

Aus dem  
Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt an der externen Einrichtung  
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik  
der Universität Ulm  
(Univ.-Prof. Dr. Anita Ignatius)

***In vivo* Untersuchungen neuartiger Seidenfibroin-Scaffolds  
als Teilersatz des Meniskus am Schafmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Katharina Laura Gruchenberg  
aus München

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

***Für meine Eltern***

***Was immer du tun kannst, oder erträumst, tun zu können, beginne es.***

***Kühnheit besitzt Genie, Macht und magische Kraft.***

***Beginne es jetzt.***

Johann Wolfgang von Goethe

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Menisken.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Mechanische Eigenschaften und Funktion der Menisken .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Meniskusverletzungen .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Behandlungsmethoden .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Konservative Therapie.....	22
1.4.2 Reparatur.....	22
1.4.3 Totale und partielle Meniskektomie .....	23
1.4.4 Meniskusersatz.....	24
<b>1.5 Ziel der Studie.....</b>	<b>28</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Seidenfibroin-Scaffold für den Meniskusteilersatz .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Tierversuch.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3 Versuchsdesign und Gruppeneinteilung .....</b>	<b>33</b>
2.3.1 Implantationsmodell.....	34
2.3.2 Operation.....	35
2.3.3 Versorgung <i>post operationem</i> .....	40
<b>2.4 Aufarbeitung der Proben .....</b>	<b>41</b>
2.4.1 Präparation .....	41
2.4.2 Makroskopische Beurteilung.....	43
2.4.3 Biomechanische Untersuchungen .....	44
2.4.3.1 Indentationstest des tibialen Knorpels.....	44
2.4.3.2 Stress-Relaxations-Test von Meniskus und Scaffold .....	49
2.4.4 India Ink Färbung.....	51
2.4.5 Histologische Auswertung .....	52
2.4.5.1 Anfertigung von histologischen Schnitten.....	52
2.4.5.2 Färbung der histologischen Schnitte .....	54
2.4.5.3 Auswertung der histologischen Schnitte.....	55
2.4.5.3.1 Bestimmung des Fibrillationsindex des Knorpels.....	55

---

2.4.5.3.2	Knorpelbeurteilung nach Mankin .....	56
2.4.6	Immunchemische Analyse der Synovia .....	58
2.4.7	Statistische Auswertung .....	59
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Intraoperative Arthrosebeurteilung</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2</b>	<b>Klinischer Verlauf</b> .....	<b>61</b>
<b>3.3</b>	<b>Makroskopische Befunde</b> .....	<b>62</b>
3.3.1	Gelenkkapsel und Gelenkflüssigkeit.....	62
3.3.2	Meniskus und Scaffold.....	62
3.3.3	Tibialer und femoraler Gelenkknorpel.....	65
<b>3.4</b>	<b>Biomechanische Untersuchungen</b> .....	<b>67</b>
3.4.1	Biomechanik des tibialen Knorpels.....	67
3.4.2	Biomechanik der Menisken und Scaffolds.....	75
<b>3.5</b>	<b>India Ink Färbung</b> .....	<b>76</b>
<b>3.6</b>	<b>Histologische Auswertung</b> .....	<b>82</b>
3.6.1	Gelenkkapsel.....	82
3.6.2	Meniskus und Scaffold.....	89
3.6.3	Gelenkknorpel der medialen Tibiakondylen.....	100
3.6.3.1	Fibrillationsindex .....	104
3.6.3.2	Degenerationsgrad nach Mankin .....	107
<b>3.7</b>	<b>Immunchemie</b> .....	<b>111</b>
3.7.1	PGE <sub>2</sub> -Bestimmung.....	111
3.7.2	IL-1 $\beta$ -Bestimmung .....	112
3.7.3	IL-6-Bestimmung .....	112
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>114</b>
<b>4.1</b>	<b>Eignung des Modells</b> .....	<b>114</b>
4.1.1	Tiermodell.....	114
4.1.2	Versuchsdesign .....	116
<b>4.2</b>	<b>Eignung der Scaffolds für den Meniskusteilersatz</b> .....	<b>120</b>
4.2.1	Biologische Wechselwirkungen .....	120

4.2.1.1	Biokompatibilität der Seidenfibroin-Scaffolds .....	120
4.2.1.2	Bioaktivität und Einwachsverhalten der Seidenfibroin-Scaffolds .....	123
4.2.2	Mechanische Stabilität.....	129
4.2.3	Chondroprotektion .....	132
<b>4.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>137</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>138</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>142</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>157</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aa.	Arteriae
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CMI	Collagen Meniscus Implant
d	Knorpeldicke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
etc.	et cetera
F	Kraft
FDA	Food and Drug Administration
FI	Fibrillationsindex
HE	Hämatoxylin-Eosin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L	Länge
LiBr	Lithiumbromid
M.	Musculus
Men	Meniskus
mg	Milligramm
mm	Millimeter
MP	Messpunkt
N	Newton
N.	Nervus
NaCl-Lösung	Natriumchlorid-Lösung
nm	Nanometer
pg	Picogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
REM	Rasterelektronenmikroskop

RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
Sc	Scaffold
Sc3	Scaffold 3 Monate
Sc6	Scaffold 6 Monate
Sh	Sham
TE	Tissue Engineering
Tr	Teilresektion
vgl.	vergleiche
zw.	zwischen
μ-CT	Mikro-Computertomographie
μm	Mikrometer

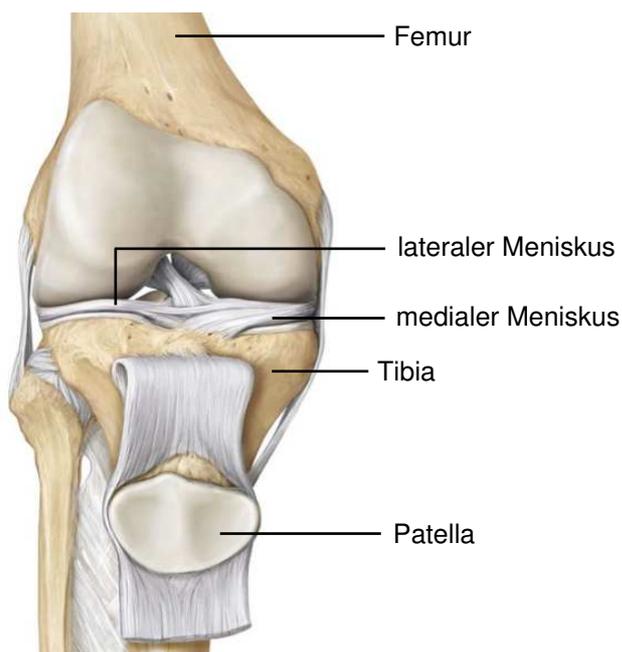
# 1. EINLEITUNG

Basierend auf der Annahme von Sutton, die Menisken seien funktionslose Rudimente eines Muskels, wurde die Bedeutung der Menisken für die Funktionalität des Kniegelenks zunächst stark unterschätzt (1897). So wurde beim Auftreten von Meniskusverletzungen lange Zeit der gesamte Meniskus entfernt. Erst als Fairbank 1948 als einer der Ersten die negativen Folgen der Meniskektomie beschrieb, beschäftigte man sich eingehend mit der Anatomie und der sich daraus ergebenden Funktion der Menisken. Dadurch wurde die funktionelle Bedeutung der Menisken erkannt und es wurde vermehrt nach therapeutischen Alternativen bei Meniskusverletzungen gesucht.

## 1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Menisken

### *Makroskopischer Aufbau*

Die Menisken sind halbmondförmige, knorpelige Strukturen, die im Kniegelenk zwischen den Gelenkflächen von Femur und Tibia gelagert sind (Abb. 1). Jedes Kniegelenk enthält einen medialen und einen lateralen Meniskus. Aufgrund der Inkongruenz des Kniegelenks weisen die Menisken einen keilförmigen Querschnitt mit einer hohen, peripheren Basis und einem dünn auslaufenden, zentralen Bereich auf (Abb. 2).



*Abb. 1: Schema des Kniegelenks; anteriore Ansicht; modifiziert nach Schünke et al., 2005*

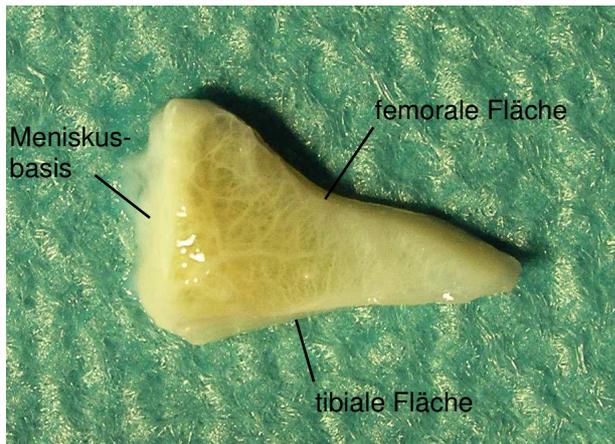


Abb. 2: Querschnitt durch einen medialen Schafmeniskus

Man unterteilt die Menisken makroskopisch in Vorderhorn, Pars intermedia und Hinterhorn (Abb. 3). An Vorder- und Hinterhorn gehen die Menisken in bandartige Strukturen über. Diese sogenannten Insertionsligamente fixieren die Menisken im Bereich der *Eminentia intercondylaris* an der Tibia. Das *Ligamentum transversum genus* verbindet die Vorderhörner der Menisken miteinander.

Der laterale Meniskus hat die Form eines unvollständigen Kreises mit eng beieinanderliegenden Ansatzstellen der Insertionsligamente (Abb. 3). Die Basis des lateralen Meniskus ist durch lockeres Bindegewebe mit Gelenkkapsel und Tibia verbunden. Im Bereich des Hinterhorns ist der laterale Meniskus zusätzlich zu den tibialen Insertionsligamenten durch ein meniskofemorales Band an der medialen Femurkondyle befestigt (Caldwell et al., 1994b).

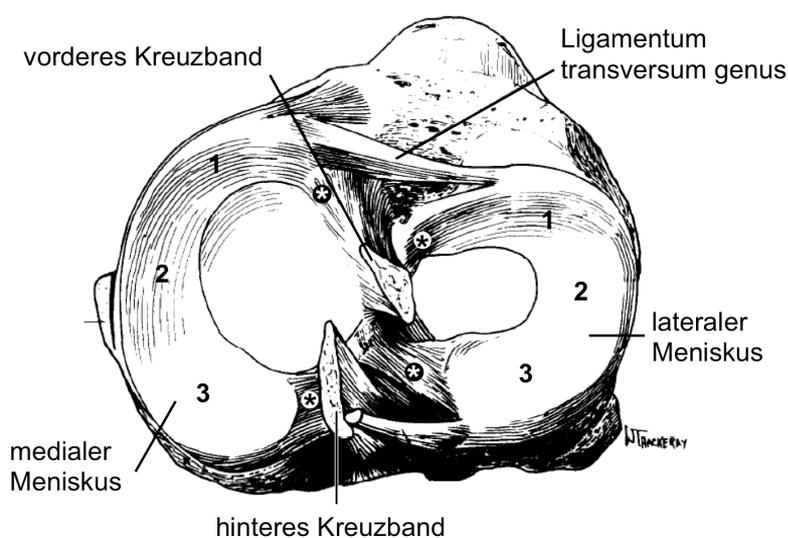


Abb. 3: Schemazeichnung des Tibiaplateaus mit Menisken und deren Insertionsligamenten (\*) modifiziert nach Warren et al., 1986; die Menisken gliedern sich in Vorderhorn (1), Pars intermedia (2) und Hinterhorn (3)

Der mediale Meniskus ähnelt in seiner Form einem „C“. Die Insertionsligamente setzen anterior beziehungsweise posterior der Insertionsligamente des lateralen Meniskus an der Tibia an und liegen damit weiter voneinander entfernt als die des lateralen Meniskus. Im Bereich der Basis ist der mediale Meniskus über faserreiches Bindegewebe mit der Gelenkkapsel und dem medialen Seitenband verwachsen (Caldwell et al., 1994b) und im Vergleich zum lateralen Meniskus ist er peripher durch das *Ligamentum coronarium* wesentlich straffer mit der medialen Tibiakondyle verbunden (Beveridge et al., 2011).

#### *Mikroskopischer Aufbau*

Das Meniskusgewebe wird aufgrund seiner strukturellen Zusammensetzung als Faserknorpel klassifiziert (Fithian et al., 1990; Messner & Gao, 1998; Rattner et al., 2011). Die Hauptbestandteile von gesundem Meniskusgewebe sind 75 % Wasser, 22 % Kollagen und ca. 1 % Proteoglykan (Kaplan et al., 2009). In diese faserreiche extrazelluläre Matrix sind nur wenige Zellen eingelagert, welche als Fibrochondrozyten bezeichnet werden (Ghadially et al., 1978; Webber et al., 1985; Mcdevitt & Webber, 1990).

Mit rund 78 % des Trockengewichts besteht der Meniskus zum größten Anteil aus Kollagenfasern (Ingman et al., 1974). Anders als bei Gelenkknorpel handelt es sich dabei hauptsächlich um Kollagen Typ I. Vor allem in den äußeren zwei Dritteln des Meniskus kommt fast ausschließlich Kollagen Typ I vor, wohingegen im zentralen Drittel Kollagen Typ II mit einem Anteil von 60 % überwiegt (Bullough et al., 1970). Neben Kollagen Typ I und II kommen auch Kollagen Typ III, V und VI in den Menisken vor (Rattner et al., 2011). Diese haben allerdings gemeinsam nur einen Anteil von unter 5 % am Gesamtkollagengehalt der Menisken. Petersen und Tillmann konnten 1998 anhand rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen zeigen, dass sich der Meniskus hinsichtlich des Verlaufs der Kollagenfasern deutlich in drei Schichten einteilen lässt (Abb. 4). In der nur ca. 10 µm dicken oberflächlichen Schicht sind die feinen Kollagenfibrillen netzartig angeordnet. Sie weisen dabei keine bevorzugte Verlaufsrichtung auf. Es folgt eine ca. 150-200 µm dicke Kollagenschicht, in der die Kollagenfasern zu durchschnittlich 30 µm großen lamellenartigen Bündeln zusammengelagert sind. Diese Faserbündel verlaufen größtenteils radial, wobei sie sich dabei überkreuzen und ein rautenförmiges Netzwerk bilden. Der mit Abstand größte Teil des Meniskus wird von der zentralen Schicht gebildet. In dieser Schicht

sind ca. 120 nm dicke Kollagenfibrillen zu unterschiedlich starken Bündeln zusammengelagert. Diese Kollagenstränge verlaufen streng zirkumferent und werden von radial verlaufenden Verankerungsfasern durchwoben. Die radial verlaufenden Verankerungsfasern strahlen von der Peripherie ausgehend in den Meniskus ein (Skaggs et al., 1994). Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass die Verankerungsfasern zu breiten Bahnen zusammengelagert sind, welche sich zum Zentrum des Meniskus hin verzweigen und zu neuen, schmälere Bahnen verbinden (Rattner et al., 2011). Dabei bilden sie eine wabenartige Struktur, welche die kräftigen, zirkumferent verlaufenden Kollagenstränge bündelt und für deren Zusammenhalt sorgt (Abb. 4).

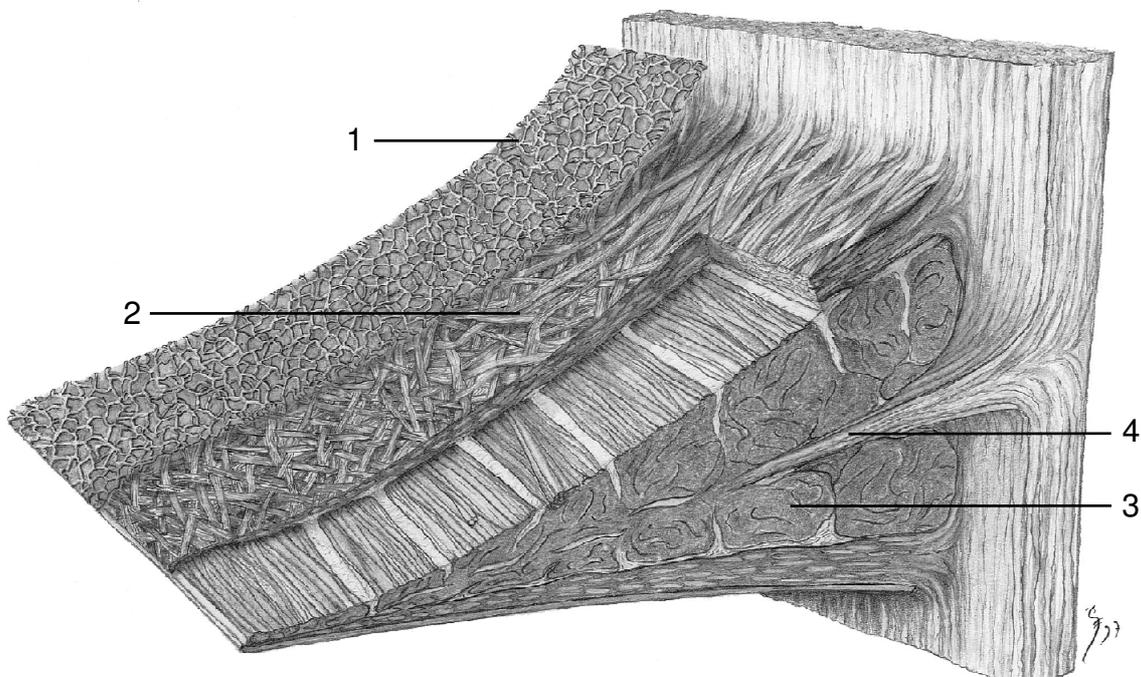
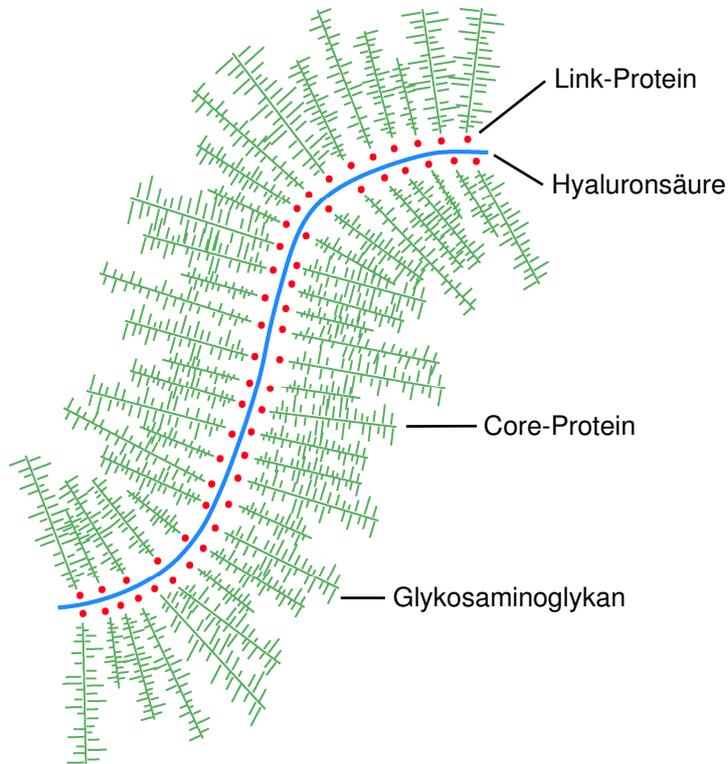


Abb. 4: Schemazeichnung der Kollagenstruktur des Meniskus nach Petersen und Tillman, 1998; oberflächliche, netzartige Schicht (1), mittlere, lamelläre Schicht (2), zentrale Schicht (3) aus zirkumferent verlaufenden Kollagensträngen durchwoben von radialen Verankerungsfasern (4)

Die Proteoglykanmonomere des Meniskus sind wie auch im artikulären Knorpel an Hyaluronsäure gebunden. So entstehen polyanionische Proteoglykanaggregate von ca. 2  $\mu\text{m}$  Länge (Abb. 5), welche zwischen die Kollagenfasern eingelagert sind (Stryer, 1996). Die Proteoglykane sind für die starke Hydratisierung des Meniskusgewebes verantwortlich, da sie durch ihre negative Ladung Wasser binden

können. In gesundem Meniskusgewebe vorhandene Proteoglykane enthalten ca. 40 % Chondroitin-6-sulfat, 10-15 % Chondroitin-4-sulfat, 20-30 % Dermatansulfat und 15 % Keratansulfat (Kaplan et al., 2009).

