



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Ultrastruktur equiner Gelenksknorpel

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Thomas Prieler
Matrikel-Nummer:	910325
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Zoologie
Betreuerin:	Prof. Dr. Waltraud Klepal

Wien, am 31.10.2008

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Danksagung	4
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1 Extrazelluläre Matrix (ECM)	8
2.2 Chondrozyten und die territoriale Gliederung	9
2.3 Chondrozyten und ihre Zellorganellen	10
2.4 Zonale Gliederung des hyalinen Gelenkknorpels	11
3. Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.2 Fixierung	15
3.3 Dekalzifizierung	16
3.4 Entwässerung und Einbettung	17
3.5 Probenaufbereitung für die vergleichenden morphologischen Untersuchungen	17
4. Ergebnisse Teil 1	19
4.1 Methodische Voruntersuchungen	19
4.2.1 Ergebnisse Standardfixierung	19
4.2.2 Ergebnisse Tannin-Fixierung	20
4.2.3 Ergebnisse mit Ruthenium Hexammintrichlorid-Fixierung	21
4.3 Dekalzifizierung	23
4.3.1 Ergebnisse EDTA	23
4.3.2 Ergebnisse Ascorbinsäure	24
5. Ergebnisse Teil 2	25
5.1 Übersicht der verschiedenen nativen Gelenkknorpel	25
5.2.1 Gewebeorganisation der Superficialzone und Mittelzone	27
5.2.2 Gewebeorganisation der tiefen Zone	28
5.2.3 Gewebeorganisation in der kalzifizierten Zone	30
5.3.1 Chondrozyten der Superficialzone	31
5.3.2 Chondrozyten der Mittelzone	33
5.3.3 Chondrozyten der tiefen Zone	34

6. Diskussion	37
7. Literatur	42
Lebenslauf	44

DANKSAGUNG

Dass diese Arbeit nun schlussendlich zustande gekommen ist, habe ich vielen lieben Menschen zu verdanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

All jenen die sich hier nicht aufgelistet sehen, bitte ich um Nachsicht für meine Vergesslichkeit. Im Besonderen sollen aber folgende Personen speziell erwähnt sein:

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Waltraud Klepal für die Überlassung des Themas und ihre hilfreiche Unterstützung im Rahmen meiner Diplomarbeit. Vor allem gilt ihr aber auch mein Dank für den faszinierenden Einblick in die Welt der Elektronenmikroskopie und ihrer Möglichkeiten, den ich durch meine Ausbildung im Rahmen von Vorlesungen und Praktika vermittelt bekommen habe. Letztendlich ist auch durch ihren Zuspruch diese Arbeit zustande gekommen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Diplomarbeitsbetreuerin Frau Mag.^a Sylvia Nürnberger. Bei Fragen stand sie mir mit kompetentem, fachkundigem Wissen stets zur Seite. Nur durch ihre nächtelangen Korrekturarbeiten war eine rechtzeitige Fertigstellung der Arbeit möglich.

In weiterer Folge gilt mein Danke allen InstitutsmitarbeiterInnen und KollegInnen. Vor allem möchte ich hier Frau Mag.^a Daniela Gruber für ihre freundlichen Ratschläge und Hilfeleistungen danken.

Ich danke meinen Eltern Christine und Josef Prieler, dass ich die Möglichkeit bekommen haben zu studieren und ohne Druck mein Studium auch beenden konnte.

Mein spezieller Dank gilt meiner Frau Mag.^a Natalia Prieler. Durch ihre Mithilfe war es mir möglich mein Studium zu beenden. Seite an Seite gab sie mir stets die Hoffnung trotz den alltäglichen beruflichen Herausforderungen nie das Ziel aus den Augen zu verlieren.

Meinen Kindern Anika, Alina und Jana danke ich für ihre herzliche Art. Sie zeigten mir auch in schwierigen Phasen, dass ein Lachen viel bewirken kann.

Für meine Familie

Zusammenfassung

Hyaliner Gelenksknorpel ist bei einigen Arten, wie Mensch, Kaninchen und Schaf bereits ausführlich beschrieben. Strukturell zeigt er ein klar definiertes Grundschema, das jedoch je nach Spezies und Lokalisation im Gelenk mechanobiologisch bedingte Unterschiede aufweist. Pferdekknorpel (equiner Knorpel) ist hingegen morphologisch noch unzureichend untersucht. Das Pferd ist in den letzten Jahren zunehmend als Versuchstier für die Knorpelbiologie herangezogen worden. Um degeneratives, traumatisch geschädigtes oder regenerierendes Knorpelgewebe morphologisch beurteilen zu können, ist es jedoch notwendig, dessen gesunden Zustand zu kennen. Das Ziel dieser Studie war es, nativen equinen Gelenksknorpel histologisch und elektronenmikroskopisch zu charakterisieren.

Nach Standardisierung der geeignetsten Fixier- und Dekalzifizierungsmethoden wurden vier verschiedene Gelenke (Femurcondylus, Patella, Sprunggelenk, Ellenbogen) vergleichend morphologisch untersucht. Als Beurteilungskriterien wurden die Knorpeldicke, Matrixorganisation, Zellularität, Zellverteilung sowie intrazelluläre Charakteristika herangezogen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen zeigten sich Unterschiede in der Knorpeldicke, Größe, Form und Verteilung der Chondrozyten sowie der Ausprägung der oberflächlichen Lubricinschichte zwischen den Gelenken.

Generell hat sich gezeigt, dass equiner Knorpel dem humanen sehr ähnlich ist. Gewisse Unterschiede, wie die starke Ausbildung von Perizellulärmatrix und Intermediärbündeln in der Superficialzone, dürften durch die wesentlich höhere mechanobiologische Belastung der Pferdegelenke bedingt sein.

Abstract

There are various studies of hyaline articular cartilage about human, rabbit and sheep. Cartilage shows a clearly defined scheme, but in some cases there are mechano-biological differences depending on species and location of the joint. The research of equine cartilage has not been done in an adequate way. In the last years the impact of the horse as an experimental animal in the cartilage biology increased. For the morphologic evaluation of degenerative, traumatically damaged or regenerate cartilage it is necessary to know the native status. The aim of this study was to characterise native equine articular cartilage in a histological and electron-microscopical way.

After standardisation of the best method for fixation and decalcification, four different joints (Femurcondylus, Patella, anconal and ankle joint) have been investigated morphologically. The assessment criteria for the articular cartilage were the thickness of cartilage, the organisation of the cell matrix, the cellularity, the cell distribution and the intracellular characteristic. In the presented study there were differences in the thickness of cartilage, the dimension, the form and the arrangement of chondrocytes and the occurrence of the superficial lubricin layer between the joints.

In general the study indicated that the equine cartilage is similar to human ones. In fact there are some differences, for example the obvious formation of the pericellular matrix and intermediate filaments in the superficial zone. The mechano-biological treatments of the equine joints may be one reason.

2. Einleitung

Hyaliner Knorpel bedeckt die artikulierenden Enden der Gelenkknochen mit einer dünnen, wenige Millimeter dicken Schicht. Er trägt wesentlich zum Bewegungsvorgang bei. Durch seine Druckelastizität federt er Stöße auf den darunter liegenden Knochen ab und seine glatte Oberfläche ermöglicht eine weitgehend reibungslose Bewegung. Diese mechanobiologischen Eigenschaften beruhen auf der chemischen Zusammensetzung und dem Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM).

2.1 Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die Knorpelmatrix besteht überwiegend aus Wasser (60%-80%) (Van Mow et al., 1990; Stoltz et al., 2000). Von der Trockenmasse sind 60% Kollagenfasern, die wiederum beim hyalinen Knorpel zu über 90% vom Fasertyp II sind (Buckwalter and Mankin, 1997). Kollagen Typ I, das klassische Bindegewebskollagen, kommt nur in einer dünnen Schicht an der Gelenkoberfläche vor (Duance, 1983). Weitere Kollagentypen des hyalinen Knorpels sind Kollagen Typ VI, IX und XI, die beim Fibrillenaufbau beteiligt sind und der Stabilisierung des Kollagenfasernetzwerks dienen (Mendler et al., 1989). Kollagen Typ X ist typischerweise in der Wachstumsfuge anzutreffen, kann aber auch in geringen Mengen in der kalzifizierten Zone vorkommen (Gannon et al., 1991).

Die Kollagenfasern bilden ein arkadenartiges Gerüst (Benninghoff, 1925), das wiederum aus blatt- oder röhrenförmigen Untereinheiten zusammengesetzt ist (Jeffery et al., 1991; Minns and Steven, 1977). Zwischen diesem Gerüst ist eine nicht-fibrilläre Substanz, die Proteoglykane, eingelagert. Sie machen 25%-30% der Trockenmasse des Knorpels aus.

Die extreme Wasserbindungskapazität der Proteoglykane ist einer der Gründe für die enorme Elastizität der Knorpelmatrix (Comper, 1991). Das Kollagenfasergerüst hat

hingegen, neben der Zugfestigkeit und Formstabilität, die Funktion, nicht gebundenes Wasser in Bahnen zu leiten.

2.2 Chondrozyten und die territoriale Gliederung

Hyaliner Knorpel beinhaltet eine Zellart, die Chondrozyten, die sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen und Chondroblasten entwickeln. Der Zellanteil des hyalinen Gelenkknorpels beträgt in Bezug auf das Gesamtvolumen nur 5% bis 10% (Eggli et al., 1988; Hamerman and Schubert, 1962). Die Zellularität des Knorpels variiert je nach Tierart, Alter und Gelenk (Stockwell, 1978; Todd et al., 2004; Jadin et al., 2005). Innerhalb des Knorpels finden sich die meisten Zellen pro Flächeneinheit an der Knorpeloberfläche. Die Zelldichte nimmt Richtung Knochen ab.

Ein Chondrozyt selbst bildet mit seiner speziell organisierten Umgebungsmatrix ein Chondron (Poole, 1997). An der Knorpeloberfläche kommen Chondrozyten meist einzeln vor. In der Übergangszone sind oft Doppelchondrone, bestehend aus zwei Chondrozyten, anzutreffen. In den tieferen Regionen nimmt die Zahl der an einem Chondron beteiligten Chondrozyten zu. Sie sind linear angeordnet und bilden zur Oberfläche rechtwinklig orientierte Säulenchondrone, die drei oder mehr Chondrozyten beinhalten (Buckwalter and Mankin, 1997; Ghadially, 1983a).

Die Matrix des Chondrons gliedert sich in eine, die Zelle direkt umgebende, perizelluläre Matrix (PM) und die daran angrenzende pericelluläre Kapsel (PC) (Poole, 1997). Die PC ist eine schmale, dichte Schichte und ist vor allem in tieferen Regionen ausgebildet. Während die PM fast ausschließlich aus feingranulärem Material besteht, treten in der PC Kollagenfasern auf.

An die PC schließt die territoriale Matrix (TM) an (s.Abb.2.1). Sie besteht aus Bündeln von Kollagenfibrillen, die relativ ungeordnet und dreidimensional angeordnet sind. Die TM

bildet den Übergang zur interterritorialen Matrix (IM), in der die Kollagenfasern zu arkadenartigen Kollagenblättern oder -säulen organisiert sind. Daher sind die Kollagenfasern der IM in tieferen Knorpelregionen tendenziell senkrecht zur Oberfläche angeordnet (Minns and Steven, 1977).

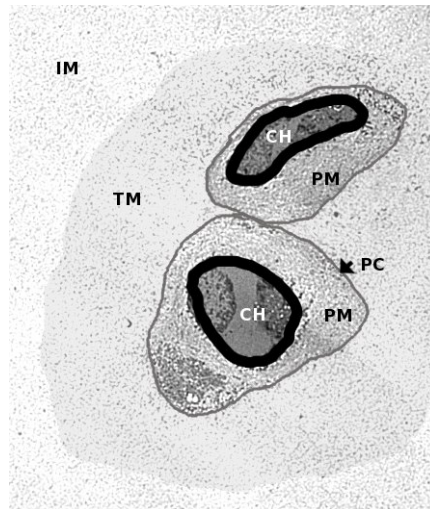


Abb.2.1: Schema eines Doppelchondrones mit Umgebungsmatrix; CH, Chondrozyt; PM, Pericelluläre Matrix; PC, Pericelluläre Kapsel; TM, Territoriale Matrix; IM, Interterritoriale Matrix

Zwischen den Kollagenfasern eingelagertes Material ist Proteoglykan (Van Mow et al., 1990). Dieses kann entsprechend der Fixierung durch Auswaschung teilweise reduziert sein, oder aber in gefällter Form vorliegen (Hunziker et al., 1982).

2.3 Chondrozyten und ihre Zellorganellen

Der Grad der Ausbildung von Golgi-Apparat und rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) sowie die Anzahl der Mitochondrien ist entsprechend der Knorpeltiefe variabel;

Glykogenansammlungen und Lipideinschlüsse nehmen mit der Knorpeltiefe zu (Egglı et al., 1988).

