

**Orthopädische und Sportorthopädische Klinik und
Poliklinik der
Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

Abteilung für Sportorthopädie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff)

**Matrixproteine im tissue engineeren
Meniskus**

Verena Conrades

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. V. Martinek
2. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Die Dissertation wurde am 16.11.2006 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für
Medizin am 21.03.2007 angenommen.

meiner Familie

in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
2	GRUNDLAGEN	10
2.1	ANATOMIE DES MENISKUS	10
2.1.1	Medialer Meniskus	11
2.1.2	Lateraler Meniskus	11
2.1.3	Gefäßversorgung der Meniski	12
2.1.4	Innervation der Meniski	13
2.2	MIKROSTRUKTUR DES MENISKUS	13
2.2.1	Kollagene	13
2.2.2	Proteoglykane und Glykosaminoglykane	15
2.2.3	Matrixglykoproteine	17
2.2.4	Elastin	18
2.2.5	Meniskuszellen	18
2.2.6	Wasser	18
2.3	FUNKTION DES MENISKUS	18
2.3.1	Kraftübertragung	19
2.3.2	Zugfestigkeit	19
2.3.3	Stoßdämpfung	19
2.3.4	Kongruenz und Gelenkstabilität	19
2.3.5	Verbesserung der Gleiteigenschaften	19
2.4	ENTWICKLUNG UND PHYSIOLOGISCHE DEGENERATION DES MENISKUS	20
3	MATERIAL/METHODEN	21
3.1	VERSUCHSANORDNUNG (STUDIENDESIGN)	21
3.1.1	Versuchstiere	22
3.1.2	Biopsie zur Gewinnung von autologen Fibrochondrozyten	23
3.1.3	Isolierung und Kultivierung der autologen Fibrochondrozyten	23
3.1.4	Besiedelung des Scaffolds mit autologen Fibrochondrozyten	24
3.1.5	Implantation des Kollagenscaffolds	24
3.1.6	Explantation des Kollagenscaffolds	25
3.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	26
3.2.1	Makroskopische Untersuchung	26
3.2.2	Histologische Untersuchung	27
3.2.2.1	Standardfärbungen	27
3.2.2.2	Immunhistochemie	27
3.2.2.2.1	Allgemeine Erläuterungen zur Arbeit in der Immunhistochemie	27
3.2.2.2.2	Darstellung des Kollagen Typ II	28
3.2.2.2.3	Darstellung des Kollagen Typ I	28
3.2.2.2.4	Darstellung von Makrophagen	29
3.2.3	Biochemische Analytik	29
3.2.3.1	Quantitative Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes	29
3.2.3.1.1	Etablierung der Methode zur Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes	30
3.2.3.1.2	Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes im explantierten Kollagenscaffold	32
3.2.3.1.3	Durchschnittlicher Gehalt löslichen Kollagens im Schafsmeniskus	32
3.2.3.2	Bestimmung des löslichen Anteils an Kollagen Typ II	32
3.2.3.2.1	Etablierung der Methode zur Bestimmung des löslichen Gehaltes an Kollagen Typ II	32
3.2.3.2.2	Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes im explantierten Kollagenscaffold	33
3.2.3.3	Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes	33
3.2.3.3.1	Etablierung der Messmethode zur Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes	33
3.2.3.3.2	Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes im explantierten Kollagenscaffold	34
3.2.3.3.3	Durchschnittlicher Glykosaminoglykangehalt im Schafsmeniskus	34
3.2.3.4	Ermittlung des Wassergehaltes	34
3.2.3.5	Bestimmung der Zellaktivität	34
3.2.4	Biomechanischer Druck- Relaxationsversuch	35
3.3	DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK	36

4	ERGEBNISSE	37
4.1	VORARBEITEN ZUR ZELLKULTIVIERUNG	37
4.2	TIERE	37
4.3	KLINISCHE UNTERSUCHUNG	37
4.4	MAKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG	38
4.5	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	39
4.5.1	Standardfärbungen	39
4.5.2	Immunhistochemie	41
4.6	BIOCHEMISCHE ANALYTIK	45
4.6.1	Gesamtkollagengehalt	46
4.6.2	Kollagen Typ II- Gehalt	48
4.6.3	Glykosaminoglykangehalt	49
4.6.4	Wassergehalt	50
4.6.5	Sulfat uptake- Versuch	52
4.7	BIOMECHANIK	53
5	DISKUSSION	54
5.1	LITERATURÜBERBLICK ZUM THEMA DES MENISKUSERSATZES	54
5.1.1	Autografts als Meniskusersatz	55
5.1.2	Allografts als Meniskusersatz	56
5.1.3	Scaffolds als Meniskusersatz	58
5.1.4	Beurteilung der aktuellen Möglichkeiten im Meniskusersatz	60
5.1.5	Anforderungen an einen Meniskusersatz	60
5.1.6	Tissue Engineering des Meniskus	61
5.2	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	66
5.2.1	Studiendesign	66
5.2.2	Schafe als Versuchstiere in der Kniegelenksforschung	67
5.2.3	Entlastung bei Schafen	68
5.2.4	Anwendung am medialen Meniskus	68
5.2.5	Operationstechnik zur Implantation des Scaffolds	69
5.2.6	Makroskopische Beurteilung der Explantate	69
5.2.7	Bedeutung der Fibrochondrozyten	70
5.2.8	Histologische Auswertung	71
5.2.9	Immunhistochemische Auswertung	71
5.2.10	Analytische Auswertungen	73
5.2.10.1	Gesamtkollagengehalt im Explantat	73
5.2.10.2	Gehalt von Kollagen Typ II	75
5.2.10.3	Glykosaminoglykangehalt im Explantat	75
5.2.10.4	Wassergehalt in den Explantaten	77
5.2.10.5	Sulphat uptake-Versuch	77
5.2.11	Biomechanik	77
5.2.12	Aufbewahrung von Materialien	78
6	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	79
7	ZUSAMMENFASSUNG	86
8	ANHANG	88
8.1	IMMUNHISTOCHEMISCHES FÄRBEPROTOKOLL FÜR KOLLAGEN TYP II MIT DER KONZENTRATION 1:10	88
8.2	BESTIMMUNG DES GESAMTGEHALTES AN LÖSLICHEM KOLLAGEN	90
8.3	PROTOKOLL KOLLAGEN ELISA	95
8.4	BESTIMMUNG DES GLYKOSAMINOGLYKANGEHALTES	98
9	LITERATURVERZEICHNIS	104
10	DANKSAGUNG	122

1 Einleitung

Die Meniski sind halbmondförmige Faserknorpelscheiben, die zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau liegen. Ihr Name leitet sich von dem griechischen Wort „*meniskos*“ ab und bedeutet: „Halbmond“.

Die Meniski sind ein essentieller Anteil der komplexen Anatomie des Kniegelenkes und spielen vor allem in der Biomechanik eine entscheidende Rolle. Sie dienen zum Kongruenzausgleich der unterschiedlich geformten Knochen des Kniegelenkes, der Schockabsorption, der Lastenverteilung und der Verbesserung der Stabilität (Rodkey, 2000).

Am Kniegelenk sind Meniskusläsionen die häufigsten Verletzungen (Renström et Johnson, 1990). Folgen sind der Verlust der Gelenkstabilität und der Gleiteigenschaften. Die mechanischen Kräfte, die im Normalfall der Meniskus absorbiert, konzentrieren sich auf die Knorpeloberflächen von Femur und Tibia. Dies führt zu Knorpelschäden und folgend zu progressiven degenerativen Veränderungen, die in eine Gonarthrose münden (Szomor et al., 2000, Setton et al., 1999, Milachowski et al., 1989, Allen et al., 1984, Fairbank, 1984, Tapper et Hoover, 1969, Müller, 1982, Rodkey et al., 1999, Scoggin, 1998, Boyd et Myers, 2003).

Diese Erkenntnis wurde 1984 durch Fairbanks wissenschaftlich belegt, indem er degenerative Veränderungen nach Meniskektomien radiologisch nachwies.

Der Stellenwert der Meniski wurde davor jahrzehntelang verkannt, weil er nur als Füllgewebe zum Inkongruenzausgleich galt. In dieser Zeit wurde bei Verletzungen großzügig der komplette Meniskus entfernt, da man annahm, die Arthrose entstehe aus den Überresten der verletzten Meniski (Smilie, 1943).

Das Interesse der Wissenschaft am Meniskus wird einerseits genährt durch das Ziel, Patienten mit Meniskusläsion oder –verlust eine Behandlungsmöglichkeit bieten zu können. Der Meniskusersatz stellt noch immer ein ungelöstes Problem in der Orthopädie/ Traumatologie dar (Goble et al., 1999, Messner et al., 1999, Koski et al., 2000, Ibarra et al., 2000). Andererseits spielen auch volkswirtschaftliche Gründe eine bedeutende Rolle. Meniskusläsionen sind eine der häufigsten Ursachen für Fehlzeiten am Arbeitsplatz (Baker et al., 2002). Sowohl durch die häufig durchgeführten Arthroskopien als auch durch den Ersatz mit einem künstlichen Kniegelenk ist das Gesundheitssystem durch sehr hohe Kosten belastet (Rodkey et al., 1999).

Zum besseren Verständnis für die häufige Traumatisierung wurden Studien durchgeführt, die Risikofaktoren und Ursachen aufzeigen sollten.

Baker et al. führten 2002 eine Studie durch, in der sie mögliche Risikofaktoren und Ursachen für die Entstehung von Meniskusläsionen aufdeckten. Sie untersuchten 243 Männer und Frauen zwischen 20 und 59 Jahren, bei denen arthroskopisch eine Meniskusläsion bestätigt wurde hinsichtlich Größe, Gewicht, Body Mass Index (BMI), Rauchen, Alkohol, Sport und berufliche Tätigkeit. Bei traumatisch bedingten Läsionen standen die Sportarten Fußball und Rugby im Vordergrund. Degenerative Meniskusläsionen standen in Zusammenhang mit knieenden Tätigkeiten und Adipositas.

Traumatisch bedingte Verletzungen treten vor allem bei jungen sportlichen Menschen auf, wohingegen bei älteren Personen die degenerativen Veränderungen dominieren (Ibarra et al., 2000).

Drosos et Pozo (2004) stellten fest, dass mit zwei Drittel die degenerativ bedingten Meniskusverletzungen deutlich überwiegen.

Verfolgt man die Entwicklung in den letzten 20 Jahren, erkennt man eine allgemein steigende Tendenz bei Meniskusläsionen und eine Zunahme von jungen Patienten (Veltri et al., 1994, Stone, 1999).

Bei Jugendlichen machten Oepen et Jaramillo (2003) die zunehmende Entwicklung von Leistungs- und Wettkampfsport verantwortlich. Bei jungen Erwachsenen stellt sich das Missverhältnis aus sportlichem Training und sportlichem Einsatz als großes Problem dar. So stehen viele der aktiven Sportler bereits voll im Berufsleben und finden keine Zeit, sich adäquat auf die gewünschte Sportart vorzubereiten, wie sie es während der Ausbildung oder dem Studium gewohnt waren. Die Folgen sind Abbau der Muskulatur, reduzierte körperliche Belastbarkeit und eine Verschlechterung der koordinativen Fähigkeiten. Spring et al. (1997) bezeichnen diesen Zustand als Konditionsmangel-syndrom. Eine herabgesetzte körperliche Leistungsfähigkeit vermindert die Belastbarkeit. Bereits geringe sportliche Aktivitäten führen zu einer Überlastungssymptomatik, die zu Schonung und Ruhigstellung führt. Diese Umstände begünstigen eine Verletzung, vor allem im Hinblick auf die Uneinsichtigkeit, das sportliche Niveau an die neue Situation anzupassen.

Diese These wird durch die Studie von Bergstrom et al. (2001) bestätigt, die in einer Ski-Highschool zeigen konnten, daß bei sportartspezifischer Trainingsvorbereitung und präventiver Physiotherapie eine signifikante Reduktion der Beschwerden

erreicht werden konnte und somit das Verletzungsrisiko von 73% auf 35% gesunken ist.

Die häufigsten Verletzungsarten am Meniskus sind Längsrisse, die in einen Korbhenkelriss münden können, Querrisse sowie horizontale Risse. Insgesamt ist der mediale Meniskus aufgrund seiner Fixierung mit dem Innenband und der Kapsel öfter betroffen als der laterale Meniskus (Hough et Webber, 1990).

Man teilt den Meniskus in eine vaskuläre, eine Intermediärzone und eine avaskuläre Zone ein. Der vaskularisierte Anteil besitzt eine Regenerationspotenz (Veth et al., 1986, Klompmaker et al., 1991). Liegt die Läsion im avaskulären Anteil, ist die Chance einer Selbstheilung des Meniskus gering (Webber et al., 1986, Hough et Webber, 1990, Veltri et al., 1994, Arnoczky et al., 1988, Setton et al., 1999, Martinek et al., 2000, Tienen et al., 2003).

Die Behandlungsmöglichkeiten bei Meniskusläsionen sind limitiert. Die derzeitige Standardbehandlung bei Meniskusläsionen ist die arthroskopische Teilmeniskektomie, die zu den häufigsten Operationen in der Orthopädie/Traumatologie gehört (Webber et al., 1986, Arnoczky et al., 1988, Kohn, 1994, Koski et al., 2000, Ibarra et al., 2000, DeHaven, 1990, Milachowski et al., 1994, Stone et al., 1999). Je nach Lokalisation können auch die Meniskusnaht und die Meniskusrefixation durchgeführt werden (Seil et Kohn, 2001). Durch die Einführung der minimal invasiven Chirurgie und Verbesserung der Operationstechniken wurden diese Behandlungsmöglichkeiten optimiert.

Ungelöst bleibt bis zum heutigen Zeitpunkt das Problem bei komplettem Meniskusverlust oder bei größeren Verletzungen, bei denen oben genannte Methoden nicht mehr durchführbar sind. Älteren Patienten kann man in diesem Stadium eine Knie totalprothese anbieten. Für jüngere Patienten existieren keine effizienten Behandlungsmöglichkeiten.

Seit Jahrzehnten wird auf diesem Gebiet intensiv geforscht. Die Herausforderung bei der Entwicklung eines Meniskusersatzes besteht in der Wiederherstellung aller meniskalen Eigenschaften, um dessen knorpelprotektive Funktion zu erhalten.

Im Test waren Kadavermeniski, sogenannte Allografts, die anstelle des fehlenden Meniskus implantiert wurden. Verschiedene körpereigene Gewebe, auch Autografts genannt, wie zum Beispiel Fett (Kohn et al., 1997), Sehnen (Kohn et al., 1992), Fibringerinnsel (Arnoczky et al., 1988), perichondrales Gewebe (Bruns et al., 1998) und intestinale Submukosa (Cook et al., 2001) wurden als Testmaterial versetzt. Auch synthetische Substanzen wurden getestet.

Doch hat es bis jetzt keine dieser Therapieoptionen geschafft, die physiologischen Eigenschaften des Meniskus wieder so herzustellen, dass nicht nach einigen Jahren Beschwerden wegen Knorpelabnutzung und Bewegungseinschränkung entstehen.

Als einziges Produkt dieser Ersatzmaterialien ist das Collagen Meniscus Implant (CMI) in die klinische Phase übergetreten und stellt derzeit die einzige Behandlungsmethode dar, die auch für den Menschen in Frage kommt (Stone et al., 1992, Stone et al., 1997, Rodkey et al., 1999). Das CMI ist eine resorbierbare Kollagenmatrix aus Typ I Kollagen, das aus Rinderachillessehnen gewonnen wird. Durch Einwachsen von körpereigenen Zellen in dieses Gerüst soll ein Meniskusregenerat induziert werden (Stone et al., 1992, Rodkey et al., 1999).

Klinisch zeigt sich eine kurzzeitige Beschwerdeverbesserung. In histologischen Kontrollen wurde ein kollagenreiches Narbengewebe nachgewiesen, dessen Oberflächenstrukturen und biomechanische Eigenschaften nicht mit einem meniskalen Gewebe zu vergleichen sind. Über Langzeitergebnisse dieses Verfahrens liegen derzeit noch keine Daten vor.

Ein derzeit aktueller Bereich der Forschung im Hinblick auf Gewebe mit geringer Heilungspotenz stellt das Tissue Engineering dar (Arnoczky, 1999, Martinek et al., 1999, Ibarra et al., 2000, Pelinkovic et al., 2000). Das Ziel dieser neuen Technik ist die Entwicklung von biologischen Ersatzmaterialien zur Reparatur, Rekonstruktion, Regeneration oder zum Ersatz von biologischem Gewebe. Ibarra war einer der Ersten, die das Tissue Engineering am Meniskus als eine mögliche neue Behandlungsoption erkannten (Ibarra et al., 1997, Setton et al., 1999, Messner et al., 1999).

Die steigende Nachfrage nach einem suffizientem Meniskusersatzmaterial und die vielversprechenden Ergebnisse der Implantation des CMI und dem Tissue Engineering am Meniskus haben zur Entstehung der vorliegenden Studie beigetragen.

Durch die Kombination aus der Implantation eines Scaffolds und der neuen Technik des Tissue Engineerings soll herausgefunden werden, ob dies eine neue Option für einen Meniskusersatz darstellen könnte.

Die Idee bestand darin, das Scaffold im Vorfeld mit autologen Meniskuszellen zu besiedeln, dieses Konstrukt für kurze Zeit in Kultur zu halten, um den Zellen die Möglichkeit zur Adhäsion zu geben und sie dann in die Versuchstiere zu implantieren. Nach einem bestimmten Beobachtungszeitraum sollten die Konstrukte explantiert und histologisch, biochemisch und biomechanisch

quantifiziert werden und mit physiologischen Meniskugewebe sowie mit einem unbehandelten Scaffold verglichen werden.

Bei dem Design der Studie sollten möglichst viele Parameter berücksichtigt werden, die von vorangegangenen Studien als Verbesserungen postuliert wurden und uns als besonders wichtig erschienen. So wurde als Versuchstier das Schaf gewählt, das der menschlichen Anatomie mehr ähnelt als die gängigen Versuchstiere Maus oder Kaninchen. Die Fallzahl wurde mit 39 Tieren bewußt hoch gewählt, um möglichst viele Vergleichswerte zur Verfügung zu haben. Die Dauer der Studie wurde auf ein halbes Jahr angelegt, um die Tendenz für eine Langzeittherapieoption absehen zu können. Desweiteren wurde bei der Auswertung der Explantate besonderer Wert auf die analytischen Messungen gelegt. Die prozentuale Zusammensetzung der Matrixproteine sollte möglichst genau analysiert werden, um Rückschlüsse und Vergleiche zu physiologischem Meniskugewebe zulassen zu können.

Durch den komplexen Aufbau dieser Studie und den damit verbundenen sehr aufwändigen Vorversuchen und Evaluationen von Versuchsdurchführungen wurde die Studie in zwei Dissertationen geteilt. Teil 1: „Tissue Engineering des Meniskus. In vivo Untersuchungen von zellbesiedelten Kollagenmatrizes am Schafmodell“ wurde von Stephan Nitschke bearbeitet.

Teil 2 beschäftigt sich vor allem mit der Auswertung der explantierten Konstrukte und wurde mit dem Titel „Matrixproteine des tissue engineernten Meniskus“ in der vorliegenden Dissertation bearbeitet.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Ist Tissue Engineering am Meniskus in vivo möglich?
2. Bringt die gezielte Besiedelung eines Scaffolds mit autologen Zellen einen höheren Gehalt an Matrixproteinen als in einem Vergleichsscaffold ohne Zellbesiedelung?
3. Wird durch die Besiedelung von Scaffolds eine bessere Verteilung von Kollagenfasern erreicht?
4. Ist Tissue Engineering am Meniskus eine neue Option in der Behandlung bei Meniskusverlust?

2 Grundlagen

Um die Funktion des Meniskus gänzlich zu verstehen, muss man seine komplexe Anatomie und Zusammensetzung und deren Abweichungen kennen (Fithian et al., 1990).

Die Meniski sind zwei halbmondförmige, fibrocartilaginäre Scheiben, die zwischen Femur und Tibia liegen (Renström et Johnson, 1990, McDevitt et Webber, 1990, Almarza et Athanasiou, 2004). Ihnen werden überaus wichtige biomechanische Funktionen im Kniegelenk zuteil, zu denen die Kraftübertragung, die Stoßdämpfung, die Kongruenz, die Verbesserung der Gleiteigenschaften und die Gelenkstabilität zählen (Bullough et al., 1970, Krause et al., 1976, Adams et Muir, 1981, Renström et Johnson, 1990, Fithian et al., 1990, DeHaven, 1990, Veltri et al., 1994, Müller, 1994, Kohn, 1994, Kuhn et Wojity, 1996, Setton et al., 1999, Mueller et al., 1999, Rodkey et al., 1999, Rodeo, 2001).

Seine biomechanischen Eigenschaften kann der Meniskus nur durch seinen biochemischen Aufbau, seine typische Struktur und seine Befestigung ausüben. Die Eigenschaften des Meniskus werden durch die Zusammensetzung des Gewebes und durch die Organisation und Interaktion der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix, Wasser, Proteoglykane und Kollagen bestimmt (Fithian et al., 1990).

Biochemisch betrachtet unterscheidet sich der Meniskus sehr stark von hyalinem Knorpel, mit dem er oft verglichen wird (Cheung, 1987, Almarza et Athanasiou, 2004).

2.1 Anatomie des Meniskus

Der Meniskus wird in zirkulärer Richtung in eine anteriore, zentrale und posteriore Zone unterteilt und in radiärer Richtung in ein inneres, mittleres und äußeres Drittel (Almarza et Athanasiou, 2004). Desweiteren erfolgt eine Einteilung in eine superfizielle Schicht, die den Kontakt zum Femur herstellt, eine tiefe Schicht, die den Kontakt zur Tibia gewährleistet und eine mittlere Schicht, die sandwichartig zwischen diesen beiden Schichten liegt (Almarza et Athanasiou, 2004).

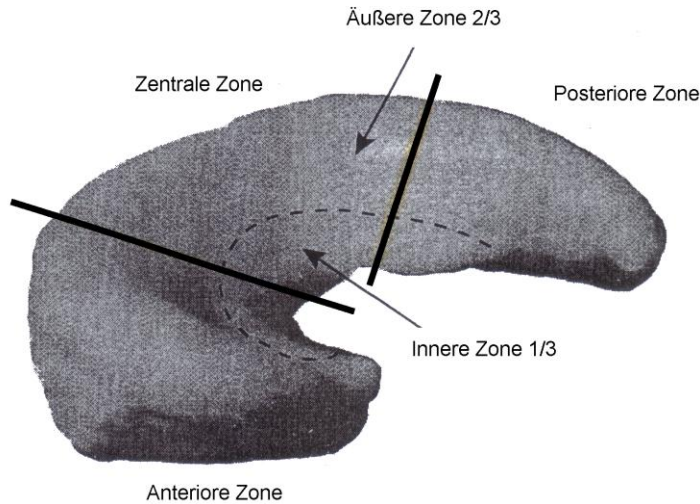


Abb. 2.1: Einteilung der Vaskularisationszonen des Meniskus

2.1.1 Medialer Meniskus

Der mediale Meniskus ist C-förmig und circa 3,5 cm lang. Die Vorder- und Hinterhörner haben Kontakt zur Gelenkfläche. Das Vorderhorn ist an der anterioren Oberfläche des Tibiaplateaus, das Hinterhorn an der posterioren Oberfläche des Tibiaplateaus befestigt, kurz vor der Insertion des hinteren Kreuzbandes. Die anterioren Fasern des vorderen Kreuzbandes verschmelzen mit dem Ligamentum transversum, das die Vorderhörner der Meniski verbindet. Die periphere Seite des medialen Meniskus ist gänzlich mit der Gelenkkapsel verbunden, das heißt er ist stark fixiert und in seiner Beweglichkeit weit mehr eingeschränkt als der laterale Meniskus. Durch eine Kondensation der Gelenkkapsel in der Mitte des medialen Meniskus, die bekannt ist als tiefes mediales Ligament, ist der Meniskus mit dem Femur und der Tibia verbunden (Arnoczky, 1987). Der mediale Meniskus ist anteilig mit dem Ligamentum collaterale mediale verbunden. Es besteht kein direkter muskulärer Kontakt, indirekt hat er über die Gelenkkapsel Kontakt zum M. semimembranosus, der eine Retraktion des Hinterhorns initiiert (Renström et Johnson, 1990). Er arbeitet als Synergist des vorderen Kreuzbandes und stabilisiert das Gelenk (Kohn, 1994, Milachowski et al., 1994).

2.1.2 Lateraler Meniskus

Der laterale Meniskus besitzt die Form eines 5/6 Kreises, der die Peripherie weit mehr umschließt als der mediale Meniskus (Müller, 1994). Das Vorder- und Hinterhorn haben im Gegensatz zum medialen Meniskus keinen Kontakt zur tibialen Gelenkfläche. Das Vorderhorn des lateralen Meniskus strahlt in den Ansatz des vorderen Kreuzbandes ein, das Hinterhorn ist knapp hinter der

Eminentia intercondylaris befestigt. Es strahlen Anteile des lateralen Meniskus in das vordere Kreuzband ein. Es besteht keine Verbindung zum Ligamentum collaterale laterale. Kapsulär ist der laterale Meniskus inferior und posterior durch die Sehne des M. popliteus unterbrochen (Renström et Johnson, 1990). Sowohl die straffe Befestigung des Ligamentum arcuatum zum lateralen Meniskus, als auch die Verbindung der Popliteussehne zum lateralen Meniskus und dem Ligamentum arcuatum gewährleisten eine dynamische Retraktion des lateralen Meniskus während der Anfangsrotation aus maximal gestrecktem Kniegelenk (Renström et Johnson, 1990).

Der laterale Meniskus ist beweglicher als der mediale: das Bewegungsausmaß in anteroposteriorer Richtung liegt bei 11,8 cm, das des medialen bei 0,5 cm (Müller, 1994) und trägt zur femorotibialen Lastübertragung bei (Kohn, 1994).

Die variabel angelegten meniskofemorale Bänder Wrisberg und Humphrey verlaufen vom Hinterhorn des lateralen Meniskus zur lateralen Fläche der medialen Femurkondyle (Renström et Johnson, 1990).

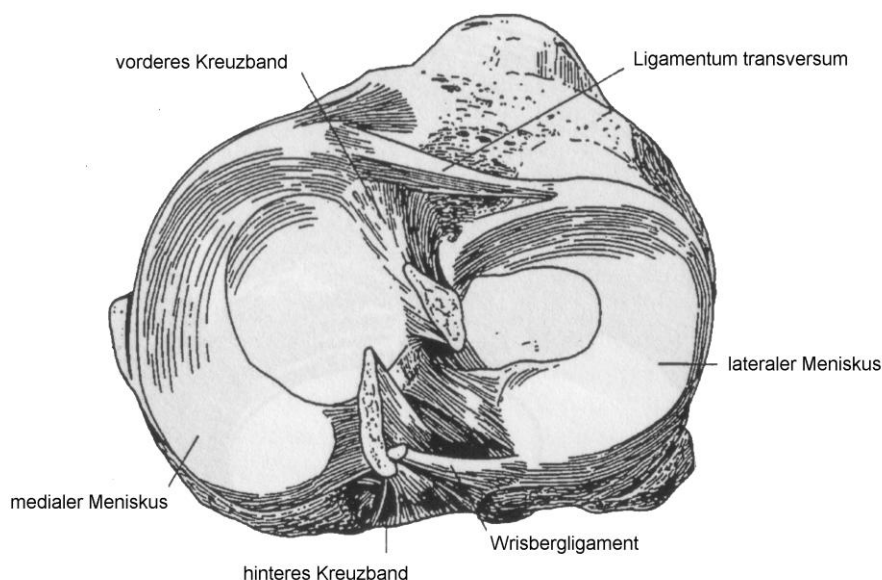


Abb. 2.2: Aufsicht auf das Kniegelenk von kranial

2.1.3 Gefäßversorgung der Meniski

Die Gefäßversorgung der Meniski wird von den Arteriae genicularis lateral inferior et superior und den Arteriae genicularis medial inferior et superior gewährleistet. Diese Gefäße geben Äste ab, die den perimeniskalen Kapillarplexus innerhalb der Synovia und der Kapsel bilden. Nur die peripheren

Bereiche der Meniski werden direkt versorgt. Die zentralen Anteile der Meniski werden über Diffusion ernährt (Renström et Johnson, 1990, McDevitt et Webber, 1990). Wie in anatomischen Studien gezeigt werden konnte, liegt der vaskularisierte Anteil erwachsener Meniski zwischen 10 und 30 % (McDevitt et Webber, 1990). Mit zunehmendem Alter nimmt der Anteil der Gefäßversorgung ab (Arnoczky et Warren, 1983).

2.1.4 Innervation der Meniski

In humanen Meniski sind die Vorder- und Hinterhörner deutlich stärker innerviert als die medialen Anteile. Die zentralen Drittel sind nicht innerviert. Die Nervenendigungen haben sensorische Funktion und können somit zur propriozeptiven Wahrnehmung der Gelenkstellung beitragen. (Arnoczky, 1987, Rodkey et al., 1999).

2.2 Mikrostruktur des Meniskus

Die extrazelluläre Matrix des Meniskus ist charakterisiert durch einen niedrigen Anteil an Zellen, die von reichlich perizellulärer Matrix umgeben sind. Sie setzt sich aus den Makromolekülen Kollagen, Proteoglykan, Matrix-Glykoprotein und Elastin zusammen (McDevitt et Webber, 1990).

2.2.1 Kollagene

Das Kollagen ist das Protein der extrazellulären Matrix, das den Hauptbestandteil des Meniskus ausmacht. Es verleiht ihm seine typische Struktur und seine Zugeigenschaft (McDevitt et Webber, 1990, Almarza et Athanasiou, 2004).

Es sind derzeit 19 verschiedene Kollagentypen bekannt (Prockop et al., 1995). Für den Meniskus relevant sind die Typen I, II, III, V und VI. Charakteristisches Merkmal aller Kollagentypen ist die Zusammensetzung aus drei Polypeptidketten, die immer die gleiche Tripeptid-Sequenz besitzen. Die Polypeptidketten sind in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden. Die Aminosäuren des Kollagens sind meist Glycin, Prolin und Hydroxyprolin. Als kleinste proteinogene Aminosäure bildet Glycin das Zentrum des dreisträngigen Kollagenmoleküls. Da das Stickstoffatom von Prolin in einem Ring fixiert ist, schränkt es die Rotation der Peptidkette ein. Das Hydroxyprolin verstärkt die Drehung zusätzlich. Aus dieser Fixierung resultiert die hohe Zugfestigkeit des Kollagens.

Die Synthese des Kollagens läuft in mehreren Stufen ab. Im Fibroblasten findet die Bildung des Präprokollagens statt, aus dem durch Abspaltung des Signalpeptids das Prokollagen entsteht. Am C-terminalen Ende des Prokollagens beginnt die Tripelhelixbildung, die nach Hydroxylierung und Glykosylierung zur vollständigen Ausbildung der Tripelhelix führt. Anschließend erfolgt die Sekretion in die extrazelluläre Matrix, in der das Prokollagen durch Matrixmetalloproteinasen abgespalten wird und das Kollagen entsteht. Die sezernierten Kollagenmoleküle lagern sich parallel zu Mikrofibrillen zusammen, was wiederum zu einer Erhöhung der Stabilität führt. Stabilisiert werden die Mikrofibrillen durch das Ausbilden von kovalenten Bindungen von drei Tripelhelices, das zur Quervernetzung, sogenannten Cross-Links, führt. Durch diese Quervernetzung bilden sich in Salz unlösliche Kollagenfibrillen. Durch Zunahme des Durchmessers reifen die Kollagenfibrillen zu Kollagenen, die ab diesem Zeitpunkt unlöslich sind. Nur in der Fibrillogenese sind alle Anteile des Kollagens löslich (Scott, 1986). Der Abbau erfolgt über spezifische Kollagenasen, den sogenannten Matrixmetalloproteinasen, die von Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert werden (Petrides, 1998, Alberts, 1983, Renström et Johnson, 1990, Prockop et al., 1995).

Die Kollagenfasern im Meniskus sind überwiegend zirkulär angeordnet (Bullough et al., 1970, Oretorp et Risberg, 1978, Aspden et al., 1985, McDevitt et Webber, 1990, Almarza et Athanasiou, 2004). Durch diese Anordnung ergibt sich die Zugfestigkeit gegenüber Belastungen, die vom Femur auf die Meniski übertragen werden. Sie wirken so der Elongation entgegen (Krause et al., 1976, Kummer, 1994, Setton et al., 1999).