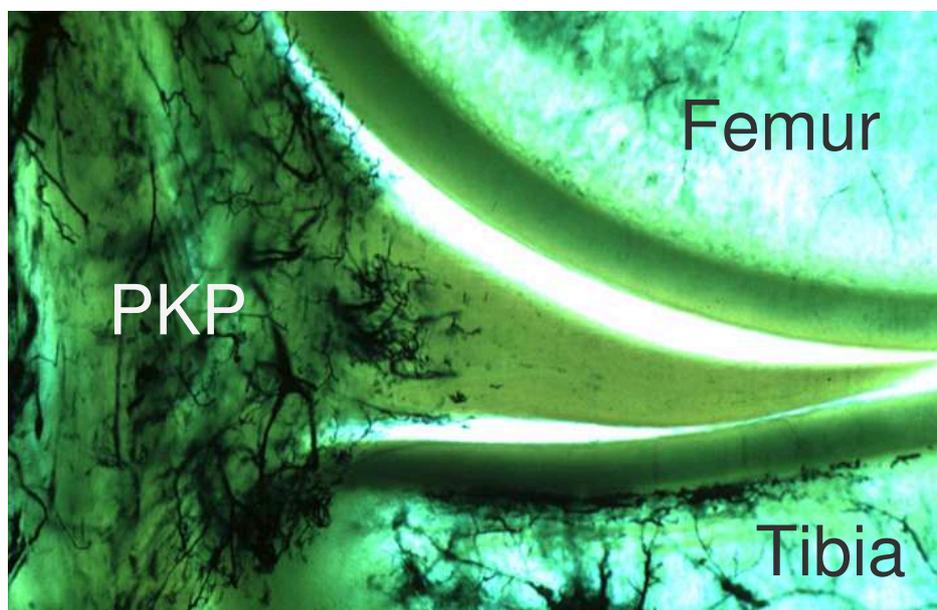


*Abb. 5: Schematische Darstellung eines Proteoglykanaggregats*

Die im Meniskusgewebe vorkommenden Zellen zeigen eine ausgeprägte Heterogenität (Nakata et al., 2001). In humanen Menisken lassen sich drei morphologisch unterschiedliche Fibrochondrozyten-Populationen unterscheiden (Nakata et al., 2001; Hoberg et al., 2006). Die oberflächliche Schicht des Meniskus enthält fusiforme Zellen ohne Zellfortsätze. Diese ähneln morphologisch den oberflächlichen Zellen des Gelenkknorpels. Unter dieser oberflächlichen Schicht kommen im basisnahen Bereich der Menisken fibroblastozytäre Zellen vor. Diese sind zwischen den Kollagenfaserbündeln in Reihen angeordnet und weisen eine große Anzahl an Zellfortsätzen auf (Hellio Le Graverand et al., 2001b). Durch das Vorkommen von fibroblastozytären Zellen sowie hauptsächlich Kollagen Typ I erinnert das Meniskusgewebe in diesem äußeren Bereich an Faserknorpel. Im inneren Drittel des Meniskus kommen hingegen runde bzw. polygonale chondrozytäre Zellen vor. Da hier auch überwiegend Kollagen Typ II vorkommt, ähnelt dieser Bereich des Meniskus dem hyalinen Knorpel.

### *Vaskularisation und Innervation*

Die Versorgung des Meniskusgewebes durch Blutgefäße erfolgt hauptsächlich durch Äste der *Aa. inferior medialis et lateralis genus* sowie der *Aa. superior medialis et lateralis genus* (Arnoczky & Warren, 1982). Diese Äste bilden ein perimeniskales Kapillarnetz im Gewebe der Gelenkkapsel. Innerhalb dieses Plexus verlaufen die Gefäße hauptsächlich zirkumferent, es strahlen aber auch einige kleine Äste radial in das Meniskusgewebe ein (Abb. 6). Diese aus dem Kapselgewebe einstrahlenden Blutgefäße dringen bis in die peripheren 10 % bis maximal 30 % des medialen Meniskus sowie bis in die peripheren 10 % bis maximal 25 % des lateralen Meniskus ein (Arnoczky & Warren, 1982). Somit sind ca. 80 % des Meniskusgewebes vollständig avaskulär (Danzig et al., 1983). Dieser avaskuläre Bereich wird ausschließlich durch Diffusion aus Synovialflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt. Basierend auf diesen anatomischen Begebenheiten kam es zu der weit verbreiteten Einteilung des Meniskus in drei Zonen. Der durchblutete äußere Bereich der Menisken stellt die rot-rote Zone dar, der innere avaskuläre Bereich die weiß-weiße Zone. Als rot-weiße Zone wird der dazwischen liegende Übergangsbereich bezeichnet.



*Abb. 6: 5 mm dicker Schnitt durch den medialen Anteil des Kniegelenks; Spalteholz Technik; radiale Gefäßäste strahlen aus dem perimeniskalen Kapillarplexus (PKP) in den medialen Meniskus ein (zur Verfügung gestellt von Steven Arnoczky)*

Die Innervation der Menisken erfolgt über Gelenkäste des *N. femoralis*, wobei auch hier hauptsächlich perimeniskal Nervenbündel, freie Nervenendigungen sowie spezielle Rezeptoren zu finden sind (Calder & Myers, 1999). Allerdings penetrieren einzelne Nerven auch in das periphere Meniskusgewebe. Dies ist vor allem im Bereich der Meniskushörner zu beobachten (Zimny et al., 1988). Durch freie Nervenendigungen sowie spezielle Mechanorezeptoren scheinen die Menisken demnach durchaus über eine sensorische sowie im Bereich der Hörner auch über eine propriozeptive Funktion zu verfügen.

## 1.2 Mechanische Eigenschaften und Funktion der Menisken

Wie alle biologischen Materialien verhalten sich auch die Menisken unter Belastung viskoelastisch. Das heißt ihr Verhalten wird sowohl durch visköse als auch durch elastische Elemente bestimmt. Dieses Verhalten ergibt sich durch den biphasischen Aufbau der Menisken (Fithian et al., 1990). Die feste Phase wird hauptsächlich von den Kollagenfasern und den darin verankerten Proteoglykanen gebildet. Diese Kollagen-Proteoglykan-Matrix weist eine sehr geringe Permeabilität auf. Die zweite Phase besteht aus der Gewebeflüssigkeit mit den darin gelösten Mineralstoffen. Bei Belastung der Menisken baut sich wegen der geringen Permeabilität vorerst ein hydrostatischer Druck im Gewebe auf (Setton et al., 1999). Die Last wird daher zunächst fast ausschließlich durch die Gewebeflüssigkeit getragen. Nach und nach kommt es dann zu einer Umverteilung der flüssigen Phase im Gewebe verbunden mit einer Matrixverformung. Außerdem tritt Flüssigkeit aus den belasteten Menisken aus und mit der Zeit übernimmt die Matrix einen steigenden Anteil der einwirkenden Lasten (Abb. 7).

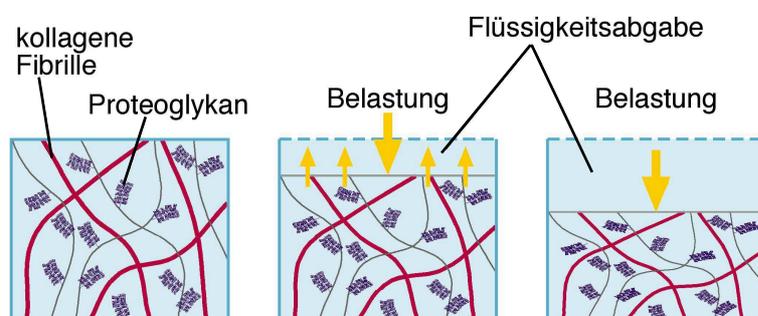


Abb. 7: Kompressionsverhalten eines biphasischen Gewebes

Als viskoelastisches Material zeigt das Meniskusgewebe unter Belastung Relaxations-, Kriech- und Hysterese-Verhalten. Sowohl diese Materialeigenschaften als auch die Struktur und Form der Menisken sowie die Belastungsverhältnisse im Kniegelenk beeinflussen die mechanische Funktion der Menisken.

Die Menisken sind ständig erheblichen Druck- und Zugbelastungen sowie Scherkräften ausgesetzt. Daher wurde in zahlreichen Studien das Verhalten der Menisken unter Kompression sowie Zugbelastung und unter Einwirkung von Scherkräften untersucht (Proctor et al., 1989; Anderson et al., 1991; Skaggs et al., 1994; Joshi et al., 1995; Mastbergen et al., 2006; Chia & Hull, 2008). In diesen Studien zeigte sich, dass sich das Meniskusgewebe in Abhängigkeit von der Probenentnahmestelle sowie der Ausrichtung der Probe im Versuchsaufbau anisotrop und heterogen verhält (Messner & Gao, 1998). Zum Beispiel konnten Proctor et al. bereits 1989 nachweisen, dass Meniskusproben aus dem Hinterhorn unter *confined compression* Bedingungen eine höhere Steifigkeit aufweisen als Meniskusproben aus dem Vorderhorn. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Meniskus unter Kompression weniger steif ist sowie eine deutlich geringere Permeabilität aufweist als Gelenkknorpel (Fithian et al., 1990). Besonders deutlich ausgeprägt ist die Anisotropie der Menisken unter uniaxialer Zugspannung. Der Zugmodul des Meniskusgewebes ist bei Prüfung der Probe in zirkumferenter Richtung fast zehnfach höher als bei Prüfung in radialer Richtung (Mastbergen et al., 2006). Dieses Verhalten ist auf die zirkumferente Anordnung der Kollagenfasern im Inneren des Meniskus zurückzuführen. Nur in der ca. 200 µm dicken oberflächlichen Schicht mit netzartig verwobenen Kollagenfasern verhält sich das Meniskusgewebe unter Zugspannung isotrop. Die Anordnung der Kollagenfasern wirkt sich auch auf das Verhalten des Meniskus unter Scherung aus. Wirkt die Scherspannung parallel zu dem Hauptverlauf der Kollagenbündel zeigt das Gewebe eine 20 % bis 33 % geringere Steifigkeit als bei Einwirken der Scherspannung senkrecht zum Verlauf der Kollagenfasern.

Die Keilform der Menisken gleicht die Inkongruenz zwischen Femur und Tibia aus. Dadurch wird die Kontaktfläche zwischen der femoralen und tibialen Gelenkfläche wesentlich vergrößert und die auftretenden Lasten werden innerhalb des Gelenks gleichmäßiger verteilt. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass im medialen Anteil des Kniegelenks rund 50 % und im lateralen Anteil bis zu 70 % der Lasten über die Menisken übertragen werden (Shrive et al., 1978; Kurosawa et al., 1980; Ahmed

& Burke, 1983; Chen et al., 1996). Diese Last tragende Funktion der Menisken lässt sich durch die anatomischen Begebenheiten erklären. Durch die Inkongruenz der Gelenkflächen stehen die Druckkräfte an der meniskofemorale Fläche nicht senkrecht zu den Druckkräften an der meniskotibialen Fläche (Abb. 8). Auf diese Weise entsteht eine radiale Kraftkomponente, welche die Menisken nach Außen drücken würde. Durch die ligamentäre Fixation der Menisken an der Tibia wird dies allerdings verhindert und die radiale Kraftkomponente wird innerhalb des Meniskusgewebes in eine Ringspannung umgewandelt (Abb. 9). Diese Ringspannung wird von den zirkumferent verlaufenden Kollagenbündeln aufgefangen und über die Insertionsligamente außerhalb der Gelenkfläche auf die Tibia übertragen. Auf diese Weise werden die im Bereich der Gelenkflächen auftretenden Kräfte weiter reduziert.

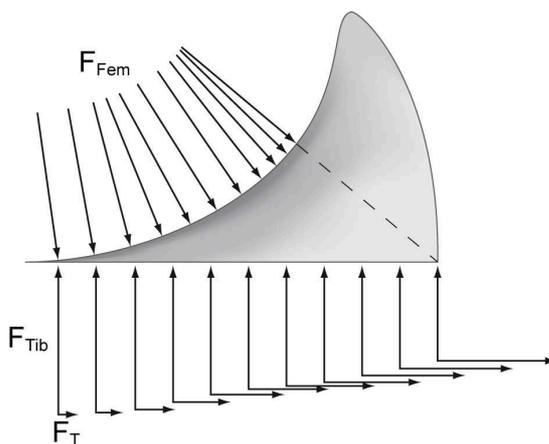


Abb. 8: Schematische Darstellung der auf den Meniskus einwirkenden Kräfte;  $F_{Fem}$  = Kraft an femoraler Fläche,  $F_{Tib}$  = Kraft an tibialer Fläche,  $F_T$  = radiale Kraftkomponente

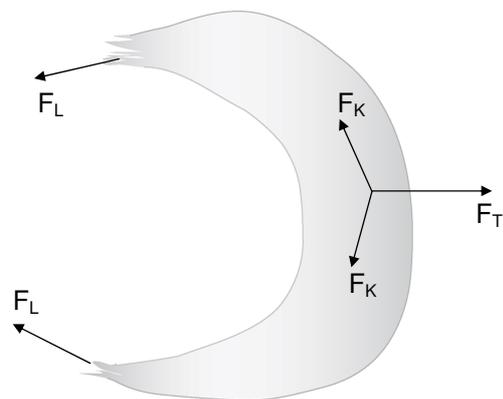


Abb. 9: Schematische Darstellung der im Meniskus wirkenden Kräfte;  $F_T$  = radiale Kraftkomponente,  $F_K$  = resultierende Kraft in den Kollagenbündeln (Ringspannung),  $F_L$  = Ligamenthaltekraft

Lange Zeit wurde auch von einer stoßdämpfenden Wirkung der Menisken ausgegangen (Krause et al., 1976; Kurosawa et al., 1980; Voloshin & Wosk, 1983). Allerdings werden seit Kurzem die Ergebnisse dieser Arbeiten und damit auch die stoßdämpfenden Fähigkeiten der Menisken in Frage gestellt (Andrews et al., 2011). Neben einer verbesserten Verteilung und Übertragung der Lasten innerhalb des Kniegelenks wird durch die Keilform der Menisken auch die Gelenkstabilität positiv beeinflusst. Der Einfluss der Menisken auf die Stabilität ist dabei abhängig von

Flexionswinkel, Belastungszustand und Unversehrtheit der Gelenkkapsel sowie der Bänder des Kniegelenks. Vor allem bei geschädigtem vorderen Kreuzband tragen die Menisken wesentlich zur Stabilität im Kniegelenk bei (Levy et al., 1982). Im gesunden Kniegelenk verhindert das vordere Kreuzband die anteriore Subluxation der Tibia. Bei Schädigung des vorderen Kreuzbandes kann der mediale Meniskus diese Funktion zu einem gewissen Grad übernehmen (Shoemaker & Markolf, 1986).

Zusätzlich scheinen die Menisken auch eine Rolle in der Gleitfilmbildung im Kniegelenk zu spielen. MacConaill schrieb bereits 1932, dass die Reibung im femorotibialen Gelenk nach Meniskektomie um ca. 20 % zunähme. Allerdings wurde der genaue Mechanismus der Reibungsreduktion bisher noch nicht weiter untersucht.

### **1.3 Meniskusverletzungen**

In den USA erleiden jedes Jahr ca. 61 aus 100 000 Menschen eine Meniskusverletzung (Baker et al., 1985). Damit sind Meniskusverletzung die am häufigsten auftretenden Verletzungen des Kniegelenks (Gu & Wang, 2010). Auch in Deutschland bilden Verletzungen der Menisken die häufigste Ursache für operative Eingriffe am Kniegelenk (Becker & Fink, 2008). Ätiologisch lassen sich dabei traumatisch und degenerativ bedingte Meniskusverletzungen unterscheiden.

Traumatische Meniskusverletzungen treten hauptsächlich bei jüngeren und sportlich aktiven Personen auf (Arnoczky et al., 1988b). Zu Sportarten mit erhöhter Inzidenz für Meniskusverletzungen zählen unter anderem Skifahren und viele Ballsportarten wie Fußball, Basketball, Rugby und Baseball (Baker et al., 1985). Bei diesen Sportarten tritt in Situationen mit Geschwindigkeitsänderungen und gleichzeitigem Richtungswechsel eine Kombination aus Flexion, Außenrotation und Valgus- oder Varusstress im Kniegelenk auf. Es entstehen starke Druck- und Scherbelastungen, die unter anderem zur Ruptur des Meniskusgewebes führen können. Männer erleiden deutlich häufiger traumatische Meniskusläsionen als Frauen (Ricklin et al., 1971; Baker et al., 1985; Greis et al., 2002a). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Männer wesentlich häufiger die sogenannten Risikosportarten betreiben als Frauen (Ricklin et al., 1971). Oftmals treten traumatische Meniskusverletzungen in Verbindung mit der Schädigung anderer Strukturen im Kniegelenk auf. Rupturiert zum Beispiel bei einem Unfall mit belastetem Kniegelenk das vordere Kreuzband, ist

diese Verletzung in ca. 30 % der Fälle mit einem zusätzlichen Meniskusschaden assoziiert (Poehling et al., 1990). Dabei wird im akuten Fall meist der laterale Meniskus geschädigt, im chronisch kreuzbanddefizienten Kniegelenk hingegen meist der mediale Meniskus (Caldwell et al., 1994a). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der mediale Meniskus bei Ruptur des vorderen Kreuzbandes wie bereits unter 1.2 beschrieben als sekundärer Stabilisator wirkt und dabei sehr hohen Belastungen ausgesetzt ist (Müller-Rath & Höher, 2007). Traumatisch bedingt entstehen typischerweise vertikale Längsrisse (Abb. 10 A), wobei insgesamt der mediale Meniskus deutlich häufiger betroffen ist als der laterale Meniskus (Baker et al., 1985). Dies ist möglicherweise durch die wesentlich starrere Verbindung des medialen Meniskus zu Gelenkkapsel und Tibiakondyle zu erklären. Kurze (< 5 mm) vertikale Längsrisse und Risse, die das Meniskusgewebe nicht in der vollen Dicke durchtrennen, sind in der Regel stabil und asymptomatisch. Diese Risse erfordern oft keine therapeutische Intervention. Ab einer Länge von ca. 1 cm werden vertikale Längsrisse instabil und rufen Symptome wie Schmerzen, Gelenkergüsse und Bewegungsblockaden im Gelenk hervor (Arnoczky et al., 1988b). In diesen Fällen ist eine Therapie erforderlich, um die Entstehung eines Korbhenkelrisses zu verhindern (Abb. 10 B) und die schmerzfreie Funktion des Gelenks auf Dauer zu gewährleisten. Wesentlich seltener entstehen bei einem Trauma vertikale Radialrisse (Abb. 10 C). Diese treten meist im Bereich der *Pars intermedia* des lateralen Meniskus auf und führen ab einer Länge von ca. 5 mm zu Instabilität und dem Auftreten von Symptomen. Unterbleibt in diesen Fällen ein therapeutischer Eingriff, ist die Bildung eines Lappenrisses recht wahrscheinlich (Abb. 10 D). Durch Verhaken des Lappens im Gelenk wird häufig ein schmerzhafter Zug auf die Gelenkkapsel ausgeübt und das Meniskusgewebe kann weiter einreißen. Durchtrennt ein Radialriss den Meniskus komplett, führt dies zu einem sofortigen Verlust der Last aufnehmenden Funktion des Meniskus.

Degenerative Meniskusläsionen betreffen vor allem Personen ab einem Alter von 40 Jahren (Greis et al., 2002a). Die Läsionen entstehen meist aufgrund einer über längere Zeit fortschreitenden Degeneration des Meniskusgewebes und sind nicht mit einem akuten Trauma in Verbindung zu bringen. Ein erhöhter Body-Mass-Index, Instabilitäten im Kniegelenk sowie bestimmte berufliche Tätigkeiten erhöhen das Risiko von degenerativen Meniskusverletzungen (Baker et al., 2002; Ford et al., 2005). Typische Symptome degenerativer Meniskusläsionen sind chronische

Schmerzen und Schwellungen im Bereich des Kniegelenks sowie chronische Bewegungsblockaden. Meist treten Horizontalrisse sowie komplexe Risse im Bereich des Hinterhorns auf (Abb. 10 E und F). Sehr häufig sind diese degenerativen Meniskuläsionen auch mit arthrotischen Knorpelveränderungen an Femur- und Tibiakondylen verbunden.