Chondrozyten sind generell arm an Zytoskelettelementen. Das einzige, jedoch in größerem Ausmaß vorkommende Zytoskelettelement ist Vimentin, der Intermediärfilamenttyp der mesodermalen Zellen. Es lagert sich vor allem in tieferen Knorpelregionen in großen Bündeln um den Kern an (Durrant et al., 1999) (Stockwell, 1979).

Chondrozyten besitzen ein Cilium mit accessorischem Centriol und Basalkörperchen mit sensorischer Funktion zur Registrierung der Matrixzusammensetzung. Es steht räumlich und funktionell mit dem Golgi-Apparat in Verbindung und ist an der Regulation der Matrixsynthese beteiligt (Scherft and Daems, 1967; Poole et al., 2001).

2.4 Zonale Gliederung des hyalinen Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel wird in vier Zonen unterteilt. Für die Unterscheidung der Zonen werden vor allem die Form und Verteilung der Chondrozyten bzw. die Anordnung der Kollagenfasern herangezogen. Primär wird zwischen einer kalzifizierten und nicht kalzifizierten Region unterschieden. Die „Tidemark“ ist die markante Trennlinie zwischen diesen beiden Zonen; die Grenzlinie zwischen kalzifiziertem Knorpel und Knochen wird Zementlinie genannt (s. Abb. 2.2). Die nicht kalzifizierte Region wird in die Superfızialzone, Mittelzone und tiefe Zone eingeteilt.

Die vier Zonen weisen hinsichtlich der Zellen und der Matrix folgende Merkmale auf (Nürnbergger et al., 2006b):

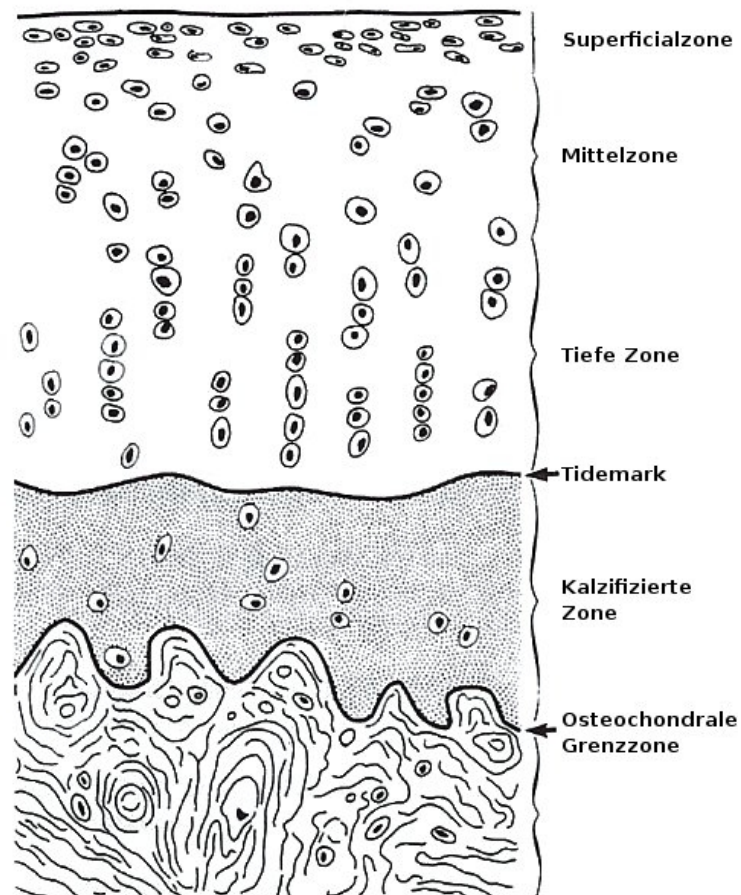


Abb.2.2: Schema der Gliederung der Knorpelzonen nach Ghadially 1983.

Die Superficialzone unterscheidet sich von allen anderen Schichten durch die oberflächenparallele Anordnung der Kollagenfasern sowie der meist länglichen Zellen und dem geringen Proteoglykangehalt. Die Dicke dieser Schicht sowie der Proteoglykangehalt können je nach Gelenksregion variieren. In gewissen Regionen ist auch die Zellmorphologie rundlich und entspricht somit den darunter liegenden Zellen (Nürnberger et al., 2006a). Die Zellen haben verhältnismäßig wenige synthetische Organellen, häufig jedoch eine große Ansammlung von Caveolae der zur Oberfläche orientierten Zellmembran (Wilsman et al., 1981). Es wird vermutet, dass diese Caveolae signaltransduktive Eigenschaften haben und im Sinne der Mechanorezeption agieren (Schwab et al., 1999).

Die oberflächlichste Abgrenzung besteht aus zellfreier Matrix. Die Kollagenfasern sind hier besonders dicht angeordnet und meist von einer dunklen Schichte überlagert (Ghadially, 1983b).

In der Mittelzone werden die Chondrozyten rundlich und treten häufig in Doppelchondronen auf, die keine einheitliche Orientierung aufweisen. Die Zellen selbst sind reich an Zellorganellen, wobei raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Vesikel und Mitochondrien den Zellinhalt dominieren. Überdies treten vereinzelt Lipidtropfen und kleinere Ansammlungen von Glykogen auf. Weiters kann in Kernnähe gelegentlich die Aneinanderlagerung von Intermediärfilamenten beobachtet werden.

In dieser Zone steigt die Proteoglykankonzentration und „maskiert“ die Kollagenfasern zunehmend. Die Faserrichtung erscheint in dieser Region ungeordnet, ist tendenziell jedoch tangential.

Die tiefe Zone ist durch das Vorkommen von Multichondronen gekennzeichnet. Diese sind entsprechend der Kollagenfasern vertikal zur Oberfläche orientiert und münden basal in die Tidemark. Der Proteoglykangehalt steigt in dieser Schichte weiter an. Intrazellulär steigen die Häufigkeit und die Größe von Glykogeneinlagerungen, Lipidtropfen und intrazellulären Filamentbündeln.

In der **kalzifizierten Zone** treten entweder Multi- oder aber Einzelchondrone auf. Die Kollagenfasern der IM haben nach wie vor eine vertikale Orientierung, sind jedoch in Hydroxyapatit eingebettet. Von der Kalzifizierung ausgenommen ist lediglich die PM.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, nativen equinen Gelenksknorpel histologisch und morphologisch zu charakterisieren. Nach Standardisierung der geeignetsten Fixier- und Dekalzifizierungsmethode sollen die Unterschiede der verschiedenen equinen Gelenksknorpel (Femurcondylus, Patella, Sprunggelenk, Ellenbogen) morphologisch herausgearbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Sämtliche Knorpelproben wurden von dem Ausschreiben (FZMB – Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie) zur Verfügung gestellt. Sie stammen von klinisch unauffälligen weiblichen Haflingern im Alter von drei bis sechs Jahre.

Mittels wassergekühlter Bandsäge wurden 5mm dicke serielle Schnittpräparate aus dem Femurcondylus, Patella, Sprunggelenk und Ellenbogen entnommen.

Die vorliegende Aufarbeitung der Proben gliederte sich in drei Abschnitte:

1. Verifizierung der geeigneten Fixierung für equinen Gelenksknorpel
2. Austestung geeigneter Dekalzifizierungsmethoden
3. Morphologisch-ultrastruktureller Vergleich der Gelenke

3.2 Fixierung

Es wurden je drei der seriellen Schnitte jedes Gelenkes mit drei verschiedenen Primärfixativen behandelt:

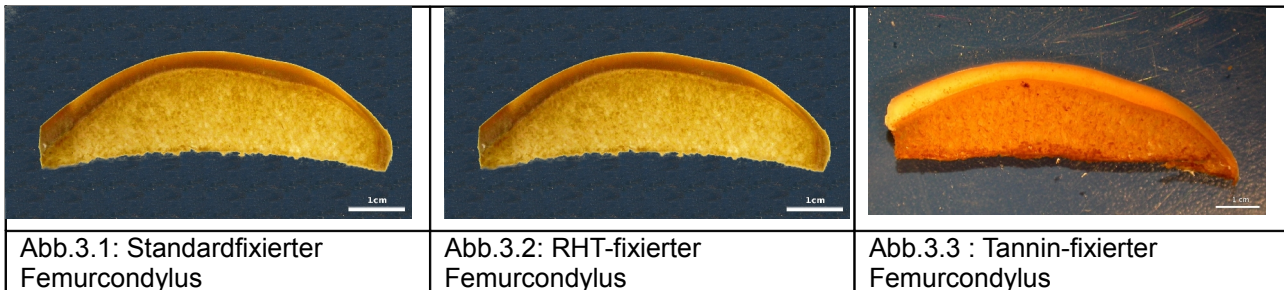
- **Standardfixierung:** 2,5%iges Glutaraldehyd in 0,1M Natriumcacodylatpuffer (Na-CaCo) (pH 7,2 + 0,2% CaCl₂) für 6 Stunden (s.Abb.3.1).
- **RHT-Fixierung:** 2%iges Glutaraldehyd in 0,05M Natriumcacodylatpuffer und 0,07% Ruthenium Hexaammintrichlorid (RHT) für 2 Stunden (s.Abb.3.2).
- **Tanninfixierung:** 2,5%iges Glutaraldehyd in 0,1M Natriumcacodylatpuffer und 1% Tannin (pH 7,2) für 2 Stunden (s.Abb.3.3).

Anschließend wurden die Präparate mit 0,1M Na-CaCo-Puffer gespült und bis zur Weiterverarbeitung in Pufferlösung aufbewahrt.

Für die Folgeschritte wurden 1mm dicke Querschnittspräparate erstellt. Die seitlichen Schnittkanten der Bandsäge wurden mechanisch entfernt.

Die Sekundärfixierung erfolgte im Falle der Glutaraldehyd- und Tanninprimärfixierung mit 0,5% Osmium tetroxide (OsO_4) in 1% Kaliumhexazyanoferat und mit 0,1% OsO_4 in 0,07% RHT im Falle der RHT-Primärfixierung.

Für die Beurteilung der Fixierqualität wurden Proben des Femurcondylus verwendet.



3.3 Dekalzifizierung

Verschiedene Dekalzifizierungsmethoden wurden an standardfixierten Proben des Femurcondylus getestet:

- 0,1M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (+NaOH Plätzchen bis ph Wert 7,3 erreicht ist) für 48 Stunden (1x Mediumwechsel)
- 10% EDTA in Tris HCl (ph Wert 7,4) für 48 Stunden
- 3% Ascorbinsäure in 0,5% NaCl für 24 Stunden

Die Dekalzifizierungsmethoden wurden sowohl vor als auch nach der Osmierung durchgeführt. Der Grad der Dekalzifizierung wurde mittels Alizarinrot überprüft.

3.4 Entwässerung, Einbettung

Die Proben wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) entwässert und über das Intermedium Propylenoxid in das Harz „Low Viscosity Resin“ (LVR) infiltriert. Die Polymerisation erfolgte für 8 Std. bei 60° C.

Semi- und Ultradünnschnitte wurden mit dem Mikrotom Ultracut E und S (Fa. Reichert, Deutschland) angefertigt. Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt; Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert.

Digitale Aufnahmen der Semidünnschnitte wurden mit dem Olympus BX41 Lichtmikroskop und der Olympus U-CMAD3 Kamera gemacht. Die ultrastrukturellen Schnitte wurden an einem Zeiss EM902 Transmissionselektronenmikroskop mit SharpEye und der ITEM 5 Software durchgeführt.

3.5 Probenaufbereitung für die vergleichenden morphologischen Untersuchungen

Basierend auf den oben genannten Voruntersuchungen wurden nachfolgend Gelenkspräparate verwendet, die mittels Standardmethode fixiert und nach der Osmierung mit 3%iger Ascorbinsäure dekalzifiziert worden waren.

Aus allen vier zur Verfügung stehenden Gelenksknorpelarten (Abb. 3.4) wurden von den primärfixierten Präparaten 1mm dicke Querschnittspräparate entnommen. Es ist bereits bekannt, dass es belastungsbedingte Unterschiede innerhalb eines Gelenkes gibt. Da das Interesse der gegenwärtigen Untersuchungen im Vergleich der verschiedenen Gelenke lag, wurden mechanobiologisch gleichwertige Stellen (längere, gerade, Gelenksbereiche) verwendet.

