-Hannover.
- Nixon, A. (1993): Die Oberfläche des Gelenkknorpels: Struktur und Funktion. *Pferdheilkunde* **2**, 95–100.
- Raker, C., R. H. Baker, J. D. Wheat (1966): Pathophysiology of equine degenerative joint disease and lameness. *Proc. 12<sup>th</sup> Ann. Meeting Am. Assoc. Equine Pract.* 229–41.
- Rotter, N., J. Aigner, A. Naumann, H. Planck, C. Hammer, G. Burmester, M. Sittinger (1998): Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 347–56.
- Sittinger, M., Bujia, J., Minuth, W. W., Hammer, C., Burmester, G. R. (1994): Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* **15**, 451–6.
- Thiesen, F., D. Barnewitz, J. Zimmermann, C. Klein (2000): Tissue Engineering – eine neue Methode der Reparatur von defektem Gelenkknorpel. *Pferde Fachspeigel* **2**, 134–136.
- Vachon, A., L. R. Bramlage, A. A. Gabel, S. Weisbrode (1986): Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 2637–45.
- Van De Lest, C. H., P. A. Brama, P. R. van Weeren (2002): The influence of exercise on the composition of developing equine joints. *Biorheology* **39**, 183–91.

Anschriften des Verfassers: Dr. Dirk Barnewitz, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e.V., Geranienweg 7, 99947 Bad Langensalza, Tel.: 0 36 03-83 31 54, Fax: 0 36 03-83 31 50, E-Mail: Dbarnewitz@fzmb.de, Internet: www.fzmb.de.

Pferdekl. Havelland, Hohenferchesarer Straße 49, 14778 Brielow/Brandenburg, Tel.: 03 38 37-2 07 80, Fax: 03 38 37-2 07 81, E-Mail: Info@pferdekl. havelland.de.

Kontaktanschrift: Med. vet. Anja Evers, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité, Experimentelle Rheumatologie und klinische Immunologie, Labor für Tissue Engineering, Tucholskystraße 2, 10117 Berlin Tel.: 0 30/4 50-51 32 93, Fax: 0 30/4 50-51 39 57, E-Mail: anja.evers@tissue-engineering.de, Internet: www.charite.de/te.