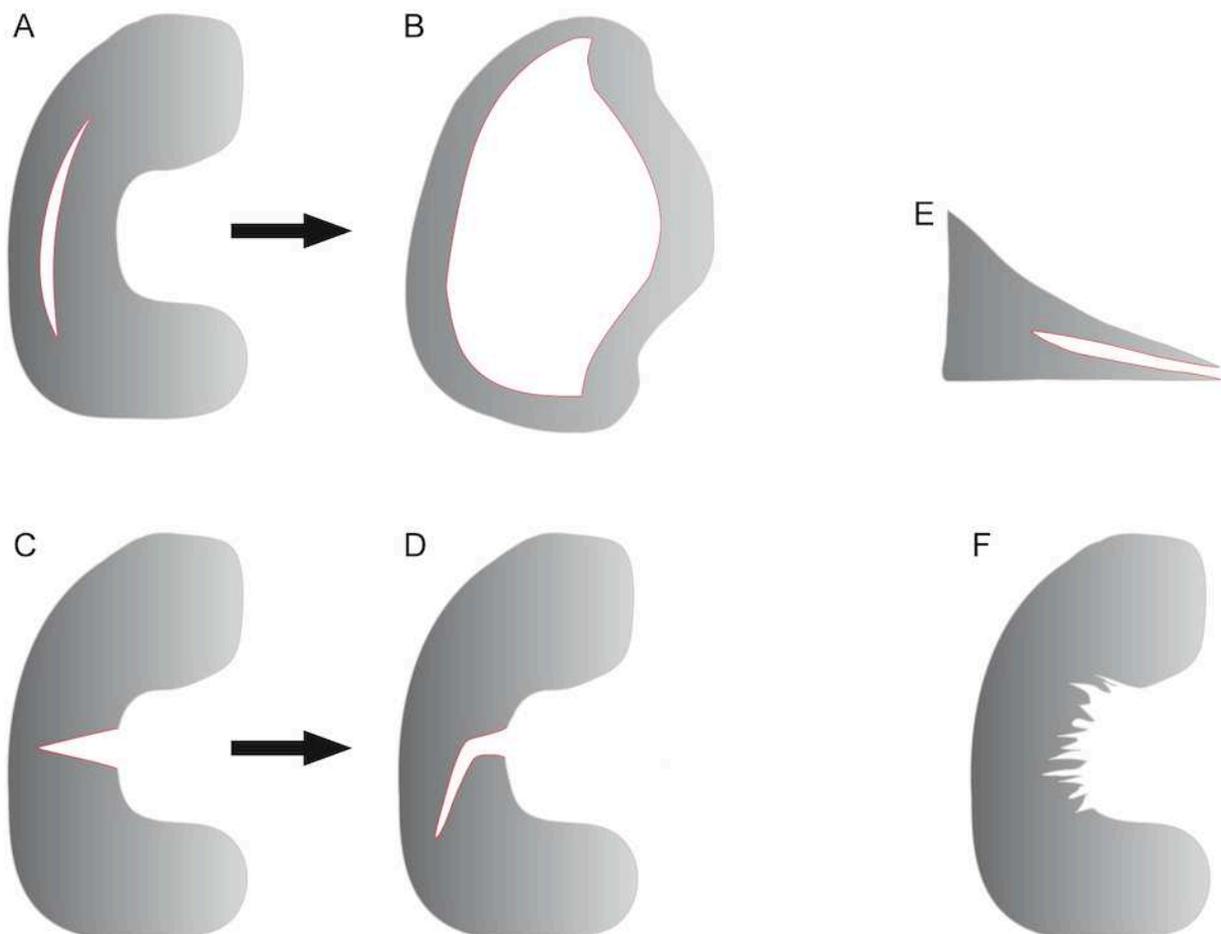


Abb. 10: Schemazeichnungen der verschiedenen Rissformen; A = vertikaler Längsriss, B = Korbhenkelriss, C = vertikaler Radialriss, D = Lappenriss, E = Horizontalriss, F = komplexer, degenerativer Riss

#### 1.4 Behandlungsmethoden

Lange Zeit galt die totale Meniscektomie als Therapie der Wahl für jede Art von Meniskuläsionen. Unmittelbar nach einer Meniscektomie ist der Patient symptomfrei und die Funktion des Kniegelenks ist meist deutlich verbessert. Die Meniscektomie führt allerdings zur Abnahme der Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia und

dadurch zu sehr hohen Druckkräften in bestimmten Arealen des Gelenks (Shiramizu et al., 2009). Die veränderten mechanischen Verhältnisse führen zur Entstehung degenerativer Knorpelveränderungen, die Fairbank bereits 1948 nach Meniskektomie beobachtete. Um die negativen Folgen der Meniskektomie zu vermeiden, wurde zunächst die partielle Meniskektomie als bessere Alternative vorgeschlagen und routinemäßig durchgeführt (Oretrop & Gillquist, 1978; Anderson et al., 1991; Andersson-Molina et al., 2002; Mandal et al., 2011). Aber selbst die Meniskusteilresektion fördert die Entstehung degenerativer Kniegelenksveränderungen (Burks et al., 1997). Daher ist es heutzutage vorderstes Therapieziel, das Meniskusgewebe nach Meniskusverletzungen möglichst vollständig zu erhalten (Miller et al., 2004). Die je nach Lokalisation stark begrenzte Heilungskapazität der Menisken erschwert dieses Vorhaben allerdings oft wesentlich. Nur im durchbluteten äußeren Drittel des Meniskus kann grundsätzlich eine Heilung durch Hämatombildung wie in anderen Geweben erfolgen. Im avaskulären Teil der Menisken erfolgt meist keine Heilung. Damit sind Lokalisation und Ausmaß der Läsion maßgebend für die Wahl der Behandlungsmethode.

#### **1.4.1 Konservative Therapie**

Bei kleinen (vergleiche Kapitel 1.3) oder unvollständigen Meniskusrissen, die kaum Symptome hervorrufen, kann zunächst ein konservativer Therapieversuch unternommen werden. Die konservative Therapie umfasst die Vermeidung starker Belastungen, die Gabe von Analgetika und Antiphlogistika und ein geeignetes Rehabilitationsprogramm. Dadurch können kleinere Risse möglicherweise spontan zur Heilung gebracht werden (Henning et al., 1988; Greis et al., 2002a). Bei größeren Rissen und bei Meniskusverletzungen, die erhebliche klinische Symptome hervorrufen, ist jedoch ein chirurgisches Eingreifen indiziert.

#### **1.4.2 Reparatur**

Insgesamt wird geschätzt, dass eine Refixation und damit Reparatur bei 10 % aller Meniskusverletzungen möglich wäre (Herwig et al., 1984). Tatsächlich werden allerdings nur ungefähr 3,2 % aller Meniskusrisse repariert. Bei Verletzungen in der rot-roten bzw. rot-weißen Zone sollte eine Refixation durchgeführt werden, da hier die Heilungsaussichten günstig sind. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Refixation ist es, dass das zu fixierende Gewebe intakt und der Degenerationsgrad

des Meniskus gering sind (Müller-Rath & Höher, 2007). Besonders geeignet für die Refixation sind basisnahe, vertikale Längsrisse. Angewendet werden unterschiedliche Nahttechniken meist im Rahmen einer Arthroskopie. Da diese Nahttechniken technisch sehr anspruchsvoll und mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden sind, werden bereits seit den 90er Jahren zahlreiche Implantat-unterstützte Techniken entwickelt. Durch diese soll die Operationszeit wesentlich verkürzt werden (Seil & Kohn, 2001). Resorbierbare und nicht-resorbierbare Implantate mit Pfeil-, Anker- oder Schraubenform, die mit speziellen Setz-instrumenten angewendet werden, sind auf dem Markt erhältlich. In *in vitro* und *in vivo* Studien sowie in Folgeuntersuchungen bei klinischer Anwendung zeigte sich allerdings, dass Implantat-assoziiert häufig Knorpelschäden sowie Fremdkörperreaktionen auftraten (Weiler et al., 2000; Hellio Le Graverand et al., 2001a; Otte et al., 2002; Miller et al., 2004). Auch das Versagen von Implantaten konnte beobachtet werden (Arnoczky et al., 1988b; Calder & Myers, 1999). Trotz der teilweise erheblichen Zeitersparnis sollten daher in der Regel die konventionellen Nahttechniken für die Reparatur von Meniskuläsionen favorisiert werden.

Die Heilung nach Meniskusnaht könnte vor allem bei Rissen mit Beteiligung der avaskulären Zone durch biologische Stimulation positiv beeinflusst werden (Müller-Rath & Höher, 2007; Makris et al., 2011). Ein möglicher Ansatz ist es, mit Nadelstichen oder Bohrkanälen durch die Meniskusbasis bis zum Bereich der Läsion einen Anschluss der Verletzung an die Blutgefäßversorgung zu erreichen (Arnoczky & Warren, 1982; Zhang et al., 1995). Andere Ansätze beinhalten das Einbringen eines exogenen Blutgerinnsels, mesenchymaler Stammzellen oder verschiedener Wachstumsfaktoren sowie das Abdecken der Läsion mit einem Synoviallappen (Baker et al., 1985; Arnoczky et al., 1988a; Henning et al., 1990; Cisa et al., 1995; Kopf et al., 2010). Obwohl in experimentellen und klinischen Studien mit diesen Methoden zum Teil gute Ergebnisse erzielt wurden, konnte sich bisher keine Methode in der klinischen Anwendung durchsetzen (Makris et al., 2011).

### **1.4.3 Totale und partielle Meniskektomie**

Indikation für eine totale Meniskektomie besteht heutzutage nur noch in sehr seltenen Fällen (Greis et al., 2002b). Eine mögliche Indikation wäre zum Beispiel eine ausgedehnte Verletzung mit starker Beteiligung der Meniskusbasis. Eine Reparatur der Läsion ist in diesem Fall häufig nicht möglich und bei einer partiellen

Meniskektomie müsste der Meniskus bis an die Basis reseziert werden, um ein erneutes Einreißen des Gewebes zu verhindern. Da hierbei Teile der Meniskusbasis entfernt werden müssten, hätte dies einen kompletten Funktionsverlust des Meniskus zur Folge und somit keine Vorteile gegenüber einer totalen Meniskektomie.

Typische Indikation für die partielle Meniskektomie besteht nach komplexen, degenerativen Meniskusverletzungen und nach Rissen in der weiß-weißen Zone, da in diesen Fällen eine Reparatur mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Erfolg hätte. Leider fällt ein Großteil aller Meniskusverletzungen in diese Kategorie und so ist die arthroskopische Teilresektion am medialen Meniskus die am häufigsten durchgeführte Operation am Kniegelenk (Müller-Rath & Höher, 2007). Bei der partiellen Meniskektomie werden bewegliche Gewebeteile reseziert und die Kontur des verbleibenden Meniskusrandes geglättet. Dadurch soll ein erneutes Einreißen verhindert werden (Greis et al., 2002b). Da eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Spitzendrücke, die auf die Tibiakondyle wirken, und der Menge des resezierten Gewebes besteht, sollte bei der partiellen Meniskusresektion grundsätzlich so viel gesundes Meniskusgewebe wie möglich erhalten werden (Andersson-Molina et al., 2002; Lee et al., 2006).

#### **1.4.4 Meniskusersatz**

Die negativen Folgen der totalen und partiellen Meniskektomie führten zu dem Bestreben einen geeigneten Ersatz für geschädigtes Meniskusgewebe zu finden. So wurden mit unterschiedlichem Erfolg bereits Transplantate und verschiedene Biomaterialien als Meniskusersatz getestet.

##### *Allografts*

Milachowski berichtete 1989 von der ersten allogenen Meniskustransplantation. Seitdem wurden sowohl frische als auch durch Kältekonservierung haltbar gemachte allogene Menisken transplantiert (Müller-Rath & Höher, 2007). In *in vivo* sowie in klinischen Studien konnten teilweise vielversprechende Ergebnisse nach Allografttransplantation erzielt werden, wobei Langzeitergebnisse noch ausstehen (Gu & Wang, 2010). Andererseits bestehen auch zahlreiche Limitationen wie zum Beispiel die hohen Kosten des Verfahrens, die schwierige Auswahl eines in Größe und Form passenden Transplantats und die Anwendung einer geeigneten Sterilisationsmethode, welche die Übertragung von Krankheitserregern zuverlässig verhindert. Außerdem wurde in verschiedenen Studien ein Schrumpfen des Transplantats

beschrieben (Canham & Stanish, 1986; Stollsteimer et al., 2000; Ryu et al., 2002). Dadurch kann das Transplantat die lasttragende Funktion des Meniskus auf Dauer nur bedingt erfüllen. Es ist auch noch nicht gesichert, ob die Allografttransplantation hinsichtlich der Auswirkungen auf den Gelenkknorpel einen Vorteil gegenüber der Meniskektomie hat (Wirth et al., 2002). Dennoch wird die Meniskustransplantation in einigen Therapiezentren, vor allem in den USA, regelmäßig durchgeführt. Nach Gu und Wang besteht gegenwärtig eine Indikation zur Meniskustransplantation bei jungen Patienten (<45 Jahre), die nach Meniskektomie weiterhin Schmerzen im entsprechenden Gelenk haben (2010). Für eine erfolgreiche Meniskustransplantation sollten diese Patienten keine oder nur geringe Degenerationserscheinungen im entsprechenden Kompartiment, eine normale Gliedmaßenachse sowie ein stabiles Kniegelenk aufweisen.

### *Autografts*

Neben Allografts wurden auch unterschiedliche Autografts z. B. aus Fett-, Sehnen- oder Perichondriumgewebe getestet (Kohn et al., 1992; Kohn et al., 1997; Bruns et al., 1998). Alle Autografts zeigten sich dem Meniskusgewebe hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften deutlich unterlegen. Auch konnte keine schützende Wirkung vor degenerativen Knorpelveränderungen nachgewiesen werden (Rijk, 2004). Daher konnte sich der Einsatz von Autografts für den Meniskusersatz nicht durchsetzen.

### *Prothesen*

Ein anderer Ansatz den Meniskus nach Meniskektomie zu ersetzen, ist die Implantation einer Prothese aus synthetischem Material. Es wurden Prothesen aus Dacron, Teflon, Polyurethan, Kohlefasern und anderen Materialien entwickelt und unter anderem experimentell *in vivo* getestet (Toyonaga et al., 1983; Wood et al., 1990; Sommerlath & Gillquist, 1992; Klompaker et al., 1996). Hierbei zeigten sich in vielen Fällen starke inflammatorische Reaktionen, starke Abnutzungserscheinungen oder negative Auswirkungen auf die benachbarten Gelenkknorpelflächen. Auch die Materialeigenschaften unterschieden sich meist gravierend von den Eigenschaften nativen Meniskusgewebes und die sichere Fixation im Gelenk war oft problematisch (Messner, 1994). Mit den bisher entwickelten synthetischen Prothesen scheint ein zufriedenstellender Meniskusersatz nicht möglich zu sein.

### *Tissue Engineering*

In den letzten Jahren wurde vor allem im Bereich des Tissue Engineerings nach neuen Strategien für den Meniskusersatz geforscht. Durch die Kombination von Zellen, Scaffolds und spezifischen Reizen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder mechanischer Stimulation, soll hierbei ein möglichst biomimetisches Gewebe erzeugt werden. Beim Tissue Engineering im engeren Sinn erfolgt die Gewebeerzeugung *in vitro* mit anschließender Implantation des entstandenen Regenerats. Dies soll die mechanischen Eigenschaften und die Regenerationsfähigkeit der Scaffolds verbessern (Martinek et al., 2006). Eine andere Strategie ist die Implantation azellulärer Scaffolds, die dann *in vivo* von lokal vorhandenen Zellen besiedelt werden. Beim Tissue Engineering von Meniskusgewebe wird bisher hauptsächlich die Methode der azellulären Implantation angewendet. Es wird davon ausgegangen, dass vor allem Fibroblasten aus der Synovialmembran die implantierten Scaffolds besiedeln und unter dem Einfluss der mechanischen Belastung ein dem Faserknorpel ähnliches Gewebe entstehen kann (Buma et al., 2004).

Scaffolds für das Tissue Engineering von Meniskusgewebe müssen sowohl biokompatibel als auch biodegradierbar sein (Arnoczky, 1999; Buma et al., 2004). Eine ausreichende mechanische Stabilität der Scaffolds ist vor allem in der Anfangsphase sehr wichtig, da in dieser Phase noch keine bindegewebige Verankerung stattgefunden hat und noch keine Stabilisierung durch eingewachsenes Gewebe besteht. Bisher wurden für das Tissue Engineering von Meniskusgewebe sowohl Scaffolds aus natürlichen Materialien als auch aus synthetischen Materialien verwendet. Scaffolds aus natürlichen Materialien bestehen entweder aus ganzen Geweben wie zum Beispiel der Dünndarmsubmukosa des Schweines oder aus einzelnen Gewebekomponenten wie Kollagenen, Proteoglykanen etc. (Cook et al., 1999; Welch et al., 2002; Bradley et al., 2007). Die verwendeten Gewebe sind dabei meist tierischen Ursprungs. Ein wesentlicher Vorteil der Scaffolds aus natürlichen Materialien ist, dass sie den Zellen eine natürliche Matrix für die Ansiedelung und Proliferation bieten können. Ihre Bioaktivität ist daher vergleichsweise hoch (Makris et al., 2011). Ein großer Nachteil von Scaffolds aus natürlichem Gewebe ist die unzureichende mechanische Stabilität zum Zeitpunkt der Implantation (Buma et al., 2004; Makris et al., 2011). Ein weiterer Nachteil ist, dass Porengröße und Scaffoldgeometrie nicht variiert werden können. Durch Zusammensetzung isolierter

Gewebebestandteile zu Scaffolds können die dreidimensionale Struktur und die mechanischen Eigenschaften allerdings angepasst und verbessert werden (Buma et al., 2004). Ein sehr bekanntes Scaffold aus dieser Kategorie ist das CMI (Collagen Meniscus Implant; früher: Menaflex™, Ivy Sports Medicine), das aus Kollagen Typ I und Glykosaminoglykanen aus bovinen Achillessehnen hergestellt wird. Nach *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen befand es sich als Meniskusteilersatz mehrere Jahre im klinischen Einsatz. Die im Jahr 2008 erteilte FDA-Zulassung für das CMI-Scaffold wurde allerdings 2010 zurückgezogen. Inzwischen ist das Scaffold nicht mehr auf dem Markt erhältlich. Die mit dem CMI-Scaffold durchgeführten klinischen Studien zeigten häufig positive Ergebnisse hinsichtlich Geweberegeneration und Schmerzentwicklung (Rodkey et al., 2008; Zaffagnini et al., 2011). Allerdings traten sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien ein Schrumpfen der Scaffolds, Probleme bei der Befestigung sowie eine unvollständige Integration der Scaffolds auf (Steadman & Rodkey, 2005; Martinek et al., 2006). Die mechanische Belastbarkeit der Kollagenscaffolds wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht.

Synthetische Scaffolds für den Meniskusersatz wurden bislang aus nicht degradierbaren Polymeren wie z. B. Polyurethan oder aus biodegradierbaren Polymeren wie z. B. Polycaprolacton, Polymilchsäure und Polyglykolsäure hergestellt. Auch Kombinationen dieser Polymere kamen bereits zum Einsatz. Theoretisch können Porengröße, Fasergeometrie sowie die mechanischen Eigenschaften der synthetischen Scaffolds durch Veränderungen im Produktionsprozess an unterschiedliche Bedürfnisse angepasst werden (Gu & Wang, 2010; Makris et al., 2011). Auch die Degradationsgeschwindigkeit der resorbierbaren Scaffolds kann grundsätzlich variiert werden. Praktisch erwies es sich allerdings als äußerst schwierig, die Degradationsgeschwindigkeit so zu verändern, dass *in vivo* eine stabile Gewebematrix entstehen konnte, bevor Degradationsprozesse die mechanische Funktionalität der Scaffolds bereits stark vermindert hatten. Die Degradation der resorbierbaren Polymere erfolgt hauptsächlich über Hydrolyse sowie über enzymatischen Abbau wobei meist ausschließlich nicht-toxische Abbauprodukte entstehen (Buma et al., 2004; Müller-Rath et al., 2004). Nur selten wurde von Entzündungsreaktionen durch saure oder toxische Abbauprodukte berichtet (Ignatius & Claes, 1996; De Groot et al., 1997). Die Bioaktivität der Polymerscaffolds ist wesentlich geringer als die Bioaktivität der Scaffolds aus natürlichen Materialien (Makris et al., 2011). Oft weisen synthetische Scaffolds eine vergleichsweise raue

Oberfläche auf, wodurch der benachbarte Gelenkknorpel geschädigt werden könnte. In verschiedenen Tiermodellen wurden bisher vor allem Scaffolds auf Polyurethanbasis eingesetzt und auch eine klinische Studie wurde bereits mit einem Polycaprolacton-Polyurethan-Scaffold (Actifit<sup>®</sup>, Orteq Ltd.) durchgeführt (Hannink et al., 2010; Maher et al., 2010; Verdonk et al., 2011). Meist konnte eine gute Integration sowie Besiedelung der Scaffolds gezeigt werden. In einer Studie wurde aber auch von einer unzureichenden Integration der Scaffolds berichtet (Klompaker et al., 1991). Der Einsatz als Meniskustotalersatz führte zu einer starken Schädigung des Gelenkknorpels und scheint daher nicht empfehlenswert zu sein (Hannink et al., 2010). Beim *in vivo* Einsatz als Teilersatz entsprach das Ausmaß der entstandenen degenerativen Knorpelschäden dem Ausmaß nach Teilresektion (Maher et al., 2010). Ein Vorteil gegenüber der Teilresektion bleibt somit fraglich. Verschiedene Ansätze wie die Beschichtung der Scaffoldoberfläche oder die Beschichtung der Scaffolds mit Komponenten der natürlichen extrazellulären Matrix könnten in Zukunft die Eignung synthetischer Scaffolds als Meniskusersatz verbessern (Buma et al., 2004).