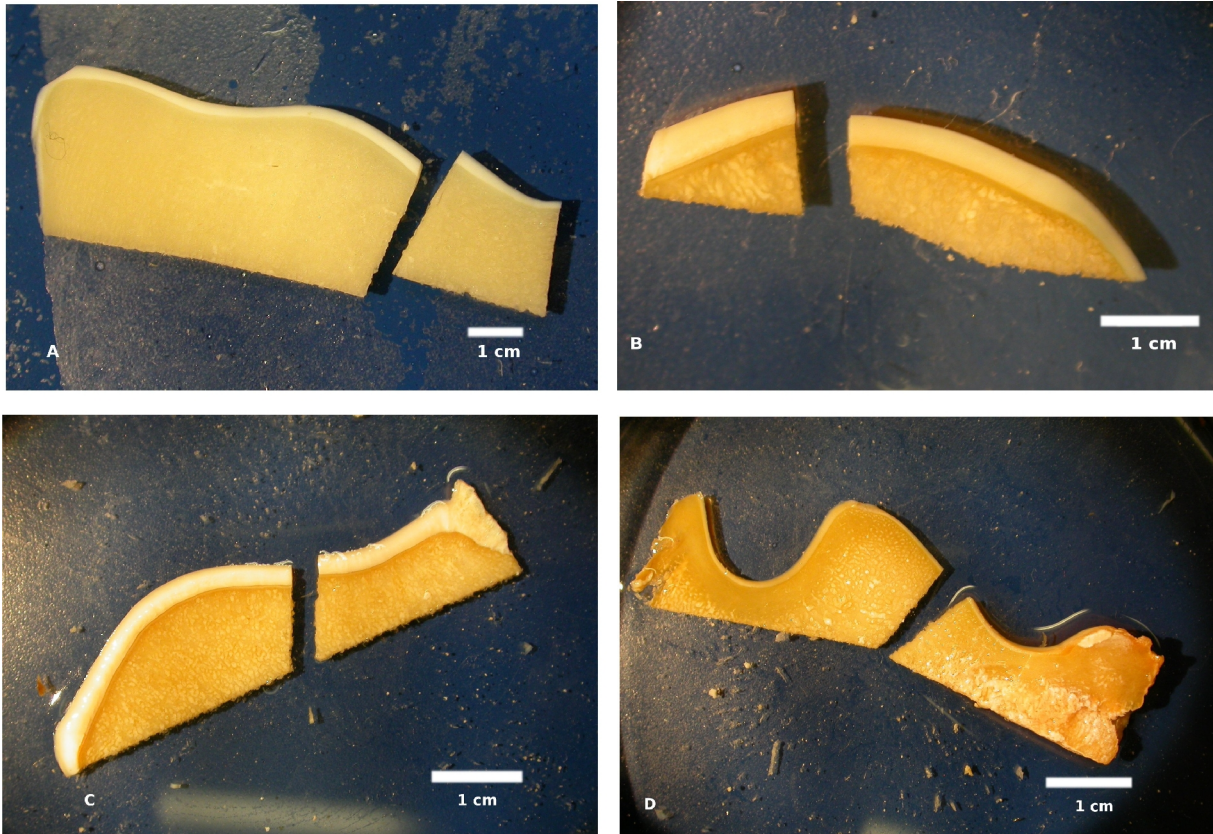


Abb.3.4: Makroskopische Aufnahme nach Entnahme der Proben für die Weiterverarbeitung:

A: Ellenbogen; A: Femurcondylus; C: Patella; D: Sprunggelenk.

4. Ergebnisse Teil 1

4.1 Methodische Voruntersuchungen

Die methodischen Voruntersuchungen dienten dem Austesten der am besten geeigneten Fixierungs- sowie Dekalzifizierungsmethode für den equinen Knorpel.

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben sich vor allem bei den drei getesteten Fixativen große Unterschiede hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen. Es hat sich überdies gezeigt, dass die Chondrozyten unterschiedlich empfindlich auf die Fixative reagieren. Dies wirkte sich wiederum auf die Beständigkeit der Ergebnisse aus, da es bei Zellen, die sich durch die Präparation bereits in einem schlechteren Allgemeinzustand befanden, zu Fixierartefakten kommen konnte. Da die Probenentnahme von Knorpel-Knochenpräparaten im Vergleich zu anderen Geweben ein sehr diffiziler Arbeitsschritt ist, kann eine gewisse Beeinträchtigung der Zellen niemals vollständig ausgeschlossen werden. Die Verwendung eines schonenden Fixatives ist beim Knorpel daher besonders wichtig.

Bei der Dekalzifizierung waren die Unterschiede weniger ausgeprägt. Sie beschränkten sich im Wesentlichen auf Auswaschungen von Zytoplasmaeinlagerungen (Glykogenakkumulationen, Lipidtropfen) und Klarheit von Membranstrukturen.

Die natriumkacodylatgepufferte Glutaraldehyd-Fixierung (Standardfixativ) mit nachfolgender 3%iger Ascorbinsäureentkalkung stellte sich als die beständigste Fixier- und Dekalzifizierungskombination heraus.

4.2.1 Ergebnisse Standardfixierung

Bei der Standardfixierung waren alle wesentlichen knorpelspezifischen Strukturen erhalten. Zell- und Organellenmembranen waren deutlich erkennbar und Lipid- sowie Glykogenakkumulationen zeigten keinerlei Auswaschungen (s. Abb.4.1. u. Abb.4.2). Das

Zytoplasma hatte eine feine Struktur und mittleren Kontrast. Die Gliederung der ECM in die Perizellular-, Territorial- und Interterritorialmatrix war gut erkennbar. Die Kollagenfasern selbst waren gut erhalten, das Bänderungsmuster jedoch nur schwach erkennbar. Die Matrix zwischen den Kollagenfasern war zum großen Teil ausgewaschen.

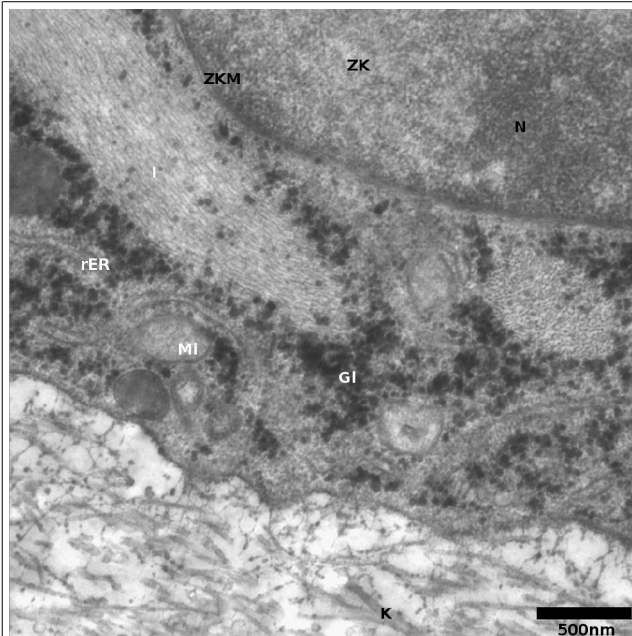


Abb. 4.1: Detailansicht eines Chondrozyten mit Glutaraldehyd fixiert. Erkennbar ist der Zellkern (ZK), Nucleolus (N) und die Zellkernmembran (ZKM). Im Zytoplasma sind weiters Intermediärfilamente (I) um den Kern angelagert. In Richtung Zellmembran erkennbar sind Glykogeneinschlüsse (GI), raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und Mitochondrien (Mi).

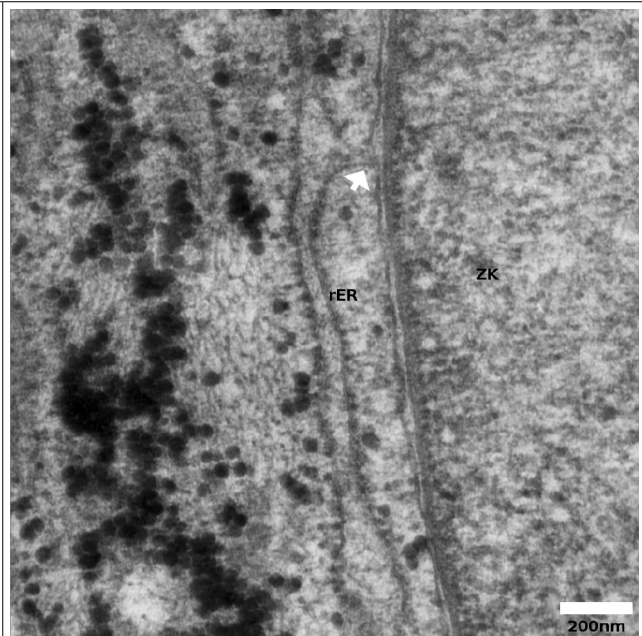


Abb. 4.2: Zellkernmembran eines Chondrozyten. Pfeil, Zellkernmembrankontakt mit rauem endoplasmatischem Retikulum (rER); ZK, Zellkern

4.2.2 Ergebnisse Tannin-Fixierung

Mit der Tannin-Fixierung zeigte der Knorpel eine relativ harte Kontrastierung mit wenig Graustufen. Das Gesamtbild war relativ dunkel, was auf die hohe Elektronendichte von Zytoplasma und ECM zurückzuführen ist. Membranen, Zytoskelettelemente und Glykogeneinlagerungen zeigten einen guten Erhaltungszustand. In den Übersichtsansichten waren sie jedoch aufgrund des dunklen Gesamteindrucks nur schwer erkennbar. Vesikel mit hellem Inhalt waren hingegen besonders deutlich erkennbar. Auf diese Weise konnten auch die relativ kleinen Caveolae und pinozytotischen Vesikel an der

Zellmembran bereits in Übersichtsansichten gut erkannt werde. Die Kollagenfasern der ECM waren gut erhalten und ihre Bänderung deutlich erkennbar. Der interfibrilläre Raum war teilweise mit Matrix gefüllt (s. Abb.4.3. u. Abb.4.4).

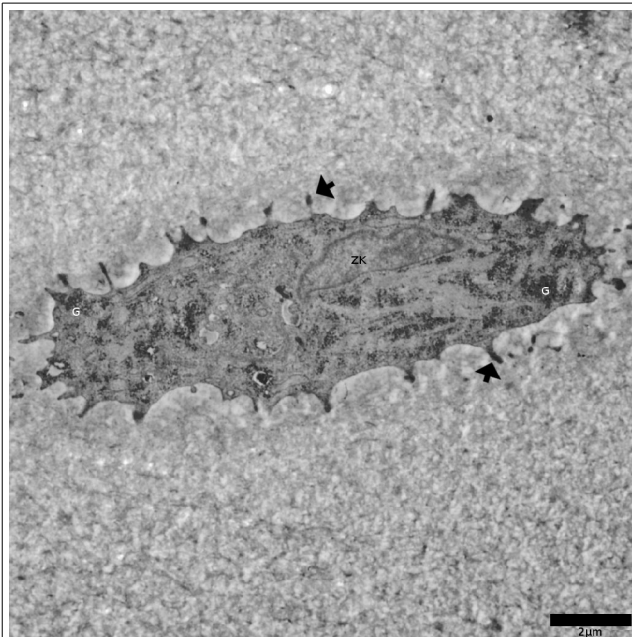


Abb. 4.3: Chondrozyt Femur Condylus Tannin fixiert. Pfeil, Zellfortsätze mit dunkel gefärbten Glykogeneinschlüssen

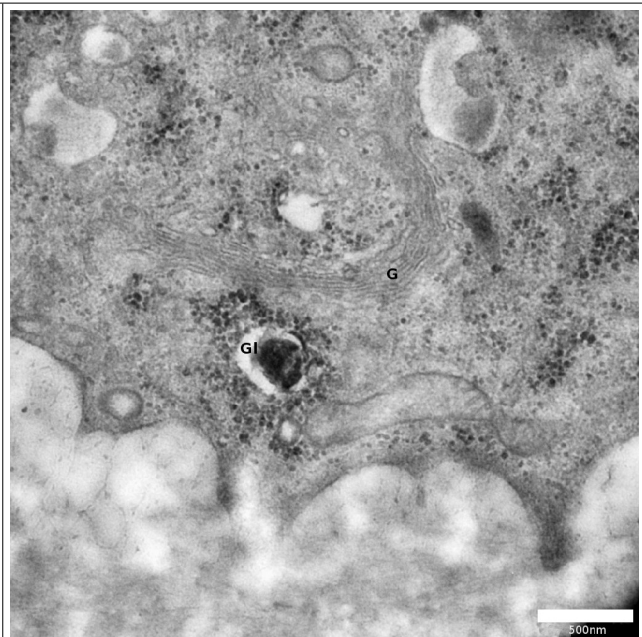


Abb. 4.4: Detailansicht Chondrozyt mit Tannin fixiert. GL, Glykogeneinschluss; G, Golgi-Vesikel

4.2.3 Ergebnisse mit Ruthenium Hexammintrichlorid (RHT)-Fixierung

Das elektronenoptische Bild von RHT-fixierten Proben zeigte einen noch wesentlich dunkleren Gesamteindruck und einen noch härteren Kontrast im Vergleich zu den Tannin-fixierten Knorpelproben (s. Abb.4.4.- Abb.4.8).

Intrazellulär kam es zu Auswaschungen und Verdichtungen des Zytoplasmas. Die Zytoskelettelemente waren gut erhalten und wenig elektronendicht, die Ribosomen hingegen sehr dunkel. Beides hob sich von dem Zytoplasma ab und war dadurch gut erkennbar. Im Gegensatz dazu erschienen Membranen elektronenhell und wurden nur durch die Kontrastunterschiede der umgebenden Strukturen deutlich.

Die Zellen schienen auf diese Fixierung am stärksten zu reagieren und zeigten die stärkste und häufigste Schrumpfung. Dies führte wiederum zu einer weiteren Verdichtung

des Zytoplasmas.