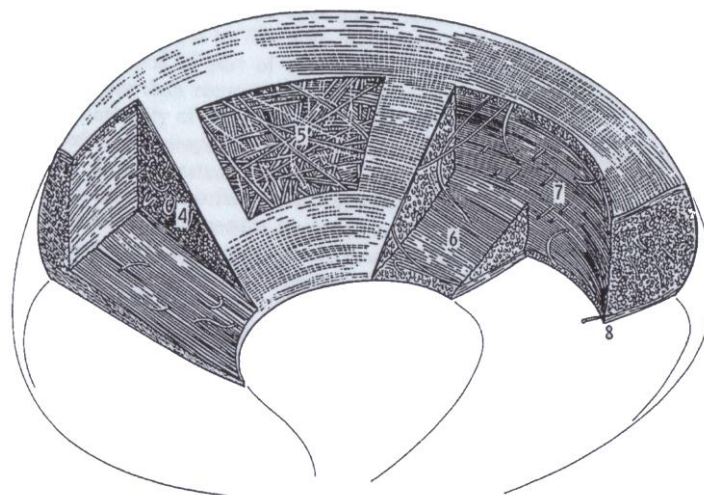


Abb. 2.3: Anordnung der Kollagenfasern im Meniskus

In der superfizialen und mittleren Zone bilden die Kollagenfasern ein Netzwerk aus zufällig angeordneten Fasern. Die radiär angeordneten Kollagenfasern, die im anterioren und posterioren Bereich der mittleren Zone überwiegen, stellen die strukturelle Steifheit her, die dem Auftreten von longitudinalen Rissen vorbeugen, die unter Kompression vom Femur auf die Meniski entstehen können (Renström et Johnson, 1990).

Das Kollagen ist mit einem Anteil von 60 bis 80% des Trockengewichts das am stärksten vertretene Matrixmolekül im Meniskus (Ingman et al., 1974, Somer et Somer, 1983, Gosh et Taylor, 1987, Cheung, 1987, McDevitt et Webber, 1990, Setton et al., 1999, Arnoczky, 1999, Almarza et Athanasiou, 2004).

Cheung (1987) stellte fest, dass der Kollagengehalt im Trockengewicht im inneren Drittel mit 70% geringer ist als im äußeren Drittel mit 80%, Nakano et al. (1997) bestätigten diese Erkenntnis. Der häufigste Kollagentyp ist der Typ I mit über 80% des gesamten Kollagengehaltes (Eyre et Wu, 1983, Cheung, 1987, Renström et Johnson, 1990, Fithian et al., 1990, Almarza et Athanasiou, 2004). Desweiteren werden die Typen II, III und V beobachtet (Eyre et Wu, 1983, Cheung, 1987). Interessanterweise wurde der Typ II fast ausschließlich im inneren avaskulären Drittel beobachtet, und zwar mit einem Anteil von 60% (Cheung, 1987, McDevitt et Webber, 1990). In den äußeren zwei Dritteln dominiert das Kollagen Typ I (Cheung, 1987, Almarza et Athanasiou, 2004).

2.2.2 Proteoglykane und Glykosaminoglykane

Proteoglykane sind große Moleküle mit einem relativ einfach gebauten Proteingerüst, dem Core-Protein, an das lange lineare Kohlenhydratketten (=Heteroglykanketten oder Glykosaminoglykane) geheftet sind. Das Core-Protein bildet den Schlüssel zur Klassifizierung der Proteoglykane (Hascall, 1986, Almarza et Athanasiou, 2004). Sie werden eingeteilt in große und kleine Proteoglykane. Im Meniskus kommen Biglykan und Decorin vor (Nakano et al., 1997, Almarza et Athanasiou, 2004). Die Glykosaminoglykane bilden die strukturellen Seitenketten der Proteoglykane.

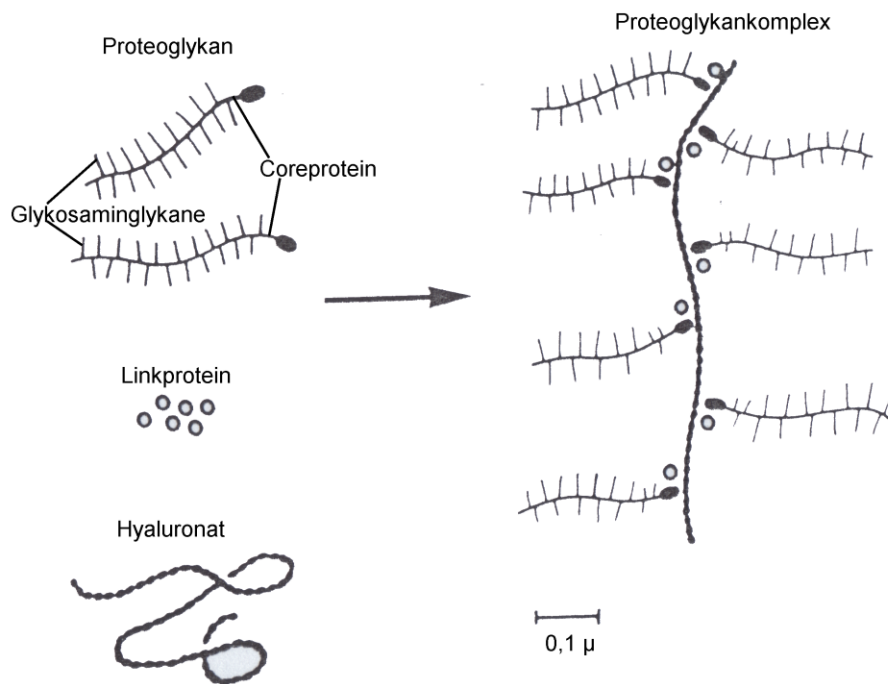


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Proteoglykanstruktur

Proteoglykane bestehen zu 80–94% aus Glykosaminoglykanen und zu 6 bis 20% aus Proteinen. Die Eigenschaften der Proteoglykane werden vor allem durch den Aufbau der Glykosaminoglykane geprägt und werden weiter unten beschrieben (Petrides, 1998). Proteoglykane haben Verbindungen zu Kollagenfasern und fördern somit die Aggregation zu einem Kollagennetzwerk, das die Zugeigenschaften des Meniskus bestimmt (Poole et al., 1986, Scott, 1986, Hasler et al., 1999, Almarza et Athanasiou, 2004).

Der Name der Glykosaminoglykane ist durch deren biochemische Zusammensetzung entstanden. Die typischerweise vorkommenden Heteroglykane sind Aminozucker (=Glykosamine) und Monosaccharide (=Glykane). Diese tragen Sulfatreste, weshalb auch von sulphatierten Glykosaminoglykanen gesprochen wird (Hardingham, 1983). Glykosaminoglykane sind negativ geladene Polysaccharide, durch die Wassermoleküle angezogen werden (Hardingham, 1983, McDevitt et Webber, 1990). Durch diesen Hydratationseffekt steigen die Kompressionseigenschaften des Gewebes an (Kempson et al., 1973, Almarza et Athanasiou, 2004). Proteoglykane scheinen keinen Einfluss auf die Zugeigenschaften des Meniskus zu haben (Gosh et Taylor, 1987).

Die Synthese der Glykosaminoglykane erfolgt über einzelne Bausteine: Aminosäuren als Proteinbausteine, D-Glukose als Vorstufe der verwendeten Zucker sowie Enzyme, die den Zusammenbau von Glykosaminoglykanen zu Proteoglykane bis zum Einschleusen in die extrazelluläre Matrix katalysieren. Der Abbau erfolgt über das Zusammenwirken mehrerer lysosomaler Hydrolasen (Petrides, 1998).

Der Gesamtgehalt der Glykosaminoglykane im Meniskus liegt zwischen 2 und 3%, angegeben in Trockengewicht. Er variiert in Abhängigkeit der verschiedenen Zonen des Meniskus und seinen entsprechenden Eigenschaften. In der inneren Zone ist der Gehalt an Glykosaminoglykanen höher als in den äußeren Zonen (Nakano et al., 1997, Setton et al., 1999). Mit 40 bis 60% ist das Chondroitin-Sulfat das häufigste Glykosaminoglykan im humanen Meniskus (McNicol und Roughly, 1980, Herwig et al., 1984, McDevitt et Webber, 1990, Verbruggen et al., 1996, Nakano et al., 1997, Almarza et Athanasiou, 2004). Chondroitin-6-Sulfat ist mit 40% stärker vertreten als Chondroitin-4-Sulfat mit 10–20% (Herwig et al., 1984). Desweiteren findet sich im Meniskus Dermatan-Sulfat mit 20–30% und Hyaluronsäure und Keratan-Sulfat mit 15%, (Herwig et al., 1984, McDevitt et Webber, 1990, Almarza et Athanasiou, 2004). Über die Verteilung der Glykosaminoglykane im Meniskus ist derzeit noch wenig bekannt. Man nimmt an, dass auch der Glykosaminoglykangehalt von der Zoneneinteilung des Meniskus abhängig ist (Almarza et Athanasiou, 2004).

Die wichtigsten Unterschiede zwischen Meniskus und hyalinem Knorpel, mit dem der Meniskus gerne gleichgesetzt wird, liegen zum Einen an einem achtfach niedrigeren Glykosaminoglykangesamtgehalt (Adams et Muir, 1981) und zum Anderen an einem signifikanten Gehalt an Dermatan-Sulfat (McDevitt et Webber, 1990, Almarza et Athanasiou, 2004). Daraus ergibt sich eine hohe Zugfestigkeit, aber eine geringere Kompressions-eigenschaft.

Die strukturelle Integrität des Kollagennetzwerkes mit den Proteoglykanen ist für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich (Hardingham et al., 1986).

2.2.3 Matrixglykoproteine

Diese Proteine besitzen die Eigenschaft, andere Moleküle zu binden oder an Zelloberflächen zu aggregieren und werden deshalb auch als Verbindungsmoleküle bezeichnet.

Kollagen Typ VI ist ein intermolekulares Verbindungsprotein, das andere Matrixbausteine wie Kollagen, Proteoglykane oder Glykoproteine zusammenfügt.

Fibronectin ist beteiligt an Reparatur- und Regenerationsvorgängen bei verletzten Meniski (McDevitt et Webber, 1990).

Thrombospondin interagiert mit anderen Proteinen wie Fibronectin, Fibrinogen, Plasminogen, und anderen und wird als Marker für Zell-Matrix-Verbindungen in physiologischen und zerstörten Meniski verwendet (Miller et McDevitt, 1988).

2.2.4 Elastin

Elastin macht 0,6% des Trockengewichts des Meniskus aus. Es verbindet die Kollagenfasern zu einem brückenartigen Netzwerk (McDevitt et Webber, 1990).

2.2.5 Meniskuszellen

Die Zellen des Meniskus werden als Fibrochondrozyten bezeichnet, weil ihre Morphologie, Proliferation und die Eigenschaften der extrazellulären Matrix zwischen denen der Fibroblasten und der Chondrozyten liegen (Somer et Somer, 1983, Webber et al., 1985, Nakata, 2001). Der Morphotyp der Zellen ist abhängig von der Meniskuszone: in der superfizialen Zone treten sie oval und fusiform in Erscheinung, in der tiefen Zone erscheinen sie polygonal und rund. Polygonale Zellen werden den Chondrozyten zugeordnet, fusiforme Zellen den Fibroblasten. Die gemischte Zellpopularität ist dafür verantwortlich, dass der Meniskus als Faserknorpel bezeichnet wird (Ghadially et al., 1983, Webber et al., 1985, Mueller et al., 1999).

2.2.6 Wasser

Der Wassergehalt des Meniskus liegt zwischen 70% und 75% und korreliert stark mit dem Gehalt von Glykosaminoglykanen (Gosh et Taylor, 1987, McDevitt et Webber, 1990, Setton et al., 1999).

2.3 Funktion des Meniskus

Vom anatomischen fibrocartilaginären Aufbau ist der Meniskus dafür geeignet, Druck aufzunehmen und auch erheblichem Druck zu widerstehen. Sowohl die axiale Belastung mit der Verdrängung der Meniski peripherwärts auf dem Tibiaplateau, als auch die Innen- und Aussenrotation führen zum Zug in der Meniskusperipherie. Dementsprechend befindet sich dort die größte Konzentration der zirkulär angeordneten Kollagenfasern, die diesen Zugbeanspruchungen entgegenwirken.

2.3.1 Kraftübertragung

Schon 1936 postulierte King, dass die Meniski die Kraft auf das Knie übertragen. Mittlerweile wurde festgestellt, dass die Meniski zwischen 30 und 70% der Kraft, die aufs Kniegelenk ausgeübt wird, auf das Kniegelenk übertragen (Krause et al., 1976, Webber et al., 1989, Renström et Johnson, 1990). Nach totaler Meniskektomie reduziert sich die Kraftaufnahme fläche am Tibiaplateau auf 40 bis 50% (Kummer, 1994).

2.3.2 Zugfestigkeit

Die Zugfestigkeit ist auf die strukturelle Zusammensetzung der Meniski aus Kollagenen und Proteoglykanen (siehe oben) zurückzuführen (Bullough et al., 1970).

2.3.3 Stoßdämpfung

Bei Komprimierung des Kniegelenkes werden die Meniski peripherwärts verschoben und die zirkulär ausgerichteten Kollagenfasern werden gedehnt. Auf diese Weise absorbieren die Meniski Energie und reduzieren die Stoßkraft, die ansonsten der Gelenkknorpel und der subchondrale Knochen abfangen müsste (Cheung, 1987, Renström et Johnson, 1990). Die Kapazität der Stoßdämpfung wird bei einer Meniskektomie um 20% reduziert (Voloshin et Wosk, 1983).

2.3.4 Kongruenz und Gelenkstabilität

Die Meniski verbessern die Kongruenz des Kniegelenkes, indem sie den Raum zwischen Tibia und Femur, die nicht miteinander in Kontakt stehen, ausfüllen. Somit erhöhen sie die Gelenkstabilität. Die Meniski vergrößern die Kontakt-Kraft-Aufnahme zwischen Femur und Tibia um 40 bis 50% (Müller, 1994).

Die enge Verbindung des Meniskusansatzes zu den Kreuzbändern sowie zu den kapsulären Anteilen des Kniegelenkes stabilisieren das Gelenk zusätzlich (Renström et Johnson, 1990). Schon eine kleine Menge intraartikulärer Flüssigkeit ist ausreichend, um die Stabilität merklich zu stören. Diese Störung beeinträchtigt im Wesentlichen die propriozeptive Steuerung der aktiven Stabilisierung.

2.3.5 Verbesserung der Gleiteigenschaften

Die Menisken verteilen auf ihrem normalen Weg über das Tibiaplateau und die Femurrolle die wenigen Tropfen Synovial-

flüssigkeit als Schmiermittel, das gleichzeitig die Nährstoffe für die Knorpelflächen und -schichten liefert (Müller, 1994).

2.4 Entwicklung und physiologische Degeneration des Meniskus

Die Meniski erscheinen erstmals in der achten Woche der Fötusentwicklung als eine Kondensation von Mesenchymzellen innerhalb des Kniegelenkes (Somer et Somer, 1983). Zu diesem Zeitpunkt besitzt der Meniskus viele Fibroblasten und ist stark vaskularisiert. Eine extrazelluläre Matrix existiert noch nicht. In der Folge werden die Meniski kollagenreicher und erhalten allmählich ihre typische Ausrichtung (Arnoczky, 1987, McDevitt et Webber, 1990).

Die Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Meniskus während seiner Entwicklung und im Alterungsprozess ist mit den Vorgängen im Gelenkknorpel vergleichbar (Inerot et Heinegard, 1983, Gosh et Taylor, 1987, Hough et Webber, 1990): der Kollagengehalt steigt bis zum 30. Lebensjahr an, bleibt bis Anfang des 80. Lebensjahres konstant, um dann kontinuierlich abzunehmen (Gosh et al., 1975, Gosh et Taylor, 1987). Der Wassergehalt steigt mit zunehmender Degeneration an. Der Gehalt an Matrixproteinen sinkt. Der Glykosaminoglykangehalt sinkt mit einem relativen Ansteigen des Chondroitin-6-Sulfats (Herwig et al., 1984).

3 Material/Methoden

In einem großen Tiermodell wurde ein tissueengineertes Scaffold mit einem unbehandelten Scaffold verglichen.

Alle Tiere wurden dreimal operiert. Zunächst wurde eine Biopsie am linken Kniegelenk durchgeführt. Diese diente zur Gewinnung der autologen Fibrochondrozyten. In der zweiten Operation erfolgte die Einteilung in die verschiedenen Gruppen. Bei allen Tieren wurde eine mediale subtotale Meniskektomie durchgeführt, bei der eine basisnahe Randleiste belassen wurde. In der gleichen Sitzung wurde in Gruppe 1 ein tissueengineertes Scaffold implantiert, in Gruppe 2 erfolgte die Implantation eines nicht vorbehandelten Scaffolds. In Gruppe 3 wurde die Meniskektomie ohne Meniskusersatz durchgeführt. Die dritte Operation entsprach der Opferung der Tiere, bei der die Scaffolds beziehungsweise das entstandene Ersatzgewebe explantiert wurde.

3.1 Versuchsanordnung (Studiendesign)



Abb. 3.1: Biopsie an der Meniskusbasis

Biopsie

Zur Gewinnung von autologen Fibrochondrozyten wurde eine Biopsie am linken Kniegelenk der Versuchstiere durchgeführt.



Abb. 3.2: Gewinnung der Fibrochondrozyten

Isolierung der Fibrochondrozyten

Aus dem entnommenen Gewebestück wurden die Fibrochondrozyten isoliert und die Zellen vier Wochen lang kultiviert.



Abb. 3.3: Besiedelung des CMI

Besiedelung

Diese Zellen wurden in das Kollagen-Scaffold, das CMI, eingebracht und weitere zwei Wochen in Kultur gehalten.



Abb. 3.4: Implantation der Scaffolds

Implantation

Anschließend erfolgte die Implantation der besiedelten und unbesiedelten Kollagen-gerüste in die Versuchstiere.



Abb. 3.5: Explantation der Scaffolds

Explantation

Nach einem Beobachtungszeitraum von drei bis sechs Monaten wurden die Scaffolds explantiert und die im folgenden beschriebenen Versuche zur Quantifizierung der Konstrukte durchgeführt.

3.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 39 weibliche Merinoschafe, die im Mittelwert acht Jahre alt waren (Standardabweichung 1,8) und ein durchschnittliches Gewicht von 80 kg aufwiesen.

Während der gesamten Studienzeit wurden die Schafe artgerecht gehalten und regelmäßig durch einen Veterinärmediziner untersucht. Es wurden die Beweglichkeit und die Stabilität der Gelenke, die Gangart und das Verhalten der Tiere sowie die Wundheilung beurteilt.

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 umfasste eine Meniskusteilresektion und die Transplantation eines mit autologen Fibrochondrozyten besiedelten CMI (n=16), Gruppe 2 beinhaltete eine Meniskusteilresektion und die Transplantation eines nicht besiedelten CMI (n= 14), in Gruppe 3 erfolgte nur eine Teilmeniskektomie (n=9).

	Beschreibung	Anzahl
Gruppe 1	Ersatz durch besiedeltes CMI	16
Gruppe 2	Ersatz durch unbe-siedeltes CMI	14
Gruppe 3	Kein Ersatz	9
Gesamt		39

Tab. 3.1: Einteilung der Versuchstiere und Bezeichnung der Gruppen

3.1.2 Biopsie zur Gewinnung von autologen Fibrochondrozyten

Zur Gewinnung der Fibrochondrozyten wurde eine 1–2 mm große Probe an der Basis des Vorderhornes am Innenmeniskus des linken Hinterlaufes entnommen. Dabei blieb das mediale Kollateralband intakt und das Kniegelenk wurde nicht eröffnet. Die Wunde wurde schichtweise mit Einzelknopfnähten verschlossen und mit einem Sprühverband versorgt.

Postoperativ erhielten die Tiere drei Tage regelmässig Analgesie mit Carprofen i.m. (4mg/kg/d).

3.1.3 Isolierung und Kultivierung der autologen Fibrochondrozyten

Die Isolierung der Fibrochondrozyten erfolgte nach Green (Green, 1971). Unter sterilen Bedingungen wurde die entnommene Gewebeprobe zerkleinert und mit Trypsin vorbehandelt. Durch die Inkubation mit Kollagenase wurden die Zellen isoliert. Nach Zentrifugieren und Waschen der Zellen wurden sie in Zellkulturflaschen mit Dulbecos modified eagle medium mit dem Zusatz von fetalem Kälberserum, Glutamin, Penicillin und Streptomycin umgeschichtet und über einen Zeitraum von vier Wochen in Kultur gehalten. Die Zellen wurden drei- bis viermal gesplittet, bis eine durchschnittliche Zellzahl von zehn Millionen Zellen je eingesetzter Probe erreicht war. Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Neubauer Zählkammer.

3.1.4 Besiedelung des Scaffolds mit autologen Fibrochondrozyten

Die Form des CMI entspricht der eines humanen Meniskus. Für die kleineren Kniegelenke der Schafe wurde deshalb nur ein halbes CMI benötigt. Pro Versuchstier wurde ein halbes CMI (3,0 cm) mit durchschnittlich zehn Millionen Fibrochondrozyten besiedelt. Mit einer feinen Kanüle wurden die Zellen in das CMI infiltriert. Die dabei austretende Zellsuspension wurde aspiriert und wieder infiltriert. Dieser Vorgang wurde bis zu 30-mal wiederholt, um eine homogene Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Für eine optimale Adhäsion der Zellen an die Kollagenmatrix wurden die Konstrukte vor der Implantation zwei weitere Wochen in vitro kultiviert.

3.1.5 Implantation des Kollagenscaffolds

Etwa sechs Wochen nach der Gewebeentnahme wurde die Transplantation am bioptierten Kniegelenk durchgeführt. Der Prämedikation folgten die Narkoseeinleitung mit Thiopental i.v. (10mg/kg), die Intubation und die Beatmung mit Enfluran-Gas.

Nach einer mediopatellären Hautinzision wurde eine mediale Arthrotomie durchgeführt und der ventrale Zügel des Ligamentum collaterale mediale eingekerbt, um die posterioren Anteile des Meniskus zu erreichen. Es folgte eine subtotale Meniskektomie, bei der eine circa zwei Millimeter breite Randleiste belassen wurde, um eine sichere Implantation der Zellscaffoldkonstrukte zu gewährleisten.

Die Implantation der Kollagenscaffolds erfolgte in inside-in-Technik unter Verwendung von vier Einzelknopfnähten (Ethibond 3-0). Abschließend wurde das Ligamentum collaterale tibiale genäht und die Wunde schichtweise verschlossen. In Gruppe 3 erfolgte ausschließlich eine Meniskektomie. Um eine Entlastung des Kniegelenkes für etwa acht bis zwölf Tage und anschließender Teilbelastung des linken Hinterlaufes zu gewährleisten, wurde ein 1 bis 1,5 cm langer Teil der ipsilateralen Achillessehne im Anschluss an die Transplantation exzidiert. Postoperativ erhielten die Tiere für 3 Tage eine Analgesie mit Carprofen (4mg/kg/d) und wurden regelmässig untersucht.

3.1.6 Explantation des Kollagenscaffolds

Mit der Explantation erfolgte die Opferung der Tiere.

Je ein Schaf aus Gruppe 1 und 2 wurden als sogenannte „first-look- Ergebnisse“ bereits nach sechs Wochen euthanasiert. Bei den übrigen Tieren wurde die Explantation nach drei oder sechs Monaten post implantationem durchgeführt. Die Anzahl der geopferten Tiere pro Gruppe und Beobachtungszeitraum können Tab. 3.2 entnommen werden.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz
3 Wochen	1	0	0
6 Wochen	1	0	0
3 Monate	9	8	5
6 Monate	4	5	4
Gesamt	15	13	9

Tab. 3.2: Anzahl der geopferten Tiere pro Gruppe und Beobachtungszeitraum

Die Euthanasie erfolgte nach der üblichen Anästhesie-Einleitung mit Propofol i.v. durch eine Überdosis Narcuren und KCl.

Unter sterilen Bedingungen wurde eine mediopatellar gelegene Arthrotomie am Kniegelenk des linken Hinterlaufes im Bereich der alten Operationsnarben durchgeführt. Das Kniegelenk wurde nach Durchtrennung des vorderen und hinteren Kreuzbandes nach ventral luxiert. Die Exzision des Komplexes aus Meniskusbasis und Implantat in toto erfolgte nach der makroskopischen Beurteilung (siehe Abb. 3.6).

Für die analytischen Auswertungen wurden die Explantate wie folgt aufgeteilt:

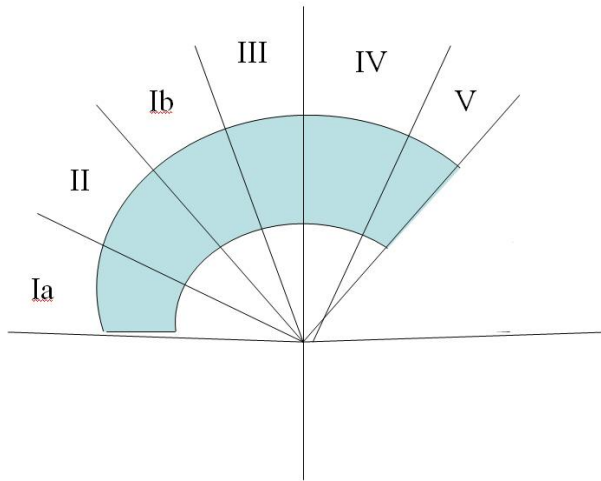


Abb. 3.6: Einteilung der Explantate für die analytische Auswertung

- I.a Histologie, Vorderhorn
- I.b Histologie, Pars intermedia
- II. GAG-Messung
- III. Kollagen-Messung
- IV. Biomechanische Untersuchung
- V. Sulphat-uptake

In einzelnen Fällen musste von dieser Einteilung abgewichen werden, da einige Explantate durch Umbauprozesse nicht ausreichend groß waren.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Makroskopische Untersuchung

Nach der Gelenkeröffnung wurde zunächst die Synovialflüssigkeit begutachtet. Die Gelenkflächen wurden bezüglich chondralen und osteochondralen Läsionen beurteilt. Bei der Inspektion des medialen und lateralen Gelenkknorpels wurden die Knorpeldefekte in vier Grade eingeteilt und sowohl femoral als auch tibial beurteilt (Jackson et al, 1992).

Die Explantate wurden makroskopisch hinsichtlich Größe, Form, Oberfläche, Farbe, Konsistenz, Vaskularisation und Integration im Gelenk beurteilt und fotodokumentiert.

3.2.2 Histologische Untersuchung

Für die histologische Auswertung waren jeweils zwei Präparate vorgesehen, eines aus dem Bereich des Vorderhornes und eines aus der Pars intermedia. Es wurden die Meniskuszellen, zu denen Fibrochondrozyten und Endothelzellen gehören, sowie die Bestandteile der extrazellulären Matrix durch die Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin, Alzian Blau und van Giesson nachgewiesen. Als Indikator für neu gebildetes Kollagen wurde selektiv Typ II mit Hilfe der Immunhistochemie dargestellt.

Direkt nach der Explantation wurden die Gewebestücke Ia und Ib in 4%igem Formalin konserviert und anschließend maximal 24 Stunden in 70%igem Ethanol fixiert. Die Präparate wurden in Paraffin eingebettet.

3.2.2.1 Standardfärbungen

Es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Haematoxylin-Eosin, Alzian und van Giesson gefärbt wurden. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop mit abstrahierten Präparatebezeichnungen durch zwei Untersucher. Folgende Kriterien wurden beurteilt: Zellmorphologie, Anordnung der Zellen, Vaskularisierung, Kollagenfasern und Entzündungszeichen (Nitschke, 2006).

3.2.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.2.1 *Allgemeine Erläuterungen zur Arbeit in der Immunhistochemie*

Zunächst muß ein Primärantikörper ausgewählt werden, der an einem Testarray bezüglich seiner Wirksamkeit ausgetestet wird.

Hierfür wurden zwei Testarrays erstellt: das Erste enthielt Gewebeproben von Haut, Sehne, Meniskus, hyalinem Knorpel und Dünndarm der Spezies Schaf sowie das CMI. Das Zweite enthielt die gleichen Gewebearten vom Menschen. Das benötigte humane Material wurde freundlicherweise vom pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar zur Verfügung gestellt. Diese zwei Testarrays wurden zur Austestung aller darzustellenden Antigene verwendet.

Vor dem Einsatz des Antikörpers muß eine enzymatische Vorbehandlung erfolgen. Während der Fixierung mit Formalin entstehen Aldehydverbindungen, die eine Bindung des Antikörpers verhindern können. Auch kann sich dadurch die dreidimensionale Struktur eines Antigens verändern und so für den Antikörper nicht mehr erkennbar sein (Noll, S. 2000). Damit

der Antikörper das spezifische Antigen im Gewebe wieder identifizieren kann, ist eine Vorbehandlung nötig, die die entsprechenden Antigene demaskiert. Man unterscheidet zwischen einer enzymatischen und einer hitzeinduzierten Demaskierung.

Wenn die optimale Primärantikörperkonzentration und eine geeignete Vorbehandlungsmethode feststeht, muß eine Negativkontrolle durchgeführt werden. Hierbei wird der Primärantikörper durch das Verdünnungsmedium, mit dem der Primärantikörper verdünnt wird, ersetzt, um sicherzustellen, dass die spezifische Färbung ausschließlich auf die Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen zurückzuführen ist. Zuletzt wird eine Kreuzreaktion zwischen den Antigenen des Testmaterials und denen des Detektionssystems ausgeschlossen. Hierfür wird anstelle des Primärantikörpers ein unspezifisches Serum verwendet.

Für die Färbung der immunhistochemischen Präparate wurde der DAKO TechMate™ Horizon, ein Automat für immunhistochemische Färbungen mit entsprechendem Detektionssystem (DAKO, ChemMate™ Detection Kit, K5001), verwendet. Als Nachweismethode diente die LSAB-Methode.

3.2.2.2 *Darstellung des Kollagen Typ II*

Zur Darstellung des Kollagen Typ II wurde ein Antikörper der Firma chemicon verwendet (Rabbit anti-human collagen type II polyclonal antibody, AB 761, Chemicon, CA).

Das Färbeprotokoll für die Darstellung des Kollagen Typ II, das die genauen Angaben zur Vorbehandlung und Färbung enthält, ist im Anhang mit der Nummer 8.1 zu finden. Als Kontrolle diente das Tissuearray, bei dem der hyaline Knorpel als Positivkontrolle und Sehne, Haut, Muskel, Dünndarm und das CMI als Negativkontrolle gewertet wurden.

Die Explantate wurden bezüglich folgender Kriterien untersucht: die Kollagenisierung des Typ II durch die Intensität der Färbung und die Lokalisation des Kollagen Typ II. Zum Ausschluss von Artefakten wurden Entzündungszeichen, Nekrosen und Exsudate, Granulationsgewebe, autochtones Kapselgewebe, die Besiedelung durch Fibrochondrozyten und die Vaskularisation mitbeurteilt.

3.2.2.3 *Darstellung des Kollagen Typ I*

Zur Darstellung des Kollagen Typ I wurden zwei Antikörper ausgetestet (rabbit anti-human collagen type I polyclonal antibody, AB 745, chemicon und Anti-Collagen Typ I, human, CO

20111, biologo). Als Kontrolle diente das Tissuearray. Sehne und Haut fielen in der Bewertung unter die Positivkontrolle und hyaliner Knorpel, Muskel, Dünndarm und das CMI unter die Negativkontrolle.

3.2.2.2.4 *Darstellung von Makrophagen*

Für die spezifische Makrophagendarstellung wurden vier verschiedene Antikörper ausgetestet (Anti-Human CD68, Makrophage Clone PG-M1, Monoclonal Mouse, M 0876, DAKO, Anti-Human CD68, Makrophage Clone KP 1, Monoclonal Mouse, M 0814, DAKO, Monoklonale Mays Antikörper gegen Monozyten/Makrophagen, camon, Mouse anti Sheep Macrophage, clone VPM 64, BZL 03734, biozol). Als Positivkontrolle diente der Dünndarm. Sehne, Haut, hyaliner Knorpel, Muskel und das CMI dienten als Negativkontrolle.

3.2.3 Biochemische Analytik

Zur Ermittlung der biochemischen Zusammensetzung der explantierten Kollagenkonstrukte wurde der Gehalt des löslichen Kollagens sowie der Anteil an Kollagen Typ II, der Glykosaminoglykangehalt und der Wassergehalt bestimmt.

3.2.3.1 Quantitative Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes

Für die quantitative Bestimmung des Kollagens wurde das "sircol collagen assay" gewählt (biocolor, Irland). Durch einen Reaktionskomplex aus dem anionischen Farbstoff Sirius Red und den Seitenketten Glycin-X-Y des Kollagens wird eine Verbindung hergestellt, die spektrometrisch erfasst werden kann.

Gemäß des biochemischen Aufbaus des Kollagens müssen die verschiedenen Synthesestufen bei der Messung berücksichtigt werden:

Salzlösliches Kollagen vertritt den jüngsten Teil des Kollagens, das heißt das Kollagen befindet sich kurz vor dem Übergang zu Kollagenfibrillen. Säurelösliches Kollagen stellt den Anteil dar, der vor kurzem gebildet wurde, abhängig vom Alter des Versuchstieres. Bei jungen Tieren ist dieser Anteil höher. Pepsinlösliches Kollagen repräsentiert ebenfalls vor kurzem synthetisiertes Kollagen, allerdings wird durch Pepsin mehr Kollagen herausgelöst als bei der Säureextraktion.