## 1.5 Ziel der Studie

Durch den Ersatz von Meniskusgewebe nach Meniskusverletzungen sollen die negativen Auswirkungen der totalen oder partiellen Meniskektomie vermieden werden. Daher wurden wie zuvor beschrieben bereits unterschiedlichste natürliche und synthetische Materialien als Meniskusersatz getestet. Keines dieser Materialien konnte bisher das Meniskusgewebe zufriedenstellend ersetzen. Die verschiedenen Strategien des Tissue Engineerings erzielten bisher die vielversprechendsten Ergebnisse. Dennoch war meist die mechanische Belastbarkeit der eingesetzten Materialien noch nicht ausreichen oder es erfolgte eine zu rasche Degradation der Materialien *in vivo*. Häufig konnte auch kein Vorteil gegenüber der partiellen oder totalen Meniskektomie hinsichtlich der Auswirkung auf den Gelenkknorpel gezeigt werden.

In der vorliegenden Studie wurde ein neuartiges Scaffold aus Seidenfibroin für den Meniskusteilersatz getestet und dessen Nutzeffekt mit dem der partiellen Meniskektomie verglichen. Materialien aus Seidenfibroin, die schon seit längerem in anderen Bereichen als Biomaterialien eingesetzt werden, zeichnen sich besonders durch ihre hohe mechanische Belastbarkeit sowie eine langsame Degradation aus. In

dieser Studie sollte nun untersucht werden, ob sich die Seidenscaffolds als Meniskusersatz nach partieller Meniskektomie eignen. Ein wichtiges Beurteilungskriterium war dabei die Fähigkeit der Seidenscaffolds, das Auftreten degenerativer Knorpelveränderungen verhindern bzw. vermindern zu können. Außerdem fand eine mechanische Untersuchung der Scaffolds vor der Implantation und nach Versuchsende statt. Des Weiteren wurde der Biokompatibilität des Materials beim Einsatz im Kniegelenk untersucht sowie die Integration der Scaffolds in das Meniskusgewebe histologisch beurteilt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Seidenfibroin-Scaffold für den Meniskusteilersatz

Die verwendeten Seidenfibroin-Scaffolds wurden von einem Industriepartner (Orthox Ltd., Abingdon, Großbritannien) des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm entwickelt und dem Institut für *in vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Die Scaffolds wurden aus Rohseide der Seidenspinnerraupe (*Bombyx mori*) hergestellt. Hauptbestandteile dieser Seide sind die Proteine Fibroin und Sericin. Jeweils zwei Fibroinketten bilden zusammen eine Seidenfaser, die von dem kleberartigen Glykoprotein Sericin umgeben wird. Da Sericin nachweislich immunogene Reaktionen hervorruft (Panilaitis et al., 2003), wurde dieses vor dem eigentlichen Produktionsprozess durch ein spezielles Verfahren sorgfältig von den Seidenfasern entfernt. Die zurückbleibenden Fibroinfasern wurden in Lösung gebracht und die Fibroin-Lösung härtete dann in Gussformen aus, die in Anlehnung an die Anatomie des medialen Schafsmeniskus erstellt worden waren. Die so erzeugten Seidenfibroin-Scaffolds waren im Querschnitt keilförmig, besaßen eine glatte Oberfläche und eine poröse Struktur im Inneren (Abb. 11). Die Scaffolds waren einzeln in Röhrchen verpackt, die mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung gefüllt waren. Zum Zeitpunkt der Lieferung waren die Scaffolds bereits durch Gammastrahlung (Bestrahlungsdosis 25 KGy) sterilisiert.



Abb. 11: Seidenfibroin-Scaffold mit glatter Oberfläche und keilförmigem Querschnitt; angepasst an die Anatomie des ovinen medialen Meniskus

Vor dem Beginn der Tierstudie wurden die Fibroin-Scaffolds am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik durch *in vitro* Versuche näher

charakterisiert. Eine strukturelle Analyse der Scaffolds erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskop (REM), Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT) und unterschiedlicher Färbemethoden. REM- und  $\mu$ -CT-Analysen zeigten, dass über 90 % der Poren einen Durchmesser von  $> 100 \mu\text{m}$  aufwiesen (Abb. 12 und Abb. 13). Mit Hilfe eines speziellen 3D-Software Paketes wurde ein Anteil der offenen Porosität an der Gesamtporosität von 85 % ermittelt.

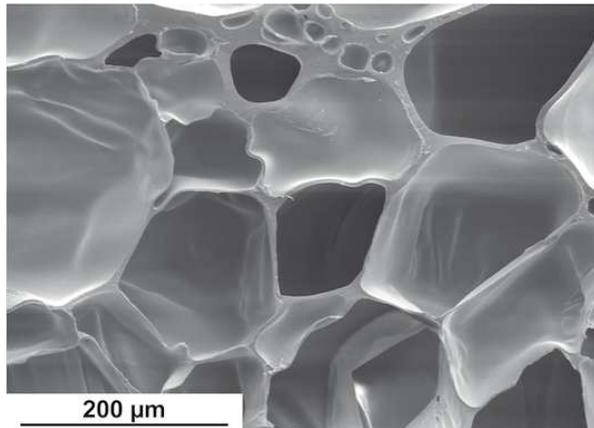


Abb. 12: REM-Aufnahme eines Seidenfibroin-Scaffolds

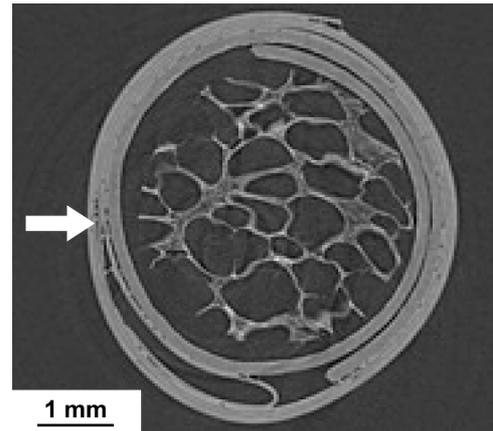


Abb. 13:  $\mu$ -CT-Scan einer Scaffold-Stanze ( $\varnothing 3 \text{ mm}$ ) in der Probenhalterung (Pfeil)

Färbeversuche an Scaffoldproben mit verschiedenen Methoden und Farbstoffen ergaben allerdings, dass die Farbstofflösungen nicht vollständig in das Probeninnere eindringen konnten (Abb. 14). Möglicherweise liegt der tatsächliche Anteil der offenen Porosität daher unter dem Wert, der zuvor mit Hilfe der  $\mu$ -CT-Messungen ermittelt wurde.

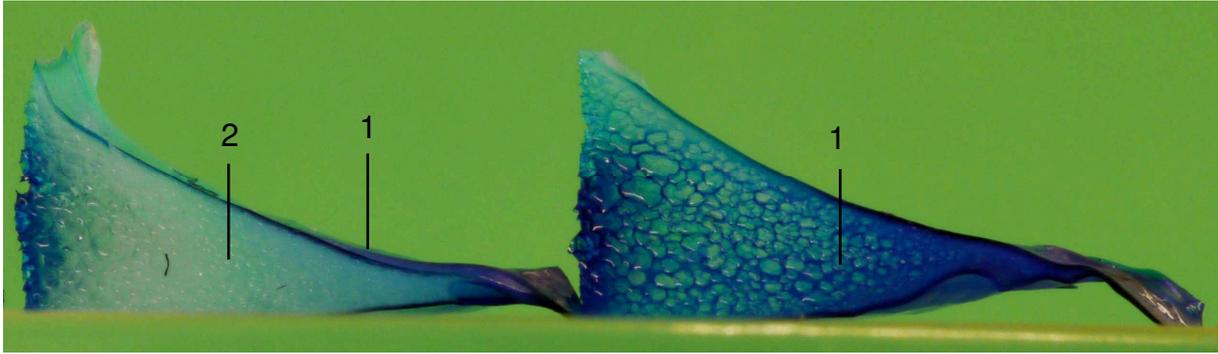


Abb. 14: Scaffoldprobe nach Färbung mit Giemsa (10 %); aus der Probe wurde nach der Färbung ein Mittelstück herausgeschnitten (links); die Farblösung haftete an der Oberfläche des Scaffolds (1), konnte aber nicht in das Innere der Probe eindringen (2)

Die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds wurden mit einem Kompressionstest in einer Materialprüfmaschine ermittelt. Der Elastizitätsmodul der Scaffolds lag bei ca. 1 MPa bei einer Dehnung von < 10 %.

Für die Prüfung der Biokompatibilität wurden Scaffoldstanzen *in vitro* mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark kultiviert. Nach 29 Tagen konnte eine Zellschicht auf der Oberfläche der Scaffoldstanzen nachgewiesen werden (Kolbe, 2013). Histologische und immunhistologische Färbungen sowie Genexpressionsanalysen ließen auf eine chondrogene Differenzierung dieser Zellen schließen. Im Inneren der Proben fand kein Zellwachstum statt, vermutlich aufgrund der oben beschriebenen mangelnden Interkonnektivität der Poren. Zytotoxische Eigenschaften des Materials konnten durch diesen Zellversuch ausgeschlossen werden.

## 2.2 Tierversuch

Die Durchführung des Tierversuchs zur Untersuchung der Seidenfibroin-Scaffolds wurde am 17.09.2010 durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Versuchsnummer 1020).

In der Studie wurden weibliche Merinoschafe verwendet. Mit einem Alter von durchschnittlich 4 Jahren (2,5-6 Jahre) und einem mittleren Körpergewicht von 88 kg (69-111 kg) besaßen alle Tiere skelettale Reife.

Die Einstellung der Tiere in das Tierforschungszentrum der Universität Ulm am Oberberghof erfolgte zwei Wochen *prae operationem*. Die Tiere wurden zunächst in Gruppen à 8-10 Tieren in eingestreuten Gruppenboxen gehalten. Jeweils 48 Stunden

vor der Operation wurden die Tiere in Einzelboxen mit Spaltenboden umgestellt. *Post operationem* kamen die Tiere für eine Woche in eingestreute Einzelboxen. Über den restlichen Versuchszeitraum erfolgte die Haltung der Schafe in einem Einraumlaufstall mit Stroheinstreu.

Die Tiere erhielten Wasser und Heu *ad libitum* sowie einmal täglich Graspellets. Durch künstliches Licht wurde über den gesamten Versuchszeitraum ein gleichmäßiger Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden aufrecht erhalten. Eine Behandlung der Schafe gegen Endo- und Ektoparasiten erfolgte mit 0,2 mg/kg KG Doramectin (Dectomax® 1%ige Injektionslösung für Rinder und Schafe, Elanco Animal Health) subkutan durch die Tierärzte des Tierforschungszentrums im Abstand von drei Monaten.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte streng nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.5.2006 und den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

### 2.3 Versuchsdesign und Gruppeneinteilung

Folgendes Versuchsdesign wurde gewählt:

Tab. 1: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen in Abhängigkeit der durchgeführten Behandlung sowie der Standzeit

		Behandlung	Standzeit in Monaten	Tierzahl
<b>Gruppe 1</b>	<b>(Sc3)</b>	Scaffold	3	9
<b>Gruppe 2</b>	<b>(Sh)</b>	Sham	6	9
<b>Gruppe 3</b>	<b>(Tr)</b>	Teilresektion	6	9
<b>Gruppe 4</b>	<b>(Sc6)</b>	Scaffold	6	10

Jeweils acht Schafe wurden randomisiert in eine der Gruppen aus Tab. 1 eingeteilt. Zusätzlich standen fünf Tiere als Reservetiere zur Verfügung, um mögliche versuchsunabhängige Tierverluste ausgleichen zu können. Diese Tiere wurden ebenfalls randomisiert einer der vier Gruppen zugeordnet und entsprechend operiert.

So ergab sich eine Gesamtanzahl von 37 Tieren.

Den Tieren der Gruppe 1 (Sc3) wurde nach Teilresektion am medialen Meniskus ein Seidenfibrin-Scaffold implantiert. Die Standzeit nach der Operation betrug drei Monate. Bei den Tieren der Gruppe 2 (Sh) erfolgte ebenfalls eine Arthrotomie des Kniegelenks aber kein Eingriff am Meniskus. Mit dieser Gruppe sollte überprüft werden, ob die Arthrotomie die mechanischen Verhältnisse im Kniegelenk verändern und dadurch bereits degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels hervorrufen kann. Den Tieren aus Gruppe 3 (Tr) wurde ein Teil des Meniskus reseziert. Der entstandene Defekt blieb bei diesen Tieren leer. Den Tieren der Gruppe 4 (Sc6) wurde nach Teilresektion ein Scaffold implantiert. Die Standzeit in den Gruppen 2 (Sh), 3 (Tr) und 4 (Sc6) betrug sechs Monate. Die Sham- und die Teilresektion-Gruppe dienten als orientierende Vergleichsgruppen.

### **2.3.1 Implantationsmodell**

Für den Eingriff am medialen Meniskus musste zunächst eine Arthrotomie am rechten Kniegelenk durchgeführt werden. Die Arthrotomie wurde in allen Gruppen identisch durchgeführt. In den Gruppen 1 (Sc3), 3 (Tr) und 4 (Sc6) wurde im Anschluss an die Arthrotomie ein möglichst standardisiertes Meniskusstück von ca. 9 mm Länge und ca. 7 (kranial) bzw. 5 mm (kaudal) Breite im Bereich des Vorderhorns und des kranialen Anteils der *Pars intermedia* reseziert. Dabei blieben ca. 2 mm der Meniskusbasis für die Fixation des Scaffolds erhalten (Abb. 15). In manchen Fällen mussten die Maße geringfügig an die anatomischen Besonderheiten des jeweiligen Tieres angepasst werden. Das resezierte Meniskusstück diente bei den Tieren der Gruppen 1 (Sc3) und 4 (Sc6) als Schablone, um das Scaffold in die jeweils erforderliche Form und Größe zu schneiden (Abb. 16). Das zugeschnittene Implantat wurde durch zwei Horizontalnähte im Defekt fixiert. Bei dieser Nahttechnik wurde die glatte Oberfläche des Scaffolds nicht penetriert. Eine negative Beeinflussung des tibialen oder femoralen Knorpels durch den Faden sollte so vermieden werden.

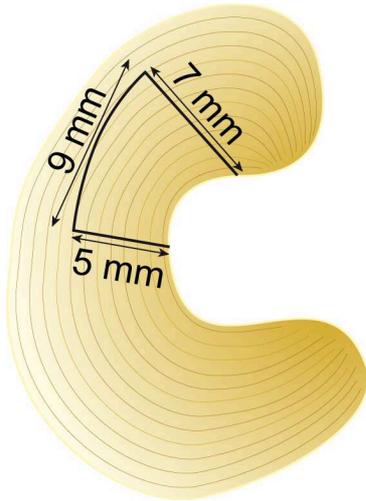


Abb. 15: Schema des medialen Meniskus; Schnittführung für die Resektion eingezeichnet



Abb. 16: Zugeschnittenes Scaffold

### 2.3.2 Operation

#### Vorbereitung

Präoperativ fasteten die Schafe für 48 Stunden. Durch diese Maßnahme wurde das Risiko des Regurgitierens vor der Intubation minimiert. Die Wasseraufnahme war weiterhin *ad libitum* über Selbsttränken möglich.

Am Tag der Operation erhielten die Tiere noch im Stall 0,3 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun<sup>®</sup> 2%, Injektionslösung für Tiere: Rinder, Pferde, Hunde, Katzen; Bayer AG) als Prämedikation intramuskulär. Außerdem erfolgte hier bereits die antibiotische Versorgung der Tiere mit 7 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl<sup>®</sup> LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH) sowie die Analgesie mit 2 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl<sup>®</sup> 50 mg/ml, Pfizer Deutschland GmbH). Beide Präparate wurden subkutan verabreicht. Nach Wirkungseintritt der Sedation mit Xylazinhydrochlorid wurden die Tiere in den Operationsvorbereitungsraum transportiert. Hier wurde nach Schur, Reinigung und Desinfektion des linken Ohres ein Venenverweilkatheter (Vasofix<sup>®</sup> Braunüle 20 G, BBraun Melsungen AG) in die *Vena auricularis lateralis* gelegt und mit Klebeband fixiert. Über den Venenverweilkatheter erfolgte nach Spülung mit steriler Natriumchlorid-Lösung die Narkoseeinleitung mit bis zu 10 mg/kg KG Thiopental-Natrium (Thiopental Inresa 0,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH) je nach Wirkung. Sofort nach Ausbleiben des Schluckreflexes erfolgte die orotracheale

Intubation und die Schafe wurden auf den Vorbereitungstisch in Rückenlage verbracht. Der Tubus wurde an ein Inhalationsnarkosegerät angeschlossen und die Narkose über die Dauer der Operation mit ca. 1-2 % Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Co. KG) in der Atemluft bei Spontanatmung aufrecht erhalten.

Die rechte Hintergliedmaße wurde geschoren und mit jodhaltiger Flüssigseife (Jodosept<sup>®</sup>, Vétoquinol GmbH) gereinigt. Anschließend wurde das Tier in den Operationsraum verbracht und dort auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert. Um ein Aufgasen des Pansens während der Operation zu verhindern, erhielten die Schafe eine Pansensonde. Ein Gel (Vidisic<sup>®</sup> Augengel, Bausch & Lomb) wurde in die Augen gegeben, um ein Austrocknen der Cornea zu verhindern. Zur Kreislaufstabilisation erhielten die Schafe eine Elektrolyt-Infusionslösung (Jonosteril<sup>®</sup> Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) als Dauerinfusion über die *Vena auricularis lateralis*. Das gereinigte rechte Hinterbein wurde zunächst mit Ethanol (70 %) und anschließend zusätzlich mit einem alkoholischen Hautdesinfektionsmittel (Freka-Derm<sup>®</sup> Hautdesinfektion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) desinfiziert. Dann wurden über die rechte Klaue bis über das Sprunggelenk zwei sterile Handschuhe gezogen und das Schaf wurde unter Aussparung der zu operierenden Gliedmaße mit sterilen Tüchern abgedeckt.

#### *Zugang und Arthrotomie*

Nach Palpation von *Patella*, Patellarsehne, *Tuberositas tibiae* und medialem Seitenband erfolgte eine ca. 6 cm lange Hautinzision parallel zum kranialen Rand des medialen Seitenbandes. Das darunterliegende Unterhautgewebe, die *Fascia femoralis superficialis* und *Fascia genus*, sowie die darin einstrahlende Endaponeurose des *M. quadriceps femoris* wurden auf gleicher Länge durchtrennt. Nach Mobilisierung der Kniefaszie wurde ein Ast der *Arteria genus descendens* sichtbar. Dieser wurde isoliert, mit dem Elektrokauter koaguliert und anschließend durchtrennt. So wurde der Zugang zum femoralen Ansatz des medialen Seitenbandes möglich. Die rigiden Seitenbänder des Schafes verhindern das Aufklappen des Kniegelenks effektiv. Es ist allerdings nicht möglich eine Resektion von Meniskusgewebe durchzuführen, ohne das Gelenk aufzuklappen. Daher wurde der Bandansatz des medialen Seitenbandes inklusive des *Epicondylus medialis* mit einem Meißel knöchern vom Femur gelöst (Abb. 17). Die bindegewebigen Verwachsungen des Seitenbandes mit der Gelenkkapsel wurden vorsichtig mit einer

Schere durchtrennt. Dadurch konnte das Seitenband nach distal geklappt werden (Abb. 18). Da der mediale Teil des infrapatellaren Fettkörpers das Vorderhorn des Meniskus verdeckte, wurde er von der Kapsel gelöst und mit einem elektrochirurgischen Messer reseziert. Als nächstes erfolgte die Inzision der Gelenkkapsel knapp oberhalb der Anheftung an den Meniskus. Kranial wurde der Schnitt im rechten Winkel ca. 1 cm nach proximal fortgeführt. Durch Ansetzen eines Hohmann Knochenhebels zwischen den Femurkondylen wurde unter starker Beugung sowie Außenrotation im Kniegelenk das Vorderhorn und Teile der *Pars intermedia* des Meniskus zugänglich. Der chirurgische Zugang sowie die Arthrotomie wurden in allen Gruppen identisch durchgeführt.