Die Kollagenfasern der ECM waren gut erhalten und das Bänderungsmuster deutlich erkennbar. Der Intrafibrillarraum war dicht mit feiner Matrix gefüllt. Die vollständige Erhaltung der Matrixbestandteile und deren Elektronendichte führten zu dem dunklen Eindruck der Matrix.

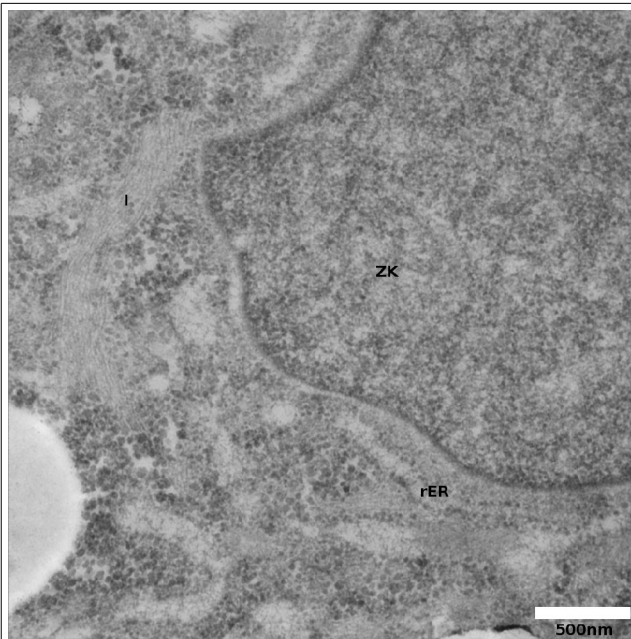


Abb. 4.5: Detailansicht eines mit RHT fixierten Chondrozyten. I, Intermediärfilamente; ZK, Zellkern; rER, raues Endoplasmatisches Retikulum

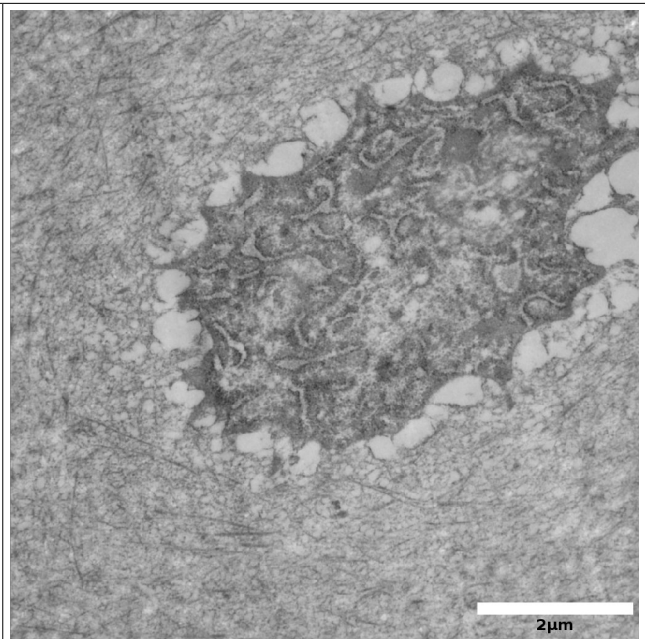


Abb. 4.6: RHT fixierter Chondrozyt

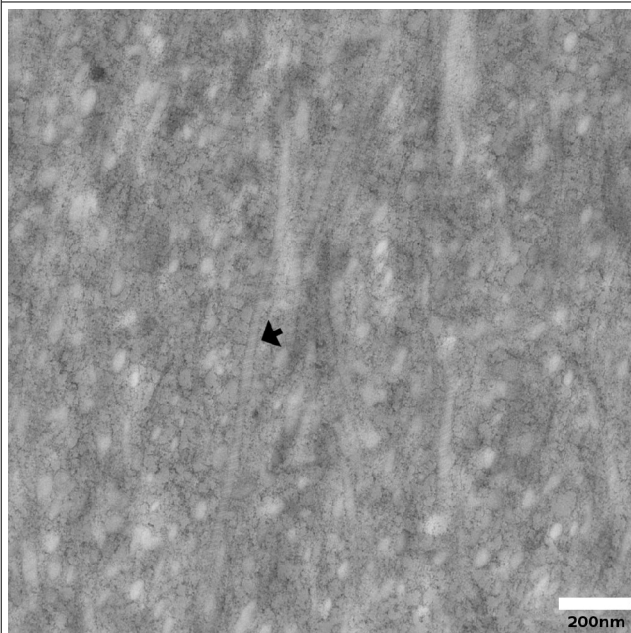


Abb. 4.7: Detailansicht von Kollagenfasern (Pfeil) (mit RHT fixiert).

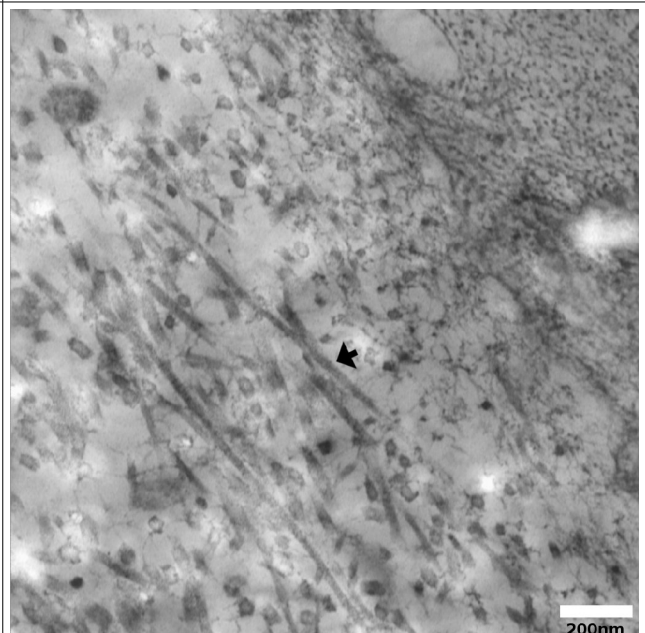


Abb. 4.8: Detailansicht von Kollagenfasern (Pfeil) (Standardfixation).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Standardfixierung eine besonders gute Zellerhaltung gewährleistete, während die RHT-Fixierung insbesondere eine vollständige und detailreiche Erhaltung der Matrix bewirkte. Die Tannin-Fixierung schien am besten für Spezialanwendungen wie einer gezielten Darstellung von Vesikeln geeignet zu sein.

4.3 Dekalzifizierung

Der Entkalkifizierungstest wurde mit Alizarinrot-Behandlung durchgeführt und war bei allen Proben erfolgreich. Weder die zwei verschiedenen EDTA Lösungen (für 48h) noch die 3%igen Ascorbinsäurelösung (für 24h) zeigten Kalkrückstände.

4.3.1 Ergebnisse EDTA

Die Ergebnisse mit 1M und 10%iger EDTA Lösung als Dekalzifizierungsreagenz waren relativ gut, zeigten jedoch Auswaschungen der intrazellulären Glykogenakkumulationen (s. Abb.4.9. u. Abb.4.10).

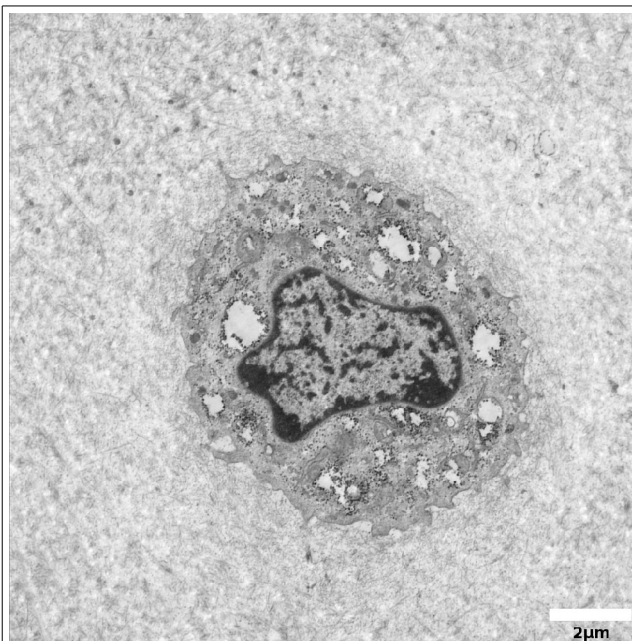


Abb. 4.9: Auswaschungen im Zellplasma des Chondrozyten, Entkalkifizierung mit 0,1M EDTA-Lösung.

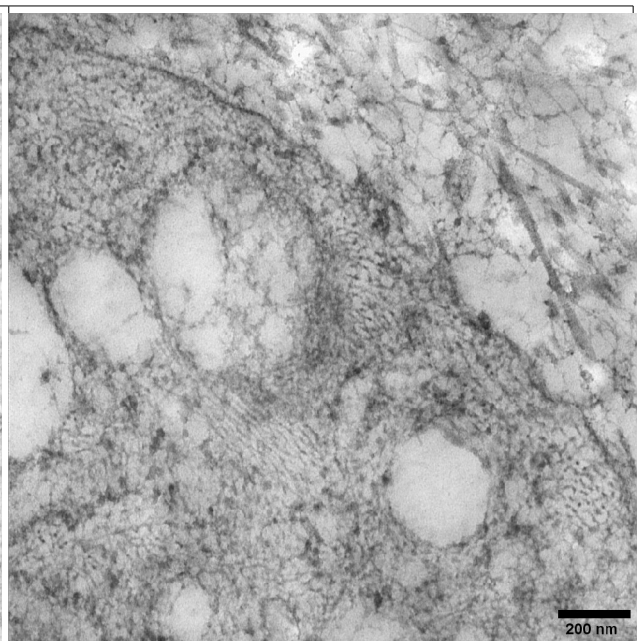


Abb. 4.10: Detailansicht Entkalkifizierung mit 0,1 M EDTA-Lösung

4.3.2 Ergebnisse Ascorbinsäure

Die Dekalzifizierung mit 3%iger Ascorbinsäure bewirkte keinerlei Beeinträchtigung der Strukturhaltung, sowohl Membranen, Zytoplasma, Zytoplasma-einlagerungen (Lipid, Glykogen) sowie auch die Matrix waren gegenüber der unentkalkten Proben unverändert gut erhalten (s. Abb.4.11. u. Abb.4.12).

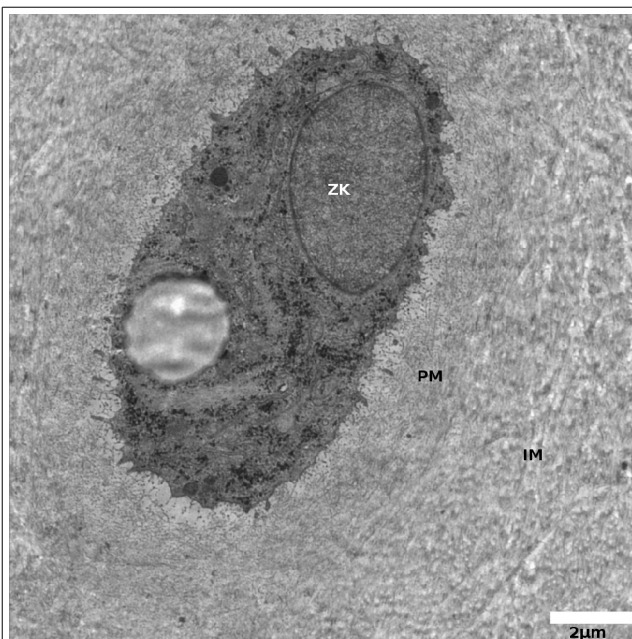


Abb.4.11 Chondrozyt Entkalkifizierung mit 3%iger Ascorbinsäure. ZK, Zellkern; PM, pericelluläre Matrix; IM, interterritoriale Matrix

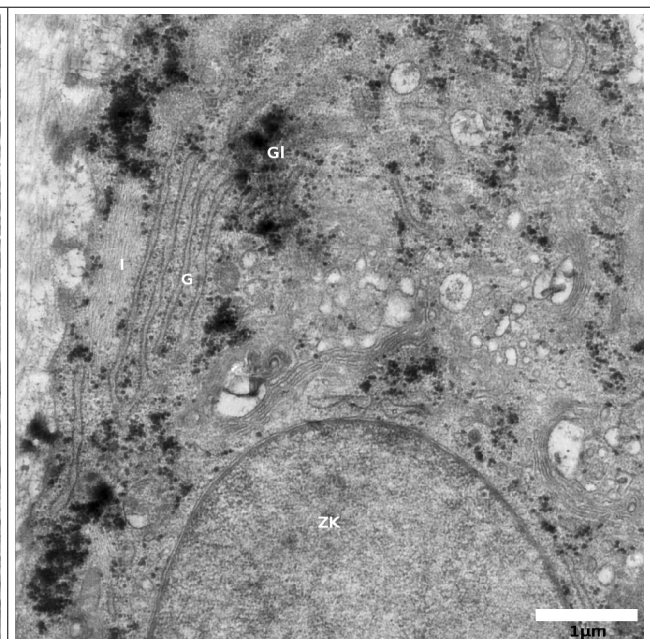


Abb.4.12 Detailansicht Entkalkifizierung mit 3%iger Ascorbinsäure. GL, Glykogeneinschluss; G, Golgi-Vesikel; I, Intermediärfilamente; ZK, Zellkern

5. Ergebnisse Teil 2

5.1 Übersicht der verschiedenen nativen Gelenksknorpel

Die für die Untersuchungen herangezogenen vier verschiedenen Gelenke zeigten bereits makroskopisch wesentliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Knorpeldicke. Anhand der Semidünnschnitte wurde von der Knorpeloberfläche bis zur Zementlinie die genaue Knorpeldicke ermittelt (Tab. 5.1). Der Ellenbogen war mit 1200 μm der Dickste. Der Femurcondylus und die Patella wiesen mit etwa 1000 μm sehr ähnliche Maße auf. Mit Abstand am Dünnssten (357 μm) war der Sprunggelenksknorpel. Bei genauerer Betrachtung der vier Knorpelzonen zeigte sich, dass diese Differenzen vor allem auf der unterschiedlichen Höhe der mittleren und tiefen Zone beruhen. Beispielsweise waren die mittlere und tiefe Zone bei dem Ellenbogen annähernd vier Mal dicker als bei dem Sprunggelenk. Die Superficialzone und kalzifizierte Zone waren hingegen relativ konstant hinsichtlich ihrer Maße.