Nicht lösliches Kollagen wird auch als cross-linked-Kollagen bezeichnet. Es besteht die Möglichkeit, auch diesen Teil zu messen, indem man die Proteine denaturiert oder das Kollagen

auf über 80°C erhitzt, so dass das Kollagen in Gelatine übergeht. Dieser Anteil kann dann gemessen werden.

3.2.3.1.1 Etablierung der Methode zur Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes

Als Probenmaterial wurden native Meniski vom Schaf sowie vom Menschen verwendet. Diese wurden vor und nach dem Gefrier-trocknen gewogen.

Um eine möglichst große Angriffsfläche für das Extraktionsmedium zu schaffen, wurden mit einem Skalpell möglichst kleine Späne von dem gefriergetrockneten Meniskus abgeschabt. 10–15 mg wurden in ein 15 ml Gefäß gegeben, mit 5 ml destilliertem Wasser 5 Minuten resuspendiert und mit einem Homogenizer (Ultra Turrax T 25, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik) weiter zerkleinert. Die Proben wurden 5 Minuten bei 10000 RPM (rounds per minute) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Abschließend wurden die Proben nochmals lyophilisiert.

Als Probengewicht wurden 5–10 mg eingesetzt. Die Proben wurden nacheinander mit 1 ml einer Salz-, Säure- und Pepsinlösung inkubiert. Die Zusammensetzung der Extraktionslösungen sind im Anhang unter 8.2 angegeben.

Nach jedem Schritt wurden die Proben 5 Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden intensiv mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor das nächste Extraktionsmedium zugefügt wurde. Der Aufbau und die Inkubationszeiten dieses Versuches sind in Abb. 3.7 aufgeführt.

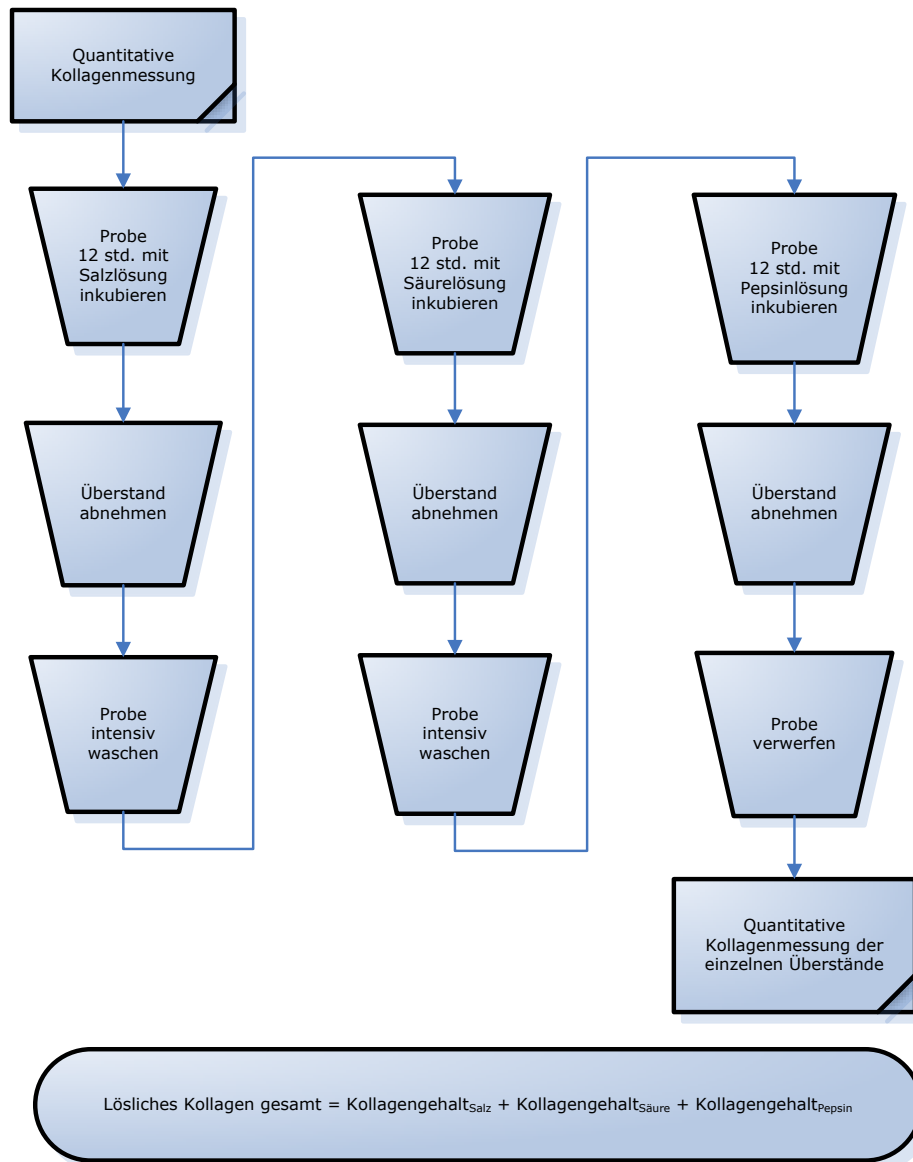


Abb. 3.7: Vorgehensweise zur quantitativen Kollagenmessung

Nach der letzten Extraktion wurden jeweils 100 µl der Überstände in ein 1,5 ml fassendes Eppendorff-Gefäß pipettiert und gemäß des Herstellerprotokolls, das im Anhang unter 8.2 aufgeführt ist, gemessen.

Mit einem Spektralphotometer (Biolumin 960, Kinetic Fluorescence/ Absorbance, Molecular Dynamics) wurde die Absorption bei der Wellenlänge 540 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve, die mit Standardlösungen, die 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl Kollagen Typ I enthalten, erstellt wurde. Das Programm des Spektralphotometers errechnete den Kollagengehalt in µg pro Well. Daraus wurde mit Hilfe des eingesetzten Probengewichts der Gesamtgehalt errechnet und in Gewichtsprozent angegeben.

3.2.3.1.2 *Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes im explantierten Kollagenscaffold*

Um den Gesamtgehalt an löslichem Kollagen im explantierten Kollagenscaffold zu ermitteln, wurde das Probenstück III verwendet (siehe Abb. 3.6). Der Ablauf des Messverfahrens ist dem Protokoll im Anhang unter 8.2 zu entnehmen, das nach Etablierung der Messmethode zur Bestimmung des Gehaltes löslichen Kollagens erstellt wurde.

3.2.3.1.3 *Durchschnittlicher Gehalt löslichen Kollagens im Schafsmeniskus*

Zur Ermittlung des durchschnittlichen Kollagengehaltes in Schafsmenisken wurde dieser nach oben beschriebenen Schema in 24 Schafsmenisken bestimmt und daraus der Mittelwert errechnet.

3.2.3.2 Bestimmung des löslichen Anteils an Kollagen Typ II

Zur spezifischen Messung von Typ II Kollagen wurde das "Native Type II Collagen Detection Kit" (MD Biosciences, Zürich, Schweiz) gewählt, ein Enzyme-linked Immunosorbentassay (ELISA). Mit dieser standardisierten Methode werden spezifische Antikörper gegen ein Antigen mittels enzymmarkierter Sekundäntikörper nachgewiesen (Hof, 2000).

Als Probenmaterial dienten wiederum ein Schafsmeniskus und ein humaner Meniskus, die, wie im Kapitel 3.2.3.1.1 beschrieben, vorbehandelt wurden.

3.2.3.2.1 *Etablierung der Methode zur Bestimmung des löslichen Gehaltes an Kollagen Typ II*

Die Extraktion erfolgte gemäß den Herstellerangaben nacheinander durch eine Salz-, Säure-, Pepsin- und Elastaselösung. Im Anhang unter 8.3 sind die Zusammensetzungen dieser Lösungen und die Inkubationszeiten der jeweiligen Lösung aufgeführt.

100 µl des Überstandes nach Kollagenextraktion mittels Elastaselösung wurden für den Kollagen-ELISA verwendet. Der Ablauf der Messung ist vom Hersteller übernommen und im Anhang unter 8.3 aufgeführt.

Es wurde eine Standardlösung angesetzt, die 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µg Kollagenstandard vom Hersteller enthalten sowie eine Nullprobe, mit deren Hilfe eine Standardkurve erstellt wurde. Mit einem Spektralphotometer (Biolumin 960, Kinetic Fluorescence/

Absorbance, Molecular Dynamics) wurde die Absorption bei der Wellenlänge 490 nm gemessen und mit der Standardkurve verglichen. Die Auswertung erfolgte über die Software des Spektralphotometers, bei der der Kollagen Typ II- Gehalt im Well in Prozent angegeben wird. Der tatsächliche Kollagen Typ II-Gehalt der Probe wurde aus der Kollagen Typ II-Konzentration und dem eingesetzten Probengewicht berechnet.

3.2.3.2.2 *Bestimmung des löslichen Kollagengehaltes im explantierten Kollagenscaffold*

Nach der Explantation wurde das Probenstück III entsprechend dem Protokoll zur spezifischen Kollagen Typ II-Bestimmung (Anhang 8.3) verwendet.

Die Bestimmung des Gehaltes von löslichem Kollagen und die Bestimmung des Anteils an Kollagen Typ II wurde in einer kombinierten Messung durchgeführt, da die Extraktionsschritte, -medien und -zeiten identisch sind.

3.2.3.3 Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes

Es wurde das "Blyscan Sulphated Glykosaminoglykan Assay" (biocolor, Ireland) gewählt, eine quantitative Farbstoff-Bindungsmethode zur Messung sulphatierter Glykosaminoglykane.

3.2.3.3.1 *Etablierung der Messmethode zur Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes*

Als Probenmaterial wurden native Meniski vom Schaf sowie vom Menschen verwendet. Die Vorbehandlung erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.1.1 beschrieben.

Zur Extraktion der Glykosaminoglykane wurde die Salz-extraktionslösung nach Farndale verwendet. Diese setzt sich zusammen aus 4 M Guanidin- HCl, 0,1 M 6-Aminohexanonic Acid, 0,01 M Na₂EDTA und 0,05 M Natriumessig. 5 bis 10 mg des aufbereiteten Probenmaterials wurden mit 2 ml der Extraktionslösung in einem 15 ml Tube für mindestens 2 Stunden bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert. Die Proben wurden 5 Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden zur Ermittlung des Glykosaminoglykangehaltes eingesetzt. Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, die im Anhang unter 8.4 angegeben sind.

Zur Messung der Glykosaminoglykangehalte der eingesetzten Proben wurde ein automatisiertes Spektralphotometer (Biolumin 960, Kinetic Fluorescence/Absorbance, Molecular Dynamics) bei

der Wellenlänge 650 nm eingesetzt. Zur Eichung des Gerätes diente eine Standardkurve, welche nach den Vorgaben des "blyscan Manual" erstellt wurde. Die Auswertung erfolgte über die Software des Gerätes, bei der der Glykosaminoglykangehalt im Well in Prozent angegeben wird. Der tatsächliche Glykosaminoglykangehalt der Probe wurde aus der Glykosaminoglykankonzentration und dem eingesetzten Probengewicht berechnet.

3.2.3.3.2 *Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes im explantierten Kollagenscaffold*

Um den Glykosaminoglykangehalt im explantierten Kollagenscaffold zu ermitteln, wurde das Probenstück II verwendet. Die Messung erfolgte gemäß dem Protokoll zur Glykosaminoglykanbestimmung (Anhang 8.4), das nach Etablierung der Messmethode erstellt wurde.

3.2.3.3.3 *Durchschnittlicher Glykosaminoglykangehalt im Schafsmeniskus*

Zur Ermittlung des durchschnittlichen Glykosaminoglykangehaltes in Schafsmeniskien wurde dieser nach oben beschriebenen Schema in 24 Schafsmeniskien bestimmt und daraus der Mittelwert errechnet.

3.2.3.4 Ermittlung des Wassergehaltes

Die Probenstücke III und IV wurden vor dem Weiterverarbeiten für ihre vorgesehene Messung auf ihren Wassergehalt untersucht. Die Proben wurden direkt nach der Explantation und nach dem Gefriertrocknen gewogen. Aus dem Quotienten zwischen Trocken- und Nassgewicht wurde der Wassergehalt errechnet und in Prozent angegeben.

Zur Ermittlung des durchschnittlichen Wassergehaltes in Schafsmeniskien wurde dieser in 24 Schafsmeniskien bestimmt und daraus der Mittelwert errechnet.

3.2.3.5 Bestimmung der Zellaktivität

Zur Bestimmung der aktuellen Aktivität der Zellen der explantierten Kollagenscaffolds wurde ein Sulphat Uptake-Versuch durchgeführt. Hierfür wurde das Gewebestück V verwendet.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass in einen Zellüberstand radioaktiv markierter Schwefel, S^{35} , gegeben wird, der den Zellen zum Einbau in deren produzierten und

exprimierten Molekülverbindungen zur Verfügung steht. Bestimmt man im Anschluss an eine Inkubationsphase das Verhältnis zwischen frei vorliegenden S^{35} -haltigen Ionen und S^{35} -Atomen, welche in komplexe Molekül- bzw. Proteinstrukturen eingebaut wurden, so lässt dies einen Rückschluss auf die Zellaktivität zu.

Nach Adhäsion einer bestimmten Zellzahl am Boden einer 24-Well-Platte erfolgte das Umschichten mit 1 ml Komplettmedium, welches vorher mit einer definierten Menge S^{35} -markierten Sulphationen versetzt wurde. Nach einer 7-tägigen Inkubationsphase wurde der Überstand abgenommen. Die Zellzahl am Boden der Kulturschale wurde erneut bestimmt. Zur Analyse wurde zunächst mittels eines Beta Counters die gesamte Aktivität des S^{35} bestimmt. Nach Ultragelfiltration mittels Sephadex G-25 (PD-10 Columns; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.) wurde das Ultrafiltrat hinsichtlich seiner S^{35} -Aktivität im Beta Counter untersucht. Unter Berücksichtigung eines Leeransatzes lässt sich aus der Differenz der beiden Messwerte der S^{35} -Anteil bestimmen, der durch die Zellen in großmolekulare Verbindungen eingebaut wurde. Das Ausmaß dieses Anteils, bezogen auf die zugrundeliegende Zellzahl, lässt auf die Aktivität der einzelnen Zelle schließen. Es wurden Gewebeproben von besiedelten und nicht besiedelten CMI sowie frisch isolierte Zellen von nativem Meniskusgewebe miteinander verglichen.

3.2.4 Biomechanischer Druck-Relaxationsversuch

Um die biomechanische Belastbarkeit der Explantate zu ermitteln, wurde ein Druck-Relaxationsversuch durchgeführt. Untersucht wurde die Steifigkeit des Meniskus. Es wurde ein Indentation Tester und die Software „TestExpert“ benutzt. Für diesen Versuch wurde das Probenstück IV verwendet, das mindestens 5 mm groß sein musste. Nach der Explantation wurde das Probenstück in 7 ml D-MEM, das 100 μ l 20%iges DMSO (Frostschutzmittel) enthielt, gegeben und für 4 bis 12 Wochen bei -80°C eingefroren. Direkt vor der Durchführung des Versuchs wurde die Probe bei Raumtemperatur aufgetaut und in einen eigens angefertigten Probenhalter aus Stahl gelegt. Der Indentation Test erfolgte mit einem kugelförmigen Stempel mit 4 mm Durchmesser. Nach dem Anfahren bis zu einer Vorlast von 0,01 Newton erfolgte die Auflastung mit einer definierten Geschwindigkeit von 0,1 mm pro Sekunde bis zu einer maximalen Kraft von 2 Newton. Sobald die Kraftmessdose den Kraftwert von 2 Newton an das Steuergerät gemeldet hat, verharrte der Stempel in seiner Position. Über einen Zeitraum von 60 Sekunden wurde der Abfall der dem Stempel

entgegenwirkenden Kraft registriert. Dieser Kraftabfall ergab sich aus den viskoelastischen Eigenschaften von biologischen Materialien und ist durch das Umverteilen von Flüssigkeits- und Kollagenanteilen unter dem Druck des Stempels zu erklären. Das Ausmass des Kraftabfalles wurde bestimmt. Die Phase des Aufbelastens diente zur Bestimmung der Steifigkeit des meniskalen Gewebes aus dem Quotienten von Kraftänderung und Wegänderung. Mit standardisierter Geschwindigkeit wurde mit einem Stempel, der einen Durchmesser von 4 mm hatte, auf die Probe gedrückt. Über einen Zeitraum von 60 Sekunden verharrte der Stempel in dieser Position bei einer maximalen Kraft von 2 Newton. Unter dem Druck des Stempels verteilten sich die Flüssigkeits- und Kollagenanteile um, so dass die ursprüngliche Kraft von 2 Newton kleiner wurde. Diese Kraftveränderung wurde aufgezeichnet.

3.3 Datenauswertung und Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden quantitative Verfahren verwendet. Diese Verfahren bieten für den derzeitigen Stand der Studie eine effiziente Methode, um Aussagen zu vorgenommener Analytik zu treffen. Statistische Testverfahren wurden bewusst nicht eingesetzt, da es sich hier um eine Grundlagenstudie handelt und die Anzahl der Meßergebnisse keine verbesserte Auswertung der Analytik durch statistische Methoden erwarten lässt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten zur Zellkultivierung

Die Ergebnisse zu den Vorarbeiten hinsichtlich der Zellkultivierung, der Zellproliferation sowie der Besiedelung der Kollagenscaffolds waren Teil der Dissertation von S. Nitschke. Ergebnisse können seiner Dissertation entnommen werden (Nitschke, 2006).

Während der *in vitro* Phase wurden in der Gruppe der besiedelten CMIs Glykosaminoglykanmessungen durchgeführt. Es konnten keine Glykosaminoglykane nachgewiesen werden.

4.2 Tiere

Während der gesamten Studienzeit mussten zwei Tiere aus der Gruppe 1 frühzeitig aufgrund einer Herzinsuffizienz und einem Kniegelenksempyem geopfert werden.

Diese wurden von der Gesamtevaluation ausgeschlossen, so dass sich eine endgültige Anzahl der Versuchstiere von 37 ergibt, davon 14 aus der Gruppe 1, 14 aus der Gruppe 2, und 9 aus der Gruppe 3.

	Beschreibung	Anzahl
Gruppe 1	Ersatz durch besiedeltes CMI	14
Gruppe 2	Ersatz durch unbesiedeltes CMI	14
Gruppe 3	Kein Ersatz	9
Gesamt		37

Tab. 4.1: Anzahl der Versuchstiere nach Ausschluss

Es traten keine intra- oder postoperativen Komplikationen auf.

4.3 Klinische Untersuchung

Nach der Achillessehnenresektion wurde eine weitgehende Entlastung des operierten Kniegelenkes für mindestens vier Wochen beobachtet. Von einer kompletten Entlastung kann nicht gesprochen werden, da die Tiere beim Liegen das Knie maximal flektieren und dadurch ein sehr hoher Druck auf das Meniskushinterhorn entsteht. Danach schloss sich eine Teilbelastung von zwei bis vier Wochen an. Acht Wochen nach

der zweiten Operation konnten alle Tiere wieder ohne Einschränkung belasten.

Bei der Abschlussuntersuchung vor der Opfierung zeigten sich in Gruppe 2 und 3 reizlose Narbenverhältnisse. In Gruppe 1 fielen (neben sonst ebenfalls reizlosen Narben) zwei hypertrophe Verwachsungen auf.

Die Beweglichkeit und das Gangverhalten aller Tiere waren unauffällig, die Kniegelenke bei Varus- und Valgusstress sowie bei vorderem und hinterem Schubladentest stabil. Die Tiere wiesen alle ein volles Bewegungsausmaß von Ext/Flex: 0-0-140 auf.

Zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich keine Unterschiede.

4.4 Makroskopische Untersuchung

Bei der Eröffnung des Kniegelenkes wurde zunächst die Synovialflüssigkeit beurteilt.

In Gruppe 2 und 3 erschien diese serös, in Gruppe 1 wurde bei zwei Tieren eine eitrige Synovialflüssigkeit dokumentiert. Bei den restlichen Tieren der Gruppe 1 erschien die Synovialflüssigkeit ebenfalls serös.

Bei der Inspektion der medialen Gelenkflächen wurden in Gruppe 1 drei femorale Knorpeldefekte, in Gruppe 2 drei femorale und zwei tibiale Knorpeldefekte beobachtet. In Gruppe 3 fielen zwei femorale und ein tibialer Defekt auf.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz
Knorpeldefekt femoral gesamt	3	3	2
Grad			
V	1	2	1
VI	2	1	1
Knorpeldefekt tibial gesamt	0	2	1
Grad			
V	0	0	1
VI	0	2	0
Gesamt	3/14	5/14	3/9

Tab. 4.2: Knorpeldefekte femoral und tibial zum Zeitpunkt der Explantation.

Die Gradeinteilung erfolgte nach Bauer und Jackson (1988), aus Strobel (1998), bezogen auf die degenerative Einteilung:

- Grad V: Fibrillation
- Grad VI: Fibrillation und Ablösung

Bei der Beurteilung der Implantate im Gelenk wurden in Gruppe 1 elf meniskusähnliche Regenerate im medialen Kompartiment gefunden, in Gruppe 2 zehn und in Gruppe 3 vier.

Bezüglich der Farbe, Oberfläche und Elastizität der Regenerate und der Integration der Transplantate in den Kapselverband ergaben sich in den Gruppen 1 und 2 keine Unterschiede.

In den Fällen, bei denen kein Regenerat gefunden wurde, konnte keine Korrelation zu Knorpeldefekten nachgewiesen werden.

Bei den vorhandenen Meniskusregeneraten wurde zusätzlich die Vaskularisationssituation beurteilt. Dabei wurde die Oberfläche der Meniskusbasis an der Kapselinsertion begutachtet. In Gruppe 1 wurde eine sehr gute Vaskularisierung in fünf von elf Fällen gesehen, in einem Fall war nur der Vorderhornbereich gut vaskularisiert. In Gruppe 2 wurde in fünf von zehn Meniskusregeneraten eine teilweise vaskularisierte Situation im Bereich des Vorderhorns beobachtet. Bei den Regeneraten der Gruppe 3 war keine Vaskularisierung zu beobachten.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz
Gesamt	14	14	9
Meniskusregenerat	11	10	4
Vaskularisation	6/11	5/10	0/4

Tab. 4.3: Meniskusregenerate und Vaskularisation postexplantationem

4.5 Histologische Untersuchung

4.5.1 Standardfärbungen

Schon in den 3-Wochen Kontrollen zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2 hinsichtlich Zellverteilung und Anteil an extrazellulärer Matrix. In Gruppe 2 fielen eine sehr hohe Anzahl an Fibrozyten auf, die nur von einem schmalen

Saum extrazellulärer Matrix umgeben waren. Im Gegensatz dazu wurde in Gruppe 1 eine eher geringe Anzahl an Fibrochondrozyten beobachtet, die von reichhaltiger extrazellulärer Substanz umgeben waren.

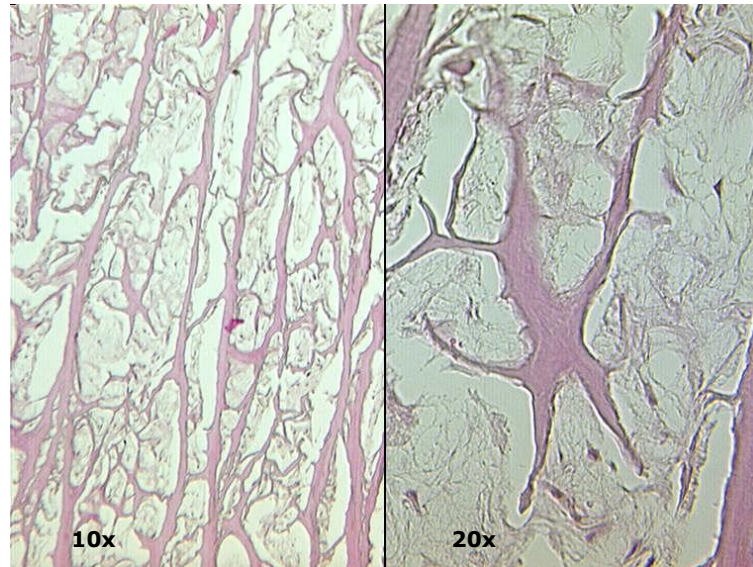


Abb. 4.1: HE-Schnitt eines besiedelten CMI nach drei Wochen. Man erkennt vereinzelte Fibrochondrozyten, die von reichlich extrazellulärer Matrix umgeben sind. Vergrößerungsfaktor 10 bzw. 20.

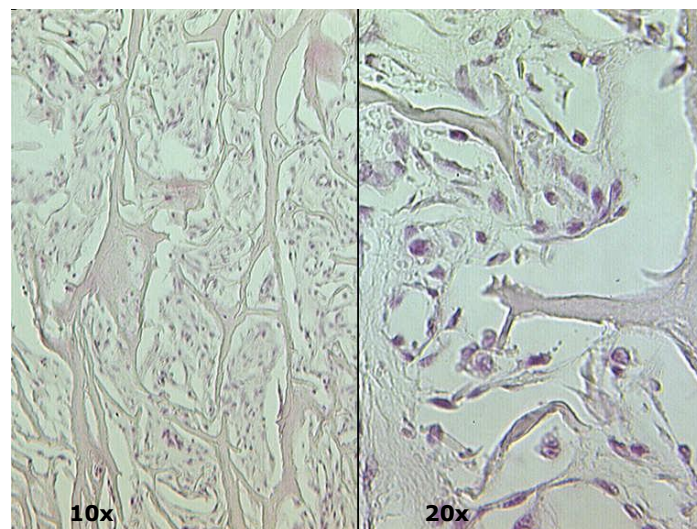


Abb. 4.2: HE Schnitt eines unbesiedelten CMI. Man erkennt eine hohe Anzahl an Fibrozyten, die perizellulär von wenig extrazelluläre Matrix umgeben sind. Vergrößerungsfaktor 10 bzw. 20.

Nach der Beobachtungszeit von drei und sechs Monaten zeigten sich in Gruppe 1 verschiedene Stadien des Remodelling. Unter Remodelling versteht man die Neubildung beziehungsweise Neuformation des Gewebeszellverbandes des Kollagengerüsts.

Im Vergleich dazu konnte in Gruppe 2 kein nachweisliches Remodelling festgestellt werden.

Bei den menispektomierten Tieren der Gruppe 3 dominierte das histologische Bild eines narbenähnlichen Gewebes. Dieses erschien fibrös, zellreich und sehr unorganisiert (Nitschke, 2006).

4.5.2 Immunhistochemie

Bei den Vorversuchen zur Darstellung von Kollagen Typ II konnte gezeigt werden, dass der humane Antikörper (rabbit anti-human collagen type II polyclonal antibody, AB 761, Chemicon, CA) auf die Spezies Schaf übertragbar ist.

Die Negativkontrollen zeigten keine Anfärbung bei CMI, Muskel, Haut, Sehne und Dünndarm. Die Positivkontrolle, für die hyaliner Knorpel gewählt wurde, zeigte hingegen eine intensive Färbung.

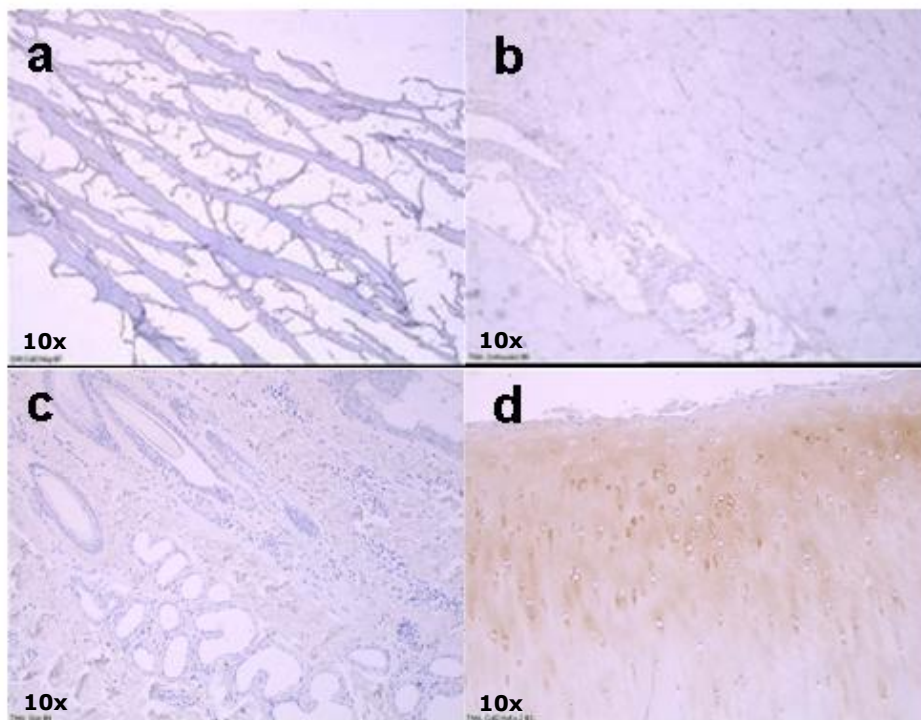


Abb. 4.3: Repräsentativer Ausschnitt aus dem Tissuearray der Negativ- und Positivkontrollen für die Kollagen Typ II Darstellung

- a: unbesiedeltes CMI, Kollagen Typ II negativ, Vergrößerungsfaktor 10
- b: Muskel, Kollagen Typ II negativ, Vergrößerungsfaktor 10
- c: Haut, Kollagen Typ II negativ, Vergrößerungsfaktor 10
- d: hyaliner Knorpel, Kollagen Typ II positiv, Vergrößerungsfaktor 10

Für die immunhistochemische Darstellung des Kollagen Typ II wurden nur ausgewählte Präparate dargestellt, die nach histologischen und analytischen Ergebnissen repräsentativ für ihre jeweilige Gruppe waren.

Aus der Gruppe 1 wurden sieben Präparate, aus der Gruppe 2 vier und aus der Gruppe 3 zwei Präparate dargestellt. Die Intensität der Anfärbbarkeit der Kollagen Typ II Fasern wurde in drei Stufen eingeteilt:

- 3/3 entspricht einer intensiven Anfärbung
- 2/3 entspricht einer mittelgradigen Anfärbung
- 1/3 entspricht einer geringen Anfärbung
- 0/3 wurde verwendet, wenn keine Anfärbung erkennbar war.

Die Lokalisation des gefärbten Kollagens Typ II wurde differenziert in eine diffuse Anordnung der Kollagenfasern, in eine fokale Anordnung sowie in eine Mischform. Bei der diffusen Anordnung lagen die Fasern über das gesamte Präparat verteilt, bei der fokalen Anordnung drängte sich das Kollagen Typ II vorwiegend dicht um die Zellen herum. Die Mischform beinhaltete beide der beschriebenen Formen.

Die Intensität der Kollagenfärbung in Gruppe 1 war in zwei der Präparate sehr stark (3/3), in zwei mittelgradig (2/3) und in drei gering (1/3). Die Lokalisation des Kollagen Typ II war in fünf Präparaten diffus, in zwei fokal angeordnet und in einem Präparat gemischt.

In Gruppe 2 war die Intensität der Kollagenfärbung in allen Bereichen mittelgradig. Die Lokalisation des Kollagen Typ II war in drei Präparaten gemischt und in einem diffus angeordnet.