Abb. 17: Lösen des medialen Seitenbandes am femoralen Ursprung



Abb. 18: Gelöster Epicondylus medialis mit frei präpariertem medialen Seitenband

#### *Meniskusteilresektion und Scaffoldimplantation*

Bei den Tieren der Gruppen 1 (Sc3), 3 (Tr) und 4 (Sc6) wurde im Anschluss an die Arthrotomie vorsichtig ein Meniskusstück mit einem spitzen Skalpell (Skalpellklinge Nr. 11, Aesculap AG) reseziert (Abb. 19). An Hand dieses resezierten Meniskusstücks wurde ein passendes Implantat gefertigt. Zwei doppelt armierte, nicht resorbierbare Fäden (Mopylen<sup>®</sup> 3-0, Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG) wurden, die Oberfläche des Implantats nicht penetrierend, in das Implantat vorgelegt und die Nadeln nacheinander von innen so durch das Meniskusgewebe gestochen, dass sie an der Meniskusbasis austraten. Durch vorsichtigen und gleichmäßigen Zug an allen vier Fadenenden konnte das Implantat in den

Meniskusdefekt verbracht werden (Abb. 20). Der Sitz des Implantats im Defekt wurde nach zwei Extensions- und Flexionszyklen überprüft und anschließend das Implantat durch Verknoten der Fäden an der Meniskusbasis fixiert. Den Tieren der Teilresektion-Gruppe wurde kein Scaffold implantiert und der Defekt blieb leer.



Abb. 19: Medialer Meniskus nach Teilresektion

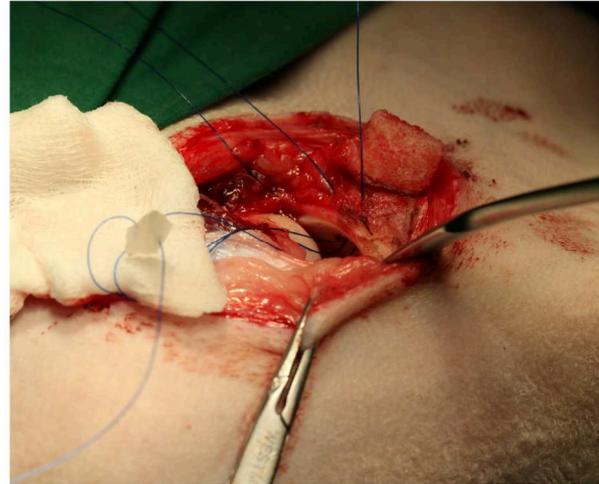


Abb. 20: Einnähen des Scaffolds

### Wundverschluss

Die Reposition und Fixation des *Epicondylus medialis* erfolgte unter Extension und Innenrotation des Kniegelenks. Zunächst wurde der *Epicondylus* mit Hilfe eines Pfriems positioniert (Abb. 21). Dann wurde ein Krallenplättchen so angelegt, dass sich das Loch des Plättchens mittig auf der medialen Fläche des Femurs und die Krallen auf dem *Epicondylus* befanden. Unter Spülung mit isotonischer NaCl-Lösung wurde mit einem Bohrer (Durchmesser 2,7 mm) ein Schraubenloch durch die mediale und laterale Kortikalis gebohrt. Mit einem Gewindeschneider (Außendurchmesser 3,5 mm) wurde in dieses Schraubenloch ein Gewinde eingebracht, anschließend die Lochtiefe mit einem Tiefenmessgerät bestimmt und das Krallenplättchen mit einer entsprechend langen Kortikalisschraube (Außendurchmesser 3,5 mm) fixiert (Abb. 22).



Abb. 21: Positionierung des Knochenblocks



Abb. 22: Mit Krallenplättchen fixierter Knochenblock

Nach sorgfältiger Spülung des Gelenks sowie des gesamten Wundgebietes mit isotonomischer NaCl-Lösung erfolgte der Verschluss der Gelenkkapsel durch Einzelknopfnähte mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl® 2-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH). Ebenso wurden Faszien und Unterhaut vernäht. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls mit Einzelknopfnähten, allerdings wurde hierfür ein nicht-resorbierbarer Faden verwendet (Resolon® 2-0, Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG).

Dann wurde die Haut mit isotonomischer NaCl-Lösung und einem milden Hautantiseptikum (Octenisept®, Schülke & Mayr GmbH) gereinigt, ein Sprühverband (Opsite\* Spray, Smith & Nephew GmbH) aufgetragen und die Wunde mit einem sterilen Pflaster (Cutiplast\* Steril, Smith & Nephew GmbH) abgedeckt. Der Wundverschluss wurde in allen vier Gruppen identisch durchgeführt.

#### *Intraoperative Probengewinnung und Arthrosebeurteilung*

Gleich nach Gelenkeröffnung wurde mit einer sterilen 2 ml Spritze Synovialflüssigkeit aus dem Kniegelenk gewonnen und für spätere immunchemische Untersuchungen umgehend bei  $-80^{\circ}$  C eingefroren.

Aus dem resezierten Meniskusstück wurde intraoperativ mit einer sterilen Biopsiestanze (Stiefel® Biopsy Punch, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG) ein Zylinder (Durchmesser 3 mm) gewonnen und für die nachfolgende biomechanische Untersuchung in steriler isotonomischer NaCl-Lösung kühl gelagert. Auf gleiche Weise wurde ein Zylinder aus den Resten des verwendeten Scaffolds gestanzt und

gelagert.

Die im einsehbaren Bereich des Gelenks befindlichen degenerativen Veränderungen sowie andere Auffälligkeiten wurden im Operationsprotokoll vermerkt. Die intraoperative Arthrosebeurteilung sollte die Beurteilung degenerativer Veränderungen nach Ablauf des Versuchszeitraumes erleichtern (Tab. 2).

Tab. 2: Schema zur intraoperativen Arthrosebeurteilung

Beschreibung	Grad	Beschreibung	Grad
Degeneration an Femur		Degeneration an Meniskus	
keine	0	keine	0
Erweichung/Aufquellung	1	gelbliche Verfärbung	1
Risse/Fissuren lokal begrenzt	2	Auffaserung zentral im Bereich <i>Pars intermedia</i>	2
Risse/Fissuren generalisiert	3	Auffaserung zentral von Vorder- bis Hinterhorn	3
Abtragung bis auf Knochen	4	Auffaserung bis zur Meniskusbasis	4
Degeneration an Tibia		Sonstiges	
keine	0	keine	0
Erweichung/Aufquellung	1	Zottenbildung/ vermehrt	
Risse/Fissuren lokal begrenzt	2	Gelenkflüssigkeit	1
Risse/Fissuren generalisiert	3		
Abtragung bis auf Knochen	4		
Gesamtgrad			0-13

### 2.3.3 Versorgung *post operationem*

#### *Monitoring post operationem*

In der Aufwachphase nach der Operation wurden die Tiere beaufsichtigt bis sie ihr volles Standvermögen wiedererlangt hatten.

In den darauf folgenden Tagen erfolgte eine tägliche Kontrolle des Allgemeinbefindens sowie der Körpertemperatur der Schafe durch einen Tierarzt. An

den ersten drei postoperativen Tagen erhielten die Schafe subkutan 7 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl<sup>®</sup> LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH) als Infektionsprophylaxe sowie 2 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl<sup>®</sup> 50 mg/ml, Pfizer Deutschland GmbH) als Analgetikum. Zudem wurde täglich eine Wundkontrolle durchgeführt. Nach erfolgter Wundheilung wurden die Fäden der Hautnaht entfernt. Anschließend erfolgte die tierärztliche Kontrolle zweimal wöchentlich. Soweit bei einzelnen Tieren erforderlich wurden die Kontrollen auch häufiger durchgeführt.

#### *Versuchsende*

Nach Ablauf der Standzeit (drei bzw. sechs Monate) wurden die Tiere mittels Bolzenschuss betäubt und durch sofortigen Blutentzug getötet. Beides erfolgte durch befugte Tierpfleger des Tierforschungszentrums der Universität Ulm.

## **2.4 Aufarbeitung der Proben**

### **2.4.1 Präparation**

Rechte und linke Hintergliedmaßen wurden unverzüglich nach der Tötung im Hüftgelenk exartikuliert. Haut, Unterhautgewebe sowie die gesamte Muskulatur wurden entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gelenkkapsel des Kniegelenks intakt blieb. Der Metatarsus wurde für eine bessere Handhabung der Proben im Sprunggelenk abgesetzt. Die Eröffnung der Gelenkkapsel erfolgte proximal der *Trochlea ossis femoris*. An der rechten Hintergliedmaße wurde die Synovialflüssigkeit mit einer 2 ml Spritze möglichst vollständig aspiriert, auf Eppendorfgefäße aufgeteilt und sofort bei  $-80^{\circ}$  C eingefroren. Als nächstes wurde an beiden Gliedmaßen die Gelenkkapsel vollständig eröffnet und im kaudomedialen Bereich eine ca. 0,5 x 0,5 cm große Gewebeprobe der Gelenkkapsel für histologische Untersuchung gewonnen und umgehend in Formaldehyd (4%) fixiert. Nach vorsichtiger Durchtrennung der Kreuzbänder, des medialen sowie lateralen Seitenbandes und des gemeinsamen sehnigen Ursprungs des *M. fibularis tertius* und des *M. extensor digitalis longus* konnte das Femur vollständig von der Tibia getrennt werden. Dabei wurden auch die femoralen Insertionsbänder der Menisken durchtrennt. Die Verwachsungen der Menisken mit der Tibia wurden gelöst. Bei einem Tier jeder Gruppe wurden die Menisken unverzüglich in Formaldehyd (4 %) fixiert. Bei allen anderen Tieren wurden vor der Fixierung jeweils eine Stanze (Durchmesser 3 mm) aus dem medialen Meniskus bzw. dem Scaffold gewonnen

(Abb. 23). Die Stanzen wurden dann mit einem Skalpell koplplanar zur tibialen Meniskusfläche zugeschnitten. So entstanden Zylinder mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Höhe von ca. 1 mm (Abb. 24).

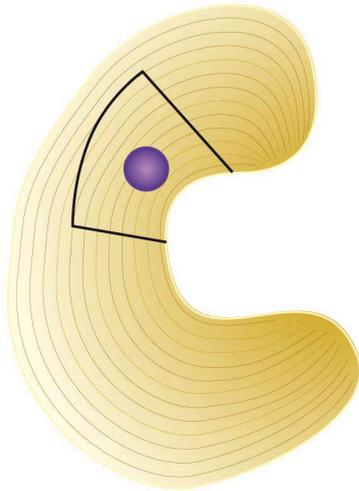


Abb. 23: Schematische Darstellung der Entnahmestelle der Meniskus- bzw. Scaffoldstanzen

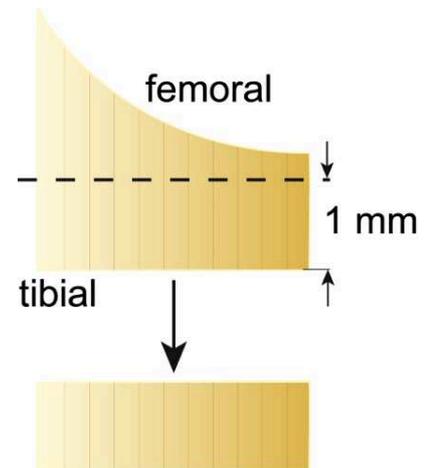


Abb. 24: Präparation der Meniskus- bzw. Scaffoldzylinder für biomechanische Untersuchungen

Diese Zylinder wurden für mechanische Tests zunächst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und aufbewahrt.

Es folgte das Absetzen des Tibiaplateaus ca. 1 cm distal der Gelenkfläche mit einer Diamant-Bandsäge (Exakt 30/384, PSI Grünwald GmbH & Co. KG) sowie die Teilung in der *Area intercondylaris centralis* in den *Condylus lateralis* und *Condylus medialis* (Abb. 25). Der *Condylus medialis* wurde für biomechanische Untersuchungen in isotonische NaCl-Lösung verbracht, der *Condylus lateralis* umgehend in Formaldehyd (4 %) fixiert.

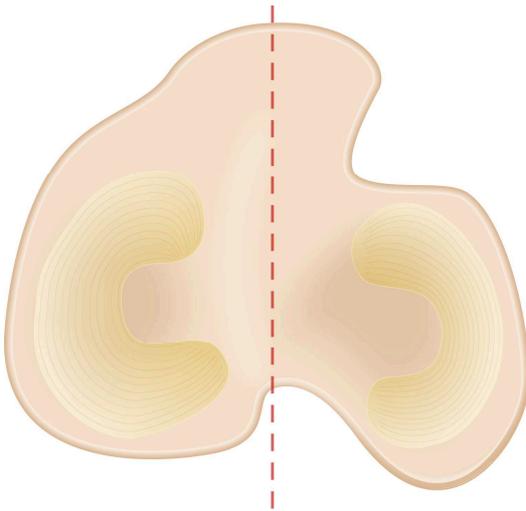


Abb. 25: Teilung des Tibiaplateaus in *Condylus medialis* (links) und *Condylus lateralis* (rechts) im Bereich der *Area intercondylaris centralis* (gestrichelte Linie)

Ebenso wurden die Femurkondylen vom Femurschaft abgesetzt, in *Condylus lateralis* und *Condylus medialis* geteilt und in Formaldehyd (4 %) fixiert.

Die Präparationsschritte wurden fotografisch dokumentiert.

#### 2.4.2 Makroskopische Beurteilung

##### *Allgemeine Beurteilung der operierten Gliedmaße*

Während der Präparation der Gliedmaßen wurde auf makroskopische Entzündungsanzeichen wie Rötungen, Verfärbungen, Schwellungen oder Abszessbildung geachtet. Hierbei wurde insbesondere festgestellt, ob die Heilung der OP-Wunde vollständig abgeschlossen war. Mit großer Sorgfalt wurde die Synovialmembran des Kniegelenks untersucht. Mögliche Anzeichen für lokale Entzündungsreaktionen der Gelenkkapsel wurden im Präparationsprotokoll vermerkt. Ebenso fand eine Beurteilung der Farbe und Konsistenz der Synovialflüssigkeit statt.

##### *Menisken*

Beurteilt wurde die Position des Scaffolds im Defekt, die Verbindung des Scaffolds zum Meniskusgewebe sowie der Zustand des Scaffolds. Des Weiteren wurden mögliche degenerative Veränderungen an den Menisken beurteilt und im Präparationsprotokoll vermerkt. Bei den Tieren der Teilresektion-Gruppe wurde darauf geachtet, ob sich ein Regenerationsgewebe innerhalb des Defekts gebildet hatte.

##### *Tibialer und femoraler Knorpel*

Das Ausmaß der degenerativen Gelenkknorpelveränderungen wurde modifiziert nach Outerbridge erfasst (1961). Hierbei wurden mediale und laterale

Femurkondylen sowie mediale und laterale Tibiakondylen jeweils einzeln beurteilt (Tab. 3).

Grad	Beschreibung
0	Keine sichtbaren Veränderungen
1	Erweichung und Aufquellung des Knorpels
2	Aufbrechen und Fissurbildung in Gebiet $\leq 1$ cm
3	Aufbrechen und Fissurbildung in Gebiet $\geq 1$ cm
4	Abtragung des Knorpels bis auf Knochen

*Tab. 3: Beurteilung der Knorpelveränderungen modifiziert nach Outerbridge*

### 2.4.3 Biomechanische Untersuchungen

Alle biomechanischen Untersuchungen wurden mit Hilfe einer Materialprüfmaschine (Z10, Zwick GmbH & Co. KG) durchgeführt und die Messdaten mit der dazugehörigen Mess- und Prüfsoftware (testXpert<sup>®</sup> Version 12.2, Zwick GmbH & Co. KG) aufgezeichnet. Auftretende Kräfte wurden durch einen Kraftaufnehmer (Typ KAP-Z, A.S.T. GmbH) mit einem Messbereich von  $\leq 50$  N bei einer Messgenauigkeit von  $\leq 0,3$  % erfasst. Als Wegeaufnehmer wurde ein Triangulationssensor (IL-D220-20, Micro-Epsilon Messtechnik) mit einer Genauigkeit von  $\leq 0,2$  % in einem Messbereich von 20 mm verwendet.

#### 2.4.3.1 Indentationstest des tibialen Knorpels

Mit dem Indentationstest konnten die biomechanischen Eigenschaften des tibialen Knorpels bestimmt werden. Getestet wurden die medialen Tibiakondylen. Die Kondylen wurden auf einen Aluminiumträger aufgeschraubt (Abb. 26) und mit diesem in eine spezielle Vorrichtung (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik Ulm) eingespannt (Abb. 27). Diese Vorrichtung ließ ein Schwenken des zu prüfenden Präparats um  $90^\circ$  in der Sagittalebene und um  $40^\circ$  in der Frontalebene zu. Die Einspannvorrichtung befand sich in einer mit isotonischer NaCl-Lösung gefüllten Plexigaskammer. Durch diese Form der Einspannung war die Ausrichtung des Druckstempels senkrecht zur Knorpeloberfläche an jeder gewünschten Position möglich. Gleichzeitig wurde das Austrocknen der Proben während der Prüfdauer verhindert.



Abb. 26: Mediale Tibiakondyle auf Aluminiumträger

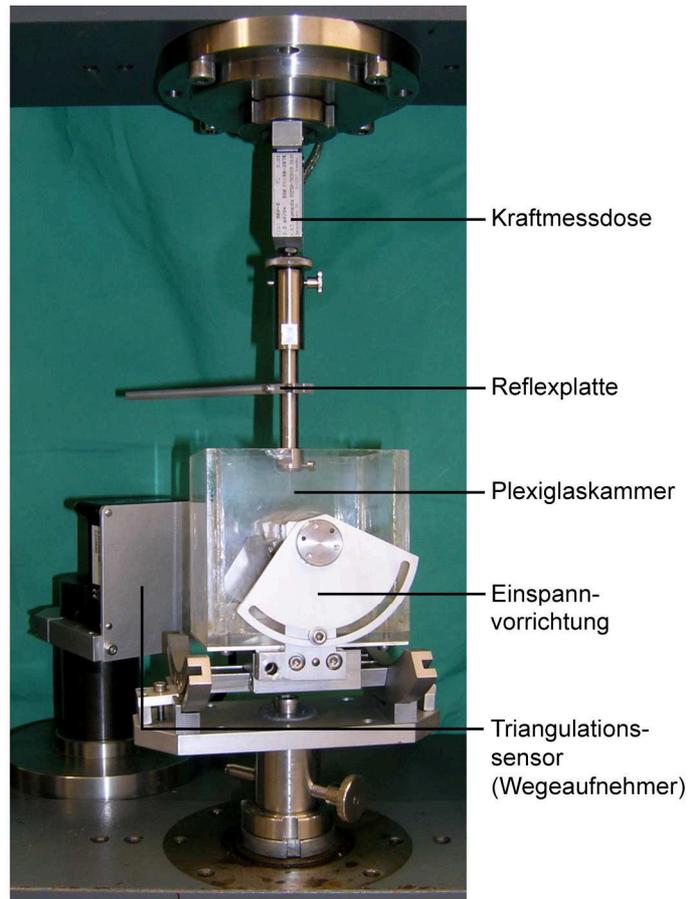


Abb. 27: Prüfaufbau für den Indentationstest der medialen Tibiakondylen

Die mechanischen Eigenschaften des Knorpels wurden an drei Messpunkten je medialer Tibiakondyle bestimmt (Abb. 28). Messpunkt 1 befand sich bei den Tieren der Gruppen 1 (Sc3) und 4 (Sc6) in dem Bereich der Tibiakondyle, der zuvor von dem Scaffold bedeckt wurde. In den Gruppen 2 (Sh) und 3 (Tr) befand sich Messpunkt 1 an entsprechender Stelle der Tibiakondyle. Messpunkt 2 lag zentral in dem Abschnitt der Tibiakondyle, der in direktem Kontakt zur medialen Femurkondyle stand. Messpunkt 3 lag posterior von Messpunkt 1 und wurde *in vivo* bei allen Tieren von der *Pars intermedia* des Meniskus bedeckt. Die Messpunkte wurden mit einem speziellen Gewebestift (Devon™ Skin Marker, Tyco Healthcare Group LP) auf dem Knorpel markiert. Die Messpunkte auf der medialen Tibiakondyle der nicht operierten linken Hintergliedmaße wurden entsprechend gewählt.