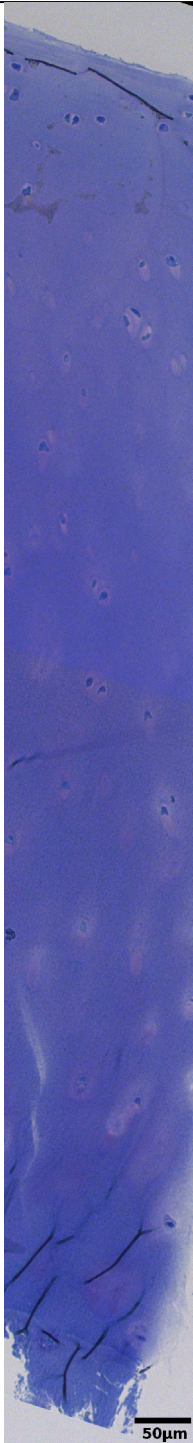


Abb. 5.1 Knorpel des Ellenbogengelenks

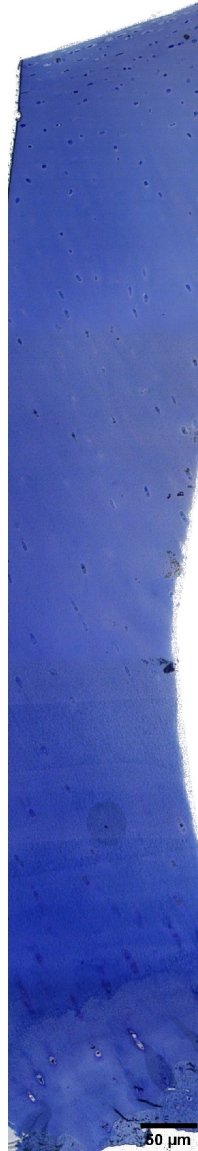


Abb. 5.2 Knorpel des Femur condylus

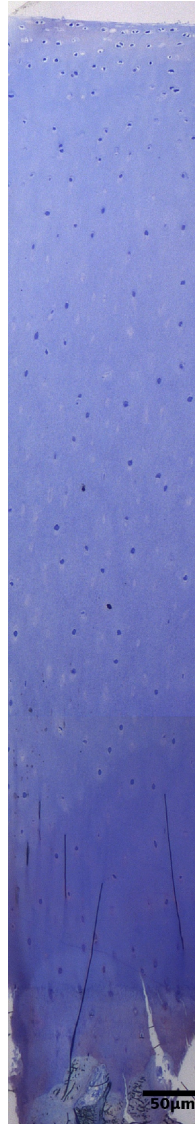


Abb. 5.3 Knorpel der Patella

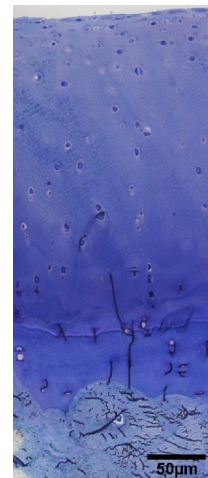


Abb. 5.4 Knorpel des Sprunggelenks

5.2.1 Gewebeorganisation der Superfizialzone und Mittelzone

Die Knorpel der vier Gelenke zeigten Unterschiede in der Zellform, -anordnung, -dichte und -verteilung sowie dem Vorhandensein und der Dicke der Lubricinschicht.

Die Superfizialzone des **Ellenbogens** war 50 µm, die Lubricinschicht war bis zu 1 µm dick. Die Zellen waren länglich und hatten eine oberflächenparallele Orientierung. Die Anzahl der Chondrozyten war unregelmäßig und die Zelldichte gering. Die obersten 30 µm waren über lange Distanzen völlig zellfrei (Abb. 5.6A). Helle Matrixregionen im Ausmaß von flachen Chondronen wiesen darauf hin, dass die Zellen in dieser Region bereits seit längerer Zeit degeneriert waren.

In der Mittelzone nahmen die Chondrozyten kugelige bis elipsoide Formen an und traten teilweise als Doppelchondrone auf (Abb. 5.9). Chondrone in dieser Region zeigten eine leichte Neigung und waren nicht streng rechtwinkelig zur Knorpeloberfläche orientiert. Die Zellverteilung war nach wie vor unregelmäßig, jedoch waren kaum leere Chondrone erkennbar.

Der Knorpel des **Femurcondylus** wies eine ca. 25 µm dicke Superfizialzone auf, die mit einer bis zu 1,5 µm elektronendichten Lubricinschicht abschloß (Abb. 5.5B). Typisch für diese Zone waren die abgeflachten Chondrozyten mit ihrer länglichen Orientierung parallel zur Knorpeloberfläche. Sie waren von einer perizellulären Matrix umgeben, die zur Gelenksoberfläche hin wesentlich stärker ausgebildet war.

In der Mittelzone kamen im oberen Bereich noch abgeflachte Zellen vor (s. Abb. 5.6D). Die Orientierung dieser Chondrozyten war vergleichbar mit jener aus der obersten Knorpelregion, jedoch war die Abflachung nicht so stark ausgeprägt. In Richtung Knochen wurden die Zellen zunehmend runder. Neben Einzelchondronen kamen auch Doppelchondrone vor.

Die **Patella** hatte eine 25 µm dicke Superfizialzone, die jedoch fast keine Lubricinschichte

aufwies (Abb. 5.5C). Es waren bereits in den obersten Regionen Doppelchondrone vorhanden, die meist parallel zur Knorpeloberfläche orientiert waren. Die perizelluläre Matrix war gut ausgeprägt und von der interterritorealen Matrix abgegrenzt.

In der Mittelzone befanden sich Einzel- oder Doppelchondrone mit kugeligen Chondrozyten.

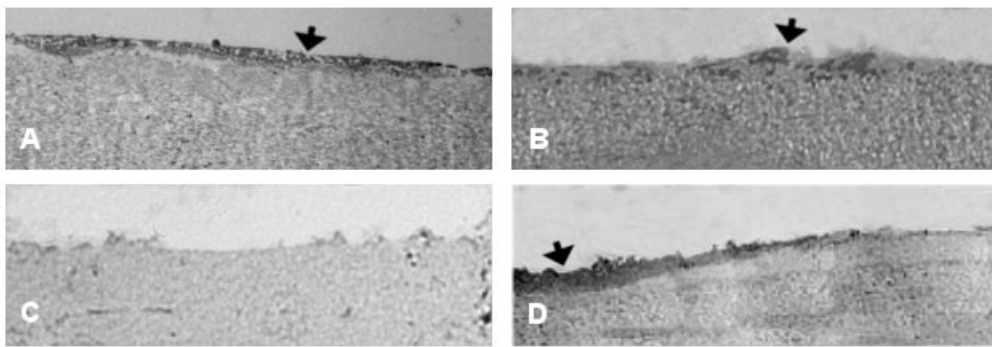
Die Superficialzone des **Sprunggelenks** war 25 µm dick und von einer 2 µm Lubricinschichte bedeckt. Die Zellen waren meist rundlich und bildeten teilweise Doppelchondrone, die oberflächenparallel angeordnet waren (Abb. 5.6G).

Die runde Zellform und die Doppelchondronbildung setzte sich in der Mittelzone fort; die Zellverteilung war jedoch unregelmäßig.

5.2.2 Gewebeorganisation der tiefen Zone

Wie in der Superficial- und Mittelzone ergaben sich auch in der tiefen Zone wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Zellform, -anordnung, -dichte und -verteilung.

Der Ellenbogen und das Sprunggelenk hatten eine wesentlich größere Zelldichte als der Femurcondylus und Patella. Vor allem im Sprunggelenk ordneten sich die Zellen zu Doppelchondronen an. Hier waren auch Säulenchondrone von bis zu drei Chondronen vorhanden, die eine vertikale Orientierung aufwiesen. Multichondrone von mehr als drei Zellen pro Chondron waren nicht vorhanden. Im Femurcondylus hatten die Chondrozyten eine langgestreckte Form von 10-12 µm Länge und 4-5 µm Breite. Sie waren vertikal orientiert, jedoch nicht exakt im rechten Winkel zur Gelenksoberfläche bzw. dem subchondralen Knochen ausgerichtet. Auch beim Ellenbogen setzte sich die leichte Neigung der Chondrone der Mittelzone in der tiefen Zone fort. Im Femurcondylus und der Patella waren die Chondrozyten größer und hatten eine stärker ausgeprägte perizelluläre Matrix als im Knorpel der anderen beiden Gelenke.



5 µm

Abb. 5.5: Die Abbildung zeigt die an der Superficialzone des Knorpels aufgelagerte Lubricinschicht. A, 1µm dicke Lubricinschicht des Ellenbogens; B, ca.1,5 µm dicke Lubricinschicht des Femurcondylus; C, Bei der Patella ist praktisch kein Lubricin vorhanden; D, bis zu 2µm dicke Lubricinschicht beim Sprunggelenk.

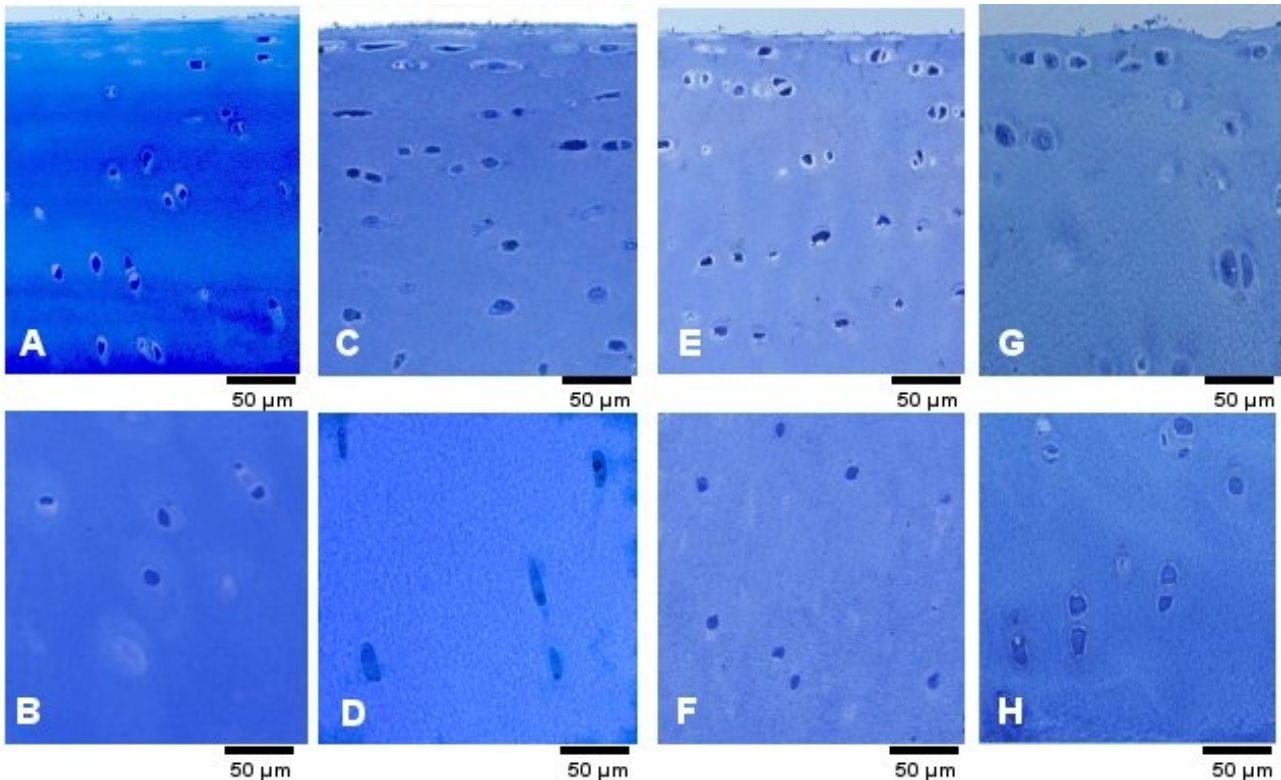


Abb. 5.6: Die lichtmikroskopisch abgebildeten Semidünnschnitte zeigen den nativen Knorpel verschiedener Gelenke in der Superficialzone (A, C, E, G) und der Mittelzone (B, D, F, H). A, Superficialzone des Ellenbogens. Deutlich sichtbar sind die oberflächennahen hellen Matrixregionen ehemaliger Chondrozyten. B, Die Mittelzone des Ellenbogens zeigt ausgeprägt kugelige bis ellipsoide Chondrozyten oder Doppelchondrone. C, Die oberflächennahen Chondrozyten des Femurcondylus weisen stark abgeflachte, langgestreckte Chondrozyten auf. In der Mittelzone des Femurcondylus (D) ändert sich die Orientierung der Chondrozyten. Bei der Patella sind auch in der Superficialzone Doppelchondrone vorhanden (E). In der Mittelzone sind die Zellen kugelig ausgeprägt (F). Ausgeprägt große Doppelchondrone und Säulenchondrone kamen im Sprunggelenk sowohl in der Superficialzone (G) als auch in der Mittelzone vor (H).