Die Intensität der Kollagenfärbung in Gruppe 3 war in beiden Fällen mittelgradig, die Lokalisation des Kollagen Typ II war ausschließlich fokal.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz
Intensität			
3/3	2	0	0
2/3	2	4	2
1/3	3	0	0
Verteilung			
diffus	5	1	0
fokal	2	0	2
gemischt	0	3	0
Gesamt	7	4	2

Tab. 4.4: Auswertung der immunhistochemischen Darstellung des Kollagen Typ II nach der Intensität der Färbung und der Verteilung der Kollagenfasern

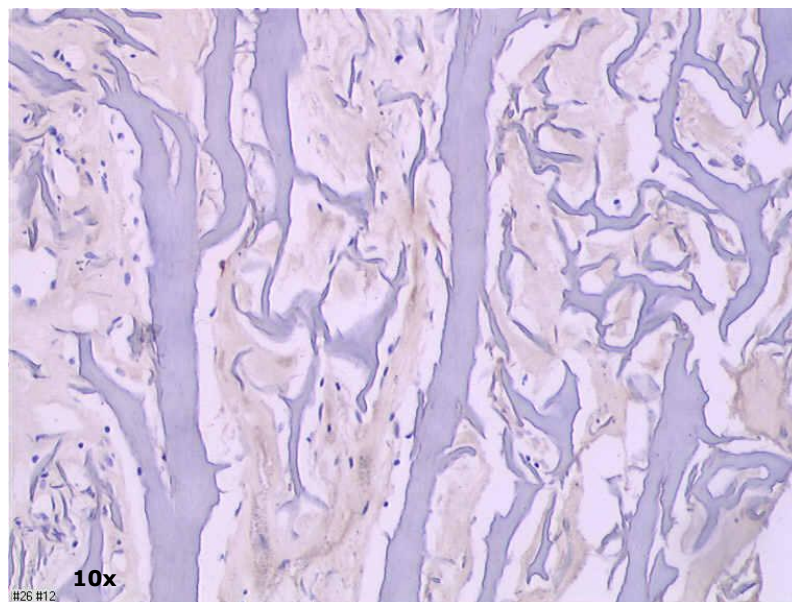


Abb. 4.4: Immunhistochemisches Bild eines besiedelten CMI. Man erkennt deutlich die mittelgradige Anfärbung der Kollagenfasern (2/3), die im gesamten Präparat diffus verteilt vorliegen, Vergrößerungsfaktor 10

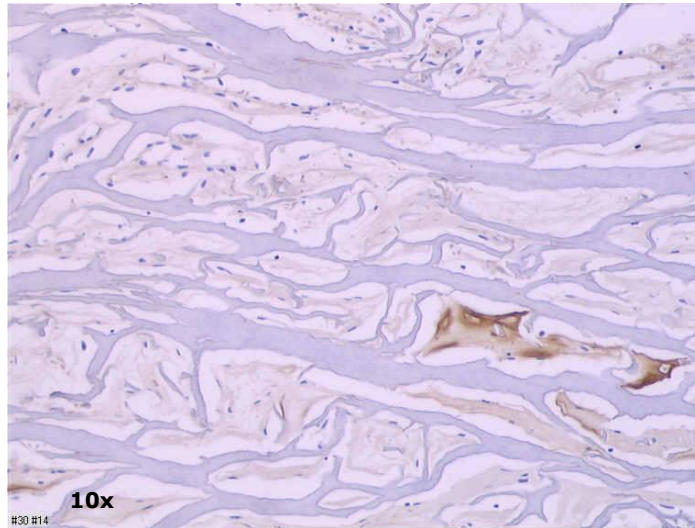


Abb. 4.5: Immunhistochemisches Bild eines besiedelten CMI. In diesem Bild werden die unterschiedlichen Anfärbungen deutlich. Der stark gefärbte Bereich entspricht 3/3, der leicht bräunliche Anteil, der überwiegt, entspricht der Einteilung 1/3. Das Kollagen liegt auch hier überwiegend diffus, Vergrößerungsfaktor 10

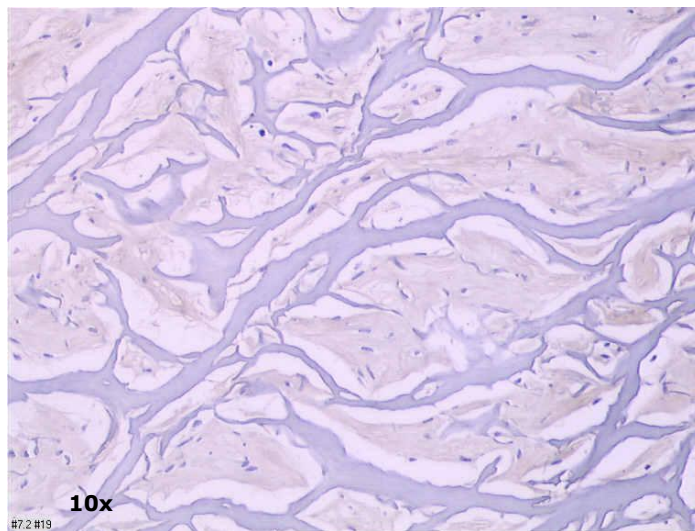


Abb. 4.6: Immunhistochemisches Bild eines unbesiedelten CMI. Man erkennt eine mäßige Anfärbung 2/3 bei überwiegend diffuser Verteilung, Vergrößerungsfaktor 10

Die Darstellung des Kollagen Typ I und der Makrophagen konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Die ausgetesteten Antikörper konnten nicht auf die Spezies Schaf übertragen werden.

4.6 Biochemische Analytik

Für die analytischen Messungen konnten nicht alle Tiere in die Wertungen einbezogen werden. Der Hauptgrund lag in der Tatsache begründet, dass kein CMI-Transplantat mehr vorhanden war. In Gruppe 1 war dies in vier von fünf Tieren der Fall, in Gruppe 2 in fünf von sechs Tieren. Je ein Tier aus beiden Gruppen wurde als sogenanntes „first-look“-Schaf drei Wochen nach der Implantation geopfert. Deren Explantate wurden nur histologisch ausgewertet.

Für die verschiedenen Messungen waren jeweils bestimmte Mindestmengen notwendig, um ein valides Meßergebnis zu erzielen. Abhängig von der Größe der Explantate wurde eine Reihenfolge festgelegt, die die Messungen bezüglich ihrer Aussagekraft für die Studie wiedergibt. In absteigender Reihenfolge wurden die Messungen durchgeführt:

Glykosaminoglykan

 Kollagen gesamt

 Kollagen Typ II

 Sulfat uptake

 Biomechanik.

Aus diesem Grund ergibt sich die unterschiedliche Anzahl der Explantate für die einzelnen Messungen.

In Gruppe 3 wurden unerwartet Regenerate gefunden. Um deren Zusammensetzung zu analysieren, wurden sie zusätzlich zu den Explantaten der Gruppen 1 und 2 ausgewertet. Die Größe der Regenerate ließ nur in zwei von sechs Fällen eine Messung von Glykosaminoglykanen und Kollagen zu. In drei Fällen konnte nur die Glykosaminoglykanmessung durchgeführt werden, in einem Fall nur eine histologische Auswertung erfolgen.

In nachstehender Übersicht ist die Anzahl der Versuchstiere angegeben, die in die analytischen Auswertungen einbezogen werden konnten.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz	Gesamt
Beginn der Studie	16	14	9	39
Ausschluss vor Implantation	2	0	0	2
Ausgangswert für Analytik	14	14	6 gefundene Regenerate	34
Ausschluss für Analytik wegen fehlendem CMI	4	5	0	9
Ausschluss für Analytik wegen „first-look“ Schaf	1	1	0	2
Gesamtanzahl für Analytik	9	8	6	23

Tab. 4.5: Anzahl der Versuchstiere, die in die analytischen Auswertungen einbezogen wurden

4.6.1 Gesamtkollagengehalt

Für die Gesamtkollagenmessung wurden in Gruppe 1 sieben Explantate untersucht. In Gruppe 2 wurden acht Explantate analysiert, von denen ebenfalls zwei Präparate ausgeschlossen werden mussten. In einem Fall ergab die Histologie ein Narbengewebe. Bei dem zweiten ausgeschlossenen Fall war eine Meßungenauigkeit der Grund. In Gruppe 3 wurden beide gemessenen Werte einbezogen.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz	Gesamt
Gesamtanzahl für Analytik	9	8	6	23
Analysierte Explantate für Kollagen	7	8	2	17
Ausgewertete Explantate für Kollagen	7	6	2	15

Tab. 4.6: Anzahl der gemessenen und in die Gesamtwertung einbezogenen Tiere für die Gesamtkollagenmessung

Daraus ergeben sich folgende Werte:

	CMI	Nativ	Gruppe 1 Besiedeltes CMI n=7	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI n=6	Gruppe 3 Kein Ersatz n=2
Mittelwert	0,00	13,05	27,92	24,62	41,28
Median	0,00	13,05	26,37	25,44	41,28
Standardabweichung	0,00	0,15	11,68	8,36	3,70

Tab. 4.7: Mittelwert, Median und Standardabweichung des gesamtlöslichen Kollagengehaltes.

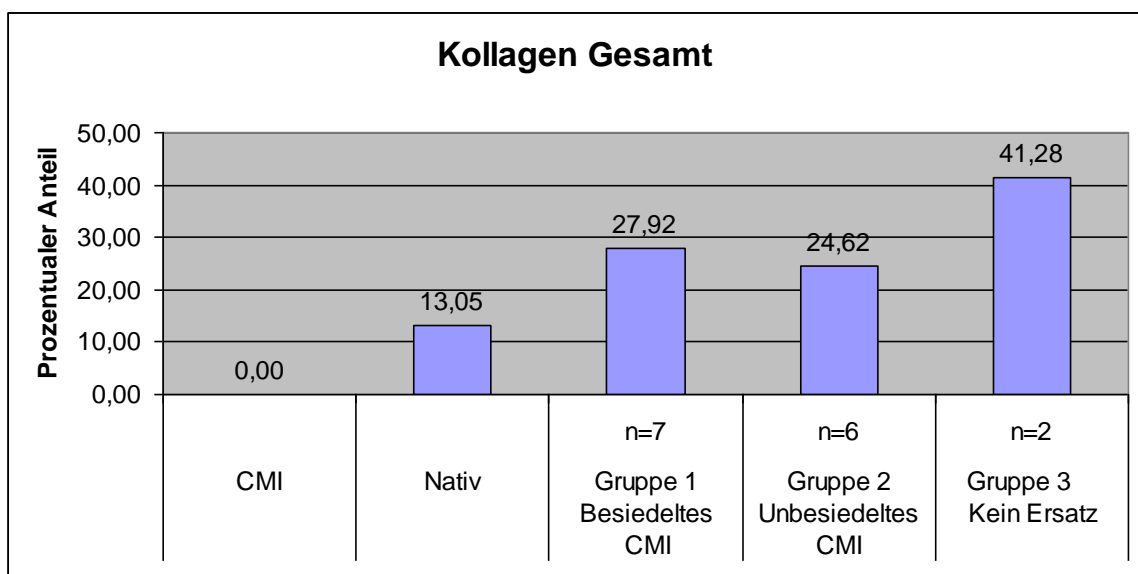


Abb. 4.7 : Darstellung des Kollagengehaltes an gesamtlöslichem Kollagen

4.6.2 Kollagen Typ II- Gehalt

Der Kollagen Typ II- Gehalt wurde aus der gleichen Anzahl der Explantate ermittelt wie der Gehalt des gesamtlöslichen Kollagens. Alle Werte konnten in die Wertung miteinbezogen werden.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz	Gesamt
Gesamtanzahl für Analytik	9	8	6	23
Analysierte Explantate für Kollagen II	7	8	2	17
Ausgewertete Explantate für Kollagen II	7	8	2	17

Tab. 4.8: Anzahl der gemessenen und in die Gesamtwertung einbezogenen Tiere für die Kollagen Typ II Messung

	CMI	Gruppe 1 Besiedeltes CMI n=6	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI n=8	Gruppe 3 Kein Ersatz n=2
Mittelwert	0,00	1,84	1,31	0,61
Median	0,00	0,53	0,62	0,61
Standardabweichung	0,00	2,54	1,81	0,09

Tab. 4.9 : Mittelwert, Median und Standardabweichung des Kollagen Typ II Gehaltes

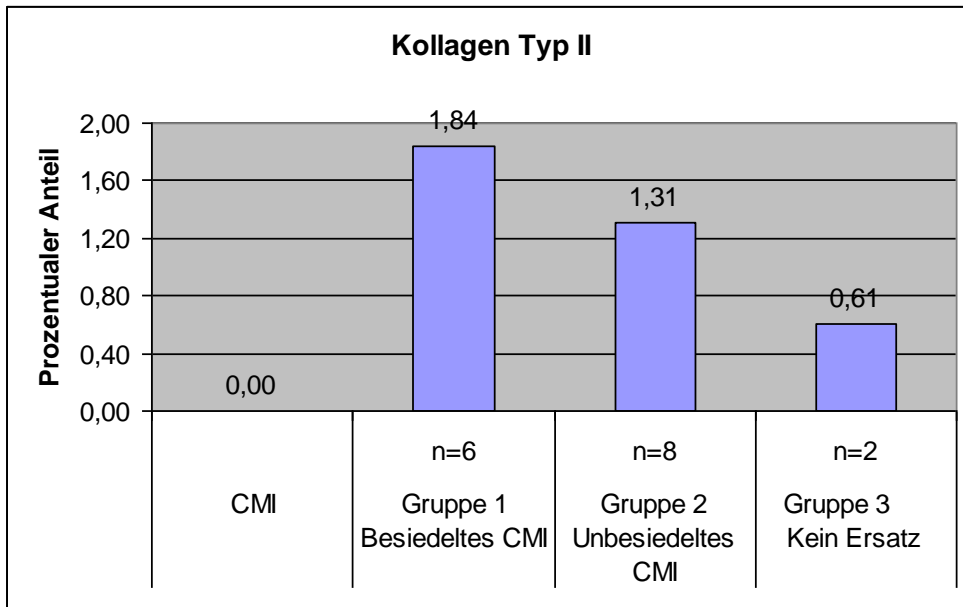


Abb. 4.8: Darstellung des Gehaltes an Kollagen Typ II

4.6.3 Glykosaminoglykangehalt

In der Gruppe der besiedelten CMIs wurde der Glykosaminoglykangehalt aus neun Explantaten ermittelt. Zwei mussten wegen Messungenauigkeiten ausgeschlossen werden. In Gruppe 2 wurden acht Explantate analysiert. Davon wurden zwei aus der Wertung genommen. In einem Fall wurde rückwirkend Narbengewebe festgestellt, bei einem weiteren Explantat lag ein Messfehler vor. In Gruppe 3 wurden fünf Explantate analytisch ausgewertet.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz	Gesamt
Gesamtanzahl für Analytik	9	8	6	23
Analysierte Explantate für Glykosaminoglykane	9	8	5	22
Ausgewertete Explantate für Glykosaminoglykane	7	6	5	18

Tab. 4.10: Anzahl der gemessenen und in die Gesamtwertung einbezogenen Tiere für die Glykosaminoglykanmessung

Daraus ergeben sich folgende Werte:

	CMI	Nativ	Gruppe 1 Besiedeltes CMI n=7	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI n=6	Gruppe 3 Kein Ersatz n=5
Mittelwert	0,00	4,60	2,23	0,48	44,75
Median	0,00	4,60	1,40	0,04	42,28
Standardabweichung	0,00	0,00	2,21	0,71	12,47

Tab. 4.11: Mittelwert, Median und Standardabweichung des Glykosaminoglykangehaltes

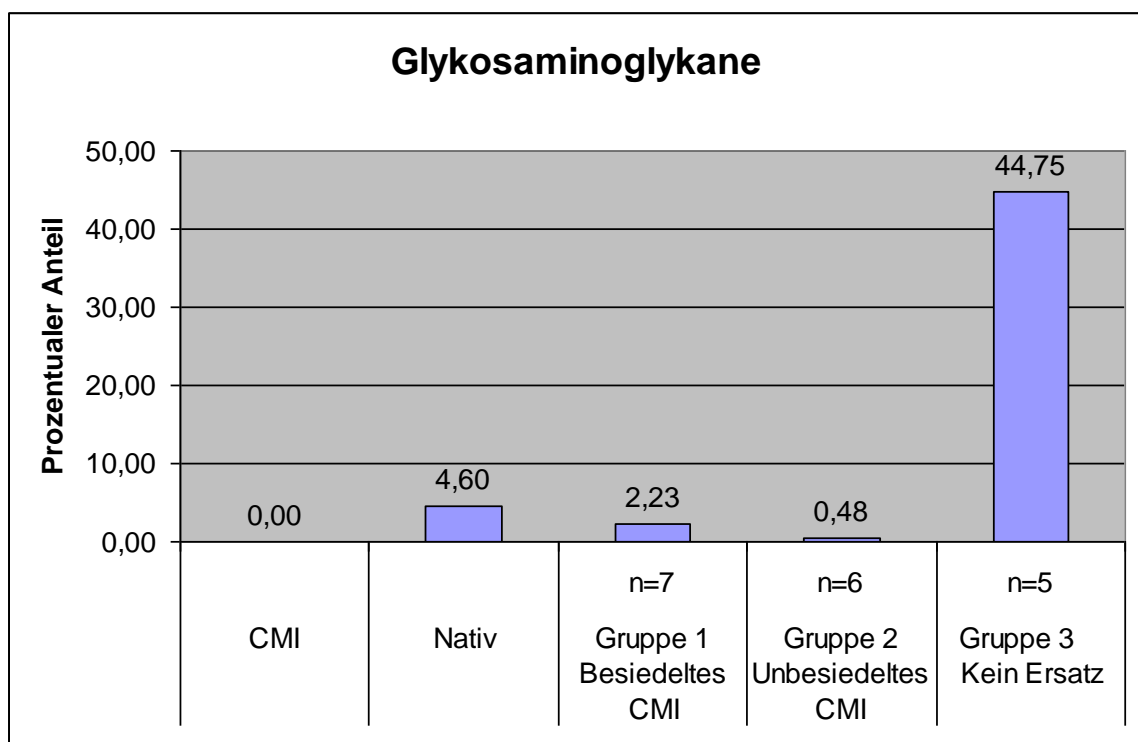


Abb. 4.9: Darstellung des Glykosaminoglykangehaltes

4.6.4 Wassergehalt

Der Wassergehalt wurde in Gruppe 1 aus fünf Explantaten ermittelt, in Gruppe 2 aus sieben und in Gruppe 3 aus fünf.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz	Gesamt
Gesamtanzahl für Analytik	9	8	6	23
Bestimmung des Wassergehaltes	5	7	5	17

Tab. 4.12: Anzahl der analysierten Explantate für den Wassergehalt

	CMI	Nativ	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gruppe 3 Kein Ersatz
		n=23	n=5	n=6	n=5
Mittelwert	0,00	70,74	83,84	84,05	83,24
Median	0,00	70,57	84,25	86,06	83,64
Standardabweichung	0,00	2,75	2,62	2,29	5,31

Tab. 4.13: Mittelwert, Median und Standardabweichung des Wassergehaltes

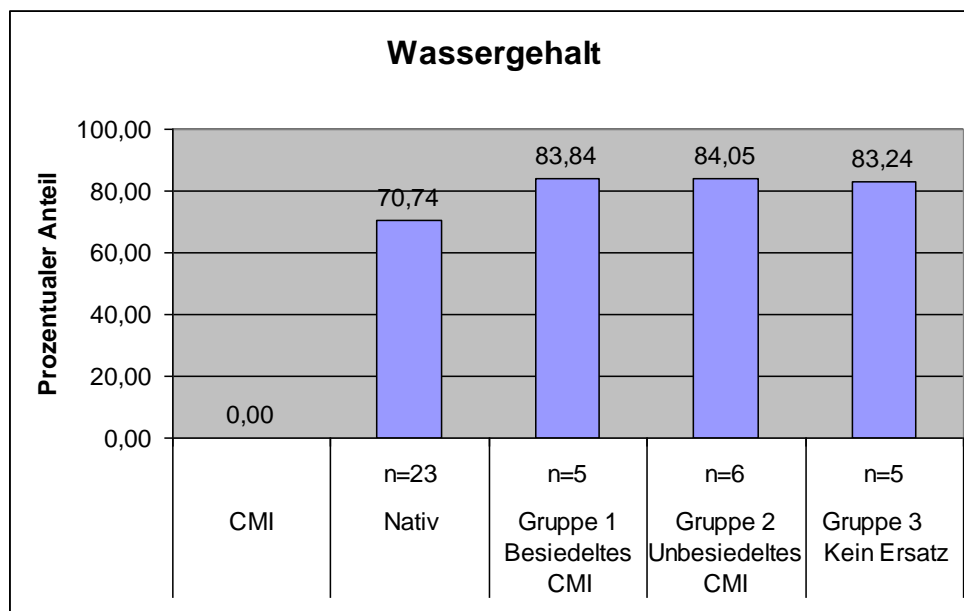


Abb. 4.10: Darstellung des Wassergehaltes

4.6.5 Sulfat uptake- Versuch

Die Zellzahl wurde in der Gruppe 1 in drei Explantaten ermittelt. In Gruppe 2 wurde die Zellzahl in fünf Explantaten ermittelt.

	Gruppe 1 Besiedeltes CMI	Gruppe 2 Unbesiedeltes CMI	Gesamt
Gesamtanzahl für Analytik	9	8	17
Analysierte Explantate für Sulfat uptake	3	5	8
Ausgewertete Explantate für Sulfat uptake	3	5	8

Tab. 4.14: Anzahl der gemessenen und in die Gesamtwertung einbezogenen Tiere für Sulfat uptake-Versuch

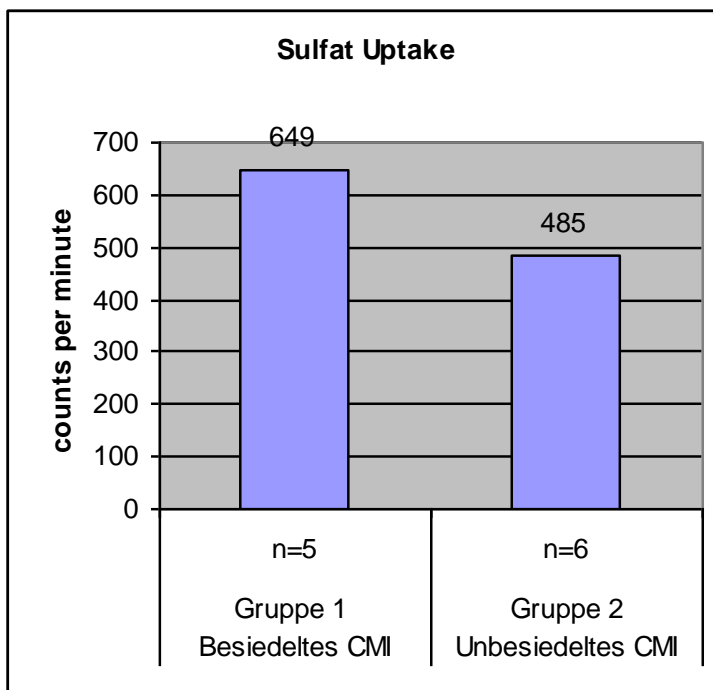


Abb. 4.11: Darstellung der markierten Zellen in CPM bei 1 Millionen Zellen

4.7 Biomechanik

Für die biomechanischen Tests konnten insgesamt nur sieben Explantate ausgewertet werden, davon vier aus Gruppe 1 und drei aus Gruppe 2. Dies lag an der festgelegten Reihenfolge der Versuchsdurchführungen. Die besiedelten Scaffolds wiesen eine höhere Steifigkeit auf als die Scaffolds aus der unbesiedelten Gruppe. Die biomechanischen Tests führte S. Nitschke durch. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit nicht detailliert auf den Versuchsaufbau und die Ergebnisse eingegangen.

5 Diskussion

5.1 Literaturüberblick zum Thema des Meniskusersatzes

Die Erkenntnis über den makro- und mikroanatomischen Aufbau des Meniskus, seine physiologischen Eigenschaften sowie das Verständnis der komplexen Interaktionen der Proteine, der extrazellulären Matrix und deren Regulationsfaktoren brachte die Wissenschaft einen entscheidenden Schritt nach vorne (Jackson et Simon, 1999). Dadurch konnte man die Veränderungen bei einer Meniskusläsion oder einem Meniskusverlust nachvollziehen und dementsprechend bei der Weiterentwicklung der Behandlungsoptionen reagieren.

Läsionen am Meniskus sind für signifikante Veränderungen in seiner biochemischen und biomechanischen Umgebung verantwortlich.

Bei einer Verletzung resultiert eine Bildung von unfunktionellem Narbengewebe, das qualitativ dem Meniskusgewebe stark unterlegen ist (Martinek et al., 2000). Dieses Gewebe kann den Anforderungen im Kniegelenk nicht standhalten und wird aufgerieben. Es entsteht ein Knorpeldefekt, der in eine Gonarthrose mündet (Webber et al., 1986, Hough et Webber, 1990, Shin et al., 2003).

Lanzer et Komenda (1994) wiesen die wichtige knorpelprotektive Funktion des Meniskus nach, indem sie die Veränderungen am Gelenkknorpel nach Meniskektomie untersuchten. In den Bereichen, in denen der Gelenkknorpel nicht von Meniskusgewebe bedeckt war, waren degenerative Veränderungen die Folge. Im Gegensatz dazu konnten an den Bereichen, die gänzlich von Meniskusgewebe bedeckt waren, keine degenerativen Veränderungen beobachtet werden.

Früher behandelte man Meniskusläsionen generell mit der kompletten Resektion des betroffenen Meniskus. Mit der Erkenntnis der Arthroseentstehung versuchte man, diese radikale Methode zu vermeiden und den Meniskus so lang als möglich zu erhalten (Kuhn et Wojity, 1996, Rodeo, 2001, Boyd et Myers, 2003). Es wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden entwickelt und getestet. Meniskusnähte und Teilmeniskektomien haben sich bei kleineren Meniskusläsionen durchgesetzt. Von anderen Methoden wie dem Fibrinclot, dem Synovia-Flaps, dem Fibrinkleber und der Induktion von Blutgefäßen kam man wegen nicht zufriedenstellender Ergebnisse schnell wieder ab (Arnoczky et al., 1988, Ibarra et al., 1997, Sweigart et Athanasiou, 2001).

Ein nach wie vor offenes Problem stellen die größeren Meniskusläsionen dar, bei denen oben genannte Methoden nicht mehr angewandt werden können. Die einzige Möglichkeit besteht derzeit in der Transplantation eines Meniskusersatzes (Rodkey et al., 1999). Seit der ersten erfolgreichen Meniskustransplantation 1984 in München wird dieses Verfahren weltweit durchgeführt. Doch kann diese Behandlungsoption nur als eine zeitlich limitierte Methode bei jüngeren Patienten angesehen werden (Martinek et al, 2005).

Vor einer Transplantation muss die Indikationsstellung den Kontraindikationen genau gegenübergestellt werden. Die Transplantation eines Meniskus ist noch kein Routineverfahren und kann nur in speziellen Fällen durchgeführt werden. Bei Symptomen wie Schmerzen und Schwellung, die durch ein meniskusdefizientes tibiofemorales Kompartiment entstanden sind, bei Varus- Valgus- Instabilität mit Knorpelschaden, bei vorangegangenen Meniskusverletzungen oder Teilresektionen, sowie bei dem Ersatz des vorderen Kreuzbandes kann ein Meniskus transplantiert werden. Eine fortgeschrittene Knorpeldestruktion und eine unkorrigierte Knieinstabilität oder Achsenabweichung stellen die Kontraindikationen dar (Rodeo, 2001).

Als Meniskusersatzmaterialien stehen derzeit Autografts, Allo-grafts und Scaffolds zur Verfügung.

5.1.1 Autografts als Meniskusersatz

Unter Autografts versteht man Gewebe, das einem Individuum entnommen wird, um es ihm selbst an anderer Stelle zu transplantieren. Das Individuum ist also sein eigener Spender. Einige Autoren erwähnen die Autografts auch im Zusammenhang mit natürlichen Scaffolds (siehe unten).

Cook et al. (2001) setzten einen grossen Defekt im medialen Meniskus von Hunden und implantierten an der Stelle des Defekts small intestinal Submukosa. Die Kontrolle per Ultraschall zeigte keinen Unterschied zu normalem Meniskugewebe. Histologisch wurde Kollagen mit der typischen Zonenausrichtung nachgewiesen. Die Autoren bezeichnen das Ergebnis ihrer Studie als erfolgversprechend und fordern mehr Arbeit im Bereich von Studien zu Meniskektomien sowie zu postoperativen Stabilisationstechniken.

Bruns et al. (1998) verwendeten in ihrer Studie autologes Knorpelgewebe als Meniskusersatz, welches sie 18 Schafen nach kompletter medialer Meniskektomie implantierten. Die Opferung wurde nach drei, sechs und zwölf Monaten durchgeführt und die Transplantate makroskopisch, histologisch und biomechanisch

untersucht. Makroskopisch ähnelten sie einem normalem Meniskus, mikroskopisch war eine normale Kollagenfaserorientierung zu beobachten, die aber zentral durch Kalzifizierungen unterbrochen war. In den biomechanischen Tests waren die Explantate weit unter den Anforderungen eines normalen Meniskus.

Kohn et al. (1992) ersetzten die medialen Meniski von 20 Schafen durch ein Sehnenautograft der Patellarsehne. Mikroskopisch war ein Remodelling zu erkennen, aber die biomechanischen Eigenschaften wie Stressabsorption und Zugeigenschaften waren schlechter als in einem normalem Meniskus.

Als weitere Sehnenautografts wurden noch Achillessehnen (Hokama et al., 1995) und Quadricepssehnen (Peters et al., 1998) getestet. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht groß von denen der Patellarsehnentransplantation. Diese Möglichkeiten zeigen zwar vielversprechende Ansätze, werden aber von den Autoren selbst nicht empfohlen.

Kohn et al. (1997) transplantierten anstelle eines Meniskus ein Fettpolster. Dieses Verfahren kommt aus dem Bereich der Wiederherstellungschirurgie. Diese Methode stellte sich als ungeeignet heraus.

Vorteile des körpereigenen Gewebes als Meniskusersatz sind die leichte Verfügbarkeit und der geringe finanzielle Aufwand sowie das Fehlen immunologischer und hygienischer Probleme (Kohn, 1994, Messner et al., 1999). Als Nachteil muss im Zeitalter der minimal invasiven Chirurgie der große Weichteileingriff angesprochen werden, der bei der Autograftentnahme entsteht (Messner et al., 1999, Martinek et al., 2000).

Man kann zusammenfassen, dass die Autografttransplantation positive Ansätze aufzuweisen hat, sich aber nicht durchsetzen wird, da die Transplantate morphologisch weit entfernt von normalem Meniskusgewebe sind. Sie begünstigen weder die Gelenkstabilität noch verhindern sie degenerative Schäden (Stone, 1996). Zusätzlich entsteht ein Trauma durch die Entnahme des Autografts.

5.1.2 Allografts als Meniskusersatz

Unter einem Allograft versteht man die Transplantation eines Organs oder Gewebes von einem Individuum zu einem anderen der gleichen Spezies mit unterschiedlichem Genotyp.

Im Bereich der Allografts wurden zahlreiche experimentelle und klinische Studien durchgeführt. Sie unterscheiden sich in der Spezies der Spender und in der Aufbewahrungsmethode von der

Arbeit mit Allografts. Es werden frische und tiefgefrorene (Verdonk et al., 1994), gefriergetrocknete (Arnoczky et al., 1990, deBoer et Koudstaal, 1994), kältekonservierte und Glutaraldehydkonservierte Allografts verwendet (Kohn, 1994, Kuhn et Wojtys, 1996, Messner et al., 1999).

Milachowski et al. (1994) implantierten im Rahmen einer tierexperimentellen Vorstudie ein lyophilisiertes γ -Strahlen sterilisiertes und ein tiefgefrorenes Allograft in insgesamt 30 Schafe. Der Beobachtungszeitraum betrug sechs, zwölf, 24 und 48 Wochen. Die Auswertung erfolgte histologisch, mikroangiographisch, biomechanisch und rasterelektronenmikroskopisch. In beiden Gruppen wurde ein vollständiges Einheilen der Meniski beobachtet. Die histologische Untersuchung zeigte einen kompletten Umbau des lyophilisierten Meniskus in einen bindegewebigen Ersatzmeniskus, der tiefgefrorene Meniskus war vollständig, aber ohne zellulären Umbau eingehilt. Die biomechanische Untersuchung ergab auch nach 48 Wochen keine dem normalen Meniskus identische Stabilität. In beiden Fällen fand eine Größenreduktion der Transplantate statt.

Die klinische Anwendung erfolgte von 1984 bis 1986 an 23 Patienten. Die Transplantation der Allografts erfolgte in Verbindung mit dem Ersatz des vorderen Kreuzbandes. Neben klinischen Kontrolluntersuchungen fanden bei 19 Patienten postoperative Arthroskopien statt. Operationsspezifische Komplikationen traten nicht auf. Beide Transplantate erlitten eine Größenreduktion. Die tiefgefrorenen Transplantate zeigten in der Regel gute bis sehr gute Ergebnisse. Es bestand jedoch theoretische Möglichkeit der Krankheitsübertragung. Bei den lyophilisierten Transplantaten waren die Ergebnisse durch Größenreduktion teilweise bis auf Regeneratgröße beeinträchtigt.

Canham et Stanish (1986) implantierten Glutaraldehydkonservierte Meniski in Hunde. Nach einer Beobachtungszeit von zwei Monaten wurden die Allografts explantiert. Es stellte sich heraus, dass sie von Pannusgewebe umgeben waren und nicht in das umliegende Gewebe integriert waren.

Arnoczky et al. (1990) transplantierten gefriergetrocknete Allografts in Kaninchen. Die Meniski wurden in flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet. Nach diesem Vorgang waren sämtliche Zellen abgetötet. Die Implantation erfolgte anschließend. Die Auswertungen zeigten, dass sich neue Zellen in die Allografts integriert hatten. Allerdings wurde ein Verlust der Kollagenfaserorientierung bemerkt.

DeBoer et Koudstaal (1991) transplantierten einen kältekonservierten Meniskus in ein stabiles Knie. Die arthroskopische Kontrolle zeigte nach sechs Monaten einen normal grossen

Meniskus, der fest in die Kapsel integriert war. Die Biopsie zeigte zahlreiche, metabolisch aktive Chondrozyten.

Garrett et Stevenson (1991) transplantierten frische Meniskus-allografts in sechs Patienten. Bei vier Patienten konnte postoperativ eine Kontrollarthroskopie durchgeführt werden. Es zeigte sich ein komplettes Einheilen des Meniskus ohne Transplantatverkleinerung.