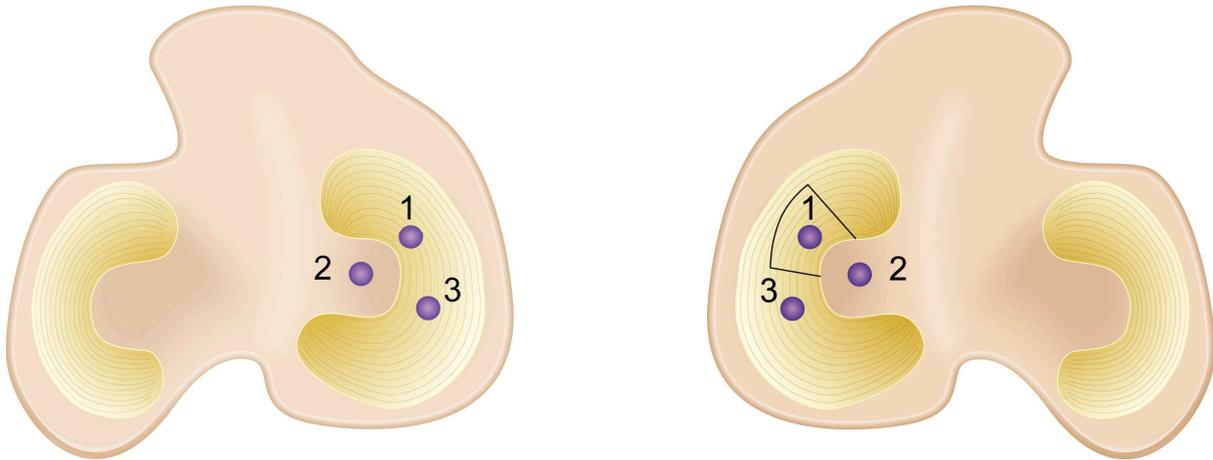


Abb. 28: Schematische Darstellung der Messpunkte auf den medialen Tibiakondylen der nicht operierten (links) und der operierten Gliedmaße (rechts)

Vor der eigentlichen biomechanischen Prüfung wurde die Dicke der Knorpelschicht an der jeweiligen Messposition bestimmt. Hierzu wurde eine Insulinkanüle ( $\varnothing$  0,30 mm; Omnican® 50, B. Braun Meslungen AG) an den Kraftaufnehmer angebracht (Abb. 29). Die Traverse der Materialprüfmaschine bewegte die Insulinkanüle mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min gegen die Probe. Das Eindringen der Kanüle in den Knorpel führte zu einem messbaren Kraftanstieg. Während dem Durchdringen der Knorpelschicht stieg die gemessene Kraft kontinuierlich an. Das Auftreffen der Nadel auf den subchondralen Knorpel führte zu einem plötzlichen, starken Kraftanstieg. Der Kraftverlauf wurde von der Messsoftware in einer Kraft-Weg-Kurve aufgezeichnet (Abb. 30). Aus dieser konnte die Knorpeldicke (d) abgeleitet werden.



Abb. 29: Insulinkanüle zur Bestimmung der Knorpeldicke

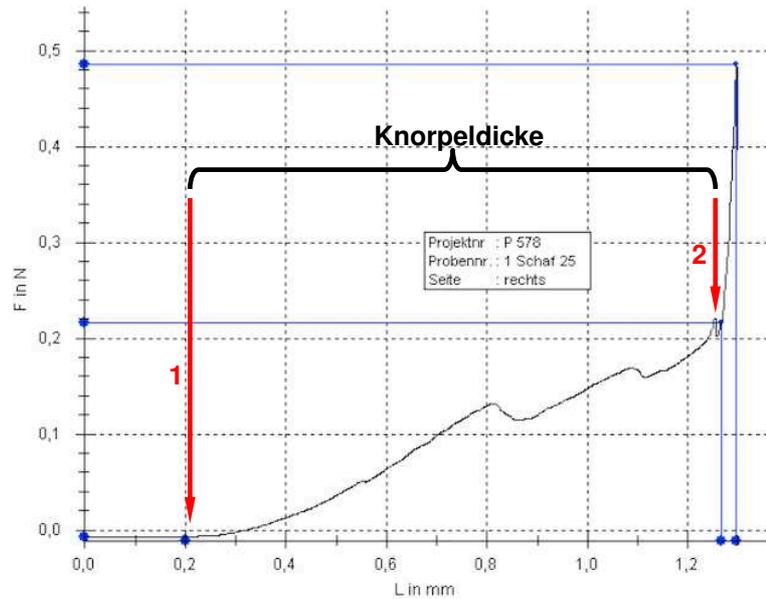


Abb. 30: Typische Kraft-Weg-Kurve bei der Dickenmessung des Knorpels; Pfeile markieren Beginn (1) und Ende (2) der Knorpelschicht

Nach Bestimmung der Knorpeldicke wurde die Insulinkanüle gegen einen zylindrischen Druckstempel ( $\varnothing$  1,5 mm; Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik) ausgetauscht und der Indentationstest durchgeführt. Der Druckstempel wurde mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min senkrecht auf die Knorpel-Knochen-Probe gedrückt bis eine Vorkraft von 0,2 N erreicht war. Ab Erreichen der Vorkraft wurde der Stempel mit der konstanten Geschwindigkeit von 100 % der Knorpeldicke pro Minute gegen die Probe gedrückt bis die maximale Kraft von 4,8 N aufgebracht war. Es wurden 4,8 N als maximale Kraft gewählt, da sich damit bei der Stempelfläche von 1,77 mm<sup>2</sup> eine physiologische Flächenpressung von 2,7 N/mm<sup>2</sup> ergab (Mutschler & Claes, 1985). Die Eindringtiefe  $\Delta l$  des Druckstempels als Maß für die Knorpeldeformation wurde mit dem Triangulationssensor erfasst. Aus  $\Delta l$  und  $d$  konnte auf die Dehnung  $\epsilon$  der Probe in % geschlossen werden. Die bei Belastung der Probe mit der maximalen Kraft erreichte Dehnung wurde über einen Zeitraum von 20 min konstant gehalten. Während diesem Zeitraum kam es zur Relaxation der Probe und einem damit verbundenen Abfall der gemessenen Kraft. Die durch die Messsoftware erzeugte Kraft-Zeit-Kurve stellte den Kräfteverlauf in Abhängigkeit der Zeit  $t$  dar (Abb. 31).

Aus der Kraft-Zeit-Kurve konnten der Gleichgewichtsmodul  $E_{eq}$  sowie der Kriechmodul  $E_c$  der Knorpelprobe ermittelt werden. Der Gleichgewichtsmodul

beschreibt die elastischen Eigenschaften des Knorpelgewebes und die Berechnung des Moduls erfolgte mit der Formel nach dem Hookeschen Gesetz:

$$E_{eq} = \frac{F_R}{A} \times \frac{d}{\Delta l}$$

mit

- $F_R$  = Restkraft nach 20 min
- $A$  = Fläche des Druckstempels
- $d$  = Knorpeldicke
- $\Delta l$  = Eindrücktiefe des Druckstempels.

Der Kriechmodul beschreibt die viskösen Eigenschaften und wurde mit der modifizierten Formel nach Kempson et al. berechnet (1971):

$$E_c = \frac{3 \times F_{max}}{8 \times R} \times \frac{\Phi(t/R)}{\Delta l}$$

mit

- $F_{max}$  = maximale Kraft
- $R$  = Radius des Druckstempels
- $\Phi(t/R)$  = eine empirisch ermittelte Kriechfunktion die den Einfluss der Geometrie und der Zeit berücksichtigt; modifiziert nach Waters et al. (1965)
- $\Delta l$  = Eindrücktiefe des Druckstempels.

Nachdem der Indentationstest an allen drei Messpunkten abgeschlossen war, wurden die medialen Tibiakondylen in Formaldehyd (4 %) fixiert.

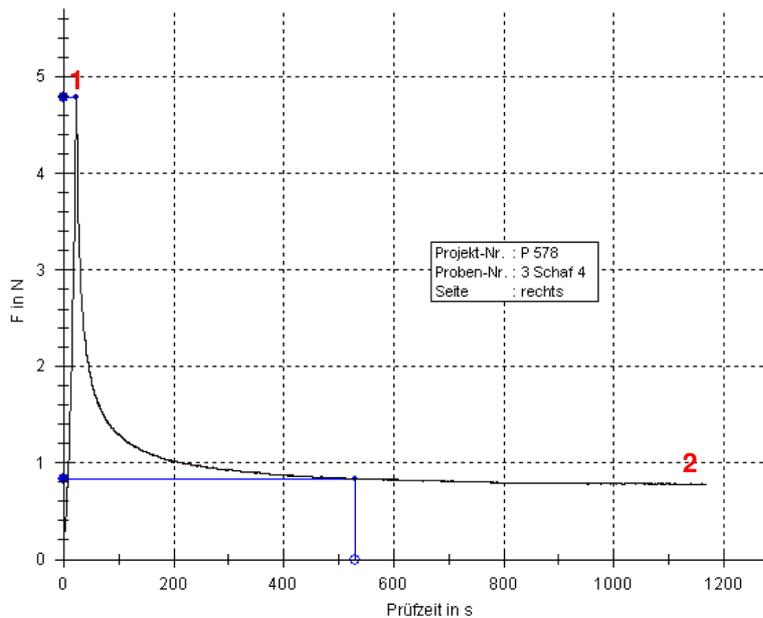


Abb. 31: Typische Kraft-Zeit-Kurve eines Indentationstests; die Probe wurde bis zu einer max. Kraft von 4,8 N belastet (1) und relaxierte bei gleichbleibender Dehnung bis sich ein Gleichgewichtszustand (2) einstellte

#### 2.4.3.2 Stress-Relaxations-Test von Meniskus und Scaffold

Um die mechanischen Eigenschaften von Meniskus und Scaffold vergleichen zu können, wurde ein Stress-Relaxations-Test durchgeführt. Es wurden jeweils eine Meniskusstanze (Probengewinnung vgl. Kapitel 2.1.3 und 2.2.1) und zwei unterschiedliche Scaffoldstanzen getestet. Bei den Scaffoldproben handelte es sich um eine Stanze aus dem nicht implantierten Scaffoldanteil sowie um eine Stanze aus dem implantierten Scaffold nach Ablauf der Versuchszeit (Probengewinnung vgl. Kapitel 2.1.3 und 2.2.1). Auf diese Weise wurde die Änderung der Scaffoldseigenschaften über den Implantationszeitraum erfasst.

Die Prüfung der Stanzen fand in einer mit isotonischer NaCl-Lösung gefüllten Prüfkammer mit einer 3-mm-Bohrung statt (Abb. 32). Durch diesen Prüfaufbau war die Testung der Proben unter *confined compression* Bedingungen möglich. Dies bedeutet, dass sich die Probe bei axialer Belastung nicht seitlich ausdehnen konnte, da sie von der Wand der Prüfkammer begrenzt wurde. Die Kraft wurde über einen porösen Keramikzylinder eingeleitet. Dieser ermöglichte den Wasseraustritt aus den Proben. Die Meniskusproben wurden mit der tibialen Kontaktfläche nach oben und die Scaffoldproben mit der porösen Fläche nach oben in die Prüfkammer eingebracht.

Zunächst wurde die Probenhöhe exakt ermittelt. Hierzu wurde nur der poröse Keramikzylinder in die Prüfkammer eingebracht und die Traverse der Materialprüfmaschine mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min nach unten gefahren,

bis der Druckstempel den Keramikzylinder gerade berührte. Dort stoppte die Traverse automatisch und ihre Position wurde als Nullposition (LE-Referenz) definiert (Abb. 32). Nach Einbringen der Probe wurde der Vorgang wiederholt. Auch hier wurde die Stopp-Position der Traverse bestimmt und durch Abzug der aktuellen Position von der LE-Referenz konnte die Probenhöhe in mm ermittelt werden.

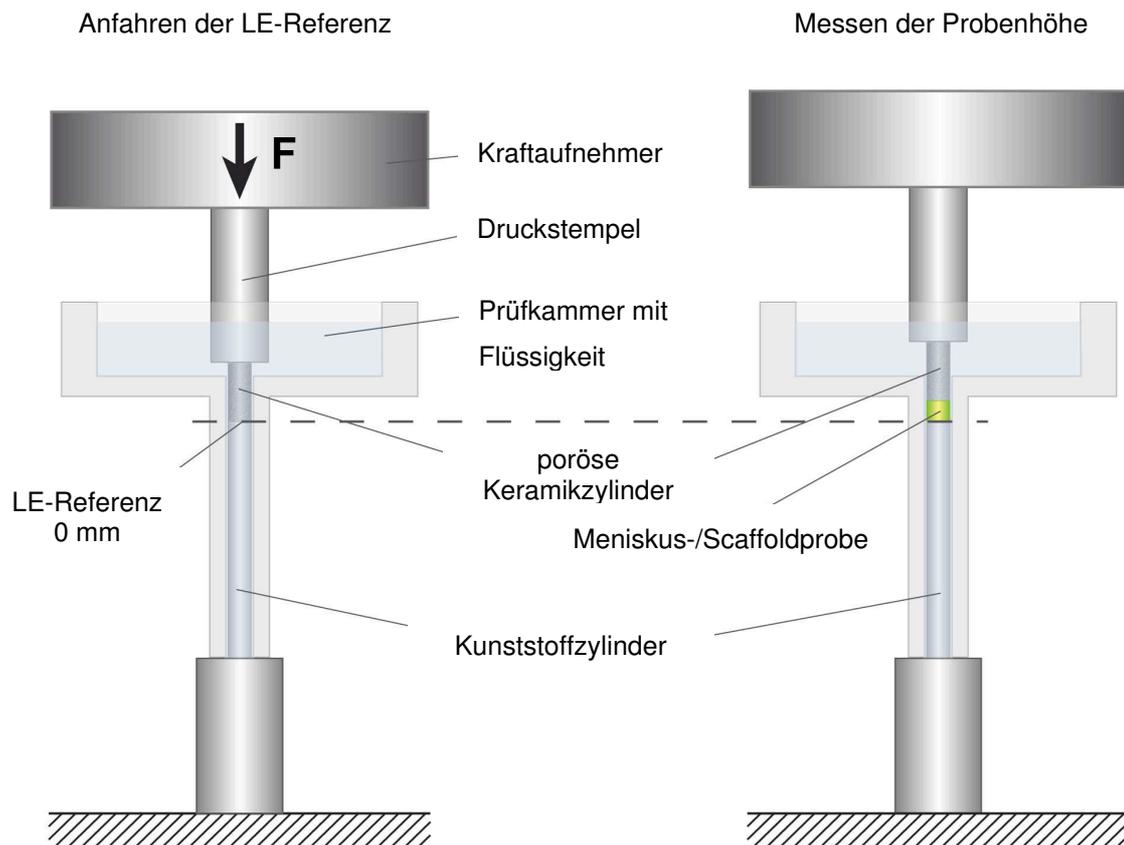


Abb. 32: Schematische Darstellung des Prüfaufbaus für den Stress-Relaxations-Test von Meniskus- und Scaffoldproben

Die Geschwindigkeit mit der die Probe im Stress-Relaxations-Test belastet wurde ergab sich aus der ermittelten Probenhöhe für jede Probe individuell (30 % der Probenhöhe pro Minute). Dadurch war die relative Belastungsgeschwindigkeit für alle Proben konstant. Dies war wichtig, da die Steifigkeit viskoelastischer Materialien von der Belastungsgeschwindigkeit abhängig ist. Zu Beginn des Stress-Relaxation-Tests wurden die Proben belastet, bis eine Vorkraft von 0,5 N aufgebracht war. Nach Erreichen der Vorkraft erfolgte die Kompression der Proben zunächst auf 10 %, dann auf 15 % und zuletzt auf 20 % der ursprünglichen Probenhöhe. Auf jeder Kompressionsstufe relaxierten die Proben für 1200

(Meniskus) bzw. 900 Sekunden (Scaffold). Die auftretenden Kräfte wurde von dem Kraftaufnehmer erfasst und die Messsoftware zeichnete die Kraft in Abhängigkeit von der Zeit auf (Abb. 33).

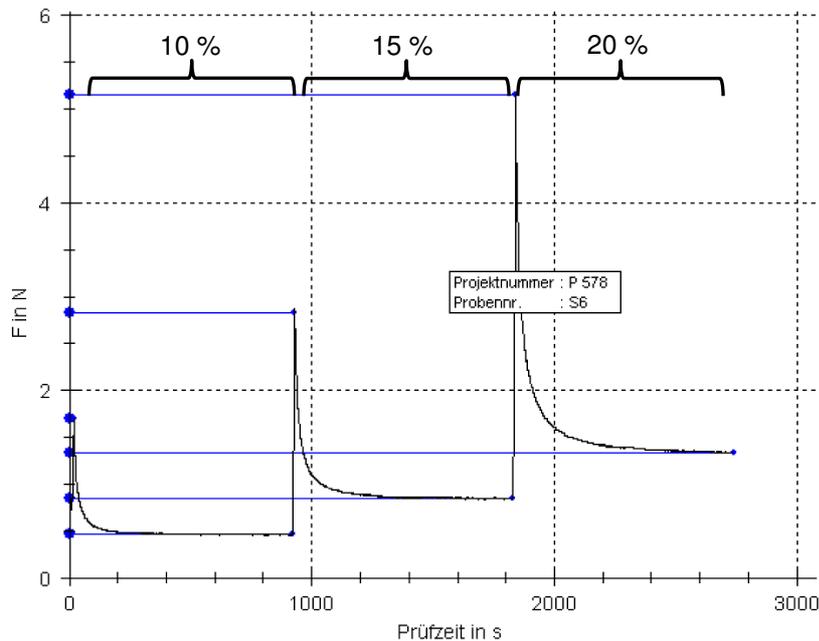


Abb. 33: Exemplarische Kraft-Zeit-Kurve des Stress-Relaxations-Tests bei Kompression der Scaffoldprobe auf 10 %, 15 % und 20 % der ursprünglichen Dicke

Um den Einfluss von Messfehlern zu minimieren, wurde mit einem Statistikprogramm (Jmp™ 5.0.1.2., SAS Institute Inc.) für die gemessenen Werte eine Kurvenanpassung mit dem Maxwell Gleichungsmodell für viskoelastische Materialien durchgeführt und anschließend der Gleichgewichtsmodul  $E_{eq}$  der Meniskus- und Scaffoldproben ermittelt.

#### 2.4.4 India Ink Färbung

Mit der India Ink Färbung wurden degenerierte Knorpelareale makroskopisch deutlich sichtbar gemacht. Für die Färbung wurden die bereits fixierten Femur- und Tibiakondylen aus der Formaldehydlösung genommen und für ca. 60 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurde pro Kondyle ein Tropfen Tusche (Tusche A Drawing Ink, Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG.) auf die Knorpelfläche aufgetragen und eingerieben. Die Kohlepartikel der Tusche konnten nur an degeneriertem Knorpel, aber nicht an der intakten, glatten Knorpeloberfläche binden (Abb. 34 A). Die nicht gebundene Tusche wurde kurz unter Leitungswasser abgespült. Das Aufbringen und Abspülen der Tusche wurde ein Mal wiederholt. Die gefärbten Proben wurden unter konstanten Lichtbedingungen fotografiert und die

entstandenen Fotos mit Hilfe einer Bildanalysesoftware (Metamorph<sup>®</sup>, Leica GmbH) ausgewertet. Zunächst wurde der Umriss der degenerierten und somit schwarz gefärbten Bereiche mit der Computermaus markiert (Abb. 34 B) und die Software berechnete die von Degeneration betroffene Knorpelfläche in mm<sup>2</sup>. Anschließend wurde die Gesamtknorpelfläche markiert (Abb. 34 C) und auch hier die Fläche in mm<sup>2</sup> berechnet. Aus diesen Werten wurde der relative Anteil der degenerierten Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche in % bestimmt.

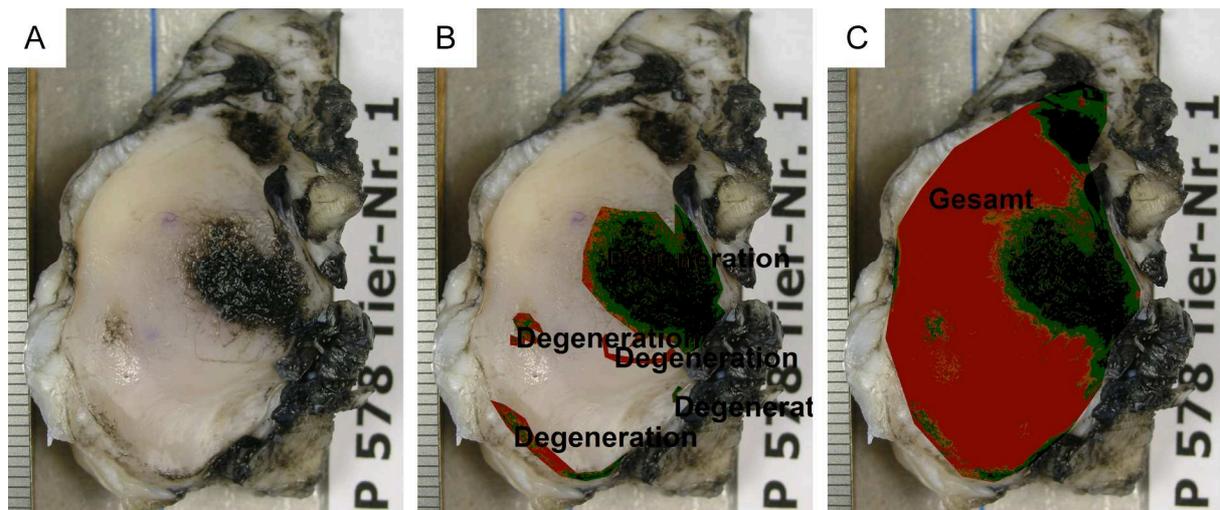


Abb. 34: Mediale Tibiakondyle nach Färbung mit India Ink (A), nach Markierung der degenerierten Knorpelfläche in Metamorph<sup>®</sup> (B) und nach Markierung der Gesamtknorpelfläche (C)

## 2.4.5 Histologische Auswertung

### 2.4.5.1 Anfertigung von histologischen Schnitten

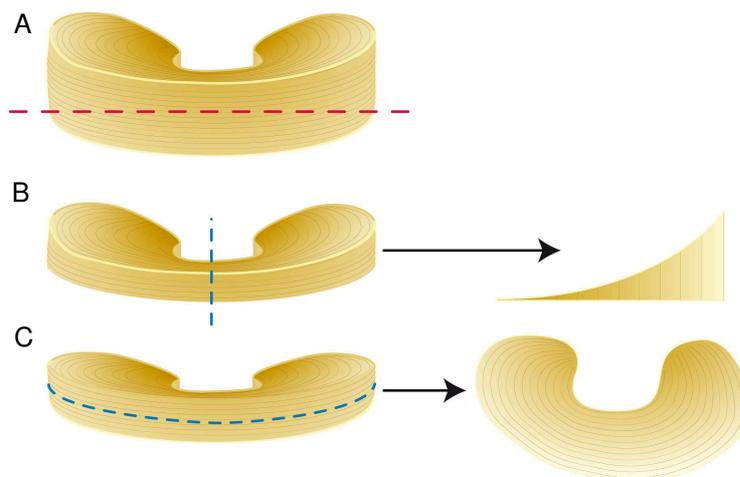
#### *Gelenkkapsel*

Die Proben der Gelenkkapsel wurden zunächst aus dem Formaldehyd genommen und zur Entfernung der Formaldehydrückstände für ca. 60 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend durchliefen die Proben zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol: 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %, 100 %) und wurden dann in Xylol entfettet. Nach der Entfettung wurden die Proben in 60° C heißes Paraffin verbracht. Im Paraffinbad wurden die Proben von dem flüssigen Paraffin infiltriert und härteten anschließend bei Raumtemperatur aus. Die Anfertigung der ca. 4 µm dicken Schnitte erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (DDM-0036, Medim GmbH). Zuletzt wurden die Schnitte auf Objektträger

aufgezogen.