5.2.3 Gewebeorganisation in der kalzifizierten Zone

Der kalzifizierte Knorpel aller vier Gelenktypen wies keine wesentlichen morphologischen Unterschiede auf. Die Begrenzungen des kalzifizierten Knorpels zum darüberliegenden unkalzifizierten Knorpel (die Tide mark) war klar ausgebildet und leicht gewellt. Auch vom Knochen war die kalzifizierte Zone klar abgegrenzt. Die Grenzlinie (die Zementlinie) war stärker geschwungen, drang jedoch nur bis zur Hälfte der kalzifizierten Zone vor. Die Zellen selbst waren schlecht erhalten, da das Fixativ die kalzifizierte Matrix nur schlecht

durchdrang. Aufgrund der Chondronform konnte man davon ausgehen, dass die Chondrozyten im Femurcondylus etwas länglicher waren als jene in den anderen Gelenken, und somit den Zellformen der jeweiligen tiefen Zone entsprachen.

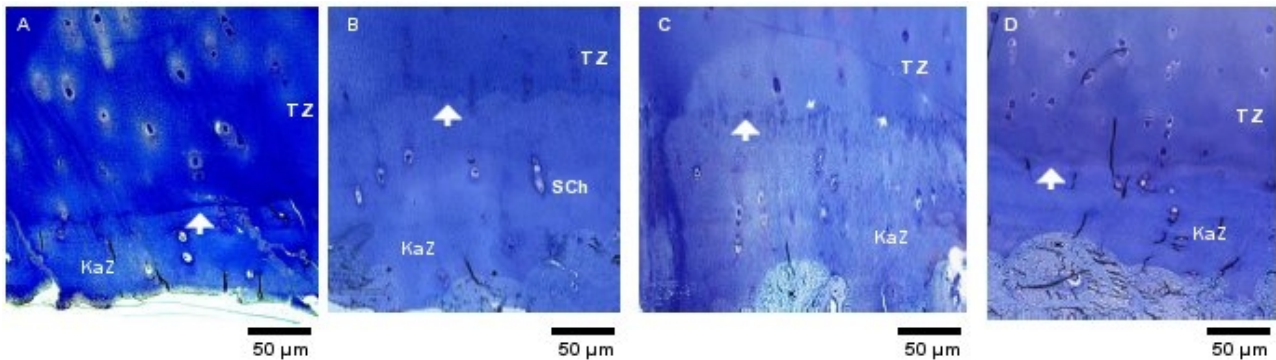


Abb. 5.7: Der Pfeil deutet die Abgrenzung der nicht kalzifizierten Tiefenzone (TZ) von der kalzifizierten Zone (KaZ) durch die Tiden mark an. Die Ausprägung ist bei Ellenbogen (A), Femurcondylus (B), Patella (C) und Sprunggelenk (D) gleichermaßen stark. Säulenchondrone (Sch) sind in der KaZ bei allen Gelenken ausgeprägt.

5.3.1 Chondrozyten der Superficialzone

In allen vier Gelenken beinhalteten die Zellen der Superficialzone, im Vergleich zu den anderen Zonen, relativ wenige Glykogeneinlagerungen und hatten einen heterochromatinreichen Kern, was auf eine geringe Syntheseaktivität schließen lässt. Auffällig war, dass sich in einigen Zellen eine große Anzahl an Intermediärfilamenten (Vimentin) in Form von Bündeln um den Kern angeordnet hatten. Weiters waren gelegentlich große Lipidtropfen im Zytoplasma eingelagert. Die perizelluläre Matrix war teilweise sehr gut ausgebildet und in Richtung Knorpeloberfläche stärker ausgeprägt.

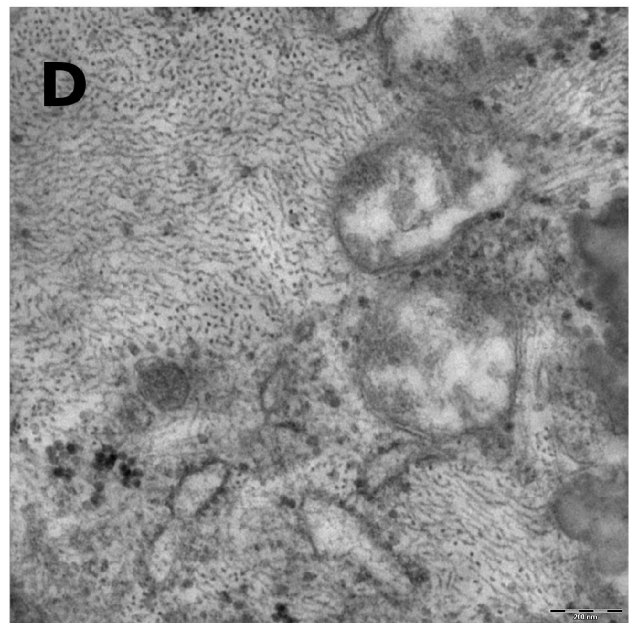
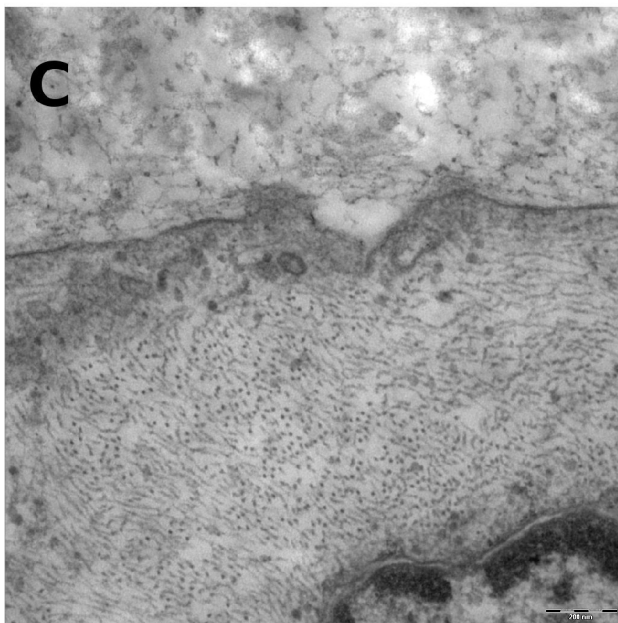
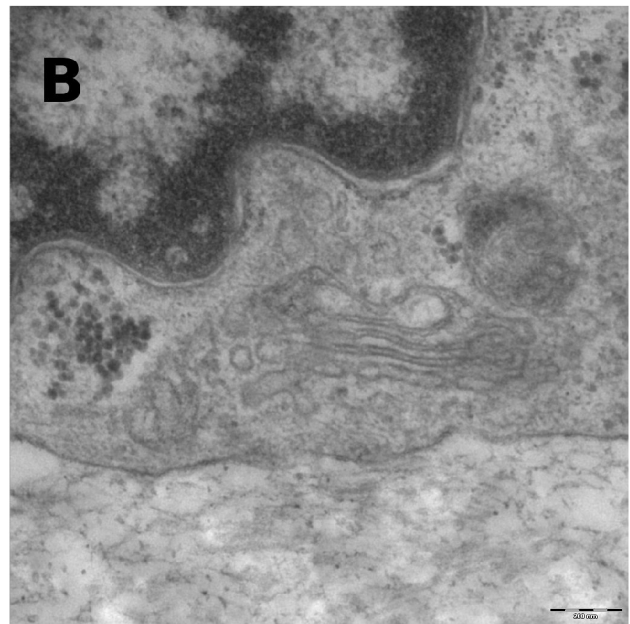
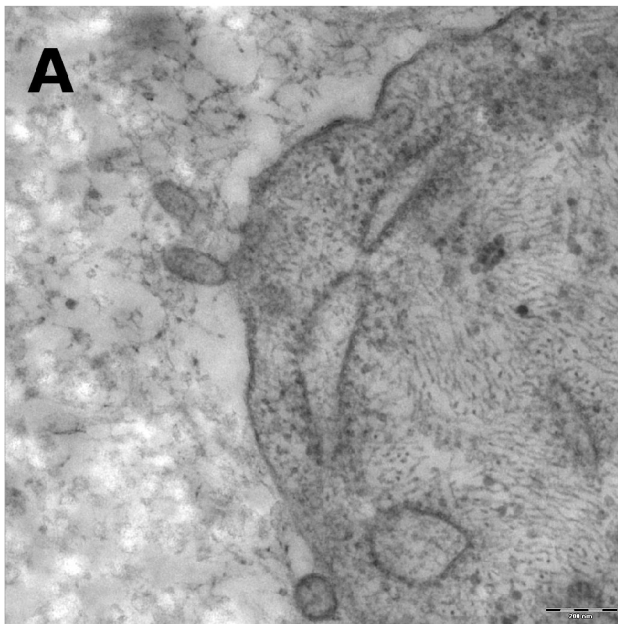
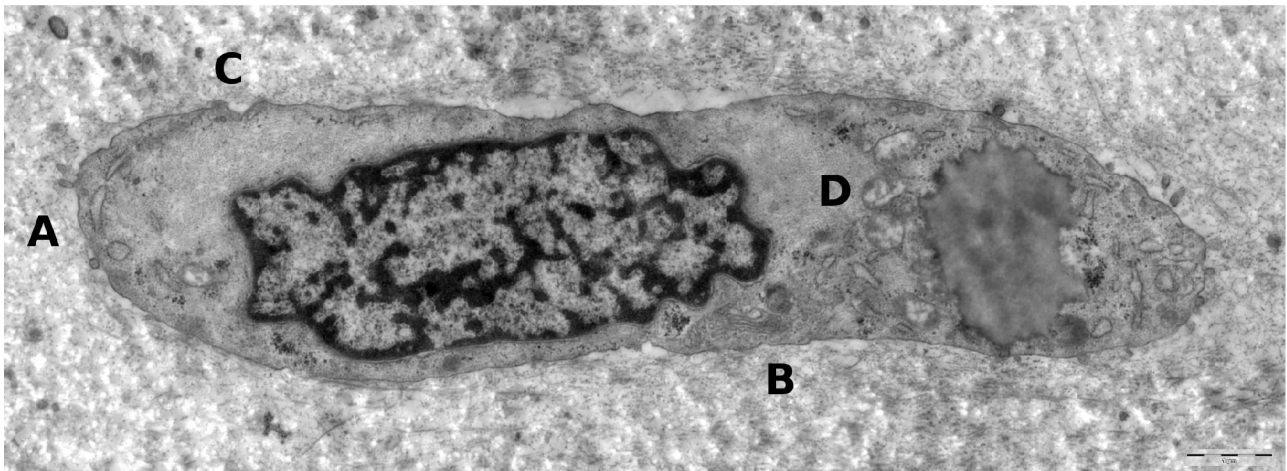


Abb. 5.8: Chondrozyt des Femurcondylus in der Superficialzone mit ausgeprägten Intermediärfilamenten (D) rund um den Zellkern. An der Zellmembran gibt es zahlreiche Zellmembran-Matrix Kontakte (C), die auch mittels Mikrovilli (A) ausgeprägt sind. Zellorganellen wie (B) Golgi-Vesikel, Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum, als auch Zelleinschlüsse wie Lysosom und Glykogen sind vorhanden.

5.3.2 Chondrozyten der Mittelzone

Die stark ausgebildeten synthetischen Zellorganellen (raue endoplasmatische Reticulum (rER), Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel) sowie der euchromatinreiche Kern der Zellen der Mittelzone wiesen auf eine hohe Syntheseaktivität hin. Überdies waren Glykogeneinlagerungen und Lipidtropfen im Zytoplasma vorhanden. Um den Kern waren meist Vimentinbündel angeordnet, die mitunter große Bereiche des Zytoplasmas einnehmen konnten (Abb. 5.9). Typischerweise tritt das rER vor allem an der Zellperipherie auf, der Golgi-Apparat war, sofern nicht von Vimentinbündel verdrängt, in Kernnähe lokalisiert.