Die besten Ergebnisse erzielten frische Allografts, weil die extrazelluläre Matrix lebende Zellen aufweist. Ein großer Nachteil der Allografttransplantation liegt in der aufwändigen Organisation. Zwischen der Gewebeentnahme und dem Transplantationstermin darf nur ein kurzer zeitlicher Abstand bestehen. Serologische Tests werden in dieser kurzen Zeit schwierig. Zudem ist dieses Verfahren mit einem hohen Kostenfaktor verbunden (Messner et al., 1999).

Als Komplikationen wurden Wundinfektionen, unvollständiges Einheilen des Allografts (Veltri et al., 1994), vollständige Zerstörung der Allografts (Milachowski et al., 1994) und Synovitis (Veltri et al., 1994) beschrieben. Nicht zu vernachlässigen ist das seltene, aber durchaus bestehende Risiko, sich mit Hepatitis B und HIV zu infizieren (Ibarra et al., 1997, Martinek et al., 2000).

Sowohl Autografts als auch Allografts zeigten in experimentellen und klinischen Studien die Fähigkeit des Einheilens in die Peripherie. Sie verursachen keine toxischen oder immunologischen Abwehrreaktionen und zeigen das Einwandern von zahlreichen Zellen (Rodeo et al., 2000). Trotzdem konnten degenerative Gelenkveränderungen nicht verhindert werden (Aagaard et al., 1999). Im Vergleich zu meniskektomierten Knien erzielten sie jedoch signifikant bessere Ergebnisse (Veltri et al., 1994).

Die Transplantation von Auto- und Allografts ist eine mögliche Behandlungsart, doch wird sie voraussichtlich den aussichtsreicheren Methoden wie der Verwendung von Scaffolds und dem Tissue Engineering weichen müssen.

5.1.3 Scaffolds als Meniskusersatz

Die Verwendung von synthetischen Materialien als Meniskusersatzmaterial wurde von der plastischen Chirurgie und der Rekonstruktionschirurgie übernommen (Brown et al., 2000).

Für den Meniskusersatz getestet wurden viele verschiedene Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien. Sowohl synthetisch hergestellte Materialien wie Poymere, PGA (Polyglycolic Acid), PLG (Polylactide/-glycolide) und PDLA (D,D-L,L-Polylactide

Acid), als auch natürliche Scaffolds wie Kollagengerüste in verschiedenen Variationen wurden verwendet. (Arnoczky et al., 1988, Ibarra et al., 1997, Cook et al., 2001, Martinek et al., 2003).

Abhängig vom Material verfolgte man zwei unterschiedliche Therapieansätze. Der Meniskusersatz durch künstliche Scaffolds soll das meniskektomierte Knie stabilisieren und als Prophylaxe für frühe degenerative Läsionen dienen. Im Gegensatz dazu sollen kollagen-basierende Scaffolds die Bildung eines neuen Meniskus induzieren, der die gleichen Eigenschaften besitzt wie ein physiologischer Meniskus (Stone et al., 1990). Die besten Ergebnisse erzielten kollagen-basierende Scaffolds (Arnoczky, 1999).

Das CMI (Collagen Meniscus Implant) ist derzeit das erfolgreichste Scaffold, das sich nach experimentellen Ergebnissen bereits in Phase II der klinischen Tests befindet (Kohn, 1994, Stone et al., 1997, Rodkey et al., 1999, Stone, 1999, Almarza et Athanasiou, 2004). Es handelt sich um ein schwammartiges Gerüst aus hochgereinigtem Kollagen Typ I, das von Rinderachillessehnen gewonnen wird.

Stone et al. (1997) implantierten auf der Grundlage ihrer in vitro und in vivo Studien das CMI in zehn Patienten. Es wurde das Ziel verfolgt, die Implantierbarkeit des Scaffolds und seine Zuverlässigkeit sowie seine Fähigkeit zur Induktion von neuem Gewebe zu evaluieren.

Rodkey et al. (1999) implantierten das CMI in acht Patienten. Die histologischen Ergebnisse ergaben ein Einwandern von meniskus-ähnlichen Zellen, die neue Matrix produzierten. Das neu gebildete Kollagen erschien noch unreif und unorganisiert. Es gab keine Anzeichen von Entzündungszellen oder einer immunologischen Abwehrreaktion (Mueller et al., 1999). Nach der 12-Monatskontrolle war die Matrix sehr dicht und begann langsam, wie Faserknorpel auszusehen. Die Autoren schlossen aus ihren Versuchen, dass das CMI ähnlich wie ein Meniskus zu fungieren scheint, indem er die chondrale Oberfläche schützt. Es wurden auch nach 32 Monaten keine degenerativen Veränderungen dokumentiert.

Derzeit existiert kein anderes Meniskusimplantat, dessen Ergebnisse mit denen des CMI vergleichbar wären.

MRI-Kontrollen nach sechs Wochen zeigten, dass das Implantat mit neugebildetem Gewebe kleiner ist als ein normaler Meniskus. Weiterhin ließ sich feststellen, dass der Reifungsprozess auch noch ein Jahr postimplantationem aktiv ist. Das heißt, dass es mehrere Jahre dauern könnte, bis das neugebildete Gewebe die charakteristischen Eigenschaften des Faserknorpels erlangt hat.

Langzeitergebnisse sind noch nicht vorhanden. Mittlerweile klinisch und histologisch belegt, unterliegt das implantierte CMI einem langsamen Resorptionsprozess (Martinek et al., 2003, Rodkey, 2002). Das neugebildete Gewebe, das in das Gerüst einwächst, ist identisch mit Narbengewebe (Rodkey, 2002). Verantwortlich für diesen Vorgang sind die Zellen, die aus der Peripherie einwachsen und im Inneren des Gerüsts ihre Arbeit ausüben. Narbengewebe ist dem hochkomplexen Meniskusgewebe weit unterlegen (Messner, 1999). Das begründet auch die Destruktion des CMI vor allem im Hinterhornbereich. Dieser Bereich ist der stärksten Belastung ausgesetzt (Martinek et al., 2002).

Derzeit ist eine Multicenterstudie in Arbeit, an der 288 Patienten teilnehmen. Den Patienten wurde ein CMI als Meniskusersatz implantiert. Die Studie soll die Langzeiteffektivität des CMI zeigen. Ergebnisse liegen noch nicht vor.

5.1.4 Beurteilung der aktuellen Möglichkeiten im Meniskusersatz

Eine zusammenfassende Interpretation der unterschiedlichen Möglichkeiten, einen Meniskus zu ersetzen gestaltet sich äußerst schwierig, da die Studien in vielen wichtigen Faktoren stark variieren. So gibt es keine einheitliche Evaluation bei der Auswahl der Patienten, es wurden verschiedene Materialien verwendet und unterschiedliche chirurgische Techniken angewandt. Oft sind in den Studien nur kleine Fallzahlen aufgeführt und es wurde nur ein limitiertes follow-up durchgeführt (Mueller et al., 1999).

Die Transplantation von Kadavermeniski wird derzeit zwar an einigen Orthopädiezentren durchgeführt, doch wird dieses Verfahren von vielen Autoren als ineffektiv bezeichnet (Rodkey et al., 1999 und Rodeo, 2001). Sie belegen ihre Aussage damit, dass die Transplantate schrumpfen, histologisch ein unheiliches Bild mit einer unorganisierten Kollagenausrichtung auffällt und sich signifikante Veränderungen in der extrazellulären Matrix ergeben.

Autografts und synthetische Scaffolds konnten sich nicht durchsetzen. Kollagenbasierende Scaffolds bezeichnen aktuell die meisten Erfolge und sind Gegenstand vieler laufender Studien (Ibarra et al., 1997 und 2000, Setton et al., 1999, Jackson et Simon, 1999, Martinek et al., 2005).

5.1.5 Anforderungen an einen Meniskusersatz

Die Anforderungen an einen Meniskusersatz sind nach dem derzeitigen Wissensstand gewachsen, da in den letzten Jahren

viele Erkenntnisse über die Physiologie der Meniski gewonnen wurden.

Der Meniskusersatz muss als Gerüst fungieren, in das Kapillaren aus der Peripherie einsprossen können, um die Vaskularisation zu gewährleisten und Meniskuszellen einwachsen können (Adams et Muir, 1981, Stone et al., 1990).

Das physiologische und biophysikalische Milieu muss gegeben sein, um den Fibrochondrozyten die nötigen Stimuli zur Synthese von Meniskusgewebe zufügen zu können. Die neugebildete extrazelluläre Matrix muss in ihrer Zusammensetzung genau der des Meniskus entsprechen (Guilak et al., 1994, Fink et al., 2001, Shin et al., 2003).

Die für den Meniskus typische Kollagenfaserorientierung muss der des physiologischen Meniskus entsprechen (Renstrom et Johnson, 1990).

Nur wenn all diese Voraussetzungen erfüllt sind, kann der Ersatz die biomechanischen Eigenschaften des Meniskus erreichen und somit das Entstehen einer Arthrose verhindern (Bullough et al., 1970, Stone et al., 1990).

Messner et al. (1999) fordern ein gründliches Studium über die prä- und postembryonale Entwicklung des Meniskus in makroskopischer, mikroskopischer und biochemischer Hinsicht. Die physiologischen Veränderungen während der Wachstumsphase und die daraus resultierenden Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften müssen besser in die Forschungsarbeit integriert werden.

Hough et Webber (1990) fordern mehr Arbeit in der Pathologie des Meniskus, um die komplexen Mechanismen verstehen zu können.

Martinek et al. (2001) sprechen sich für eine Weiterentwicklung des Verständnisses der Biologie des Meniskus, für die Weiterentwicklung von Wachstumsfaktoren, Zellen und Scaffolds aus.

5.1.6 Tissue Engineering des Meniskus

Durch die Vielfalt der zu berücksichtigenden Faktoren geht der Trend in der Behandlung von Meniskusverletzungen zum Tissue Engineering, bei dem alle oben aufgeführten Faktoren beachtet werden können (Arnoczky, 1999, Rodkey et al., 1999, Ibarra et al., 2000, Sweigart et Athanasiou, 2001). Das Tissue Engineering ist auch Gegenstand der derzeitigen Forschung (Ibarra et al., 1997 und 2000, Setton et al., 1999, Jackson et Simon, 1999, Martinek et al., 2005).

In der Arbeit mit Knochen und Knorpel erzielte das Tissue Engineering bereits grosse Erfolge (Sweigart et Athanasiou, 2001). Wenig bekannt ist dagegen der Umgang mit dem Meniskus (Ibarra et al., 2000, Walsh et al, 1999, Almarza et Athanasiou, 2004).

Der erste Versuch des Tissue Engineering am Meniskus in der Orthopädie geht zurück in das Jahr 1988, als Arnoczky und seine Kollegen versuchten, mit einem Fibrinklot die neu erkannten Meniskusheilungsvorgänge zu verbessern. Das Wissen über die in einem Blutgerinnsel enthaltenen Wachstumsfaktoren und stimulierenden Zytokine sollten die Regeneration initiieren. Der Fibrinklot wurde als Gerüst betrachtet, der eine Art Brücke zwischen den rupturierten Meniskusstellen bilden sollte. Die einsprossenden Blutgefässe sollten den Defekt ausfüllen und Zellen aus der Synovia, dem Fibrinklot und dem umliegenden Gewebe sollten den zerstörten Meniskus wieder aufbauen (Ibarra et al., 2000).

Seitdem wurden unterschiedliche Materialien getestet, um den Meniskusschaden zu decken und den Zellen als Leitschiene für das Einwandern in den Defekt zu dienen (Ibarra et al., 2000). Nachfolgende Tabelle liefert eine Übersicht über die Scaffolds, die bereits als Meniskusersatz getestet wurden.

Material	Besiedelt	Beobach- tungs- zeitraum	Versuchs- tier	Ergebnis	Referenz
Natürliche Scaffolds					
Kollagen I Schwamm	nein	24 Wo	Kaninchen	Fibröses Gewebe, deg. Veränderung	Walsh et al., 1999
Kollagen I Schwamm	Ja, MSC	24 Wo	Kaninchen	Fibröses Gewebe, deg. Veränderung	Walsh et al., 1999
Kollagengerüst	Ja	n.a.	In vitro	Anlagerung der Zellen ans Scaffold	Nakata et al., 2001
Kollagen I GAG	Ja, FCZ	3 Wo	In vitro	Zellen nur peripher des Scaffolds	Mueller et al., 1999
Kollagen II GAG	Ja, FCZ	3 Wo	In vitro	Zellen gleichmässig verteilt, guter GAG-Gehalt	Mueller et al., 1999
Kollagen I	nein	n.a.	n.a.	n.a.	Stone et al., 1992
Kollagen I	nein	n.a.	Mensch	Phase I der klinischen Tests	Stone et al., 1997
Kollagen I	nein	n.a.	Mensch	Phase II der klinischen Tests	Rodkey et al., 1999
Small intestinal Submukosa	nein	12 Wo	Kaninchen	Vielversprechende Ergebnisse	Cook et al., 1999
Perichondrales Gewebe	nein	12 Mon	Schaf	Schlechte Zueigenschaften	Bruns et al., 1998
Periosteales Gewebe	nein	24 Wo	Kaninchen	Knochen im Rep.gewebe	Walsh et al., 1999

Material	Besiedelt	Beobach- tungs- zeitraum	Versuchs- tier	Ergebnis	Referenz
Synthetische Scaffolds					
Carbonfiber	nein	17 Wo	Kaninchen	Fibrose	Veth et al., 1983
PGLA	ja	6 Wo	Schaf	Organisierte Kollagenmatrix, guter PG-Gehalt	Ibarra et al., 2000

Tab. 5.1: Scaffolds für Tissue Engineering am Meniskus

- FCZ: Fibrochondrozyten
- MSC: mesenchymale Stammzellen
- GAG: Glkosaminoglykane
- PG: Proteoglykane

Die aktuellen Studien zum Thema Tissue Engineering am Meniskus werden im folgenden beschrieben:

Ibarra et al. (1997) isolierten Fibrochondrozyten vom Kalb und besiedelten ein PGA-Scaffold und ein Alginat Gel. Diese Zell-Polymerkonstrukte implantierten sie subkutan für vier, acht und 16 Wochen in Mäuse in der Nähe eines Blutgefäßes. Die Auswertung erfolgte makroskopisch und histologisch (Hämatoxylin-Eosin-, Trichrom-, Safranin-O-Färbung). Die Ergebnisse verglichen sie mit dem Gewebe eines normalen Meniskus. Die 4-Wochen Kontrolle zeigte ein Wundheilungsgewebe. Nach acht Wochen schien das Gewebe mehr organisiert und faserknorpelig zu sein, nach 16 Wochen erinnerte die fibröse Matrix an Meniskusgewebe. Die Autoren selbst forderten biochemische Tests und Auswertungen, um die Zellen und das neugebildete Meniskusgewebe zu charakterisieren.

Auf dieser Basis führten sie ein großes Tiermodell durch (Ibarra et al., 2000) Sie entnahmen die Meniski von fünf Schafen und isolierten die Fibrochondrozyten. Die Zellen wurden in ein PGA oder PGLA Scaffold infiltriert und fünf bis sieben Tage kultiviert, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, sich an die Polymerfasern anzulagern. Die Zell-Polymerkonstrukte wurden für vier Wochen subkutan in die Schafe implantiert, wieder entfernt und als Meniskustransplantat in offener parapatellarer Arthrotomie ans Vorder- und Hinterhorn mit absorbierbaren Fäden genäht. Sechs Wochen posttransplantationem wurden die Tiere geopfert, die Scaffolds entnommen und sofort tiefgefroren. Die Auswertung erfolgte makroskopisch und histologisch. Die Ergebnisse waren erfolgversprechend, doch wieder forderten die Autoren die Charakterisierung des neuen Gewebes durch eine analytische Auswertung.

Walsh et al, (1999) führten eine Studie durch, in der sie die Regeneration von Meniskusverletzungen am Kaninchenmodell untersuchten. Sie setzten eine künstliche Läsion am medialen Meniskus. Eine Gruppe blieb unbehandelt, eine zweite Gruppe erhielt ein periosteales Autograft, einer dritten Gruppe wurde ein Kollagen Typ I Schwamm implantiert und die vierte Gruppe erhielt diesen Kollagenschwamm mit autologen, kultivierten mesenchymalen Stammzellen. Gruppe 1 zeigte eine unvollständige Reparatur mit ersten degenerativen Veränderungen am Kniegelenk, in Gruppe 2 wurde eine Differenzierung in Knochengewebe und hyalinen Knorpel beobachtet, Gruppe 3 wies ein Narbengewebe auf. In Gruppe 4 konnte vermehrtes Reparaturgewebe dokumentiert werden, in dem Faserknorpel erkennbar war. In allen Gruppen waren degenerative Veränderungen erkennbar.

Mueller et al. (1999) besiedelten ein Kollagen Typ I, -II und - Glykosaminoglykan-Scaffold mit Fibrochondrozyten vom Kalb in vitro und untersuchten die Proliferationsfähigkeit und die biosynthetische Aktivität dieser Zellen. Sie erhielten einen guten Gehalt an Glykosaminoglykanen und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Scaffold.

Nakata et al. (2001) zeigten in ihrer Studie, dass sich kultivierte humane Meniskuszellen in einen porösen Kollagenschwamm integrierten.

Die Ergebnisse der laufenden Studien zeigen, daß das Tissue Engineering eine wirksame Möglichkeit zur Entwicklung eines langfristigen Meniskusersatz werden könnte. Dennoch ist noch kein Verfahren ausgereift, um mit den Ergebnissen zufrieden zu sein. Die aktuellen Studien sind zum Teil nur in vitro durchgeführt worden. In den in vivo Studien wurde die Beobachtungszeit häufig sehr kurz angesetzt (Arnoczky, 1999). In dieser kurzen Zeit kann das komplexe Faserknorpelgewebe des Meniskus nicht entwickelt werden (Goble et al., 1999, Messner, 1999, Sweigart et Athanasiou, 2001). Weiterhin sind die explantierten Regenerate nicht auf ihren Anteil an extrazellulärer Matrix analysiert worden.

5.2 Interpretation der Ergebnisse

5.2.1 Studiendesign

Basierend auf der Grundlage der bestehenden Arbeiten über das Tissue Engineering am Meniskus ist die vorliegende Arbeit entstanden. Von besonderer Wichtigkeit erschien die Berücksichtigung der Faktoren, die von den Autoren gefordert werden. Dabei handelt es sich um die detaillierte Auswertung der Zusammensetzung der Meniskusregenerate bezüglich ihrer extrazellulären Matrix sowie um biomechanische Tests (Ibarra et al., 2000, Almarza et Athanasiou, 2004, Walsh et al., 1999, Mueller et al., 1999).

Schon mehrere Studien berichten über die Bestimmung der Matrixproteine, doch diese Studien wurden entweder in vitro oder an einem Allograft durchgeführt (Cook et Tomlinson, 2001). Vor allem die Markerproteine des Meniskus, Kollagen und Glykosaminoglykane, spielen im Nachweis eine essentielle Rolle.

Das CMI, ein Kollagengerüst, das bereits klinisch Anwendung gefunden hat, wurde mit autologen Fibrochondrozyten der Versuchstiere Schaf besiedelt und sechs Wochen in Kultur gehalten. Nachdem die Adhäsion der Zellen ans Scaffold mikroskopisch bestätigt war, wurden die Zell- Scaffold-Kon-

strukturierte nach einer medialen Meniskektomie in die Versuchstiere implantiert. Die Opferung erfolgte drei und sechs Monate nach der Implantation. Als Kontrolle diente eine Gruppe, die als Meniskusersatz ein unbesiedeltes Scaffold erhielt und eine andere Gruppe, die nur meniskektomiert wurde.

Die Auswertung erfolgte makroskopisch, histologisch und immunhistochemisch, analytisch und biomechanisch. Die analytische Auswertung beinhaltete die Bestimmung des Gesamtkollagengehalts sowie des Glykosaminoglykangehaltes, die Bestimmung des spezifischen Anteils von Kollagen Typ II, die Bestimmung des Wassergehaltes und die Überprüfung der Aktivität der Fibrochondrozyten.

Dies ist die erste Studie über das Tissue Engineering am Meniskus, das an einem großen Tiermodell durchgeführt wurde.

Die Kulturdauer von sechs Wochen wurde gewählt, um den Fibrochondrozyten ausreichend Zeit zu gewähren, sich an das Scaffold anzulagern. Gefestigt wird dies durch das Ergebnis von Verbruggen et al. (1996) in einer Studie zur Implantation von Allografts. Darin stellten die Autoren fest, dass die Meniski vor der Implantation für mindestens zwei Wochen kultiviert werden sollten. Erst ab diesem Zeitraum kann die Produktivität der Zellen vorausgesetzt werden. Auf die subkutane Implantation, die Ibarra et al. (2000) anwendeten, wurde verzichtet, weil sich in den Vorversuchen zur Kultivierung der Fibrochondrozyten herausstellte, daß die Zellen nach sechs Wochen optimal integriert waren (Nitschke, 2006). Desweiteren wurde besonderen Wert darauf gelegt, die Zellen sofort in ein physiologisches biophysikalisches Milieu zu übertragen, das sie bei der Implantation in die Versuchstiere erhielten.

Im Hinblick auf die fehlenden Langzeitstudien wurde der Beobachtungszeitraum bewusst länger angesetzt als sechs Wochen. Mit drei und sechs Monaten sollten die autologen Zellen so weit in den normalen Gelenkkomplex integriert sein, dass sie ihre Produktion von extrazellulärer Matrix aufgenommen haben.

Ein weiterer entscheidender Punkt bei dem Design dieser Studie war die Größe der Fallzahl. Da die meisten Studien zu diesem Thema nur eine sehr geringe Anzahl an Versuchstieren aufzuweisen hatten, wurden hier 39 Tiere beobachtet, um für die Ergebnisse eine möglichst große Breite zu erhalten.

5.2.2 Schafe als Versuchstiere in der Kniegelenksforschung

Um den menschlichen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurde bei der Wahl der Versuchstiere besonderer Wert darauf gelegt, dass die Biomechanik des Kniegelenkes mit der des

Menschen vergleichbar ist. Dafür kamen Rinder und Schafe in Frage. Diese Spezies eignen sich am besten für mechanische Studien (Sweigart et Athanasiou, 2001). Blickt man zurück, kann man unschwer erkennen, dass sich vor allem Schafe in der Kniegelenksforschung durchgesetzt haben (Mandl, 1929, Milachowski et al., 1989, Kohn et al., 1992, Milachowski et al., 1994, Spindler et al., 1995, Bosch et al., 1998, Ibarra et al., 2000). Weitere Vorteile bei Schafen in der Kniegelenksforschung sind die akzeptablen Haltungskosten im Vergleich zu Rindern, die vergleichbare Anatomie und Größe zum Menschen, die Anwendung der gleichen Operationstechniken und das ähnliche Bewegungsmuster.

5.2.3 Entlastung bei Schafen

Zur Begünstigung der Einheilung des Scaffolds muss das operierte Gelenk entlastet werden. Die Entwickler des CMI geben eine dreiwöchige Vollentlastung an. Bis zur sechsten Woche soll nur teilbelastet werden, anschließend ist eine Vollbelastung erlaubt (Rodkey et al., 1999). Zur postoperativen Entlastung bei Schafen hat sich die Achillessehnenresektion als gängige Methode durchgesetzt (Milachowski et al., 1994, Bruns et al., 2000).

Um die Entlastung zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Achillessehnenresektion durchgeführt. Der Operationsaufwand war nur circa fünf Minuten länger als die eigentliche Operation, es traten keine Wundheilungsstörungen auf und nach acht Wochen konnten alle Tiere wieder ohne Einschränkung vollbelastet werden.

5.2.4 Anwendung am medialen Meniskus

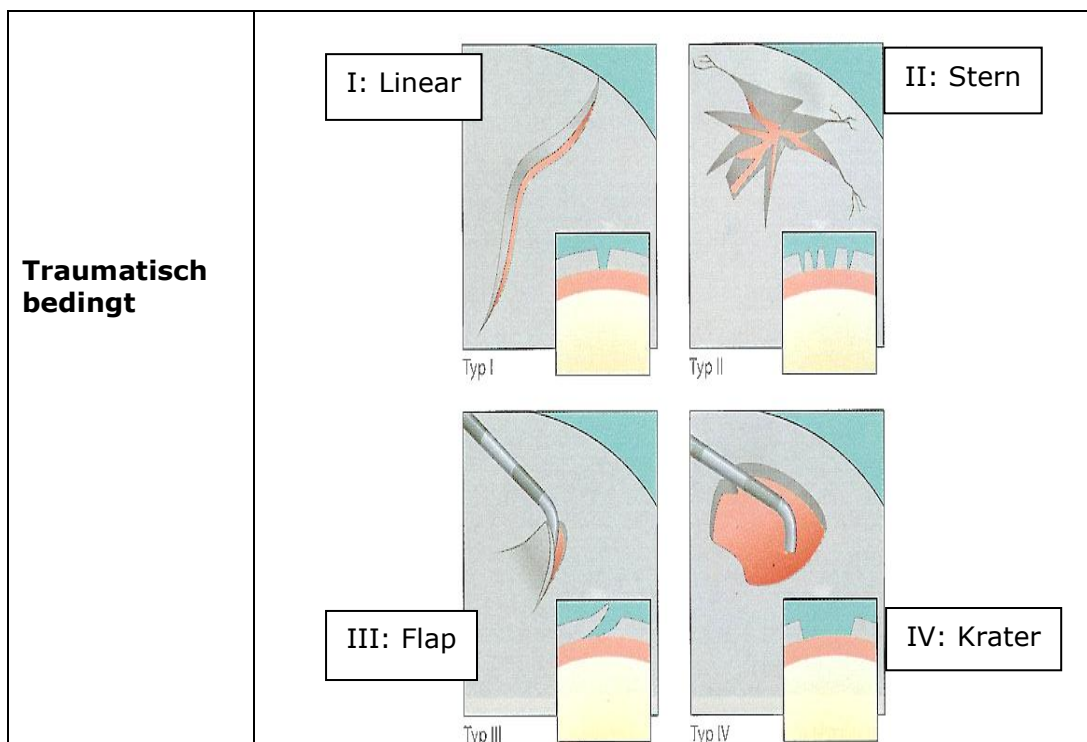
Die häufige Anwendung bei der Transplantation am medialen Meniskus ist darauf zurückzuführen, dass das mediale Kompartiment öfter betroffen ist als das laterale (Verdonk et al., 1994). Der Ersatz des lateralen Meniskus befindet sich noch tiefer im experimentellen Stadium als der Ersatz des medialen Meniskus (Kohn, 1994). Zunächst muss eine Möglichkeit gefunden werden, den medialen Meniskus erfolgreich zu ersetzen, bevor dies beim lateralen Meniskus versucht wird. Das wird auch von anderen Studien bestätigt, die sich auf den Ersatz des medialen Meniskus konzentrieren (Milachowski et al., 1989, Walsh et al., 1999).

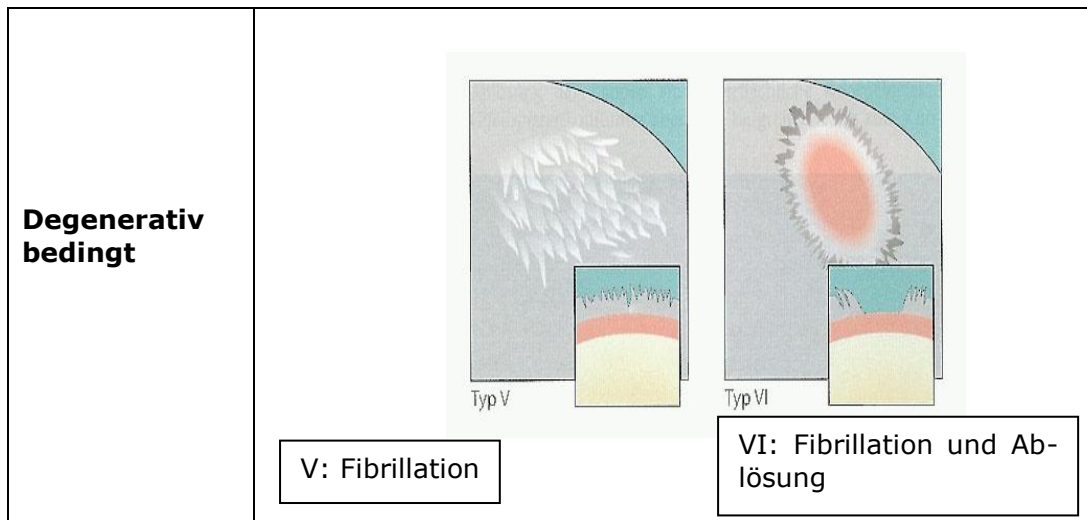
5.2.5 Operationstechnik zur Implantation des Scaffolds

Zur Transplantation von Meniski haben sich mehrere Techniken durchgesetzt: die Arthrotomie mit einem Knochenblock zur Befestigung des Transplantates an das Vorder- und Hinterhorn zur Bildung einer Knochenbrücke, die Arthroskopie ohne Knochenblockbefestigung und eine Kombination aus beiden Methoden (Kuhn et Wojitys, 1996). Bisher ist die Arthrotomie die am häufigsten angewandte Operationstechnik zur Transplantation von Meniski (Milachowski et al., 1994). Dies ist begründet in der leichteren Handhabung während der Operation und mit dem niedrigeren Kostenaufwand im Vergleich zur Arthroskopie. Doch fordern einige Autoren die Umstellung zu minimal invasiven Operationsverfahren, um den Gewebedefekt gering zu halten und das physiologische Milieu des Kniegelenkes so wenig wie möglich zu beeinträchtigen (Veltri et al., 1994, Martinek et al., 2000).

5.2.6 Makroskopische Beurteilung der Explantate

Zur makroskopischen Beurteilung der tissue engineerten Meniski wurden die Knorpelläsionen am Femur und an der Tibia herangezogen. Die Einteilung erfolgte nach Bauer und Jackson (1988), die die Knorpeldefekte bezüglich ihrer Genese in traumatische und degenerative Läsionen einteilen.





Tab. 5.2: Einteilung der Knorpeldefekte nach Bauer und Jackson, 1988, aus Strobel, 1998

In der Gruppe der tissue engineeringten Meniski wurden weniger Knorpelschäden im medialen Kompartiment beobachtet wie in der Gruppe der unbesiedelten Scaffolds. Die Bildung eines Regenerats nach Meniskektomie wurde in einigen Fällen in der Gruppe der meniskektomierten Schafe registriert, was schon aus Studien mit Kaninchen und Hunden bekannt ist (Walsh et al., 1999). Nach der Entfernung der Meniski bildet sich durch das Einbluten aus perimeniskalen Gefäßen ein Fibrinclot, der als Scaffold für das Einwandern von Zellen aus Kapsel und Synovia dient (Cook et al., 1999, Walsh et al., 1999). Palpatorisch sind die Regenerate aus Gruppe 3 den explantierten CMI-Scaffolds aus Gruppe 1 und 2 qualitativ stark unterlegen.

5.2.7 Bedeutung der Fibrochondrozyten

Die Kenntnis der biologischen Eigenschaften der Fibrochondrozyten bildet die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden für einen Meniskusersatz (Webber, 1990). Der Ursprung zur Erforschung des Knorpelgewebes in Kultur liegt 90 Jahre zurück und wurde von Carrell und Burrow im Jahr 1910 beschrieben. Die entscheidenden Fortschritte im Umgang dieser Zellen ist Webber und Kollegen zu verdanken. Sie führten den Begriff der Fibrochondrozyten für Meniskuszellen ein. Sie zeigten, dass Fibrochondrozyten proliferationsfähig sind und Matrix produzieren, wenn sie einem physiologischen Milieu ausgesetzt sind. Weder das Alter noch das Geschlecht der Versuchstiere haben einen Einfluss auf die Produktivität und die Synthese-eigenschaften der Fibrochondrozyten (Webber et al., 1985).

5.2.8 Histologische Auswertung

Die Histologie bestätigte ein dem physiologischen Meniskus ähnlicheres Erscheinungsbild in der Gruppe der besiedelten CMIs im Vergleich zu den unbesiedelten und meniskektomierten Gruppen. Eine niedrigere Zahl an Fibrochondrozyten war verbunden mit einer höheren Dichte an extrazellulärer Matrix, einer besseren Vaskularisation und Integration der Scaffolds. Die Bilder aus der meniskektomierten Gruppe erinnerten an einfaches Wundheilungsgewebe mit einer Infiltration von Entzündungs- und Reparaturzellen. Es wurden keine Anzeichen von Knorpelgewebe gefunden (Nitschke, 2006).

5.2.9 Immunhistochemische Auswertung

Zusätzlich zu den gängigen histologischen Färbungen wurde die Immunhistochemie angewandt, um selektiv Kollagen Typ I und II sowie Makrophagen darzustellen.

Gerade für die spezielle Fragestellung zur Darstellung bestimmter immunreaktiver Proteine wird die Immunhistochemie häufig verwendet. Das Prinzip besteht in der Anfärbung der antigentragenden Struktur mit Antikörper-Farbkomplexen (Noll, S. 2000). Auch im Bereich des Tissue Engineering am Meniskus fand die Immunhistochemie bereits Anwendung. Cook et Tomlinson (2001) wiesen in ihrer Studie Kollagen Typ I und II immunhistochemisch nach, um die in ihrer Arbeit verwendeten Grafts (Porcine Small intestinal Submukosa an Hunden) mit normalem Meniskus vergleichen zu können.