### *Meniskus- und Scaffoldproben*

Bei jeweils einem Tier pro Gruppe wurden die Meniskus- und Scaffoldproben nach der Fixation in Formaldehyd horizontal in zwei Stücke geteilt (Abb. 35 A). Der obere Anteil wurde wie die Proben der Gelenkkapsel aufbereitet und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Anteil wurden mit dem Rotationsmikrotom ca. 4 µm dicke, vertikale Schnitte angefertigt (Abb. 35 B). Der untere Anteil wurde nach Dehydrierung und Entfettung in ein Einbettmedium (Methylmethacrylat-Monomer, Polysciences Europe GmbH) zur Infiltration und Aushärtung überführt. Unter Zugabe eines Reaktionsbeschleunigers (Benzoylperoxid, Merck KGaA) härtete der Kunststoff unter Sauerstoffabschluss durch Polymerisation zu einem kompakten Block aus. Dieser Prozess dauerte ca. drei Wochen. Anschließend wurden mit einem Schlittenmikrotom (Polycut E SM 2500 E, Leica GmbH) ca. 5 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen (Abb. 35 C).



*Abb. 35: Schematische Darstellung der Meniskusproben für die Histologie; horizontale Teilung des Meniskus (A) in einen oberen Anteil (B) für die Anfertigung vertikaler Schnitte und in einen unteren Anteil (C) für die Anfertigung horizontaler Schnitte*

Die Meniskus- und Scaffoldproben der übrigen Tiere wurden ungeteilt wie oben beschrieben in Paraffin eingebettet und es wurden ausschließlich vertikale Schnitte angefertigt.

### *Tibiakondylen*

Nach der Wässerung zur Entfernung der Formaldehydrückstände wurden aus den medialen Tibiakondylen je drei ca. 2 mm dicke Scheiben gesägt (Abb. 36).

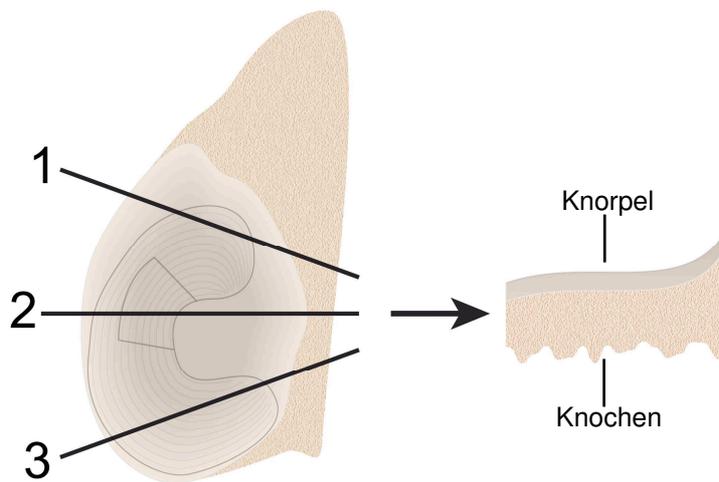


Abb. 36: Schemazeichnung für die Probengewinnung aus der medialen Tibiakondyle; die Lage des Meniskus und des Scaffolds bzw. des Meniskusdefekts ist angedeutet

Dadurch wurde die Probengröße reduziert und die folgende Aufbereitung wesentlich beschleunigt. Für die Anfertigung von Paraffinschnitten war es notwendig die Knorpel-Knochen-Proben zu entkalken. Dies erfolgte mit Ameisensäure (10 %) für ca. zwei bis drei Monate. Anschließend durchliefen die Proben den zuvor beschriebenen Prozess der Entwässerung, Entfettung und Einbettung in Paraffin. Die angefertigten Schnitte wurden ebenfalls auf Objektträger aufgezogen.

#### 2.4.5.2 Färbung der histologischen Schnitte

##### *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde als Übersichtsfärbung von Schnitten aller Proben angefertigt. Nach dem Entparaffinieren der Schnitte in Xylol erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol: 100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 70 %). Die Schnitte wurden dann mit destilliertem Wasser gespült und mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Merck KGaA) gefärbt. Das Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten hob den pH der Schnitte an, verstärkte dadurch die Blaufärbung und fixierte gleichzeitig die Färbung. Als Gegenfärbung wurde Eosin (0,5 %; Eosin gelblich, Merck KGaA) in alkoholischer Lösung verwendet.

Durch Hämatoxylin wurden hauptsächlich die negativ geladenen Zellbestandteile wie DNA/RNA und extrazelluläre Proteoglykane angefärbt. Vor allem die Zellkerne und der proteoglykanreiche Knorpel erschienen somit blau-violett gefärbt. Eosin färbte die azidophilen Zytoplasmabestandteile rot an und somit erhielt das Zytoplasma eine rote bis pinke Färbung.

Die gefärbten Schnitte wurden dehydriert und mit Deckgläschen eingedeckt. Das Eindecken diente der Haltbarmachung der Schnitte.

#### *Safranin-O-Echtgrün-Färbung*

Die histologischen Schnitte der Tibiakondylen wurden zusätzlich zu der HE-Färbung mit Safranin-O-Echtgrün (Saf-O) gefärbt. Die Vorbereitung der Schnitte erfolgte wie bereits bei der HE-Färbung beschrieben. Dann wurden die Schnitte vier Minuten mit Weigerts Eisenhämatoxylin (Eisenhämatoxylin Weigert A, Waldeck GmbH & Co Division Chroma) gefärbt. Nach kurzem Abspülen mit angesäuertem Ethanol erfolgte fünf minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte mit Echtgrün (Echtgrün FCF rein, Waldeck GmbH & Co Division Chroma) für drei Minuten gefärbt, kurz mit Essigsäure (1 %) gespült und dann mit Safranin O (Safranin O, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) fünf Minuten lang gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert und durch Deckgläschen geschützt.

Safranin O band an die polyanionischen Glykosaminoglykane des Knorpels und färbte den Knorpel rot, wobei die Intensität der Rotfärbung direkt vom Glykosaminoglykangehalt des Knorpels abhängig war. Das Zytoplasma wurde durch das Echtgrün grau-grün gefärbt. Das Eisenhämatoxylin färbte die Zellkerne schwarz.

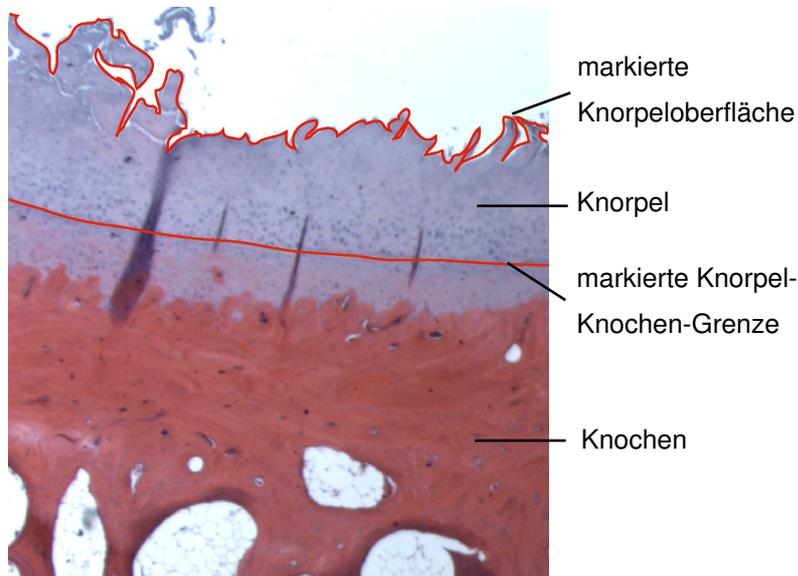
#### **2.4.5.3 Auswertung der histologischen Schnitte**

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop (DMI6000B, Leica GmbH). Die Schnitte der Synovialmembran wurden qualitativ ausgewertet, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Vorhandensein von Entzündungszellen wie z.B. mehrkernigen Riesenzellen lag. Überdies wurde die Dicke der Membran beurteilt. Auch die histologischen Schnitte der Menisken und Scaffolds wurden qualitativ beurteilt. Hier interessierte ebenfalls das Vorhandensein von Entzündungszellen. Zusätzlich wurden vorhandene Zellen, Gewebe und anderes Material innerhalb der Scaffoldporen charakterisiert und der Zustand der Scaffoldporenwände beschrieben.

##### **2.4.5.3.1 Bestimmung des Fibrillationsindex des Knorpels**

Die mit HE gefärbten Schnitte der medialen Tibiakondylen wurden mit einer Mikroskopkamera (DFC420C, Leica GmbH) bei 1,25-facher Vergrößerung eingescannt. Mit einer Bildanalysesoftware (Metamorph<sup>®</sup>, Leica GmbH) wurde anschließend der Fibrillationsindex des Knorpels nach der modifizierten Methode von

Pastoureau & Chomel bestimmt (2004). Dazu wurde die Oberfläche des Knorpels exakt mit der Computermaus markiert und die Bildanalysesoftware berechnete daraus die Länge der Knorpeloberfläche in  $\mu\text{m}$  (Abb. 37). Ebenso wurde die Knorpel-Knochen-Grenze markiert und deren Länge ermittelt (Abb. 37).



*Abb. 37: HE-gefärbter Schnitt durch die mediale Tibiakondyle; 1,25-fache Vergrößerung*

Die Division der Länge der Knorpeloberfläche durch die Länge der Knorpel-Knochen-Grenze ergab den Fibrillationsindex (FI) der Knorpel-Knochen-Probe. Bei intakter Knorpeloberfläche gilt:  $FI=1$ . Mit zunehmender Auffaserung der Knorpeloberfläche steigt der Fibrillationsindex an und ermöglicht dadurch eine Aussage über den Zustand des Knorpels.

#### **2.4.5.3.2 Knorpelbeurteilung nach Mankin**

Durch die Färbung mit Safranin-O-Echtgrün war es möglich, den Zustand des tibialen Knorpels semiquantitativ zu erfassen. Dies erfolgte nach einem von Mankin etablierten Beurteilungssystem (1971). Neben der Beurteilung der Knorpelstruktur fand auch eine Beurteilung der Zellverteilung und -zahl, der Anfärbbarkeit durch Safranin O sowie der Knorpel-Knochen-Grenze statt (Tab. 4). Je Beurteilungskriterium wurden Punkte vergeben, welche addiert einen Degenerationsgesamtgrad von 0 bis 14 ergaben.

Tab. 4: Histologische und histochemische Bestimmung des Degenerationsgrades nach Mankin (1971)

Beurteilungskriterium	Grad
I. Knorpelstruktur	
a. Normal	0
b. Unregelmäßigkeiten der Oberfläche	1
c. Pannus, Unregelmäßigkeiten der Oberfläche	2
d. Risse bis in die Übergangszone	3
e. Risse bis in die radiale Zone	4
f. Risse bis in die kalzifizierte Zone	5
g. Vollständige Desorganisation	6
II. Zellen	
a. Normal	0
b. Diffuse Hyperzellularität	1
c. Vorkommen von Zellklonen	2
d. Hypozellularität	3
III. Safranin O Intensität	
a. Normal	0
b. Leichte Reduktion	1
c. Mäßige Reduktion	2
d. Schwere Reduktion	3
e. Keine Färbung	4
IV. Knorpel-Knochen-Grenze	
a. Intakt	0
b. Übertritt von Blutgefäßen	1
<b>Gesamt</b>	<b>0-14</b>

### 2.4.6 Immunchemische Analyse der Synovia

Für die immunchemische Analyse der Synovia wurden die Synoviaprobe bei Raumtemperatur aufgetaut (Probengewinnung vgl. Kapitel 2.2.3 und 2.3.1). Bestimmt wurden die Entzündungsmarker Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Interleukin (IL) 1 $\beta$  und IL 6. Diese Parameter wurden vor dem operativen Eingriff und direkt nach der Tötung der Tiere bestimmt. So konnte ein möglicher Anstieg der Entzündungsmarker nach der Operation detektiert werden.

#### *PGE<sub>2</sub>-Bestimmung*

Für die PGE<sub>2</sub>-Bestimmung aus den Synoviaprobe wurde ein kompetitives Enzymimmunoassay Kit (EIA Kit) verwendet (Prostaglandin E<sub>2</sub>, Biotrend Chemikalien GmbH). Der EIA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die photometrische Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinity M200, Tecan Group Ltd.) bei einer Wellenlänge von 450 nm und die Bearbeitung der Daten mit der dazugehörigen Software (Megallan 6.6, Tecan Group Ltd.). Mit dem verwendeten EIA Kit war es möglich, PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 31,25 pg/ml und 1000 pg/ml zu bestimmen.

#### *IL-1 $\beta$ - und IL-6-Bestimmung*

Sowohl die IL-1 $\beta$ - als auch die IL-6-Konzentrationen der Synovia wurden mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit (ELISA Kit) bestimmt (Sheep Interleukin 1 $\beta$  ELISA Kit und Sheep Interleukin 6 ELISA Kit, Cusabio Biotech Co., Ltd.). Die ELISAs wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt und die photometrische Bestimmung der IL-Konzentrationen erfolgte wie bereits bei der PGE<sub>2</sub>-Bestimmung beschrieben. Mit den ELISA Kits konnten IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zwischen 46,87 pg/ml und 3000 pg/ml und IL-6-Konzentrationen zwischen 3,2 pg/ml und 80 pg/ml detektiert werden.

### **2.4.7 Statistische Auswertung**

Die statistischen Signifikanzen wurden bei allen quantitativen Auswerteverfahren (Biomechanik, India Ink Färbung, histologisches Grading-System nach Mankin, Bestimmung des FI, Entzündungsmarker-Bestimmung) mit einem Statistikprogramm (PASWStatistics 18.0.3, IBM Deutschland GmbH) berechnet. Zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für den Vergleich von Werten innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Test zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede herangezogen. Diese statistischen Tests wurden verwendet, da aufgrund der geringen Probenzahl innerhalb der einzelnen Gruppen (n=3-8) keine Normalverteilung der ermittelten Werte vorlag.

Punktediagramme dienten der graphischen Darstellung der Ergebnisse. Abgebildet wurden jeweils die Einzelwerte sowie der Median.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Intraoperative Arthrothesebeurteilung

Mit der intraoperativen Arthrothesebeurteilung wurde der Zustand des Knorpels vor Versuchsbeginn ermittelt. Dadurch konnte beurteilt werden, ob degenerative Veränderungen in den Kniegelenken der Schafe durch den operativen Eingriff hervorgerufen worden sind oder bereits vor Versuchsbeginn bestanden hatten.

Einige Tiere wiesen bei dieser Untersuchung keine oder nur geringgradige Veränderungen im einsehbaren Bereich des Gelenks auf. Andere Tiere hingegen zeigten bereits zu Versuchsbeginn deutliche Veränderungen. Häufig war bei diesen Tieren neben dem tibialen und femoralen Gelenkknorpel auch der Meniskus hochgradig degenerativ verändert (Abb. 38).



*Abb. 38: Während der Operation reseziertes Meniskusstück; starke Auffaserung des Gewebes im zentralen Bereich*

Die starken interindividuellen Unterschiede fielen in allen vier Gruppen auf (Abb. 39). Zwischen den einzelnen Gruppen bestanden allerdings keine signifikanten Unterschiede im Degenerationsgrad. Jedoch traten in den beiden Scaffold-Gruppen tendenziell stärkere degenerative Veränderungen auf als in der Sham- und der Teilresektion-Gruppe.

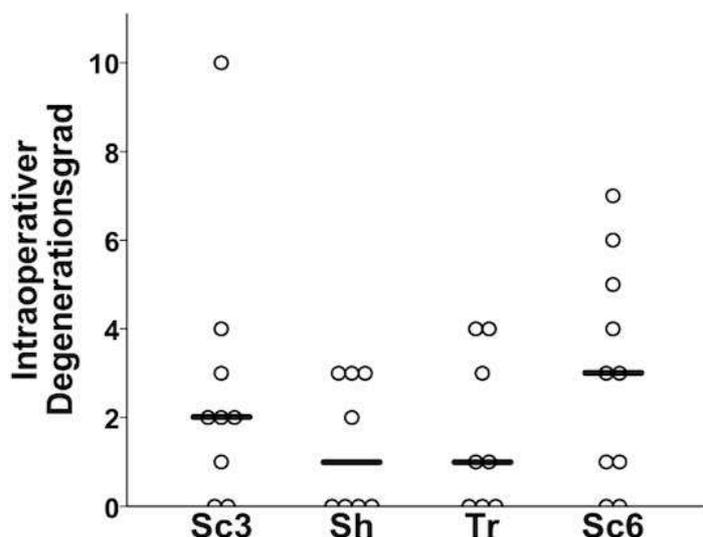


Abb. 39: Intraoperativ ermittelter Degenerationsgrad im einsehbaren Gelenkbereich (vgl. Kap. 2.3.2, Tab. 2)

### 3.2 Klinischer Verlauf

Die Operation verlief bei allen Tieren ohne Komplikationen. Lediglich ein Schaf der Sham-Gruppe starb nach Narkoseeinleitung aus unbekannter Ursache. Die Operationsdauer betrug durchschnittlich 80 Minuten und die postoperative Aufwachphase dauerte ca. 60 Minuten. Anschließend hatten alle Tiere ihr Stehvermögen wiedererlangt und belasteten die operierte Gliedmaße bereits geringgradig. Die Schafe aller Gruppen waren zwei bis vier Tage nach der Operation lahmheitsfrei und ihr Allgemeinbefinden war ungestört. In keiner Gruppe traten Wundheilungsstörungen auf.

Ein Schaf aus Gruppe 1 (Sc3) entwickelte postoperativ trotz der routinemäßigen Amoxicillin-Gabe eine Aspirationspneumonie. Daher wurde dieses Tier auf ein Enrofloxacin-haltiges Antibiotikum (Enro-Sleecol® 50 mg/ml, Albrecht GmbH) umgestellt. Das Antibiotikum wurde über fünf Tage subkutan verabreicht. Im Laufe der antibiotischen Behandlung verschwanden die Symptome der Pneumonie und das Tier zeigte über den restlichen Versuchszeitraum ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

Bei einem Tier der Teilresektion-Gruppe und einem Tier der Scaffold-Gruppe (Sc6) verschlechterte sich das Allgemeinbefinden einige Wochen nach der Operation rapide und beide Tiere mussten vor dem geplanten Versuchsende euthanasiert werden. Die Euthanasie erfolgte durch die intravenöse Gabe eines Barbiturats (Narcoren® 160 mg/ml, Merial GmbH). Es bestand kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen dem schlechten Allgemeinbefinden der Tiere und der zuvor durchgeführten Operation.

Durch die Tierverluste reduzierten sich die auswertbaren Tiere auf 34.

### 3.3 Makroskopische Befunde

Nach der Tötung der Tiere erfolgte zunächst eine makroskopische Beurteilung der Gelenkkapsel und der Menisken bzw. Scaffolds. Zusätzlich wurden auch die Gelenkknorpelflächen der operierten und der nicht operierten kontralateralen Gelenke makroskopisch bewertet.