Die Zellen waren von einer unterschiedlich stark ausgeprägten Perizellularmatrix umgeben, die häufig von einer Perizellularkapsel begrenzt war. Außerhalb der Perizellularkapsel waren teilweise viele elektronendichte Matrixvesikel in die Matrix eingelagert.

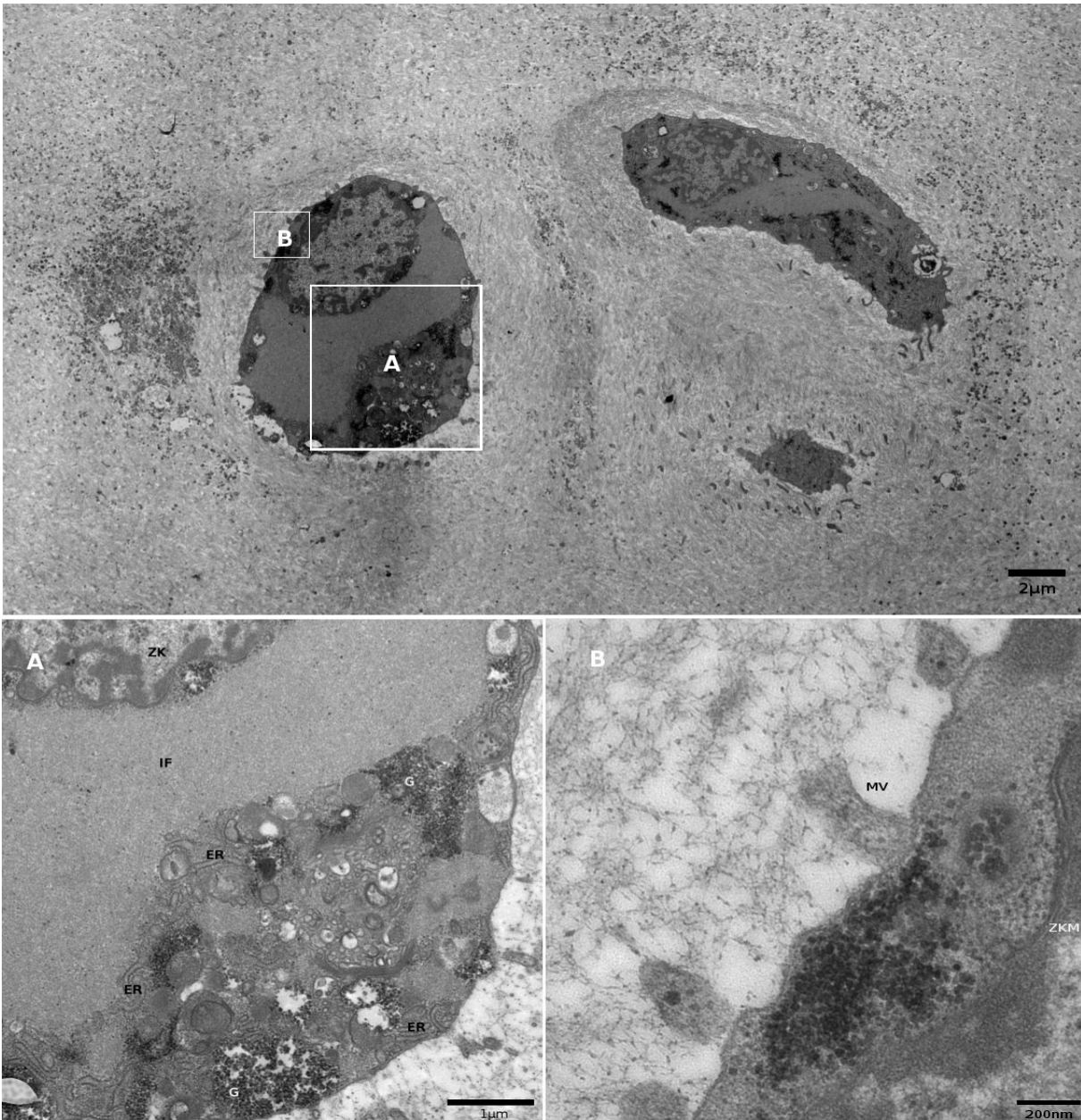


Abb. 5.9: Doppelchondron des Ellenbogens in der Mittelzone mit (A) ausgeprägtem Intermediärfilamentanteil (IF) rund um den Zellkern (ZK). Das raue endoplasmatische Retikulum (ER) ist oft an der Pheripherie angeordnet. Zur perizellulären Matrix hin sind oft Mikrovilli (MV) ausgeprägt.

5.3.3 Chondrozyten der tiefen Zone

In der tiefen Zone entsprechen die Zellen weitgehend jenen der Mittelzone, wobei die synthetische Aktivität, die Einlagerung von Glykogen und Lipid sowie die Intermediärfilamentbündel tendenziell weniger stark ausgeprägt war. Die Perizellulärmatrix hingegen waren eher stärker ausgeprägt. Matrixvesikel waren auch in dieser Region in Zellnähe zu finden.

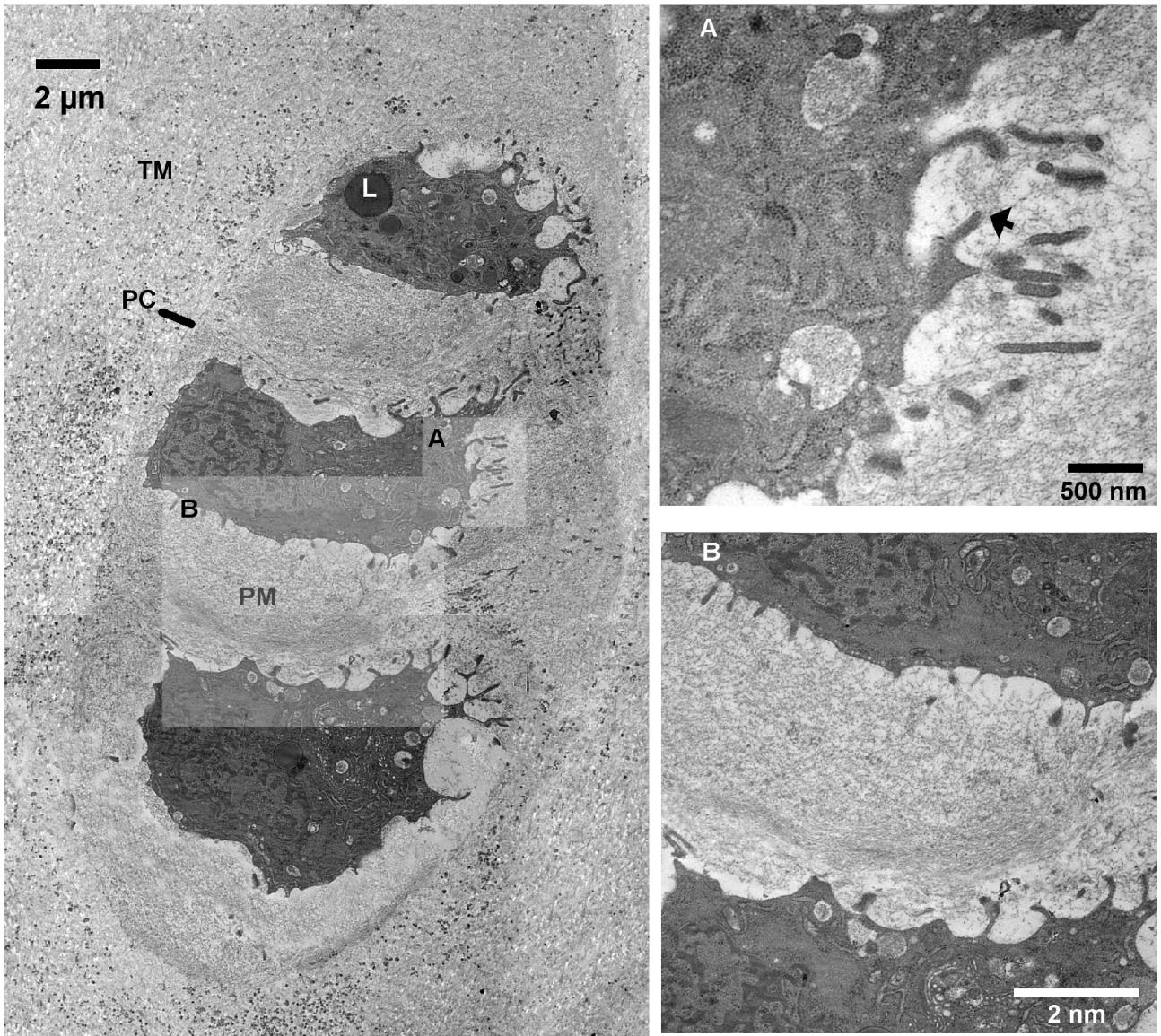


Abb. 5.10: Das Säulenchondron des Ellenbogens setzt sich aus drei Chondronen zusammen. Intrazellulär sind zahlreiche Zelleinschlüsse wie Lysosom (L) oder Multivesikuläre Einlagerungen zu finden. Die perizelluläre Matrix (PM) ist stark ausgeprägt (B) und schließt mit der perizellulären Kapsel (PC) zur territorialen Matrix (TM) hin ab. Die Zellmembran besitzt ausgeprägte Mikrovilli (Pfeil), die weit in die PM hineinreichen.

Tab. 1: Gegenüberstellung der wichtigsten morphologischen Merkmale des Gelenkknorpels von Ellenbogen, Femurcondylus, Patella und Sprunggelenk. SZ = Superficialzone; MZ=Mittelzone

Gelenkstyp	Knorpeldicke [µm]	Lubricin=schicht [µm]	Form der Zellen in der Superficialzone	Zelldichte	Doppelchondrone ab Zone
Ellenbogen	1200	1	wenn vorhanden länglich	hoch ab MZ/TZ	MZ
Femurcondylus	964	1,5	länglich	gering	MZ
Patella	1000	0,1	rund	teilweise hoch	SZ
Sprunggelenk	357	2	rund	hoch	SZ

6. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, equinen Knorpel aus vier verschiedenen Gelenken vergleichend morphologisch zu untersuchen. Besonderes Interesse galt dabei mechanobiologisch relevanten Organisationsformen wie die Bildung von Multichondronen sowie intrazellulärer Strukturen (Vimentin). In Voruntersuchungen wurden verschiedene Fixier- und Dekalzifizierungsmethoden getestet.

Die methodischen Untersuchungen ergaben, dass die Glutaraldehydfixierung mit einer anschließenden Kaliumhexazyanoferat-unterstützten Osmifizierung den besten Strukturerehalt hervorbrachte. Der wesentliche Vorteil dieser Fixierung war der intensive Membrankontrast und die gute Erhaltung von Zytoskelettelementen bei gleichzeitig dezenter Färbung des Cytoplasmas. Dadurch waren intrazelluläre Details besonders deutlich erkennbar. Auswaschungen, die bei Chondrozyten vor allem bei den massiven Glykogenanlagerungen vorkommen können, waren minimal. Diese Fixativkombination, von Kaliumhexazyanoferat mit OsO_4 , führt zu den geringsten Zellschädigungen, wie beispielsweise Schrumpfung. Im Gegensatz dazu brachte die RHT-Fixierung eine sehr spezielle für das Knorpelgewebe entwickelte Methode, sehr variable Fixierqualität und eine stärkere Zellschädigung. Selbst bei optimaler Fixierung zeigte sich eine suboptimale Erhaltung intrazellulärer Strukturen. Der aus der Literatur bekannte Vorteil der RHT-Fixierung, die Erhaltung der Perizellulärmatrix (Hunziker et al., 1982), war im Falle des vorliegenden Probenmaterials nur von geringer Bedeutung, da selbst bei der Standardfixierung gute Ergebnisse erzielt werden konnte.

Die Dekalzifizierung von Knorpel und Knochen führt häufig zu qualitativen Verlusten bei der Strukturerehaltung. Die hier getesteten Methoden umfassten zwei verschiedene Formen der EDTA-Entkalkung, sowie eine Ascorbinsäure-Entkalkung. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Entkalkung mit Ascorbinsäure keine sichtbare Veränderung in der

Strukturerhaltung bedingte. Obwohl Ascorbinsäure eine starke Säure ist, die bei 3% einen pH-Wert zwischen 1 und 2 besitzt, scheint die vollständige Fixierung (Primär- und Postfixierung) ausreichenden Schutz vor Auswaschungen zu bieten.

Für die vergleichend morphologischen Studien wurden mechanobiologisch ähnliche Regionen des Femurcondylus, Ellenbogens, Sprunggelenks und der Patella herangezogen.