Da das CMI ausschließlich aus Fasern des Kollagentyp I hergestellt wurde, wurde das Kollagen Typ II ausgewählt, um die Verteilung der neugebildeten Kollagenfasern darzustellen. Kollagen Typ I sollte nachgewiesen werden, um die prozentuale Verteilung von Kollagen Typ I und II aufzuzeigen. Um eine Aussage treffen zu können, ob im Rahmen unserer Versuche Entzündungen entstanden sind, die makroskopisch und histologisch nicht zu beurteilen waren, sollten Makrophagen nachgewiesen werden. Makrophagen sind zum einen an Entzündungsprozessen beteiligt, zum anderen weisen sie phagozytische Eigenschaften auf (Böcker, 2001).

Aufgrund des geringen Angebotes an Antikörpern für die Spezies Schaf konnte nur das Kollagen Typ II nachgewiesen werden, bei dem eine Kreuzreagibilität von Mensch auf Schaf möglich war. Es wurde eine neue Methode zur immunhistochemischen Darstellung von Kollagen Typ II im Schafsmeniskus etabliert. Bei den Vorversuchen zu Kollagen Typ I und Makrophagen gelang diese Übertragung nicht. Die Hauptprobleme lagen in der Wahl

der Versuchstiere sowie des Einbettungsmediums. Die in der Immunhistochemie gängige Darstellung von Makrophagen findet zum Großteil an Menschen und Kaninchen statt. Die biomechanischen Vorteile, die sich in vorliegender Studie durch die Wahl des Versuchstieres Schaf ergaben, erschienen wichtiger als die immunhistochemische Darstellung von Makrophagen. Weiterhin wurden Paraffinschnitte zugunsten der Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin, Alcian Blau und Van Giesson angefertigt. Für die für die Immunhistochemie gängigere Methode der Kryoschnitte wären mehrere Antikörper zur Verfügung gestanden.

Bei der Auswertung der Kollagen Typ II-Immunhistologien ging man davon aus, daß sämtliches Kollagen Typ II neugebildet oder von peripher eingewandert sein mußte, da das CMI nach Herstellerangaben ausschließlich aus Kollagen Typ I synthetisiert wurde. Diese Annahme wurde durch das Tissue Array bestätigt, bei dem Sehngewebe als Negativkontrolle fungiert. In den Versuchen zeigte sich immer ein negatives Farbergebnis. Eine stärkere Kollagenisierung entspricht demnach einer vermehrten Kollagenbildung. Weiterhin wurde die Verteilung der Kollagenfasern bezüglich ihrer Lage beurteilt. Eine diffuse, das heißt gleichmäßige Verteilung der Kollagenfasern im Präparat spricht für eine homogene Lage der kollagenproduzierenden Zellen.

In der Gruppe 1 war die Intensität der Färbungen variabler als in Gruppe 2 und 3, das Spektrum reichte von stark bis gering. In Gruppe 2 und 3 war es nur mittelgradig. Man kann annehmen, dass durch das Tissue Engineering das Kollagen Typ II stabiler, beziehungsweise besser anfärbbar war. Die Verteilung des Kollagen Typ II war in Gruppe 1 bevorzugt diffus. Durch das Besiedeln des Scaffolds mit Zellen wurde eine homogene Verteilung der Zellen erreicht. Dementsprechend war ihr Produkt, das Kollagen II, besser verteilt. In den Gruppen 2 und 3 lag das Kollagen Typ II mehr fokal, das heißt zusammengedrängt an einer Stelle. Die Zellen hatten sich zu Zellnestern zusammengelagert. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass durch das Besiedeln der Scaffolds mit Fibrochondrozyten eine homogene Verteilung der Zellen erreicht werden konnte. Die homogene Verteilung der Fibrochondrozyten und folglich die diffuse Verteilung ihres Produktes, dem Kollagen, ist essentiell für die biomechanischen Eigenschaften des Meniskus.

5.2.10 Analytische Auswertungen

Als Hauptbestandteil des Meniskus nehmen die Matrixproteine Kollagen und Glykosaminoglykane den wichtigsten Stellenwert ein, da sich die Kompressions- und Zugfestigkeit des Meniskus aus der Interaktion von Kollagen-Glykosaminoglykan-Komplexen sowie dem Wassergehalt ergibt (Favenesi et al, 1983, Yannas, 1972, Stone et al., 1990). In der vorliegenden Studie soll gezeigt werden, wie sich der prozentuale Anteil der Matrixproteine im tissue engineeren Gewebe im Vergleich zum nicht tissueengineerten Gewebe verhält. Man ging davon aus, daß ein höherer Anteil an Matrixproteinen einer aktiveren Produktion der Fibrochondrozyten entspricht.

Die quantitativen Messungen für Kollagen und Glykosaminoglykane wurden für alle drei Gruppen durchgeführt. Der Aussagewert der Gruppe 3 ist gering, da schon makroskopisch große Unterschiede zu den anderen zwei Gruppen auffielen. Die Regenerate hatten ein minderwertiges Erscheinungsbild und erschienen sehr weich, wohingegen die Regenerate der Gruppen 1 und 2 meniskusähnlich waren. Dies legte den Schluss nahe, dass sowohl die Zellen als auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix komplett unterschiedlich zu den Meniskusregeneraten sein müssen. Die verwendeten Messverfahren waren ausschließlich für die Proteine der extrazellulären Matrix etabliert und sind hochspezifisch. Bei der Auswertung der Regenerate aus Gruppe 3 zeigten sich unwahrscheinlich hohe Werte, die eine Richtigkeit fast ausschließen lassen. Es ist wahrscheinlich, daß in Gruppe 3 nicht die gewünschten Proteine nachgewiesen wurden, sondern andere Proteine, die mit den Messmethoden reagierten.

5.2.10.1 Gesamtkollagengehalt im Explantat

Noch bis in die 80er Jahre war es sehr aufwändig und zeitintensiv, den Kollagengehalt in einem Gewebe zu bestimmen, da dies allein durch Identifizierung von einzelnen Aminosäuresequenzen durchgeführt werden konnte (Cheung, 1987). Mittlerweile wurden einfachere Methoden entwickelt, bei denen durch die Bindung von Kollagen mit einem Farbstoff dieser Komplex spektrometrisch erfasst werden kann. Seitdem wandte man die quantitative Messung von Kollagen immer häufiger an (Brown et al., 2000). Doch in der Definition des gesamten Kollagengehaltes ist man sich nach wie vor nicht einig. Cheung (1987) bestimmt in klassischer Weise die unterschiedlichen Kollagenstadien durch verschiedene Extraktionsmedien. Die Messung des pepsin-löslichen Kollagens erfolgt durch 48-

stündige Extraktion mittels Pepsinlösung (2 mg/ml in 0,5 M Essigsäure). Dieser Anteil entspricht dem neugebildeten Kollagen, das noch keine Crosslinks gebildet hat. Um auch den Anteil des crosslinked Kollagen zu erhalten, wird das restliche unlösliche Gewebe mit 6N Salzsäure bei 108°C über Nacht gekocht. Im Gegensatz dazu definieren Eyre et Wu (1983) und Brown et al. (2000) den Kollagengesamtgehalt als den Gehalt, der durch Salz, Säure und Pepsin löslich ist.

In dieser Studie wurde der Kollagengehalt als der Anteil des Kollagens betrachtet, der noch keine crosslinks gebildet hat (vgl. 2.1). Weiterhin ging man davon aus, dass das Kollagen Typ I, aus dem das CMI besteht, nicht löslich ist. Sonst hätten die Ergebnisse in den Vorarbeiten einen weitaus höheren Gehalt an Kollagen ergeben müssen. Auf die Bestimmung des Gehaltes des unlöslichen Kollagens wurde verzichtet, da die Vorversuche, bei denen das Kollagen durch langes Kochen in Gelatine überführt werden sollte, keine validen Messergebnisse ergaben. Es blieb immer ein unterschiedlich großer Rest an unlöslichem Kollagen übrig. So hätte man wieder nur einen unspezifischen Teil des Kollagens erhalten.

Die Extraktionslösungen unterschieden sich nur in wenigen Parametern und hatten keinen Einfluss auf die Kollagenextraktion (Eyre et Wu, 1983, Cheung, 1987, Brown et al., 2000).

Cheung (1987) unterteilte den Gehalt des Kollagens in zwei weitere Bereiche: das innere Drittel mit 70% Kollagen, davon 34% pepsin-löslich und die äußeren zwei Drittel des Meniskus mit 80% Kollagen, davon weniger als 20% pepsinlösliches Kollagen. Diese detaillierte Unterteilung war in der Studie nicht umsetzbar, da die explantierten Scaffolds nicht die nötige Größe aufwiesen, um noch eine zweigeteilte Messung durchführen zu können.

Der Mittelwert des Kollagengehaltes in Gruppe 1 liegt mit knapp 28% etwas über dem von Gruppe 2 mit circa 24,5%. Das entspricht einer Steigerung von 13% gegenüber den unbesiedelten CMIs. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Zellen in den besiedelten Scaffolds aktiver sind und mehr kollagene Fasern gebildet haben. Man kann davon ausgehen, dass die Zellen durch die in-vitro Kultivierung schon sehr bald ihre Funktion als Kollagenbildner aufnehmen konnten. In Gruppe 2 mußten die Fibrochondrozyten erst aus der Peripherie einwandern und sich in den Gewebeverband integrieren, bevor sie ihre Produktivität beginnen konnten. Der extrem hohe Kollagengehalt von fast 41% in Gruppe 3 läßt vermuten, dass bei der Messung nicht nur selektiv das Kollagen mit dem Farbstoff reagierte, sondern auch andere Proteine, die das Ergebnis verfälschen. Der niedrige Kollagengehalt im nativen Schafsmeniskus von 13% ist durch

den stabilen und damit unlöslichen Kollagenkomplex erklärbar, aus dem das physiologische Meniskusgewebe besteht. Für die Kollagensynthese ist die Zeitspanne von drei bis sechs Monaten sehr kurz. In dieser Zeit sind die Kollagenkomplexe noch leichter extrahierbar als in einem „alten“ Meniskus. Man spricht von jungem Kollagen. Die Richtigkeit der Messungen wird bestätigt durch die Nullkontrollen, die an einem unbehandelten CMI mit durchgeführt wurden. Diese Negativkontrollen liefen bei allen Messungen mit und ergaben immer den Wert Null. Dies zeigt, dass die Kollagenfasern, die das Scaffold bilden, durch unsere Messverfahren nicht lösbar waren und alles lösliche Kollagen neugebildet oder von peripher eingewandert sein muss.

5.2.10.2 Gehalt von Kollagen Typ II

Das Kollagen Typ II wurde separat durch einen ELISA gemessen, um eine Differenzierung zwischen dem Typ I und dem Typ II zu ermöglichen. Bei dem Gehalt von Kollagen Typ II konnte man sicher davon ausgehen, dass dieses Kollagen neugebildet worden war, da es nicht aus dem CMI stammen konnte. Der Gehalt an Kollagen Typ II war in Gruppe 1 mit 1,82% am höchsten. Im Vergleich zu Gruppe 2 entspricht das einer Steigerung von 41%. Der hohe Gehalt an Kollagen Typ II in Gruppe 1 kann als Effektivität der Fibrochondrozyten interpretiert werden, was zeigt, dass die in vitro eingebrachten Fibrochondrozyten rasch ihre Funktion ausüben können. In Gruppe 2 ist der Gehalt wesentlich niedriger. Im Regenerat konnte fast kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden, was auf den geringen Gehalt an Fibrochondrozyten zurückzuführen ist. Diese Annahme wird durch die histologischen Präparate bestätigt. Auch bei dem selektiven Nachweis von Kollagen Typ II zeigte sich durch die Negativkontrolle, dass aus dem reinen CMI kein Kollagen herausgelöst werden konnte. Ob das Kollagen II nun neu gebildet wurde oder von peripher eingewandert war, kann nicht nachgewiesen werden. Da aber in Gruppe 1 ein höherer Wert festgestellt wurde, kann man davon ausgehen, daß durch das Tissue engineering die Zellen Kollagenfasern produzieren oder die Kollagenfasern angeregt werden, ins Scaffold einzuwandern.

5.2.10.3 Glykosaminoglykangehalt im Explantat

Wie auch die Bestimmung des Kollagens, so war auch die Bestimmung der Glykosaminoglykane sehr aufwändig und unspezifisch (Farndale et al., 1982). Mittlerweile hat sich zur Messung sulphatierter Glykosaminoglykane als Standardmolekül für die Messung der extrazellulären Matrix, die Dimethyl-methylenblau (DMB)-Methode bewährt (Farndale et al., 1986).

Man macht sich die Eigenschaft der Glykosaminoglykane zu nutze, Kationen zu binden. Taylor and Jeffree beschrieben 1969 erstmals diese Methode. Der positiv geladene Farbstoff DMB bildet mit den Glykosaminoglykanen einen Komplex, der spektrometrisch erfasst werden kann. Nachteilig hat sich ergeben, dass auch andere Anionen, wie zum Beispiel DNA, gebunden werden und eine Reaktion zeigen. Das Ergebnis war also relativ unspezifisch. Mehrere Forschungsgruppen (Farndale et al, 1986, Chandrasekhar et al., 1987) verbesserten diese Methode, indem sie andere Polyanionen ausschalteten. Von Vorteil ist die ubiquitäre Anwendung dieser Messmethode. So lassen sich die Glykosaminoglykane in arteriellen Gefäßen in gleicher Weise messen wie die Glykosaminoglykane im Knorpelgewebe (Farndale et al., 1982, Saklatvala et Sarsfield, 1983, Jubb, 1984). In vielen Studien wurde die DMB-Methode bereits angewendet (Bosch et al., 1998, Mueller et al., 1999, Brown et al., 2000, Cook et Tomlinson, 2001). In dieser Studie wurde ebenfalls mit der bewährten DMB-Methode gearbeitet und die Extraktion nach Farndale verwendet. Die Etablierung der Meßmethode mit Schafsmeniski als Probenmaterial konnte gezeigt werden. Eine Extraktion durch das Enzym Trypsin brachte keine Vorteile mit sich und wurde deswegen nicht weiter analysiert. Auf die Differenzierung in die einzelnen Glykosaminoglykantypen sowie in N- und O- sulphatierte Glykosaminoglykane verzichtete man, weil das Interesse in den biomechanischen Eigenschaften lag und nicht in der selektiven prozentualen Verteilung.

Der Mittelwert des Glykosaminoglykangehaltes in Gruppe 1 liegt mit 2,2% weit über dem Gehalt von Gruppe 2 mit 0,5%. Vergleicht man beide Gruppen miteinander, fällt eine Steigerung des Glykosamino-glykangehaltes in Gruppe 1 um den Faktor 4,6 auf. Dies zeigt deutlich, daß durch die Besiedelung mit Zellen mehr extrazelluläre Matrix gebildet wird. Der massiv hohe Anteil an Glykosaminoglykanen in Gruppe 3 mit 44,7% muss darauf zurückgeführt werden, dass die Regenerate nicht die Proteine enthielten, für die die Messmethode etabliert war. Dies zeigen auch die Werte für einen physiologischen Schafsmeniskus. Mit 4,6% entspricht dieser Wert den Angaben in der Literatur. Ein Wert, der um den Faktor 10 höher ist, muß als Messfehler angesehen werden.

Während der in vitro Phase wurden ebenfalls Glykosaminoglykanmessungen durchgeführt, bei denen keine positiven Ergebnisse zu vermerken waren. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der implantierten Scaffolds kommt man zu der Erkenntnis, dass für die Produktion von Glykosaminoglykanen nicht nur aktive Zellen notwendig sind, sondern auch das richtige physiologische Milieu, das den Zellen durch die

Implantation in die Versuchstiere gegeben wurde. Gerade beim Tissue Engineering am Meniskus ist es essentiell, den physiologischen Stimulus zu berücksichtigen.

5.2.10.4 Wassergehalt in den Explantaten

Der Wassergehalt innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte keinen Unterschied. Im nativen Schafsmeniskus war er geringer als in den drei Gruppen. Der hohe Wassergehalt zeigt die Insuffizienz des Meniskusersatzes im Vergleich zum nativen Meniskus. Je höher der Wassergehalt ist, desto weniger Widerstand kann das Transplantat den physiologischen Anforderungen entsprechen. Der physiologische Meniskus enthält 10% weniger Wasser und achtmal weniger Glykosaminoglykane als der Gelenkknorpel (Adams et Muir, 1981).

5.2.10.5 Sulphat uptake-Versuch

Zur Darstellung der Produktivität von Fibrochondrozyten ist die Verwendung von $^{35}\text{SO}_4$ eine gängige Methode, die in vielen Studien bereits Anwendung gefunden hat (Webber et al., 1986, McDevitt et Webber, 1990, Verbruggen et al., 1996). In der Gruppe der besiedelten CMI's konnte eine höhere Zellaktivität im Vergleich zu der nicht besiedelten Gruppe nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass durch die Besiedelung der Scaffolds mit Zellen deren Produktivität erhöht werden kann. Dieser erwünschte Effekt korreliert mit den Ergebnissen der Kollagen- und Glykosaminoglykanmessung. In der Gruppe 1 ließ sich jeweils der höchste Gehalt der Matrixproteine nachweisen.

5.2.11 Biomechanik

Die biochemischen Ergebnisse zeigen den Trend zum Tissue Engineering des Meniskus bei Meniskusverlust. Doch trotz den erfolgversprechenden Auswertungen zeigen die Explantate nicht die gewünschte biomechanische Stabilität und Funktion. Die post-operative Phase, in der die Tiere durch die ipsilaterale Achilles-sehnenresektion nur teilbelastet haben, resultierte in einer Verkleinerung der Kollagenscaffolds. In neun Fällen wurde sogar eine komplette Destruktion der Scaffolds beobachtet. In dieser kurzen Zeit konnte das komplexe Faserknorpelgewebe des Meniskus nicht entwickelt werden (Goble et al., 1999, Messner, 1999, Sweigart et Athanasiou, 2001).

Mit Hilfe des Druck-Relaxationsversuches wurde die verminderte Steifigkeit der Explantate aller drei Gruppen im Vergleich zum physiologischen Meniskus festgestellt. Durch die Besiedelung des Scaffolds mit den Fibrochondrozyten konnte aber eine

Verbesserung der Steifigkeit in Gruppe 1 erreicht werden (Nitschke, 2006).

5.2.12 Aufbewahrung von Materialien

Die Messungen zur analytischen Auswertung konnten aus technischen Gründen nicht unmittelbar nach der Explantation durchgeführt werden. Die CMI-Scaffolds wurden direkt nach der Explantation lyophilisiert und bei -82°C aufbewahrt, bis die Messung durchgeführt werden konnte. Dass diese Methode zur Aufbewahrung von Geweben ohne Denaturierung vonstatten geht, wurde von Arnoczky et al. bewiesen (Arnoczky et al., 1988).

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die therapeutischen Möglichkeiten nach dem Verlust eines Meniskus stellen nach wie vor ein ungelöstes Problem in der Orthopädie dar. Es wurden bislang verschiedene Materialien als Meniskusersatz getestet, bis heute konnte sich aber keine Methode durchsetzen. Das Tissue Engineering wird als eine vielversprechende Möglichkeit betrachtet.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Studie standen die Matrixproteine, Kollagen und Glykosaminoglykane im tissue engineerten Meniskus. Diese bilden zusammen mit den nichtkollagenen Matrixproteinen und Wasser die extrazelluläre Matrix des Meniskus. Durch die Eigenschaft der einzelnen Kollagenfasern, sich zu dehnen und das Gewebe zu verstärken, ist das Kollagen für die Zugfestigkeit des Meniskus verantwortlich. Die Glykosaminoglykane übernehmen durch ihre Fähigkeit, Wasser zu binden, die Aufgabe der Elastizität. Nur durch die perfekte Interaktion dieser beiden Moleküle sind die mechanischen Grundeigenschaften des Meniskus gewährleistet. Die Glykosaminoglykane sind zwischen den Kollagenfasern eingelagert und bestimmen durch ihre Viskoelastizität die Zug- und Druckfestigkeit der Kollagene. Schon geringe Schwankungen in diesem sensiblen Gleichgewicht wie beispielsweise die Änderung der Faserrichtung der Kollagene oder ein abweichender Wassergehalt, nehmen erheblichen Einfluss auf die Funktion des Meniskus. Dies macht die Entwicklung eines Meniskusersatzes so schwierig.

In dieser Studie wurde ein Kollagenscaffold, das Collagen Meniscus Implant (CMI), mit autologen Fibrochondrozyten besiedelt und in Schafe als Meniskusersatz implantiert. Nach einem Beobachtungszeitraum von drei bis sechs Monaten wurden die Scaffolds explantiert und analytisch, makroskopisch, histologisch und biomechanisch untersucht. Zum Vergleich wurde einem Teil der Versuchstiere ein unbesiedeltes Scaffold implantiert.

Die analytische Auswertung beinhaltete die quantitative Bestimmung des Gesamtgehaltes von Kollagenen und Glykosaminoglykanen durch Farbstoff-Bindungsreaktionen sowie die Bestimmung des Gehaltes von Kollagen Typ II durch einen ELISA. Weiterhin wurde der Wassergehalt berechnet sowie die Zellaktivität durch einen Sulphat Uptake-Versuch ermittelt. Immunhistochemisch wurde selektiv das Kollagen Typ II dargestellt, um den Faserverlauf von neugebildetem Kollagen deutlich zu machen.

Die ersten Versuche im Tissue Engineering am Meniskus führte die Forschungsgruppe um Ibarra im Jahre 1997 durch. Sie implantierten besiedelte Scaffolds subkutan in Mäuse, untersuchten diese nach einem Beobachtungszeitraum von 4, 8 und 16 Wochen histologisch und verglichen diese mit einem physiologischen Meniskus. Sie stellten fest, daß das Tissue Engineering am Meniskus möglich ist. Die positiven Ergebnisse in der Histologie lassen auf ein vielversprechendes zukunftsorientiertes Verfahren hoffen. In der vorliegenden Studie konnten die Ergebnisse an einem Tierversuchsmodell bestätigt werden. Die Verbesserungen, die Ibarra selbst nach der Beendigung seiner Versuche aussprach, wurden weitestgehend in vorliegender Studie berücksichtigt. Dies waren biochemische und biomechanische Tests, um die Explantate hinsichtlich ihrer Funktion und ihrer Zusammensetzung zu analysieren (Ibarra et al., 1997).

Die quantitative Bestimmung des Gesamtgehaltes an Kollagen und Glykosaminoglykanen ergab in der Gruppe der besiedelten CMIs im explantierten Gewebe einen deutlich höheren Gehalt als in den Explantaten der unbesiedelten CMIs. Der höhere Gehalt an Glykosaminoglykanen und Kollagenen zeigt, dass die Besiedelung eines Scaffolds mit autologen Zellen labortechnisch generell durchführbar ist. Auch in vivo stellt sich diese Methode als möglich heraus, was über den langen Zeitraum von der Implantation zur Explantation der besiedelten Scaffolds gezeigt werden konnte. Die implantierten Zellen haben die Möglichkeit, in dem technisch geschaffenen Milieu lange zu überleben und ihre Aufgabe als Matrixbildner auszuüben. Die Aktivität der Zellen zum Zeitpunkt der Explantation wurde durch einen Sulphat Uptake-Versuch geprüft. In der Gruppe der besiedelten CMIs stellte man eine höhere Aktivität der Zellen fest als bei den unbesiedelten CMIs. Durch das Tissue Engineering sind mehr Zellen aktiv und somit können mehr Matrixproteine produziert werden. Da die Anzahl der Explantate, die für den Sulphat Uptake-Versuch zur Verfügung standen, sehr klein war, muss diese Aussage rein qualitativ betrachtet werden. Quantitative Angaben erscheinen an dieser Stelle wenig sinnvoll.

Das tissue engierte Scaffold überzeugt durch seinen Mehrgehalt an Matrixproteinen und eine höhere Zellaktivität im Vergleich zu einem unbehandelten Scaffold. Durch das Tissue Engineering kann eindeutig eine Verbesserung des Scaffolds erreicht werden.

Zieht man einen physiologischen Meniskus zum Vergleich heran, muss man feststellen, dass das tissue engierte Gewebe noch nicht den Eigenschaften eines physiologischen Meniskus entspricht. Zum Einen weichen die Werte der Matrixproteine

noch zu stark von denen eines physiologischen Meniskus ab. Der Gesamtkollagengehalt im tissue engineeren Gewebe von 27,9% im Vergleich zu 13%, die im nativen Meniskus ermittelt wurden, läßt vermuten, dass das neugebildete Kollagen noch einen hohen Anteil an löslichem Kollagen enthielt. Das Kollagen entfaltet seine Aufgabe erst dann vollständig, wenn das frisch synthetisierte, lösliche Kollagen in seine unlösliche Form überführt wurde. Dies geschieht durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen, die zur Quervernetzung, sogenannten Cross-Links, der einzelnen Mikrofibrillen führt. Der Gehalt an Glykosaminoglykanen war in den besiedelten Scaffolds mit 2,2% deutlich niedriger als im nativen Meniskus, der einen Glykosaminoglykangehalt von 4,6% aufweist. Man muss annehmen, dass die Zellen in der Zeit der Beobachtungsphase nicht ausreichend Glykosaminoglykane produzieren konnten. Dass die Zellen aktiv waren, zeigt der höhere Wert im Sulphat-Uptake Versuch und der deutlich niedrigere Glykosaminoglykangehalt in den unbesiedelten Scaffolds. Andererseits weisen die tissue engineeren Scaffolds einen sehr hohen Wassergehalt von 83,8% auf (der normale Wassergehalt beträgt circa 74%). Peters und Smilie stellten schon 1972 fest, dass in geschädigtem Meniskusgewebe ein höherer Gehalt an Glykosaminoglykanen anfällt. Der erhöhte Wassergehalt im tissue engineeren Gewebe könnte also durch die Wasserbindungseigenschaft der Glykosaminoglykane begründet werden. Allerdings wurde bei der Bestimmung der Glykosaminoglykane ein niedrigerer Gehalt festgestellt. Die Ursache für den hohen Wassergehalt muss wohl an anderer Stelle gesucht werden und konnte in dieser Studie nicht eindeutig geklärt werden. Sicher ist, dass dieser in den biomechanischen Tests eine Rolle spielt.

Histologisch wurden die Zellmorphologie und die Kollagenfasern beurteilt. Diese beiden Parameter als Gemeinsamkeit geben Aufschluss über die Art des entstehenden Gewebes. Fibrozytenähnliche Zellen und viele kleine, frisch synthetisierte Kollagenfasern werden mit großer Wahrscheinlichkeit meniskusähnliches Gewebe bilden. Dieses Ergebnis konnte man in einem Teil der explantierten Scaffolds wiederfinden. In den verschiedenen Beobachtungszeiträumen von drei und sechs Monaten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede. Die Ursachen für ein schlechteres histologisches Erscheinungsbild liegen wohl in externen Faktoren, die weiter unten angesprochen werden. Weiterhin wurden Entzündungszeichen und die Vaskularisation beurteilt. Immunhistochemisch wurde selektiv Kollagen Typ II nachgewiesen. Mit dieser Färbung stellte man zum Einen den Teil des mit Sicherheit neugebildeten Kollagens dar, da das Scaffold ausschliesslich aus dem Kollagentyp I besteht. Zum Anderen konnte man die Verteilung und den

Faserverlauf des neu produzierten Kollagens beurteilen. Die Zugfestigkeit ergibt sich zum großen Teil aus der meniskus-typischen Faseranordnung des Kollagens. Die Beurteilung des Faserverlaufs wäre überzeugender gewesen, wenn das Kollagen Typ I dargestellt worden wäre. Dies war aus technischen Gründen nicht möglich. Der Vorteil der immunhistochemischen Darstellung gegenüber der klassischen Histologie liegt in der selektiven Darstellung eines einzigen Moleküls, das durch Gegenfärbung sichtbar gemacht wird. Alle anderen Zellen sind zwar erkennbar, treten aber in den Hintergrund. In der Gruppe der besiedelten CMI's zeigte sich eine deutlich bessere Verteilung der Kollagen Typ II-Fasern und eine höhere Dichte an Kollagen Typ II als in den unbesiedelten CMI's. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass durch das Tissue Engineering eine bessere homogene Verteilung der Kollagenfasern erreicht werden kann. Man nimmt an, dass sich dadurch die biomechanischen Eigenschaften erheblich verbessern lassen. Dies muss in Folgestudien bestätigt werden.

Das endgültige Ziel bei der Entwicklung eines Meniskusersatzes liegt darin, sämtliche biomechanische Eigenschaften eines physiologischen Meniskus zu übernehmen. Der Druck-Relaxationsversuch gibt Aufschluss über den biomechanischen Zustand der in dieser Studie tissue engineerten Scaffolds. Eine Aussage über das Ergebnis gestaltet sich schwierig, da nur sechs Explantate zur Verfügung standen. Im Vergleich zum unbesiedelten CMI hatte das Gewebe während der Implantation tendenziell an Steifigkeit verloren und an Relaxation zugenommen. Erklären kann man dieses Ergebnis damit, dass sich das neugebildete Kollagen erst einer Um- und Neubildung unterziehen muss und an Widerstand verliert, bevor sich ein festeres, widerstandsfähigeres Gewebe ausbildet (Nitschke, 2006). Einem physiologischen Meniskus sind die Scaffolds noch weit unterlegen. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse über die Matrixproteine, den Wassergehalt und den Faserverlauf der Kollagene, ist es nicht verwunderlich, dass die Scaffolds noch nicht den hohen biomechanischen Anforderungen gerecht werden können.

Dennoch ist es mit den vorliegenden Ergebnissen erstmals möglich, tissue engineerte Scaffolds anhand ihrer molekularen Zusammensetzung mit einem physiologischen Meniskus zu vergleichen.

Die Schwerpunkte der vorliegenden Studie lagen in der Bestimmung der Bestandteile der explantierten Scaffolds, allen voran die Matrixproteine Kollagen und Glykosaminoglykane, sowie der histologischen und immunhistochemischen Beurteilung als grundlegende Parameter für die Entwicklung eines

suffizienten Meniskusersatzes. Diese wichtigen Kriterien werden von externen Faktoren beeinflusst, die in hohem Ausmaß Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.

Das Versuchstier sollte in anatomischer und biomechanischer Hinsicht dem Menschen so ähnlich wie möglich sein, um realitätsgetreue Voraussetzungen zu schaffen. Das Schaf hat sich in biomechanischen Studien als Versuchstier durchgesetzt. Ein großer Nachteil ist das Liegeverhalten der Tiere. Im Schlaf flektieren sie ihre Knie maximal und üben somit einen massiven Druck auf das Meniskushinterhorn aus. Dies könnte der Grund sein, warum bei der Explantation der Scaffolds in einigen Fällen keine Implantate mehr gefunden wurden. Bei der postoperativen Nachbehandlung ist eine Entlastung des operierten Kniegelenkes für sechs Wochen essentiell. Um dies bei den Schafen zu erreichen, wurde eine Achillessehnedurchtrennung durchgeführt. Die Zeit von der Durchtrennung, die bei der Implantation der Scaffolds durchgeführt wird, bis zur Heilung der Achillessehne entspricht in etwa dem Therapieschema, das für den Menschen mit einer Meniskustransplantation entwickelt wurde. Da man bei Tieren Fehlbelastungen und Stürze nicht komplett ausschließen kann, muss man mit Überbelastungen rechnen, die sich negativ auf die postoperative Phase auswirken können.

Die Implantation des CMI erfolgt üblicherweise arthroskopisch. In dieser Studie entschied man sich wegen der Komplexität der Operation für die Arthrotomie. Diese hat zum Nachteil, dass das Hinterhorn nur schwer zugänglich ist und deswegen die Fixation in diesem Bereich nicht optimal gewährleistet ist. Die anatomisch korrekte und suffiziente Fixation der Transplantate ist aber eine wichtige Voraussetzung für eine gute Vaskularisation, die für eine optimale Versorgung der Zellen verantwortlich ist. In dieser Studie fielen mehrere Explantate auf, die nur im Vorderhornbereich integriert waren. Dieser Befund steht wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit dem Teil der schlechteren Histologien. Hierfür könnte das Operationsverfahren verantwortlich gemacht werden. Zur Beurteilung der Fixation der Transplantate stand in dieser Studie ausschließlich der makroskopische Sichtbefund zur Verfügung. Diesem Punkt wurde bislang nur wenig Aufmerksamkeit zuteil, obwohl die Beurteilung der Explantate nicht nur Aufschluss über die Fixation gibt, sondern auch über deren Beschaffenheit geben kann. Rückschlüsse auf die Fixation können die Integration und die Lage der Transplantate geben. Die Farbe und Oberfläche der Transplantate können Hinweise auf Entzündungen und degenerative Veränderungen geben.

Für Folgestudien wäre eine Arthroskopie mit posteriorem Zugang sicherlich eine Verbesserung. Ein weiterer Vorteil der Arthroskopie wäre das geringere Trauma. Das Kollateralband bliebe intakt, die Rehabilitation wäre früher möglich und das Infektionsrisiko wäre geringer. Um wichtige Informationen über die Transplantate und deren Zusammenhänge nicht zu verlieren, sollte in Zukunft eine konsequente makroskopische Beurteilung stattfinden.

Die Anzahl der Knorpeldefekte nach der Explantation war numerisch gesehen in der Gruppe der besiedelten CMI's am geringsten. Aus orthopädischer Sicht gibt es allerdings sehr viele Faktoren, die einen Knorpelschaden initiieren können. Auch unter optimalen Bedingungen konnte man, bedingt durch die Verwendung der Versuchstiere, nicht die Voraussetzungen schaffen, die man sich von der Compliance der Patienten erwartet. Somit kann man nicht mit Sicherheit behaupten, dass die Besiedelung der CMI's für die geringere Anzahl der Knorpeldefekte verantwortlich ist. Um dies statistisch nachweisen zu können, wäre eine größere Fallzahl sowie ein längerer Zeitraum nötig gewesen.

Durch die vorliegenden Schlussfolgerungen kann man erkennen, dass das Tissue Engineering eine deutliche Verbesserung der Scaffolds aufzeigt als bei einer isolierten Scaffoldimplantation. Man kann annehmen, dass das Tissue Engineering bei der Entwicklung eines Meniskusersatzes in der Zukunft eine führende Rolle spielen wird.

Schon während der *in vitro* Phase, in der die Zellen noch sehr störanfällig sind, müssten die besiedelten Scaffolds einem physiologischen Milieu ausgesetzt werden, um die Fibrochondrozyten zur Produktion extrazellulärer Matrix zu stimulieren. Die mechanische Umgebung entscheidet über die Anordnung der Proteine der extrazellulären Matrix und somit für deren biomechanische Eigenschaften. Ein Bioreaktor oder eine Biokammer, wie sie im sportorthopädischen Institut der TU München entwickelt wird, könnte dieses Problem lösen.

Um eine optimale Ausgangsposition für die Zellen vorauszusetzen, müsste ein Scaffold entwickelt werden, das die gleiche Mikrostruktur aufweist wie ein physiologischer Meniskus. Ein solches Scaffold befindet sich derzeit, ebenfalls im sportorthopädischen Institut der TU München, in Entwicklung.

Durch die Komplexität der Studie wurde deren Aufbau als Grundlagenstudie konzipiert. Aus diesem Grund wurde auf statistische Testverfahren verzichtet, da die Anzahl der Meßergebnisse keine verbesserte Auswertung der Analytik

erwarten ließ. In der Zukunft sollten in klinischen Folgestudien zwingend statistische Testverfahren eingesetzt werden.

Derzeit wurden die Transplantate nur nach der Explantation beurteilt. Interessant wäre die Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten der Implantationsphase. Dies könnte frühe Veränderungen im Transplantat sowie erste degenerative Veränderungen aufzeigen. Es gibt Studien, die sich mit der Messung der Gelenkknorpeldicke und der Früherkennung von degenerativen Veränderungen beschäftigen. Diese Methoden müssten weiterentwickelt werden, um sie im Bereich des Tissue Engineering am Meniskus einzusetzen.

Ein hochaktuelles Thema im derzeitigen Forschungsstand ist die Gentherapie. Diese in Kombination mit dem Tissue Engineering könnte eine zukunftsstragende Therapiemöglichkeit werden.

7 Zusammenfassung

Die therapeutischen Möglichkeiten nach einem Meniskusverlust bieten derzeit nur begrenzte Handlungsfähigkeit. Vor allem im Bereich der Langzeitergebnisse gibt es noch zu wenig Studien, die sich mit dieser Problematik auseinandersetzen.

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Tissue Engineering am Meniskus in Verbindung mit dem CMI (Collagen Meniscus Implant) untersucht.

Man entnahm den Versuchstieren durch eine Meniskusbiopsie autologe Fibrochondrozyten. Diese wurden im Anschluss isoliert und kultiviert, um sie in das CMI zu infiltrieren. Die auf diesem Weg entstandenen Zell-Scaffoldkonstrukte wurden nach einer randständigen Meniskektomie als Ersatz in 14 Schafe implantiert (Gruppe 1) und mit zwei Kontrollgruppen verglichen. Gruppe 2 (n=14) erhielt anstelle des besiedelten CMIs ein nichtbesiedeltes CMI, Gruppe 3 (n=9) wurde nur meniskektomiert. Nach einer Beobachtungszeit von drei Wochen (je ein Tier aus Gruppe 1 und 2) und drei bis sechs Monaten wurden die Tiere geopfert und die Regenerate untersucht.

Die Scaffolds wurden makroskopisch, histologisch und immun-histochemisch sowie analytisch und biomechanisch ausgewertet.

Zwei von 39 Tieren mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, abgesehen davon gab es im Hinblick auf die Versuchstiere keine Auffälligkeiten. Insgesamt wurden 25 Meniskusregenerate in den jeweiligen Gruppen gefunden, davon elf in Gruppe 1, zehn in Gruppe 2 und vier in Gruppe 3. Bei der makroskopischen Beurteilung der Knorpeloberfläche von Femur und Tibia fielen in Gruppe 1 weniger chondrale Defekte auf als in den anderen Gruppen. Histologisch erkannte man einen höheren Anteil an extrazellulärer Matrix und weniger Zellen in Gruppe 1. Immunhistochemisch ließ sich eine bessere Verteilung und Anfärbbarkeit der Kollagenfasern in den Präparaten nachweisen, was für ein qualitativ hochwertigeres Scaffold spricht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Besiedlung von Scaffolds zu einem höheren Gehalt an den Matrixproteinen, Kollagenen und Glykosaminoglykanen, führt. Diese Aussage wurde durch quantitative Messungen der einzelnen Moleküle bestätigt.

Eine höhere Zellaktivität, die für die Steigerung der extrazellulären Matrix verantwortlich sein musste, wurde durch einen Sulphat uptake-Test bestätigt.

Biomechanische Tests ergaben eine höhere Steifigkeit der Kollagen-konstrukte der besiedelten Scaffolds.

In vorliegender Grundlagenstudie konnte gezeigt werden, dass das Tissue Engineering am Meniskus mit autologen Fibrochondrozyten zu einer Verbesserung der Transplantate führt. In der Zukunft werden vor allem die Scaffolds optimiert und ein Bioreaktor zur Gewährleistung des physikalischen Milieus entwickelt werden müssen.

Die in der Einleitung gestellten Fragen können nun beantwortet werden:

1. Ist Tissue Engineering am Meniskus in vivo möglich?

Ja. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die wenigen bereits durchgeführten Studien zu diesem Thema. Erstmals wurde das Tissue Engineering am Meniskus an einem großen Tiermodell durchgeführt.

2. Bringt die gezielte Besiedelung eines Scaffolds mit autologen Zellen einen höheren Gehalt an Matrixproteinen als in einem Vergleichsscaffold ohne Zellbesiedelung?

Ja. Durch den quantitativen Nachweis der Matrixproteine konnte ein höherer Gehalt an extrazellulärer Matrix gezeigt werden.

3. Wird durch die Besiedelung von Scaffolds eine bessere Verteilung von Kollagenfasern erreicht?

Ja. Techniken der Immunhistochemie veranschaulichten, dass die Verteilung der Fasern gleichmäßiger erscheint als in den Kontrollgruppen.

4. Ist Tissue Engineering am Meniskus eine neue Option in der Behandlung bei Meniskusverlust?

Ja. Das Tissue Engineering am Meniskus konnte sich durch die positiven Ergebnisse bewähren und wird mit hoher Wahrscheinlichkeit in Zukunft eine bedeutende Rolle spielen.

8 Anhang

8.1 Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Kollagen Typ II mit der Konzentration 1:10

Arbeits-schritt	Durchführung
1	Schnitte der Proben und der Positivkontrollen anfertigen (Schnittdicke: 5 µm).
2	Schnitte auf Objektträger (Dako Chem Mate™, Capillary Gap Microscope, Slides (100µm) for use with the Tech Mate™ 500/1000, S 2025, Dako A/S Biotek Solutions, USA) aufkleben (Klebermischung aus Poly-L-Lysin und Prittkleber im Verhältnis 1:1).
3	Schnitte über Nacht im Brutschrank bei 58°C trocknen.
4	Schnitte entparaffinieren und entwässern in absteigender Alkoholreihe (100% Xylol, 2x 10 Minuten, 100% Isopropanol, 2x 5 Minuten, 96% Ethanol, 5 Minuten, 70% Ethanol, 5 Minuten).
5	Vorbehandlung mit Protease (8038, Sigma, Deutschland): 50 mg in 50 ml Trispuffer (Trizma® Base, T-1503, Sigma, Deutschland) lösen und Schnitte für 20 Minuten einstellen.
6	Mit Trispuffer (0,01M, pH =7,6) dreimal spülen.
7	Blockierung der Aktivität der endogenen Peroxidase: Schnitte in dreiprozentiger H ₂ O ₂ -Lösung für 10 Minuten einstellen.
8	Mit Trispuffer dreimal spülen und in Trispuffer einstellen.

Arbeits-schritt	Durchführung
9	<p>Vorbereitung des Färbeautomaten (Tech Mate™ Horizon, Dako, Deutschland):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Primärantikörper (rabbit anti-human collagen type II polyclonal antibody, AB 761, Chemicon, CA): pro Küvettenvertiefung 450µl Verdünnungsmedium und 50 µl Primärantikörper. ▪ Sekundärantikörper: pro Küvettenvertiefung 7 Tropfen des Sekundärantikörpers. ▪ Tertiärantikörper: pro Küvettenvertiefung 7 Tropfen des Tertiärantikörpers ▪ Hintergrundfärbung mit Hämalaun: pro Küvettenvertiefung 500µl Hämalaun
10	Jeweils zwei Objektträger zueinandergerichtet in Objektträgerhalter einstellen.
11	Küvetten und Objektträgerhalter in das Gerät einstellen und Programm Poly A 25 starten.
12	Nach 2 Stunden Chromogen vorbereiten: pro Küvettenvertiefung 750 µl HRP-Substrat-Puffer und 15 µl DAB.
13	Nach Beendigung des Programms Schnitte herausnehmen und in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol (2x), 96% Ethanol (2x), 100% Isopropanol (3x), 100% Xylol (5x)) entwässern.
14	Schnitte eindeckeln (Promounter® RCM 2000, Cover Slipping Machine, medite, Meisei).
15	Schnitte 10 Minuten bei 58°C im Brutschrank trocknen.

Tab. 8.1: Färbeprotokoll zur Darstellung von Kollagen Typ II

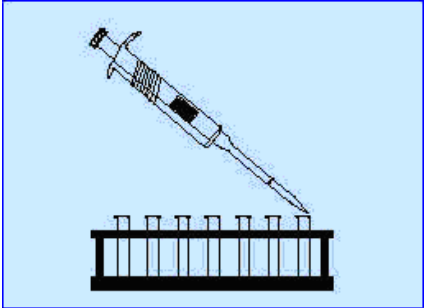
8.2 Bestimmung des Gesamtgehaltes an löslichem Kollagen

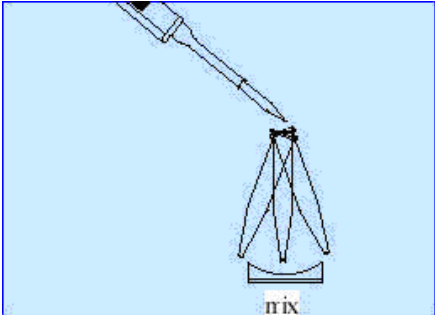
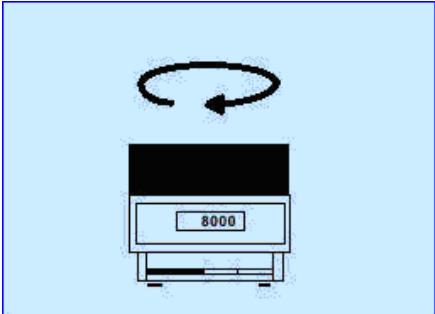
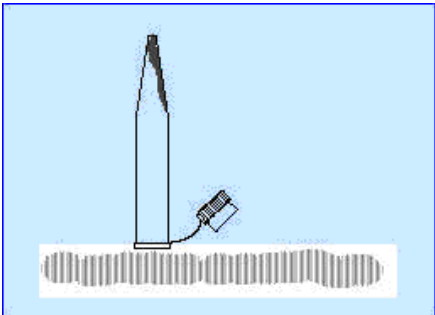
Ansetzen der Extraktionslösungen		
	Salzlösung	1 M NaCl gelöst in 0,05 M Trispuffer, pH= 7,5
	Säurelösung	0,5 M Essigsäure
	Pepsinlösung	1 mg Pepsin pro ml gelöst in 0,5 M Essigsäure
Vorbereitung der Proben		
	<ul style="list-style-type: none"> • Probengewicht bestimmen. Es sollte zwischen 5 und 10 mg liegen. • Gewicht des 15 ml Tubes, in dem die Extraktion abläuft, bestimmen. • Die Probe in H₂O schockfrieren und lyophilisieren. • Nach dem Lyophilisieren nochmals wiegen. • Mit einem Skalpell kleine Späne des gefriergetrockneten Probenstückes abhobeln. • Die Späne in 5 ml destiliertem Wasser für 5 Minuten rehydrieren. • Die Proben 5x5 Sekunden homogenisieren (Mixstab vorher und nachher ausgiebig spülen). • Die Proben kurz bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand bis auf 1 ml abnehmen. • Lyophilisieren. • Gewicht von Tube inklusive Probe bestimmen. • Tatsächliches Probengewicht bestimmen: Gewicht von Tube inklusive Probe minus Tubegewicht allein. 	
Extraktion der Kollagene		

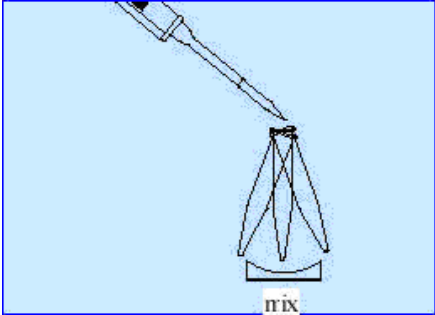
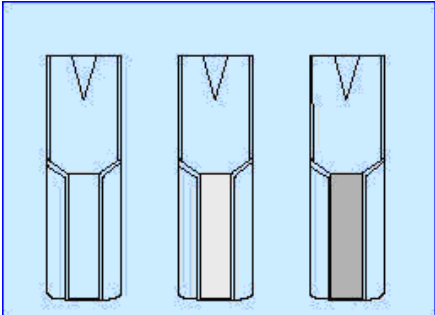
- 1 ml Salzextraktionslösung zugeben und 12 Stunden im Kühlschrank auf einem Rüttler inkubieren.
- Die Proben kurz bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand abnehmen.
 - 250 µl des Überstandes mit 250 µl Salt Soluble Collagen Precipitating Reagent für 10 Minuten mixen.
 - 10 Minuten bei 10000 RPM zentrifugieren.
 - Überstand abkippen.
 - Pellet (falls vorhanden) mit 25 µl 0,5 M Essigsäure lösen.
 - Messung gemäß Protokoll (siehe unten) durchführen.
 - als Leeransatz wird 100 µl Salt Soluble Collagen Precipitating Reagent gemessen.
- Die Proben mit 10 ml destilliertem Wasser waschen, kurz zentrifugieren und das Wasser verwerfen.
- 1 ml Säurelösung zugeben und 12 Stunden im Kühlschrank auf einem Rüttler inkubieren.
- Die Proben kurz bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand abnehmen.
 - 100 µl des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettieren und den Kollagengehalt messen (siehe unten).
 - als Leeransatz 100 µl 0,5 M Essigsäure messen.
 - der restliche Überstand wird eingefroren.
- Die Proben mit 10 ml destilliertem Wasser waschen, kurz zentrifugieren und das Wasser verwerfen.
- 1 ml Pepsinlösung zugeben und 24 Stunden im

	<p>Kühlschrank auf einem Rüttler inkubieren.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Die Proben kurz bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand abnehmen. <ul style="list-style-type: none"> ○ 100 μl des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorffgefäß pipettieren und den Kollagengehalt messen (siehe unten). ○ als Leeransatz 100 μl Pepsinlösung messen.
--	--

Messung des Kollagen - Gehaltes gemäß Sircol Protokoll (biocolor, Irland)

		<p>Vorbereitung</p> <p>Beschriften von einem Satz von 1,5 ml Mikrozentrifuge Tubes.</p> <p>Vorbereiten von</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Reagent Blank: 100 μl destilliertes Wasser oder Test Sample Buffer 2. Kollagen-Standard: Ansätze enthalten 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 5,0 μl 3. Probenmaterial: Volumen 10 bis 100 μl <p>Die Inhalte aller Proben auf 100 μl mit destilliertem Wasser oder Appropriate Buffer auffüllen.</p>
		

		<p>Mixen</p> <p>Die Tubes für 30 Minuten in einen mechanischen Mixer stellen oder 5 Minuten per Hand schüt-teln.</p> <p>Während dieser Zeitspanne bindet der Sircol-Farbstoff das gelöste Kollagen. Der Farbstoff ist so konzipiert, dass die löslichen Kollagenkomplexe aus der Lösung ausfallen.</p>
		<p>Zentrifugieren</p> <p>Die Tubes in eine Mikro-zentrifuge stellen und 10 Minuten bei 10000xg zentri-fugieren. Es ist besonders wichtig, dass sich die unlöslichen Pellets der sGAG-Farbstoff-komplexe am Boden der Tubes absetzen, damit sie beim Abkippen nicht verloren gehen.</p>
		<p>Abkippen</p> <p>Die ungebundene Farb-stoff-Lösung wird durch vorsichtiges Umdrehen der Tubes verworfen. Im Tube verbliebene Flüssigkeits-reste können durch leichtes Tippen des Tubes auf ein Papiertuch entfernt werden.</p> <p>Wichtig: Flüssigkeitsreste, die mit dem Pellet in Verbindung stehen, nicht physikalisch entfernen!</p>

		<p>Lösen des gebundenen Farbstoffs</p> <p>Zu jedem Tube werden 1 ml des Alkali Reagent zugegeben. Die Tubes verschließen und den gebundenen Farbstoff in der Flüssigkeit lösen. Hierfür eignet sich ein Vortex Mixer. Nach circa 10 Minuten ist der Farbstoff gelöst und ist nun fertig für die Messung.</p> <p>Der Farbkomplex ist lichtstabil, sollte aber innerhalb 2 bis 3 Stunden gemessen werden. Bis zur Messung die Tubes geschlossen halten.</p>
		<p>Messung</p> <p>Multiwellplate Reader mit einem blau-grünen Filter benutzen. 100 µl von jeder Probe aus den Tubes in ein 96 well plate pipettieren. Es wird die Asorption des Reagent blanks, des Kollagen-Standards und der Testproben gemessen. Das Reagent Blank wird von dem Kollagen-Standard und den Testproben abgezogen.</p> <p>Den Standard in einen Graphen einzeichnen und den Graphen für die Ermittlung des löslichen Kollagengehalts der Testproben verwenden.</p>

Tab. 8.2: Bestimmung des Gesamtgehaltes löslichen Kollagens, abgeändert aus Sircol Soluble Collagen Assay

8.3 Protokoll Kollagen ELISA

Vorbereitung des Probenmaterials: siehe Anhang 8.2

Tag 1: Extraktion des Kollagens		
	Schritt 1	<p>Das Gewebe in 0,5 ml 3 M Guanidinium/0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 rehydrieren und über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler belassen.</p> <p>Diese Extraktionslösung wird benötigt, um die Proteoglykane aus dem Gewebe zu extrahieren. Dies steigert die Pepsin-Verdauung.</p>
Tag 2: Extraktion des Kollagens		
	Schritt 1	<p>Die Proben 5 Minuten bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand abnehmen.</p> <p>Die Proben mit kaltem, destilliertem Wasser waschen.</p>
	Schritt 2	<p>Die Proben in 0,8 ml 0,05 M Essigsäure rehydrieren (Essigsäure enthält 0,5 M NaCl, pH=2,9 bis 3,0).</p>
	Schritt 3	<p>0,1 ml Pepsin (10mg/ml) zugeben, gelöst in 0,05 M Essigsäure. Bei 4°C 48 Stunden auf einem Rüttler inkubieren.</p> <p><u>Anmerkung:</u> Pepsin verdaut die Telo-Peptide, die sowohl am N-terminalen Ende als auch am C-terminalen Ende des Kollagenmoleküls lokalisiert sind. Pepsin kann nicht die intra- und intermolekularen Crosslinks lösen.</p>
Tag 3: kein Arbeitsschritt		

Tag 4: Extraktion des Kollagens		
	Schritt 1	0,1 ml 10x TSB (1.0 M Tris, 2.0 M NaCl, 50 mM CaCl ₂ , pH 7.8-8.0) zugeben.
	Schritt 2	<p>0,1 ml Pancreatic Elastase (1 mg/ml dissolved in 1X TSB, pH 7.8-8.0) zugeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler inkubieren.</p> <p><u>Anmerkung:</u> Elastase verdaut das Kollagenmolekül am N-terminalen Ende, das die intra- und intermolekularen Crosslinks enthält.</p> <p><u>Beachte:</u> Durch die Spaltung der N-terminalen Region durch Elastase werden die Dimere und Trimere des Kollagenmoleküls in Monomere überführt. Elastase verdaut denaturiertes Kollagen in kleine Fragmente. Deshalb muss ein Temperaturanstieg der Proben vermieden werden.</p>
	Schritt 3	<p>0,1 ml des Capture Antibodies mit 10 ml der Capture Antibody Dilution Buffer (Lösung A) verdünnen.</p> <p>Je 100 µl pro well in ein 96 well ELISA Plate pipettieren und über Nacht bei 4°C inkubieren.</p>
Tag 5: Messung des Kollagen Typ II		
	Schritt 1	<p>Die Proben bei 10000 RPM für 5 Minuten zentrifugieren und den Überstand abnehmen.</p> <p><u>Beachte:</u> Das Gewebe sollte vollständig gelöst sein. Ein kleiner Rest unlöslichen Gewebes kann übrigbleiben.</p>
	Schritt 2	<p>Den Überstand mit der Standard Dilution Lösung (Lösung B) auf 1:100 bis 1:10000 verdünnen.</p> <p><u>Beachte:</u> Die Temperatur der Proben darf nicht ansteigen, da ansonsten das Kollagen denaturiert. Der biotinylierte monoklonale Antikörper ist hochspezifisch und reagiert nicht mit denaturiertem Kollagen.</p>

	Schritt 3	Die Waschlösung (20x) mit destilliertem Wasser 1X verdünnen. Das well plate mit der 1x Waschlösung mindestens 3x waschen.
	Schritt 4	100 µl pro well der Proben zugeben. Für die Standardkurve 100 µl pro well des Kollagen Typ II Standards (in einer Konzentration von 0,02 bis 2,0 µg pro well), gelöst in der Standard Dilution Lösung (Lösung B) zugeben. Bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubieren.
	Schritt 5	Das well plate mit der 1x Waschlösung mindestens 3x waschen.
	Schritt 6	0,05 ml des Detection Antikörpers (biotinylierter monoklonaler Antikörper) in 10 ml der Detection Antikörper Lösung (Lösung C) lösen. Hiervon 100 µl pro well zugeben und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubieren.
	Schritt 7	Das well plate mit der 1x Waschlösung mindestens 3x waschen.
	Schritt 8	50 µl der Streptavidin Peroxidase in 10 ml Streptavidin Peroxidase Lösung (Lösung D) lösen. 100 µl pro well zugeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
	Schritt 9	Das well plate mit der 1x Waschlösung mindestens 6x waschen.
	Schritt 10	1 Tablette urea H ₂ O ₂ in seiner Packung zerkleinern. Den Inhalt mit einer OPD Tablette zusammen in 20 ml destilliertem Wasser kurz vor der Verwendung auflösen. 100 µl dieser Lösung in jedes well pipettieren und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
	Schritt 11	Die Reaktion mit 50 µl der Stopp Lösung beenden.
	Schritt 12	Die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm ermitteln.

Tab. 8.3: Messprotokoll Kollagen Typ II ELISA, abgeändert aus Native Collagen Type II Detection Kit

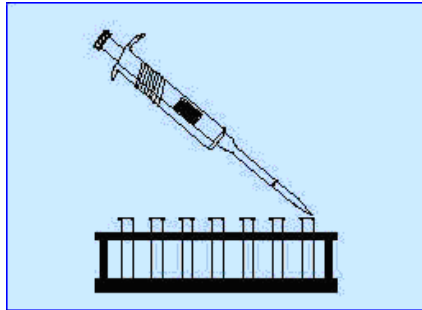
8.4 Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes

Ansetzen der Salzextraktionslösung für 100 ml									
	<table border="1"><tr><td>4 M Guanidine-HCl</td><td>38,21 g</td></tr><tr><td>0,1 M 6-Aminohexanonic acid</td><td>1,57 g</td></tr><tr><td>0,01 M Na₂ EDTA</td><td>0,37 g</td></tr><tr><td>0,05 M Sodium Acetat</td><td>4,10 g</td></tr></table>	4 M Guanidine-HCl	38,21 g	0,1 M 6-Aminohexanonic acid	1,57 g	0,01 M Na ₂ EDTA	0,37 g	0,05 M Sodium Acetat	4,10 g
4 M Guanidine-HCl	38,21 g								
0,1 M 6-Aminohexanonic acid	1,57 g								
0,01 M Na ₂ EDTA	0,37 g								
0,05 M Sodium Acetat	4,10 g								
Vorbereitung der Proben									
	<ul style="list-style-type: none">• Probengewicht bestimmen. Es sollte zwischen 5 und 10 mg liegen.• Gewicht des 15 ml tubes, in dem die Extraktion abläuft, bestimmen.• Die Probe in H₂O schockfrieren und lyophilisieren.• Nach dem Lyophilisieren nochmals wiegen.• Mit einem Skalpell kleine Späne des gefriergetrockneten Probenstückes abhobeln.• Die Späne in 5 ml destilliertem Wasser für 5 Minuten rehydrieren.• Die Proben 5x5 Sekunden homogenisieren (Mixstab vorher und nachher ausgiebig spülen).• Die Proben kurz bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand bis auf 1 ml abnehmen.• Lyophilisieren.• Gewicht von tube inklusive Probe bestimmen.• Tatsächliches Probengewicht bestimmen: Gewicht von tube inklusive Probe minus Tubegewicht allein.								

Extraktion der Glykosaminoglykane

- 2 ml Salzextraktionslösung zugeben und 12 Stunden im Kühlschrank auf einem Rüttler inkubieren.
- Die Proben kurz bei 10000 RPM zentrifugieren und den Überstand abnehmen.
- Mit dem Überstand erfolgt die Glykosaminoglykanmessung.

Messung des Glykosaminoglykan-Gehaltes gemäß Blyscan Protokoll (biocolor, Irland)



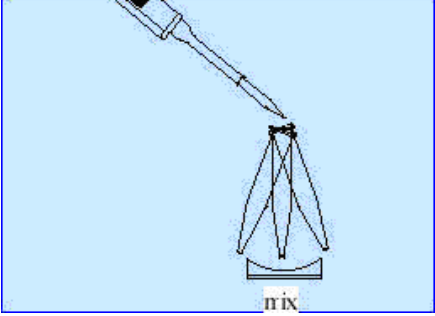
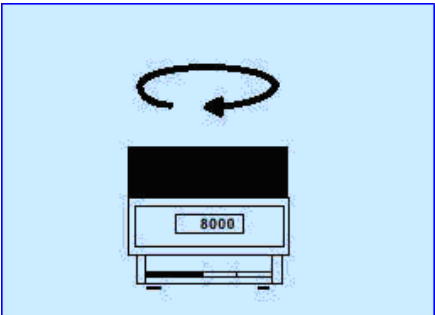
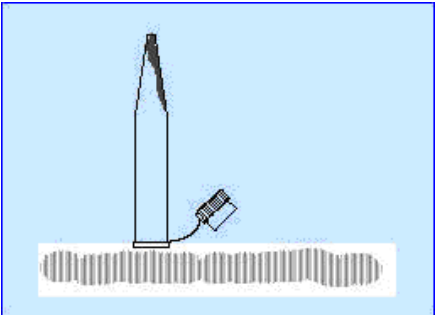
Vorbereitung

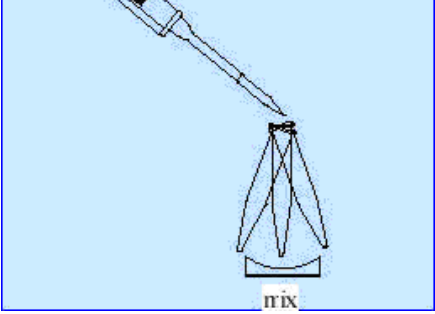
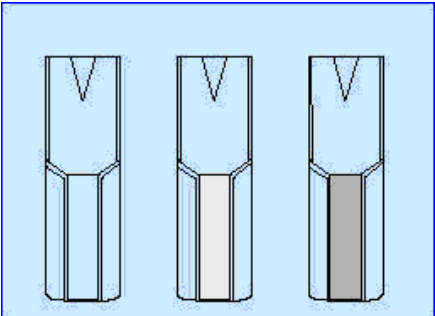
Beschriften von einem Satz 1,5 ml Mikrozentrifugentubes.

Vorbereiten von

1. Reagent blank: 100 μ l destilliertes Wasser oder test sample buffer
2. Glykosaminoglykan-Standard: Ansätze enthalten 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 5,0 μ l
3. Probenmaterial:
Volumen 10 bis 100 μ l.

Die Inhalte aller Proben auf 100 μ l mit destilliertem Wasser oder appropriate buffer auffüllen und 1:4 verdünnen.