Bereits makroskopisch waren bei den vier Gelenken Unterschiede in der Knorpeldicke zu erkennen. Der Ellenbogen zeigt die größte Knorpeldicke, gefolgt von Femur und Patella mit relativ ähnlicher Abmessung. Das Sprunggelenk hat den dünnsten Knorpelbelag, und ist im Vergleich mit den anderen drei Gelenken um mindestens die Hälfte dünner. Diese Unterschiede sind durch die unterschiedliche Ausdehnung der mittleren und tieferen Knorpelregion bedingt. Die Superficialzone und die tiefe Zone hatten hingegen bei allen Gelenken annähernd gleiche Breite.

Unterschiede in der Knorpeldicke traten auch innerhalb eines Gelenks auf und waren am stärksten bei dem Sprunggelenk ausgeprägt. Der Grund dafür sind vermutlich die, durch die ausgeprägten Condylen bedingten, unterschiedlichen Belastungsverhältnisse innerhalb des Gelenks. Zwischen den vier Gelenken war die unterschiedliche Knorpeldicke jedoch nicht ausschließlich auf die Belastungsstärke zurückzuführen. Anlass für diesen Rückschluss gibt die annähernd gleiche Knorpeldicke von Patella und Femurcondylus, die jedoch sehr unterschiedlicher Belastung ausgesetzt sind.

Im Vergleich mit anderen Spezies ist die Knorpeldicke relativ hoch. Dies entspricht der generellen Tendenz von der mit der Körpergröße ansteigenden Knorpeldicke (Stockwell, 1978). Andererseits gibt es Beispiele, wie den Elefanten, bei dem diese Korrelation nicht zutrifft. Das Pferd hat eine sehr ähnliche Knorpeldicke wie der Mensch (Frisbie et al.,

2006). Dies trifft zumindest auf das Kniegelenk zu, das am Besten für den Vergleich von bipeden Menschen und quatripeden Pferd herangezogen werden kann.

Die histologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen zeigten, dass gleiche Knorpeldicken nicht mit gleichem Aufbau hinsichtlich der Zellverteilung und Chondronbildung korrelieren. Am deutlichsten zu erkennen ist dies bei dem ungefähr gleich dicken Femur- und Patellaknorpel. Während der Femurknorpel in der tieferen Region Säulenchondrone aufweist und die Zellen generell länglicher und vertikal zur Oberfläche ausgerichtet sind, beinhaltet der Patellaknorpel über den gesamten Knorpelquerschnitt einzelne, rundliche Zellen. Auffällig ist auch die Neigung der Chondrone und somit der Kollagenfasern im Femurknorpel. Variationen in der Knorpelorganisation trotz gleicher Knorpeldicke wurden beim Menschen sogar innerhalb eines Gelenks beschrieben (Nürnberg et al., 2006a).

Bezüglich der Zelldichte zeigte sich, dass der dickste Knorpel, jener des Ellenbogens, die geringste Zelldichte aufweist und an der Oberfläche sogar teilweise zellfrei ist. Helle, wenig dichte Matrixbereiche in der Superficialzone lassen vermuten, dass das Fehlen der Zellen auf Degradation zurückzuführen ist. Zelldegeneration an der Gelenksoberfläche ist eine altersbedingte Erscheinung und führt langfristig zur Degeneration des Knorpelgewebes (Meachim et al., 1965).

Der Femur hingegen zeigte in der Superficialzone, dem klassischen Schema entsprechend (Buckwalter and Mankin, 1997), abgeflachte, einzeln angeordnete Chondrozyten, die parallel zur Knorpeloberfläche positioniert sind. Im Unterschied dazu hatte das Sprunggelenk in der obersten Knorpelschicht kugelige Chondrozyten mit Tendenz zur Doppelchondronbildung, die jedoch im Gegensatz zu den Doppel- und Multichandronen in den tiefen Regionen eine oberflächenparallele Orientierung zeigten. Ausgeprägte Doppelchondrone in der Superficialzone zeigte vor allem die Patella. Diese

Abweichung von dem klassischen Schema wurde schon in früheren Arbeiten wie zum Beispiel beim humanen Knorpel festgestellt (Nürnberger et al., 2006a).

Intrazellulär wiesen die Zellen neben den synthetisierenden Organellen auch noch Lipidtropfen, Glykogeneinlagerungen und Vimentinbündel auf. Diese typischen Merkmale der Chondrozyten sind dafür bekannt, dass sie in der Superficialzone und der oberen Mittelzone gar nicht vorkommen und zum Knochen hin in Anzahl und Größe zunehmen. Bei Pferden wurde beobachtet, dass vor allem Vimentinbündel und gelegentlich auch Lipidtropfen bereits in oberen Knorpelregionen, bis hin zur Superficialzone vorkommen. Diese Beobachtung wurde bereits in einer früheren Studie am Pferd (Nürnberger et al., 2006b), sowie bei anderen großen Tieren wie dem Rind (Langelier et al., 2000), festgestellt.

Lubricin ist eine dünne Matrixschicht auf der Knorpeloberfläche, der eine hohe Bedeutung für die reibungslose Gleiteigenschaft der Knorpeloberfläche zugeschrieben wird (Swann et al., 1981). Sie ist meist nur mittels Immunhistologie und Elektronenmikroskopie zu erkennen (Ghadially, 1983b). Bei den hier untersuchten Gelenksknorpeltypen gab es große Unterschiede in der Dicke der Lubricinanlagerungen. Das Sprunggelenk wies, gefolgt vom Femurcondylus und dem Ellenbogen, die stärkste Lubricinschicht auf. Da es sich dabei um Gelenke mit großer Belastung handelt, liegt eine Korrelation mit der mechanischen Beanspruchung nahe. Diese Vermutung wird zusätzlich erhärtet, da bei der Patella so gut wie kein Lubricin vorhanden war. Ein weiterer Faktor, für das Vorhandensein von Lubricin ist überdies das Ausmaß von Scherkräften. Diese müssen in einem relativ engen Bereich liegen, da sehr geringe wie auch zu starke Scherkräfte die Ausbildung verhindern bzw. einen Abrieb bewirken (persönliches Kommentar). Da der untersuchte Knorpel von adulten Tieren stammte, ist es möglich, dass Abnutzung zu einer Veränderung der Lubricindicke geführt hat. Um genaue Begründungen des Lubricingehalts

der verschiedenen Gelenke aufstellen zu können, sind detaillierte mechanobiologische Untersuchungen erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Morphologie des equinen Knorpels charakterisiert werden. Überdies wurde erstmals ein ultrastruktureller Vergleich von vier verschiedenen Gelenksknorpelarten angestellt, wodurch die intraspezifische Variation in Gelenksknorpelorganisation aufgezeigt werden konnte. Diese Arbeit liefert somit einen wesentlichen Beitrag für die Knorpelbiologie und bietet die nötige Voraussetzung für zukünftige experimentelle Arbeiten in der Knorpeldefektheilung.

LITERATUR

- Benninghoff,A. (1925). Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen und Funktionen. Zweiter Teil: Der Feinbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. Z. Zellforsch. 2, 783-862.
- Buckwalter,J.A. and Mankin,H.J. (1997). Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. J. Bone Joint Surg. Am. 79, 600-611.
- Comper,W.D. (1991). Physiochemical Aspects of Cartilage Extracellular Matrix. In Cartilage: Molecular aspects, B.Hall and S.Newman, eds. (Boca Raton: CRC Press), pp. 59-96.
- Duance,V.C. (1983). Surface of articular cartilage: immunohistological studies. Cell Biochem. Funct. 1, 143-144.
- Durrant,L.A., Archer,C.W., Benjamin,M., and Ralphs,J.R. (1999). Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. J. Anat. 194 (Pt 3), 343-353.
- Egglı,P.S., Hunziker,E.B., and Schenk,R.K. (1988). Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight bearing regions in articular cartilage: A stereological analysis of medial femoral condylus in young adult rabbits. Anat. Rec. 222, 217-227.
- Frisbie,D.D., Cross,M.W., and McIlwraith,C.W. (2006). A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. Vet. Comp Orthop Traumatol. 19, 142-146.
- Gannon,J.M., Walker,G., Fischer,M., Carpenter,R., Thompson,R.C., and Oegema,T.R. (1991). Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. J. Orthop. Res. 9, 485-494.
- Ghadially,F.N. (1983a). Articular cartilage. In Fine structure of synovial joints. A text and atlas of the ultrastructure of normal and pathological articular tissues, F.N.Ghadially, ed. (Butterworths: London), pp. 42-79.
- Ghadially,F.N. (1983b). The articular surface. In Fine structure of synovial joints. A text and atlas of the ultrastructure of normal and pathological articular tissues, F.N.Ghadially, ed. (Butterworths: London), pp. 80-102.
- Hamerman,D. and Schubert,M. (1962). Diarthrodial joints, an essay. Am. J. Med. 33, 555-590.
- Hunziker,E.B., Herrmann,W., and Schenk,R.K. (1982). Improved cartilage fixation by ruthenium hexamine trichloride (RHT). A prerequisite for morphometry in growth cartilage. J. Ultrastruct. Res. 81, 1-12.
- Jadin,K.D., Wong,B.L., Bae,W.C., Li,K.W., Williamson,A.K., Schumacher,B.L., Price,J.H., and Sah,R.L. (2005). Depth-varying Density and Organization of Chondrocytes in Immature and Mature Bovine Articular Cartilage Assessed by 3-D Imaging and Analysis. J. Histochem. Cytochem. 53, 1109-1119.
- Jeffery,A.K., Blunn,G.W., Archer,C.W., and Bentley,G. (1991). Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. J. Bone Joint Surg. Br. 73, 795-801.
- Langelier,E., Suetterlin,R., Hoemann,C.D., Aebi,U., and Buschmann,M.D. (2000). The Chondrocyte Cytoskeleton in mature articular cartilage: Structure and Distribution of Actin,

- Tubulin, and Vimentin Filaments. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1307-1320.
- Meachim,G., Ghadially,F.N., and Collins,D.H. (1965). Regressive changes in the superficial layer of human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 24, 23-30.
- Mendler,M., Eich-Bender,S.G., Vaughan,L., Winterhalter,K.H., and Bruckner,P. (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J. Cell Biol.* 108, 191-197.
- Minns,R.J. and Steven,F.S. (1977). The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J. Anat.* 123, 437-457.
- Nürnbergger,S., Tichy,B., Jagersberger,T., Vecsei,V., and Marlovits,S. (2006a). Histological Aspects of Articular Cartilage. *Osteosynthesis and Trauma Care* 14, 158-167.
- Nürnbergger,S., Vecsei,V., and Marlovits,S. (2006b). Ultrastructural Insights into the World of Cartilage - Electron Microscopy of articular cartilage. *Osteosynthesis and Trauma Care* 14, 168-180.
- Poole,C.A. (1997). Articular cartilage chondrons: Form, function and failure. *J. Anat.* 191 (Pt 1), 1-13.
- Poole,C.A., Zhang,Z.J., and Ross,J.M. (2001). The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J. Anat.* 199, 393-405.
- Scherft,J.P. and Daems,W.T. (1967). Single cilia in chondrocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 19, 546-555.
- Schwab,W., Hempel,U., Funk,R.H., and Kasper,M. (1999). Ultrastructural identification of caveolae and immunocytochemical as well as biochemical detection of caveolin in chondrocytes. *Histochem. J.* 31, 315-320.
- Stockwell,R.A. (1978). Chondrocytes. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 12, 7-13.
- Stockwell,R.A. (1979). Chondrocyte structure. In *Biology of cartilage cells*, R.A.Stockwell, ed. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 7-31.
- Stoltz,J.F., Dumas,D., Wang,X., Payan,E., Mainard,D., Paulus,F., Maurice,G., Netter,P., and Muller,S. (2000). Influence of mechanical forces on cells and tissues. *Biorheology* 37, 3-14.
- Swann,D.A., Slayter,H.S., and Silver,F.H. (1981). The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 256, 5921-5925.
- Todd,A.R., Robertson,C.M., Harwood,F.L., Sasho,T., Williams,S.K., Pomerleau,A.C., and Amiel,D. (2004). Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: Analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 917-923.
- Van Mow,C., Fithian,D.C., and Kelly,M.A. (1990). Fundamentals of Articular Cartilage and Meniscus Biomechanics. In *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*, J.W.Ewing, ed. (New York: Raven Press), pp. 1-18.
- Wilsman,N.J., Farnum,C.E., and Reed-Aksamit,D.K. (1981). Caveolar system of the articular chondrocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 74, 1-10.

LEBENS LAUF

Name Thomas Prieler

wohnhaft in 2351 Wiener Neudorf, Laxenbugerstraße 29/10

23. Dezember 1972 geboren in Wien

1979 – 1983 Volksschule in 1100 Wien, Laabergstraße 170

1983 – 1991 Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium Picherlmayergasse 1,
A-1100 Wien

07. Juni 1991 Absolvierung der Reifeprüfung

WS 1991 Immatrikulation an der Universität Wien
Inskription des Studiums Geschichte/Politikwissenschaft

SS 1995 Inskription Biologie

WS 1998 Inskription Zoologie

seit 2004 laufend Lehrbeauftragter der Universität Wien am Institut für Publizistik

Oktober 2008 Fertigstellung der Diplomarbeit