		<p>Mixen</p> <p>Die tubes für 30 Minuten in einen mechanischen Mixer stellen oder 5 Minuten per Hand schütteln.</p> <p>Während dieser Zeitspanne bindet der Farbstoff die sulphatierten Glykosaminoglykane. Der Farbstoff ist so konzipiert, dass die sulphatierten Glykosaminoglykan-komplexe aus der Lösung ausfallen.</p>
		<p>Zentrifugieren</p> <p>Die tubes in eine Mikro-zentrifuge stellen und 10 Minuten bei 10000x g zentrifugieren. Es ist besonders wichtig, dass sich die unlöslichen Pellets der sulphatierten Glykosaminoglykane-Farbstoffkomplexe am Boden der tubes absetzen, damit sie beim Abkippen nicht verloren gehen.</p>
		<p>Abkippen</p> <p>Die ungebundene Farbstoff-lösung wird durch vorsichtiges Umdrehen der tubes verworfen. Im tube verbliebene Flüssigkeitsreste können durch leichtes Tippen des tubes auf ein Papiertuch entfernt werden.</p> <p>Wichtig: Flüssigkeitsreste, die mit dem Pellet in Verbindung stehen, nicht physikalisch entfernen.</p>

		<p>Lösen des gebundenen Farbstoffs</p> <p>Zu jedem tube werden 1 ml der dissociation solution zugegeben. Die tubes verschliessen und den gebundenen Farbstoff in der Flüssigkeit lösen. Hierfür eignet sich ein Vortex Mixer. Nach ca. 10 Minuten ist der Farbstoff gelöst und ist nun fertig für die Messung.</p> <p>Der Farbkomplex ist lichtstabil, sollte aber innerhalb 2 Stunden gemessen werden. Bis zur Messung die tubes geschlossen halten.</p>
		<p>Messung</p> <p>Multiwellplate reader mit einem roten Filter benutzen. 100 µl von jeder Probe aus den tubes in ein 96 well plate pipettieren. Es wrd die Asorption der reagent blanks, des Glykosaminoglykanstandards und der Testproben gemessen. Das reagent blank wird von dem Glykosaminoglykanstandard und den Testproben abgezogen.</p> <p>Den Standard in einen Graphen einzeichnen und den Graphen für die Ermittlung des Gehalts der sulphatierten Glykosaminoglykanen der Testproben verwenden.</p>

Tab. 8.4: Messung des Gehalts sulphatierter Glykosaminoglykane, abgeändert aus Blyscan Manual

Nr.	Gruppe	Beobach- tungs- zeitraum	Datum der Färbung	FCZ Besiede- lung	Kollagenisierung Typ II		Granu- lations- gewebe	Artefakte	Autoch- toner Knorpel	Autoch- tones Kapsel- gewebe	Vaskula- risierung	Bemerkung
					Lokalisation diffus/fokal	Intensität 0/3 bis 3/3						
	1: besiedelt 2: unbesie- delt 3: menisk- ektomiert			Zellpopu- larisierung	Lokalisation diffus/fokal	Intensität 0/3 bis 3/3	+/-	Nekrose/Ent- zündung/Exsu- dat	+/-	+/-		
19E01	1	3 Monate	31.03.03	10%	f: 10%	3/3	+	Exsudat	+	+	-	Fibroblasten, z.T. avitale Z.
25C1	1	3 Monate	31.03.03	70%	d: 90%	1/3	+	-	-	+	basisnah	
26C1	1	3 Monate	31.03.03	30%	d: 100%	2/3	-	-	-	+	-	
30C1	1	3 Monate	31.03.03	80%	d: 50% f: <10%	1/3 3/3	+	-	-	+	-	Knorpelbil- dung an Oberfläche, Koll II nega- tiv, zellreich
35C1	1	3 Monate	31.03.03								-	Besiedelt in vitro
38C1	1	3 Monate	31.03.03	20%	d: 10%	1/3	+	phlegmonös eitrige Entzün- dung	-	+	-	Eiter, Fibrin, polymorph- kernige Granulozyten
39C1	1	3 Monate	31.03.03	80%	d: 20%	2/3	+	-	-	+	-	
7C01	2	3 Monate	04.05.03	90%	d: 60% f: 10%	2/3 3/3	+	-	-	+	Zwischen Basis und CMI	Kollagen II negativ, Faser-knorpel
8C1	2	6 Monate	04.05.03	20%	d: 90%	2/3	+	-	-	+	-	Nahtmaterial

Nr.	Gruppe	Beobach- tungs- zeitraum	Datum der Färbung	FCZ Besiede- lung	Kollagenisierung Typ II		Granu- lations- gewebe	Artefakte	Autoch- toner Knorpel	Autoch- tones Kapsel- gewebe	Vaskula- risierung	Bemerkung
					Lokalisation diffus/fokal	Intensität 0/3 bis 3/3						
	1: besiedelt 2: unbesie- delt 3: menisk- ektomiert			Zellpopu- larisierung			+/-	Nekrose/Ent- zündung/Exsu- dat	+/-	+/-		
14C1.1	2	6 Monate	04.05.03	50%	d: 70% f: <10%	1/3 2/3	+	-	-	+	-	
14C1.2	2	6 Monate	04.05.03	<10%	d: 90% f: 10%	2/3 3/3	+				-	
12C1	3	6 Monate	04.05.03	-	f: 10%	2/3	-	Reparations- zeichen am AK	+	+	-	
23C1	3	3 Monate	04.05.03	-	f: 10%	2/3	-	Reparations- zeichen am AK	+	+	basisnah	Knorpel- nester

Tab. 8.5: Auswertung der immunhistologischen Präparate. FCZ: Fibrochondrozyten, CMI: Collagen Meniscus Implant, AK: Antikörper

9 Literaturverzeichnis

1. Aagaard, H., Jørgensen, U., Bojsen-Møller F.: Reduced regenerative cartilage changes after meniscal allograft transplantation in sheep. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 7 (1999) 184 - 191
2. Adams, M.E., Muir, H.: The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem. J.* 197 (1981) 385 - 389
3. Alberts, B.: The extracellulär matrix. In: "Molecular biology of the cell". Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (Hrsg.), Garland Publishing, Inc., New York, London, 1983, 692 - 715
4. Allen, P.R., Denham, R.A., Swan, A. V.: Late degenerative changes after meniscectomy. Factors affecting the knee after operation. *J. Bone Joint Surg. (Br)* 66 (1984) 666 - 671
5. Almarza, A.J., Athanasiou, K.A.: Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Ann. Biomed. Eng.* 32 (2004) 2 - 17
6. Arnoczky, S.P., Adams, M.E., DeHaven, K.: The Meniscus. In: "Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues". Woo, S.L.-Y., Buckwalter, J.A. (Hrsg.), American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Illinois, 1987, 487
7. Arnoczky, S.P., McDevitt, C.A., Schmidt, M., Mow, V., Warren, R., F.: The effect of cryopreservation on canine menisci: A biochemical, morphologic, and biomechanical evaluation. *J. Orthop. Research* 6 (1988) 1 - 12
8. Arnoczky, S.P., Warren, R.F., Kaplan, N.: Meniscal remodeling following partial meniscectomy. An experimental study in the dog. *Arthroscopy* (1985) 247 - 252
9. Arnoczky, S.P., Warren, R.F., Spivak, J.: Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J. Bone Joint Surg.* 70A (1988) 1209 - 1217

10. Arnoczky, S.P.: Building a meniscus. Biologic considerations. *Clin. Orthop.* 367S (1999) 244 – 253
11. Arnoczky, S.P.: Breakout session 4: Meniscus. *Clin. Orthop.* 367S (1999) 293 – 295
12. Aspden R.M., Yarker Y.E., Hukins D.W.: Collagen orientations in the meniscus of the knee joint. *J. Anat. May 140 Pt 3 (1985)* 371 - 380
13. Baker, P., Coggon, D., Reading, I., Barrett, D., McLaren, M., Cooper, C.: Sports injury, occupational physical activity, joint laxity, and meniscal damage. *J. Rheumatol.* 29 (2002) 557 - 563
14. Bosch, U., Gässler N., Decker, B.: Alterations of glycosaminoglycans during patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament replacement. A biomechanical study in sheep. *Am. J. Sports Med.* 26 (1998) 103 – 108
15. Brown, A.N., Kim, B.S., Alsberg, E., Mooney, D.J.: Combining chondrocytes and smooth muscle cells to engineer hybrid soft tissue constructs. *Tissue Eng.* 6 (2000) 297 – 305
16. Bruns, J., Kahrs, J., Kampen, J., Behrens, P., Plitz, W.: Autologous perichondral tissue for meniscal replacement. *J. Bone Joint Surg. Br. Sep;80(5) (1998)* 918 - 923
17. Bruns, J., Kampen, J., Kahrs, J., Plitz, W.: Achilles tendon rupture: Experimental results on spontaneous repair in a sheep model. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 8 (2000) 364 - 369
18. Bullough, P.G., Munuera, L., Murphy, J., Weinstein, A.M.: The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J. Bone Joint Surg. Br. (1970) Aug;52(3)* 564 - 567
19. Chandrasekhar, S., Esterman, M., Hoffmann, H.: Microdetermination of proteoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Analyt. Biochem.* 161 (1987) 103 – 108

20. Cheung, H.S., Harvey, W., Benya, P., Nimni, M.: New collagen markers of "depression" synthesized by rabbit articular chondrocytes in culture. *Biochem. Biophysic. Res.* 68 (1976) 343 - 356
21. Cheung, H.S.: Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Conn. Tissue Res.* 16 (1987) 343 - 356
22. Christgau, S., Garnero, P., Fledelius, C., Moniz, C., Ensig, M., Gineyts, E., Rosenquist, C., Qvist, P.: Collagen type II telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 29 (2001) 209 - 215
23. Clark, J.M.: The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study. *J. Orthop. Res.* 3 (1985) 17 - 29
24. Cook, J., Tomlinson, J., Arnoczky, S.P., Fox, D., Cook, C.R., Kreeger, J.: Kinetic study of the replacement of porcine small intestinal submucosa grafts and the regeneration of meniscal-like tissue in large avascular meniscal defects in dogs. *Tissue Eng.* 7 (2001) 321 - 334
25. Cook, J.L., Tomlinson, J.L., Kreeger, J.M., Cook, C.R.: Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *Am. J. Sports Med.* 27 (1999) 658 - 656
26. De Boer, H.H., Koudstaal, J.: The fate of meniscus cartilage after transplantation of cryopreserved nontissue-antigen-matched allograft. A case report. *Clin. Orthop.* 266 (1991) 145 - 151
27. DeBoer, H., Koudstaal, J.: Failed meniscus transplantation. A report of three cases. *Clin. Orthop.* 306 (1994) 155 - 162
28. DeHaven, K.E.: Decision-making factors in the treatment of meniscus lesions. *Clin. Orthop.* 252 (1990) 49 - 54

29. Dey, P., Saphos, C., A., McDonell, J., Moore, V.,L.: Studies on the quantification of proteoglycans by the dimethylmethylenblue dye- binding method. *Conn. Tissue Res.* 28 (1992) 317- 324
30. Duda, G.N., Haisch, A., Endres, M., Gebert, C., Schroeder, D., Hoffmann, J., Sittinger, M.: Mechanical quality of tissue engineered cartilage: Results after 6 and 12 weeks in vivo. *John Wiley and sons, Inc.* (2000) 673 - 677
31. Eyre, D.R., Koob, T.J., Chun, L.E.: Biochemistry of the menisci: Unique profile of collagen types and site. Dependent variations in composition. *Orthop. Res. Soc.* 8 (1983) 264
32. Eyre, D.R., Wu, J.J.: Collagen of fibrocartilage: A distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett.* 158(2) (1983) 265 - 270
33. Fairbank, T.J.: Knee joint changes after meniscectomy. *J. Bone Joint Surg. (Br)*30 (1984) 664 - 670
34. Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barrett A.J.: Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylen blue. *Biochimica et Biophysica Acta* 883 (1986) 173- 177
35. Farndale, R.W., Sayers, C.A., Barrett, A.J.: A direct spectrometric microassay for sulphated glygosaminoglycans in cartilage cultures. *Conn. Tissue Res.* 9 (1982) 247 - 248
36. Favnesi, J.A., Shaffer, J.C., Mow, V.C.: Biphasic mechanical properties of the knee meniscus. *Orthop. Res. Soc.* 8 (1983) 264 - 266
37. Fink C., Fermor B., Weinberg J.B., Pisetsky D.S., Misukonis M.A., Guilak F.: The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus. *Osteoarthritis Cartilage Jul* 9(5) (2001) 481 - 487

38. Fithian, D.C., Kelly, M.A., Mow, V.C.: Material properties and structure–function relationship in the menisci. *Clin. Orthop.* 252 (1990) 19 – 31
39. Gao, J.: Immunolocalization of type I, II, and X collagen in the tibial insertion sites of the medial meniscus. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 8 (2000) 61 – 65
40. Garrett, J.C., Steensen, R.N., Stevensen, R.N.: Meniscal transplantation in the human knee: A preliminary report. *Arthroscopy* 7(1) (1991) 57 - 62
41. Garrick, J.G., Requa, R.K.: Sports and fitness activities: The negative consequences. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 11 (2003) 439 - 443
42. Ghadially, F.N., Lalonde, J.–M.A., Wedge, J.H.: Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J. Anat.* 136 (1983) 773 - 791
43. Ghosh P., Taylor T.K.: The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin. Orthop. Nov.* (224) (1987) 52 - 63
44. Ghosh, P., Ingman, A.M., Taylor, T.K.: Variations in collagen, non-collagenous proteins and hexosamine in menisci derived from osteoarthritic and rheumatoid arthritic knee joints. *J. Rheumatol.* 2 (1975) 100 - 107
45. Goble, E.M., Kohn, D., Verdonk, R., Kane, S.M.: Meniscal substitutes. Human experience. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 146 – 157
46. Goble, E.M., Verdonk, R., Kohn, D.: Arthroscopic and open surgical techniques for meniscus replacement. Meniscus allograft transplantation and tendon autograft transplantation. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 168 – 176
47. Gold, E.: A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations. *Anal. Biochem.* 99 (1979) 183 – 188

48. Guilak F., Meyer B.C., Ratcliffe A., Mow V.C.: The effects of matrix compression on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage Jun 2(2) (1994) 91 - 101*
49. Hardingham, T.E., Beardmore-Gray, M., Dunham, D., Ratcliffe, A.: Cartilage Proteoglycan. In: "Function of the Proteoglycan". Wiley, J. (Hrsg.), *Ciba Foundation Symposium 124, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986 , 30 - 46*
50. Hardingham, T.E.: Structure and Associations of Proteoglycans in Cartilage. In: "Molecular Biophysics of the Extracellular Matrix". Souther, A., Rees, D.A., Morris, E.R. (Hrsg.), *Humana Press, Library of Congress Cataloging in Publication Data, Clifton, New Jersey, 1983, 1 - 19*
51. Hascall, V.C.: Introduction. In: "Function of the Proteoglycan". Wiley, J. (Hrsg.), *Ciba Foundation Symposium 124, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986 , 1 - 8*
52. Hasler, E.M., Herzog, W., Wu, J.Z., Müller, W., Wyss, U.: Articular cartilage biomechanics: Theoretical models, material properties and biosynthetic response. *Crit. Rev. Biomed. Eng.27(6) (1999) 415 - 488*
53. Heinegard, D.: Extraction, fractionation and characterization of proteoglycans from bovine tracheal cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta 285 (1972) 181 - 192*
54. Herwig, J., Egner, E., Buddecke, E.: Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann. Rheum. Dis. 43 (1984) 635 - 640*
55. Hidaka, C., Ibarra, C., Hannafin, J., Torzilli, P.A., Quitariano M., Shih-Shi, J., Warren, R.F., Crystal, R.G: Formation of vascularized meniscal tissue by combining gene therapy with tissue engineering. *Tissue Eng. 8 (2002) 93 - 105*

56. Hoemann, C.D., Sun, J., Chrzanowski, V., Buschmann, M.D.A.: Multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Analyt. Biochem.* 300 (2002) 1 - 10
57. Hof, H.: Grundlagen der medizinischen Mikrobiologie. In: „Mikrobiologie“. Hof, H., Dörries, R., Müller, R.L. (Hrsg), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000, 1 - 76
58. Hough, A.J., Webber, R.J.: Pathology of the meniscus. *Clin. Orthop.* 252 (1990) 32 - 40
59. Huard, J., Li, Y., Peng, H., Fu, F.H.: Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J. Gene Med.* 5 (2003) 93 - 108
60. Hyllested, J.L., Veje, K., Ostergaard, K.: Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage. A review. *J. Osteoarthr. R. S. I.* 10 (2002) 333 - 343
61. Ibarra, C., Cao, Y., Vacanati C.A., Warren, R.F., Vacanti J.P.: Transplantation of tissue engineered meniscus in sheep. 44th Annual Meeting, Orthop. Res. Soc. New Orleans, Louisiana (1998) 293
62. Ibarra, C., Jannetta, C.A., Cao, Y., Kim, T.H., Upton, J., Vacanti, J.P.: Tissue engineered meniscus: A potential new alternative to allogenic meniscus transplantation. *Transplantation Proceedings* 29 (1997) 986 - 988
63. Ibarra, C., Koski, J., Warren, R.F.: Tissue engineering meniscus. Cells and matrix. *Orthop. Clin. Am* 31 (2000) 411 - 418
64. Inerot, S., Heinegard, D.: Bovine tracheal cartilage proteoglycans. Variations in structure and composition with age. *Coll. Relat. Res.* 3 (1983) 245 - 262

65. Ingman, A.M., Gosh, P., Taylor, T.K.F.: Variation of collageneous and non-collageneous proteins of human knee joint menisci with age and degeneration. *Gerontologia* 20 (1974) 212 - 223
66. Jackson, D., McDevitt, C., Simon, T., Arnoczky, S.P., Atwell, E., Silvino, N.: Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in goats. *Am. J. Sports Med.* 20 (1992) 644 - 656
67. Jackson, D., Simon, T.: Tissue engineering principles in orthopaedic surgery. *Clin. Orthop.* 367S (1999) 31 - 45
68. Jubb, R.W.: Differential responses of human cartilage to retinol. *Ann. Rheum. Diss* 43 (1984) 833 - 840
69. Kasemkijwattana, C., Menetrey, J., Bosch, P., Somogyi, G., Moreland, M.S., Fu, F.H., Buranapanitkit, B., Watkins, S.S., Huard, J.: Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin. Orthop. Jan* (370) (2000) 272 - 285
70. Kempson, G.E., Muir, H., Pollard, C., Tuke, M.: The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim. Biophys. Acta Feb* 28 297(2) (1973) 456 - 472
71. Khuory, M.A., Goldberg, V.M., Stevenson, S.: Demonstration of HLA and ABH antigens in fresh and frozen menisci by immunohistochemistry. *J. Orthop. Research* 12 (1994) 751 - 757
72. King, D.: The healing of semilunar cartilage. *J. Bone Joint Surg.* 18 (1936) 333 - 342
73. Klompaker, J., Jansen, H., Veth, R., Groot J., Nijenhuis, A., Pennings, A.: Porous polymer implantat of meniscal lesions: A preliminary study in dogs. *Biomat.* 12 (1991) 810 - 816

74. Kohn, D., Wirth, C.J., Reiss, G., Plitz, W., Maschek, H., Erhardt, W., Wulker, N.: Medial meniscus replacement by a tendon autograft. Experiments in sheep. *J. Bone Joint Surg. Br. Nov 74(6) (1992) 910 - 917*
75. Kohn, D., Aagaard, H., Verdonk, R., Dienst, M., Seil, R.: Postoperative follow-up and rehabilitation after meniscus replacement. *Scand. J. Med. Sci. Sports 9 (1999) 177 - 180*
76. Kohn, D., Rudert, M., Wirth, C.J., Plitz, W., Reiss, G., Maschek, H.: Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. An experimental study in sheep. *Int. Orthop. 21 (1997) 232 - 238*
77. Kohn, D., Verdonk, R., Aagaard, H., Seil, R., Dienst, M.: Meniscal substitutes. Animal experience. *Scand. J. Med. Sci. Sports 9 (1999) 141 - 145*
78. Kohn, D.: Meniscus transplantation should not be combined with correction of instability, deformity, cartilage defects. A personal view. *Scand. J. Med. Sci. Sports 9 (1999) 185*
79. Kohn, D.: Meniskusersatz. *Orthopäde 23 (1994) 164 - 170*
80. Koski, J.A., Ibarra, C., Rodeo, S.A., Warren, R.F.: Meniscal injury and repair: Clinical Status. *Orthop. Clin. North Am. 31 (2000) 419 - 436*
81. Krause W.R., Pope M.H., Johnson R.J., Wilder D.G.: Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J. Bone Joint Surg. Am. Jul 58(5) (1976) 599 - 604*
82. Kuhn, J., Woijs, E.: Allograft meniscus transplantation. *Clin. Sports Med. 15 (1996) 537 - 556*
83. Kummer, B.: Biomechanik des Meniskus. *Orthopäde 23 (1994) 90 - 94*
84. Lanzer, W.L., Komenda, G.: Changes in articular cartilage after meniscectomy. *Clin. Orthop. 252 (1990) 41 - 48*

85. Lee, C., Breinan, H., Nehrer, S., Spector, M.: Articular cartilage chondrocytes in type I and type II collagen-GAG matrices exhibit contractile behavior in vitro. *Tissue Eng.* 6 (2000) 555 – 565
86. Maitra, R., Miller, M., Johnson, D.: Meniscal reconstruction. Part I: Indications, techniques, and graft considerations. *Am. J. Orthop.* Apr. 1999 213– 218
87. Maitra, R., Miller, M., Johnson, D.: Meniscal reconstruction. Part II: Outcome, potential complications, and future directions. *Am. J. Orthop.* May (1999) 280 - 286
88. Mandl, F.: Regeneration des menschlichen Kniegelenkzwischen-knorpels. *Zentralblatt* 52 (1929) 3265 – 3269
89. Martinek, V., Fu, F., Huard, J.: Gene therapy and tissue engineering in sports medicine. *Physician and Sportsmedicine* 28 (2000) 1 – 11
90. Martinek, V., Fu, F., Lee, C., Huard, J.: Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering. *Clin. Sports Med.* 20 (2001) 403 – 416
91. Martinek, V., Ueblacker, P., Imhoff, A.B.: Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J. Bone Joint Surg (Br)* 85 B (2003) 782 – 788
92. Martinek, V., Usas, A., Pelinkovic, D., Robbins, P., Fu, F., Huard, J.: Genetic engineering of meniscal allografts. *Tissue Eng.* 8 (2002) 107 – 117
93. Matsumoto, F., Trudel, G., Uhthoff, H.K.: High collagen type I and low collagen III levels in knee joint contracture. *Acta. Orthop. Scand.* 73 (2002) 335 – 343
94. McDevitt, C.A., Webber, R.J.: The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin. Orthop.* 252 (1990) 8 – 18

95. McNicol, D., Roughley, P.J.: Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *Biochem. J.* 185 (1980) 705 - 713
96. Meena, D.J., Jun-Kyo, S., Takashi, M., Savio, L.Y.: Interspecies variation of compressive biomechanical properties of the meniscus. *J. Biomed. Mat. Research* 29 (1995) 823 - 828
97. Messner, K., Kohn, D., Verdonk, R.: Future research in meniscal research. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 181 - 183
98. Messner, K.: Indications for meniscal transplantation. Who and how many need a meniscus substitute? A personal view. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 184
99. Messner, K.: Meniscal regeneration or meniscal transplantation? *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 162 - 167
100. Milachowski, K., Kohn, D., Wirth, C.: Transplantation allogener Menisken. *Orthopäde* 23 (1994) 160 - 163
101. Milachowski, K.A., Weismeier, K., Wirth, C.J.: Homologous meniscus transplantation. Experimental and clinical results. *Int. Orthop.* 13 (1989) 1 - 11
102. Miller, E.J., Rhodes, R.K.: Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol.* 82 (1982) 33 - 64
103. Miller, E.J., Gay S.: Collagen: An overview. *Methods Enzymol.* 82 (1982) 3 - 32
104. Mow, V.C., Proctor, C.S., Kelly, M.A.: Biomechanics of articular cartilage. In: "Basics Biomechanics of the Musculoskeletal System. Nordin, M., Frankel, V. (Hrsg.), William and Wilkins, Baltimore, Philadelphia, London, 2. edition, 31 - 58
105. Mueller, S., Shortkroff, S., Schneider, T., Breinan, H., Yannas, I., Spector, M.: Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro. *Biomaterials* 20 (1999) 701 - 709

106. Müller, W.: Menisken und Kniestabilität. *Orthopäde* 23 (1994) 93 – 97
107. Müller, W.: Anatomie. Form, Funktion und Synergismen. In: „Das Knie. Form, Funktion und ligamentäre Wiederherstellungschirurgie“. Müller, W. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982, 1 - 7
108. Nakano, T., Dodd, C.M., Scott, P.G.: Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *J. Orthop. Res.* 15 (1997) 213 - 220
109. Nakata, K., Shino, K., Hamada, M., Mae, T., Miyama, T., Shinjo, H., Horibe, S., Tada, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin. Orthop.* 391 (Suppl) (2001) S208 - 218
110. Naumann, A., Dennis, J., Awadallah, A., Carrino, D., Mansour, J., Kastenbauer, E., Caplan, A.: Immunchemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbits. *J. H. C.* 50 (2002) 1049 – 1063
111. Nitschke, S.: „Tissue Engineering des Meniskus. In vivo Untersuchungen von zellbesiedelten Kollagenmatrizes am Schafmodell.“, 2006
112. Noll, S.: Enzymatische Demaskierung. In: „Praxis der Immunhistochemie“. Höfler, H., Müller, K.-M. (Hrsg.), Urban und Fischer Verlag, München, Jena, 2000, 1. Auflage, 40 - 43
113. Oretorp, N., Alm, A., Ekstrom, H., Gillquist, J.: Immediate effects of meniscectomy on the knee joint. The effects of tensile load on knee joint ligaments in dogs. *Acta Orthop. Scand.* Aug 49(4) (1978) 407 - 414
114. Pelinkovic, D., Martinek, V., Engelhardt, M., Lee, Y., Huard, J.: Tissue Engineering und Getherapie des Bewegungsapparates mit Muskelzellen. *Z. Orthop.* 138 (2000) 402 – 406

115. Petrides, P.E.: Binde- und Stützgewebe. In: „Biochemie und Pathobiochemie“. Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998, 6. Auflage, 733 - 760
116. Phelps, C.,F.: The dilute Solution of Glycosaminoglycans and Proteoglycans. In: "Molecular Biophysics of the Extracellulär Matrix". Souther, A., Rees, D.A., Morris, E.R. (Hrsg.), Humana Press, Library of Congress Cataloging in Publication Data, Clifton, New Jersey, 1983, 21 - 39
117. Poole, A.R., Webber, C., Pidoux, I., Choi, H., Rosenberg, L.C.: Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986) 619 - 625
118. Renström, P., Johnson, R.: Anatomy and biomechanics of the menisci. *Clin. Sports Med.* 9 (1990) 523 - 538
119. Rodeo, S.A., Seneviratne, A., Suzuki, K., Felker, K., Wickiewicz, T.L., Warren, R.F.: Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am.* Aug; 82-A(8) (2000) 1071 - 1082
120. Rodeo, S.A.: Meniscal allografts. Where do we stand? *Am. J. Med.* 29 (2001) 246 - 261
121. Rodkey, W.G.: Basic biology of the meniscus and response to injury. *Instr. Course Lect.* 49 (2000) 189 - 193
122. Rodkey, W., Steadman, R., Li, S.: A clinical study of collagen meniscus implantats to restore the injured meniscus. *Clin. Orthop.* 367S (1999) 281 - 292
123. Saklatvala, J., Curry, V.A., Sarsfield, S.J.: Purification to homogeneity of pig leucozyte catabolin, a protein that causes cartilage resorption in vitro. *Biochem. J.* 215(2) (1983) 385 - 392

124. Sarimo, J., Rantanen, J., Heikkila, J., Orava, S.: Acute traumatic extension deficit of the knee. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 13 (2003) 155 - 158
125. Scott, J.E.: Proteoglycan–Collagen Interaction. In: "Function of the Proteoglycan". Wiley, J. (Hrsg.), Ciba Foundation Symposium 124, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986, 104 - 124
126. Scully, S.P., Lee, J.W., Ghert, M.A., Qi, W.: The role of the extracellular matrix in articular chondrocyte regulation. *Clin. Orthop. Rel. Research* 391 (2001) 72 - 89
127. Seil, R., Kohn, D.: Meniskusrekonstruktion. Bewährte und innovative Verfahren. *Unfallchirurg.* 104 (2001) 274 - 287
128. Setton, L., Guilak, F., Hsu, E., Vail, T.P.: Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin. Orthop.* 367S (1999) 254 - 272
129. Shin, S.J., Fermor, B., Weinberg, J.B., Pisetsky, D.S., Guilak, F.: Regulation of matrix turnover in meniscal explants: Role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide. *J. Appl. Physiol.* Jul 95(1) (2003) 308 - 313
130. Somer, L., Somer, T.: Is the meniscus of the knee joint a fibrocartilage? *Acta Anat.* 116 (1983) 234 - 244
131. Spring, H., Dvorak, J., Schneider, W., Tritschler T., Villiger, B.: Einleitung. In: „Theorie und Praxis der Trainingstherapie. Beweglichkeit, Kraft, Ausdauer, Koordination“. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997, 1 - 4
132. Stading, M., Langer, R.: Mechanical shear properties of cell-polymer cartilage constructs. *Tissue Eng.* 5 (1999) 241 - 250
133. Stephan, J., S., McLaughlin, R., M., Griffith, G.: Water content and glykosaminoglykan disaccharide concentration of the canine meniscus. *Am. J. Vet. Res.* 59 (1998) 213- 216

134. Stone, K.R., Walgenbach, R.N.N.P.: Meniscal allografting: The three-tunnel technique. *Arthroscopy* 19 (2003) 426 - 430
135. Stone, K., Rodkey, W., Webber, R., McKinney L., Steadman, R.: Future directions. Collagen-based prostheses for meniscal regeneration. *Clin. Orthop.* 252 (1990) 129 - 135
136. Stone, K., Rodkey, W., Webber, R., Steadman, R.: Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biomechanically. *Am. J. Sports Med.* 20 (1992) 104 - 111
137. Stone, K., Steadman J.R., Rodkey, W.: Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. *J. Bone Joint Surg.* 79 (1997) 1770 - 1777
138. Stone, K.: Current and future directions for meniscus repair and replacement. *Clin. Orthop.* 367S (1999) 273 - 280
139. Stone, K.: Meniscus replacement. *Clin. Sports Med.* 15 (1996) 557 - 571
140. Sweigart, M.A., Athanasiou, K.A.: Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng.* 7 (2001) 111 - 129
141. Szomor, Z.L., Martin, T.E., Bonar, F., Murrell, G: The protective effects of meniscal transplantation on cartilage. An experimental study in sheep. *J. Bone Joint Surg.* 82 (2000) 80 - 88
142. Tapper, E., Hoover, N.: Late results after meniscectomy. *J. Bone Joint Surg. Am.* 51 (1969) 517 - 526
143. Thompson, W.O., Fu, F.H.: The meniscus in the cruciate-deficient knee. *Clin. Sports Med.* 12 (1993) 771 - 796
144. van Arkel E.R., de Boer H.H.: Survival analysis of human meniscal transplantations. *J. Bone Joint Surg. Br. Mar* 84(2) (2002) 227 - 231

145. Veltri, D., Warren, R., Wickiewicz, T., O'Brien, S.: Current status of allograft meniscal transplantation. *Clin. Orthop.* 303 (1994) 44 - 55
146. Verbruggen, G., Verdonk, R., Veys, E.M., Van Daele, P., De Smet, P., Van den Abbeele, K., Claus, B., Baeten, D.: Human meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. *Knee. Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 4 (1996) 57 - 63
147. Verdonk, R., Kohn, D.: Meniscus transplantation: Preoperative planning. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 160 - 161
148. Verdonk, R., Kohn, D.: Harvest and conservation of meniscal allografts. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 9 (1999) 158 - 159
149. Verdonk, R., Van Daele, P., Claus, B., Vandenaabeele, K., Desmet, P., Verbruggen, G., Veys, E., Claessens, H.: Das vitale Meniskustransplantat. *Orthopäde* 23 (1994) 153 - 159
150. Veth, R., Jansen, H., Leenslag, J., Pennings, A., Hartel, R., Nielsen, H: Experimental meniscal lesions reconstructed with a carbon fiber-polyurethane-poly (L-lactide) graft. *Clin. Orthop.* 202 (1986) 286 - 293
151. Voloshin, A.S., Wosk, J. Shock absorption of meniscectomized and painful knees: A comparative in vivo study. *J. Biomed. Eng.* 5 (1983) 157 - 161
152. Walsh, C.J., Goodman, D., Caplan, A.I., Goldberg, V.M.: Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng.* Aug 5(4) (1999) 327 - 337
153. Webber, R.J., Harris, M.G., Hough, A.J.: Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J. Orthop. Res.* 3(1) (1985) 36 - 42
154. Webber, R.J., Hough, A.J.: Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes II. Sulfated proteoglycan synthesis. *Biochimie Feb* 70(2) (1988) 193 - 204

155. Webber, R.J., Zitaglio, T., Hough, A.J.: Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *J. Orthop. Res.* 6(1) (1988) 13 - 23
156. Webber, R.J.: In vitro culture of meniscal tissue. *Clin. Orthop.* 252 (1990) 114 - 120
157. Webber, R.J., Harris, M.G., Hough, A.J.: Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: Proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J. Orthop. Res.* 3 (1985) 36 - 42
158. Webber, R.J., York, J.L., Vanderschelden, J.L., Hough, A.J.: An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am. J. Sports Med.* 17 (1989) 393 - 400
159. Webber, R.J., Zitaglio, T., Hough, A.J.: In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex. *Arthritis Rheum.* 29 (1986) 1010 - 1016
160. Wirth, C.J., Peters, G., Milachowski, K.A., Weismeier, K.G., Kohn, D.: Long-term results of meniscal allograft transplantation. *Am. J. Sports Med.* 30 (2002) 174 - 181
161. Woo, S.L., Matthews, J.V., Akeson, W.H., Amiel, D., Convery, F.R.: Connective tissue response to immobility. Correlative study of biomechanical and biochemical measurements of normal and immobilized rabbit knees. *Arthritis Rheum.* May-Jun 18(3) (1975) 257 - 264
162. Yasuyuki, S., Li, H., Zhu, J., Imanaka-Yoshida, K., Mizoguchi, I., Kagayama, M.: Immunohistochemical localization of type I collagen, fibronectin tenascin C during embryonic osteogenesis in the dentary of mandibles and tibias in rats. *Histochem. J.* 32 (2000) 591 - 598

163. Yoldas, E.A., Sekiya, J.K., Irrgang, J.J., Fu, F.H., Harner, C.D.: Arthroscopically assisted meniscal allograft transplantation with and without combined anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* May 11 (2003) 173 - 182

10 Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater, PD Dr. V. Martinek für das Überlassen des Themas und Univ.- Prof. Dr. A. B. Imhoff für die Zurverfügungstellung der laboratorischen Einrichtungen des sportorthopädischen Instituts.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. K. Bräun, meinem wissenschaftlichem Betreuer, der mir mit viel Geduld die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt hat und mir stets mit Rat und Tat bei offenen Fragen zur Seite stand.

Danken möchte ich auch Dr. J. Nährig vom pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar für die Hilfestellung bei den immunhistochemischen Auswertungen sowie Fr. C. Hartmann, die mich mit viel Geduld in die Geheimnisse der immunhistochemischen Färbungen eingewiesen hat.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Gänsbacher für die Möglichkeit, seine Laborräume mitnutzen zu dürfen.

Danken möchte ich auch meiner Großmutter, Fr. G. Conrades, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung ermöglicht hat, mich wissenschaftlich zu betätigen.

Danken möchte ich auch meiner Schwester Esther, die mir durch die Irrungen und Wirrungen der neuen-alten-neuen Rechtschreibung geholfen hat.

Mein herzlichster Dank geht an meinen Freund, Holger H.B. Schrödl, der mich mit viel Verständnis, noch mehr Geduld und moralischer Unterstützung zur Vollendung dieser Arbeit motiviert hat.