#### 3.3.1 Gelenkkapsel und Gelenkflüssigkeit

Die makroskopische Untersuchung der operierten Kniegelenke erbrachte keine Hinweise auf das Vorliegen einer Entzündungsreaktion. Bei fast allen Tieren trat allerdings eine mittelgradige, fibrotische Verdickung der *Membrana fibrosa* der Gelenkkapsel im medialen Bereich des Gelenks auf. Weitere Veränderungen der Gelenkkapsel waren makroskopisch nicht sichtbar.

Aus den operierten Kniegelenken wurde durchschnittlich ca. 1 ml Synovialflüssigkeit gewonnen. Diese wies eine typische fadenziehende Konsistenz auf, war klar und von hellgelber Farbe bzw. bei einigen Tieren leicht rötlich verfärbt.

#### 3.3.2 Meniskus und Scaffold

Makroskopisch erkennbare, degenerative Meniskusveränderungen traten in allen vier Gruppen bei einzelnen Tieren auf. Die Veränderungen waren meist an der tibialen Fläche der *Pars intermedia* des Meniskus lokalisiert. Leichte Veränderungen gingen mit einer gelblichen Verfärbung des Gewebes sowie einer geringgradigen Rauigkeit der Gewebeoberfläche einher. In ausgeprägteren Fällen wirkte das Meniskusgewebe aufgefasert.

##### *Dreimonatsgruppe (Scaffold-3-Monatsgruppe)*

Bei sechs Tieren der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit war das Scaffold zum Zeitpunkt der Sektion im Meniskusdefekt vorhanden. Das Scaffold füllte den Defekt bei vier dieser Tiere vollständig aus (Abb. 40 A). Bei einem Tier war ein ca. 1 mm breiter Spalt zwischen dem posterioren Rand des Scaffolds und der *Pars intermedia* des Meniskus sichtbar (Abb. 40 B). Bei einem anderen Tier war der Meniskus so stark degeneriert, dass die Fixation des Scaffolds im posterioren Bereich nicht beurteilt werden konnte (Abb. 40 D). Bei drei Tieren war das Scaffold nicht mehr bzw. nur noch zum Teil im Defekt vorhanden (Abb. 40 C). Die Fäden, mit denen das Scaffold ursprünglich im Defekt fixiert war, befanden sich bei diesen Tieren noch im Meniskusgewebe. Das Scaffold bzw. Teile des Scaffolds wurden in weniger stark

beanspruchten Bereichen des Gelenks gefunden. Die dislozierten Scaffolds schienen von einer dünnen Gewebsschicht umgeben und waren teilweise mit der *Membrana synovialis* der Gelenkkapsel verwachsen (Abb. 41).

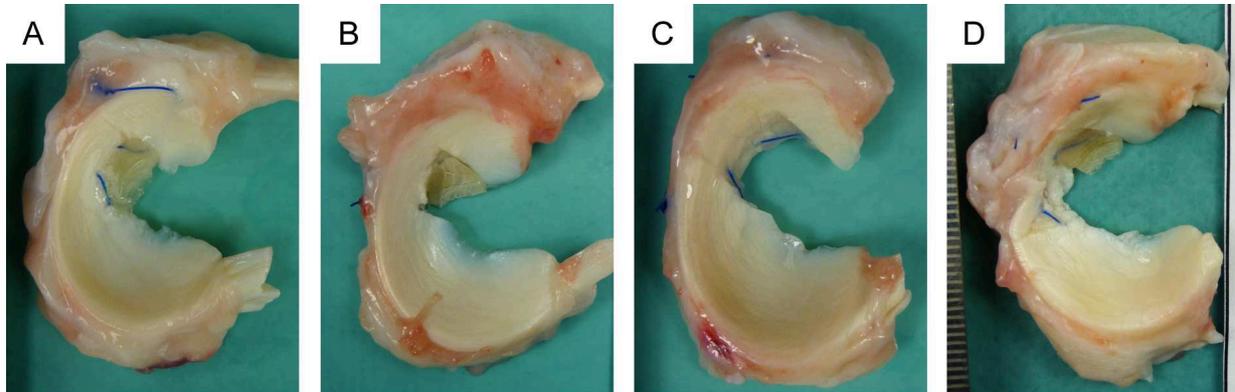


Abb. 40: Mediale Menisken von Tieren der Gruppe 1 (Sc3); Scaffold im Defekt (A), Scaffold mit ca. 1 mm breitem Spalt (B), Defekt ohne Scaffold (C), Meniskus mit starker Degeneration (D)

Auf der tibialen Fläche war bei drei Tieren eine ca. 0,5 mm hohe Stufe zwischen Meniskusgewebe und Scaffold sichtbar (Abb. 42). Die Scaffolds waren makroskopisch intakt, wiesen allerdings unterschiedlich starke Faltungen auf der tibialen und femoralen Oberfläche auf (Abb. 43). Eine bindegewebige Verwachsung zwischen Meniskus und Scaffold schien nicht stattgefunden zu haben. Nach Durchtrennung der Nähte, welche die Scaffolds im Defekt fixierten, lösten sich diese aus dem Defekt.



Abb. 41: Scaffold (\*) mit der *Membrana synovialis* der Gelenkkapsel verwachsen



Abb. 42: Tibiale Meniskusfläche mit Stufe zwischen Meniskus und Scaffold



Abb. 43: Scaffold mit Faltungen auf der femoralen Oberfläche

### *Sham-Gruppe*

Bei den Tieren, die lediglich der Sham-Operation unterzogen worden waren, traten neben den oben erwähnten vereinzelt degenerativen Veränderungen keine weiteren Auffälligkeiten am medialen Meniskus auf.

### *Teilresektion-Gruppe*

Der Meniskusdefekt war bei allen Tieren der Teilresektion-Gruppe gut sichtbar. Es hatte sich kein Regenerationsgewebe im Meniskusdefekt gebildet. Die Kanten der Geweberesektion waren bei allen Tieren deutlich erkennbar (Abb. 44 A), nur bei wenigen Tieren fiel auf, dass das Meniskusgewebe in den Ecken des Defekts an der tibialen Meniskusfläche intraoperativ nicht vollständig reseziert worden war (Abb. 44 B).

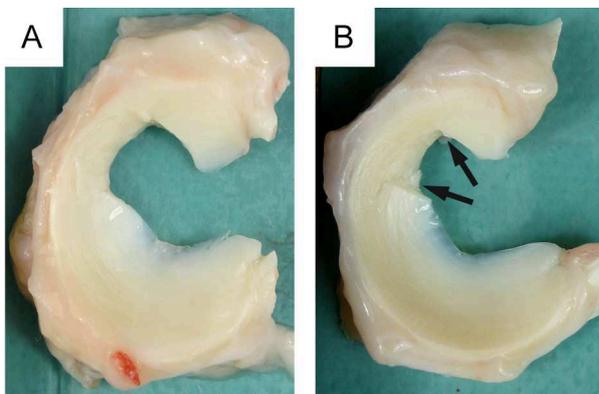


Abb. 44: Mediale Menisken aus Gruppe 3 (Tr); deutlich erkennbare Meniskusdefekte mit glatten Resektionskanten (A) und Gewebsresten in den Defektecken (B; Pfeile)

### *Scaffold-6-Monatsgruppe*

In der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit befand sich das Scaffold zum Zeitpunkt der Sektion bei sechs Tieren im Meniskusdefekt (Abb. 45 A). Bei einem Scaffold fehlte ein ca. 1 x 1 mm großes Stück im zentralen Bereich (Abb. 45 B). Alle anderen Scaffolds waren makroskopisch intakt. Ein ca. 1-2 mm breiter Spalt zwischen Scaffold und *Pars intermedia* des Meniskus war bei vier der sechs Tiere sichtbar (Abb. 45 C). Bei drei Tieren war das Scaffold nicht mehr im Defekt vorhanden (Abb. 45 D). Auch bei diesen Tieren konnte das Scaffold im Gelenk wiedergefunden werden. Ähnlich wie bei den Scaffolds nach dreimonatiger Implantation traten auch nach sechs Monaten Implantationszeit Faltungen auf der Oberfläche der Scaffolds auf und bei manchen Tieren war ebenfalls eine Stufenbildung auf der tibialen Fläche zwischen Meniskus und Scaffold erkennbar. Makroskopisch unterschieden sich die Scaffolds der beiden Scaffold-Gruppen nicht voneinander. Auch nach sechsmonatiger

Implantationszeit hatte keine bindegewebige Verwachsung der Scaffolds mit dem Meniskusgewebe stattgefunden. Die Scaffolds waren ausschließlich durch die Nähte im Defekt fixiert.

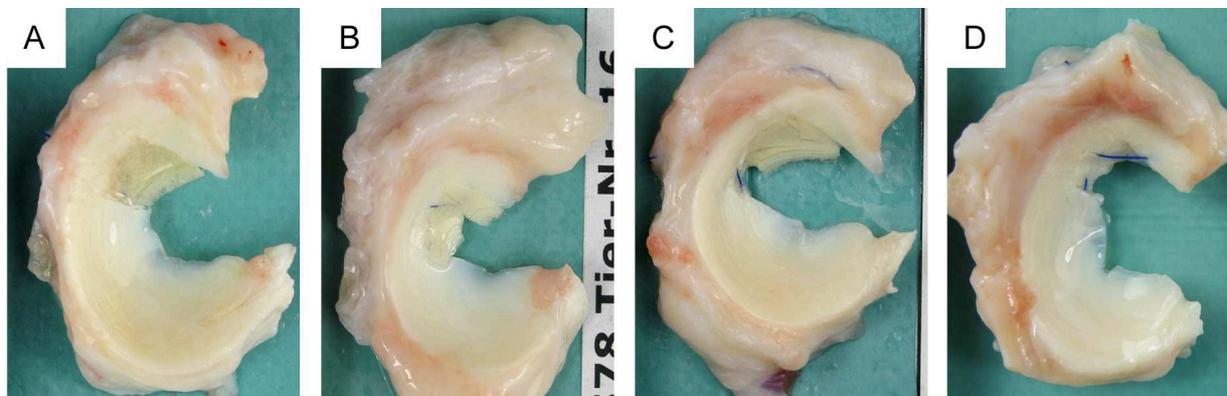
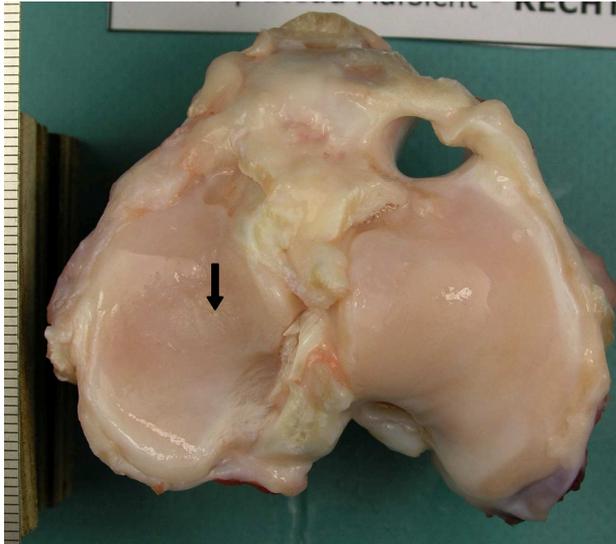


Abb. 45: Menisken von Tieren der Gruppe 4 (Sc6); Scaffold im Defekt (A), Scaffold im Defekt mit fehlendem Stückchen (B), Scaffold mit ca. 2 mm breitem Spalt (C), Defekt ohne Scaffold (D)

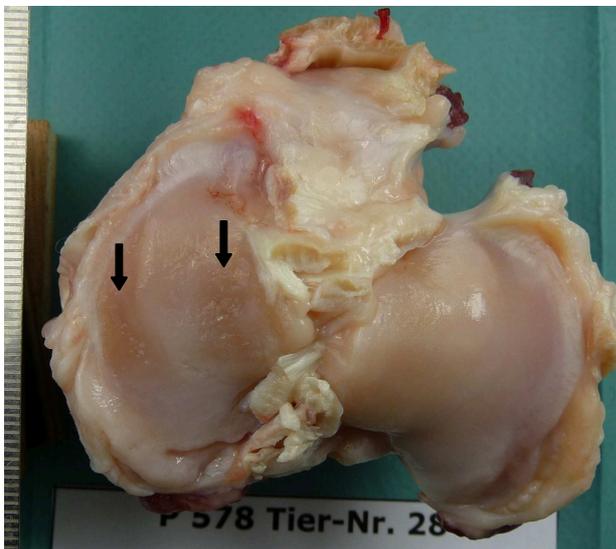
Biomechanische Untersuchungen der Scaffolds sowie des tibialen Knorpels und histologische Untersuchungen des Knorpels wurden nur bei den Tieren durchgeführt, bei denen sich das Scaffold zum Zeitpunkt der Tötung im Defekt befand. Die anderen Tiere wurden von diesen Untersuchungen ausgeschlossen, da durch den Scaffoldverlust keine klare Abgrenzung zur Teilresektion-Gruppe möglich war.

### 3.3.3 Tibialer und femoraler Gelenkknorpel

Die Ausprägung der makroskopisch sichtbaren Knorpelschäden an Tibia- und Femurkondylen war individuell sehr unterschiedlich. Leichte Veränderungen wie Erweichung und Aufquellung des Knorpels kamen bei fast allen Tieren vor (Abb. 46). Diese Veränderungen traten meist nur im zentralen Bereich auf. Bei Tieren mit stärker ausgeprägten Veränderungen traten neben einer Auffaserung der Knorpeloberfläche auch tiefe Knorpelrisse und zum Teil auch Knorpelabtragungen auf. Die deutlichsten Veränderungen waren wiederum im zentralen Bereich der Kondylen lokalisiert. Zusätzlich traten bei diesen Tieren aber auch Knorpelschäden in den peripheren Bereichen der Kondylen auf (Abb. 47). In allen Gruppen wies das mediale Gelenkkompartiment einen höheren Degenerationsgrad auf als das laterale Gelenkkompartiment (Abb. 46 und 47). Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren makroskopisch nicht zu erkennen.



*Abb. 46: Tibiaplateau mit Knorpelweichung im zentralen Bereich der medialen Tibiakondyle (schwarzer Pfeil); die laterale Tibiakondyle scheint makroskopisch unverändert*



*Abb. 47: Mediale Tibiakondyle mit starken Veränderungen sowohl im zentralen als auch im peripheren Bereich (schwarze Pfeile); geringgradige Knorpelweichung im zentralen Bereich der lateralen Tibiakondyle*

Diese ersten makroskopischen Beobachtungen wurden durch die Beurteilung der Knorpelflächen nach Outerbridge (1961) bekräftigt (vergleiche Tab 3; Abb. 48). Die Beurteilung nach Outerbridge ergab, dass die medialen Gelenkkompartimente deutlich ausgeprägtere Knorpelveränderungen aufwiesen, als die lateralen Gelenkkompartimente. In den Gruppen 1 (Sc3) und 2 (Sh) war dies besonders auffällig. Hier waren die medialen Kompartimente doppelt so stark von degenerativen Veränderungen betroffen wie die lateralen Kompartimente. In der Teilresektion-Gruppe war der Degenerationsgrad nach Outerbridge in den medialen Kompartimenten der operierten Seite signifikant höher als auf der kontralateralen nicht operierten Seite. In den anderen Gruppen (Sc3, Sh und Sc6) bestand kein signifikanter Unterschied im Degenerationsgrad der operierten und nicht operierten Kniegelenke.

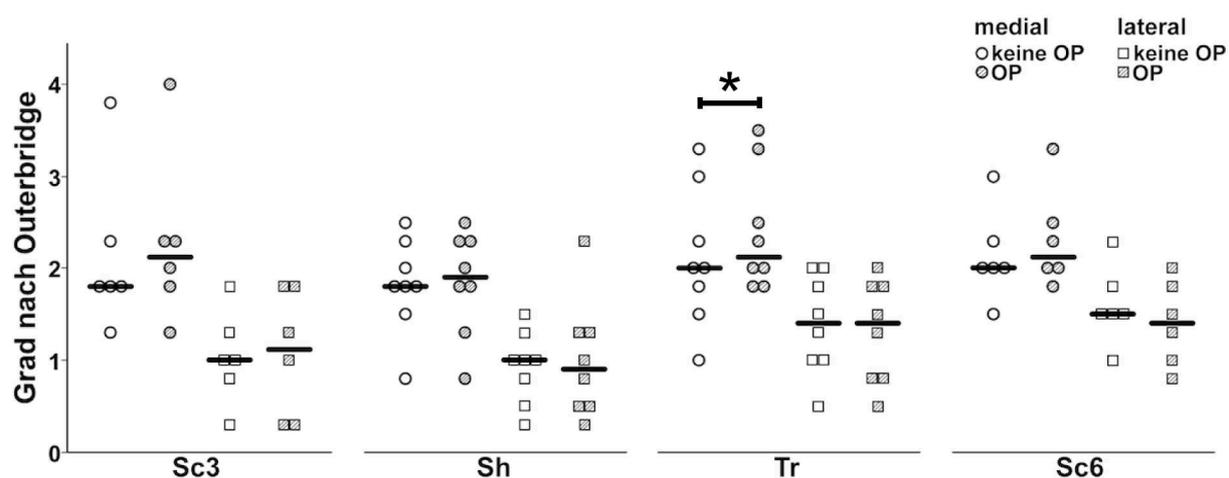


Abb. 48: Beurteilung der Knorpelflächen nach Outerbridge (1961); in jeder Gruppe links sind die Knorpelveränderungen in den medialen Gelenkkompartimenten dargestellt, rechts die Veränderungen in den lateralen Kompartimenten; Sc3: Scaffold 3 Monate, Sh: Sham, Tr: Teilresektion, Sc6: Scaffold 6 Monate;

\* signifikanter Unterschied zw. den medialen nicht operierten und den medialen operierten Gelenkkompartimenten in Gruppe 3 (Tr),  $p < 0,05$

### 3.4 Biomechanische Untersuchungen

#### 3.4.1 Biomechanik des tibialen Knorpels

Mit zunehmender Degeneration nimmt der Gehalt an Kollagenen und Glykosaminoglykanen im artikulären Knorpel ab. Diese Veränderung der Knorpelstruktur bedingt eine messbare Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels. Deshalb wurden in dieser Studie die elastischen ( $E_{eq}$ ) und viskösen ( $E_c$ ) Eigenschaften des tibialen Gelenkknorpels durch einen Indentationstest ermittelt. Zusätzlich wurde im Zuge des Indentationstests auch die Knorpeldicke bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.3.1). Um den Einfluss der Scaffoldimplantation auf die Knorpelgesundheit abschätzen zu können, wurden nach drei bzw. sechs Monaten die Eigenschaften des tibialen Knorpels der operierten Gelenke mit gesundem Knorpel verglichen. Hierfür wurden die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels der nicht operierten Gliedmaßen ermittelt. Zusätzlich wurden die Eigenschaften des Knorpels sechs Monate nach Sham-Operation bzw. nach Meniskusteilresektion bestimmt. Die ermittelten Werte konnten dann mit den Werten nach sechsmonatiger Scaffoldimplantation verglichen werden.

*Dreimonatsgruppe (Scaffold-3-Monatsgruppe)*

Die tibiale Knorpelschicht war sowohl in den operierten als auch in den nicht operierten Gelenken an Messpunkt 2 am dicksten (Abb. 49 A). An Messpunkt 1 war der Knorpel beidseits geringfügig und an Messpunkt 3 deutlich dünner als an Messpunkt 2 (Abb. 49 A). An keinem der drei Messpunkte bestand ein Unterschied zwischen den Knorpeldicken der operierten und der kontralateralen Gelenke.

Die medianen Gleichgewichtsmoduln des Knorpels waren beidseits an Messpunkt 2 nur halb so hoch wie an Messpunkt 1 und auch deutlich niedriger als an Messpunkt 3 (Abb. 49 B). Auffällig war, dass der tibiale Knorpel des operierten Gelenks an Messpunkt 1 deutlich weniger elastisch als auf der kontralateralen, nicht operierten Seite war. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Auch an Messpunkt 2 war der mediane Gleichgewichtsmodul des Knorpels der operierten Gliedmaße niedriger als der Gleichgewichtsmodul der nicht operierten Gliedmaße. Aber auch hier war der Unterschied nicht signifikant. An Messpunkt 3 unterschieden sich die Gleichgewichtsmoduln der beiden Seiten kaum.

Wie die Gleichgewichtsmoduln waren auch die Kriechmoduln an Messpunkt 2 auf beiden Seiten deutlich niedriger als an den Messpunkten 1 und 2 (Abb. 49 C). Anders als bei den Gleichgewichtsmoduln gab es aber unter anderem an Messpunkt 1 wesentlich geringere Unterschiede zwischen dem Knorpel der nicht operierten und der operierten Seite. Die medianen Kriechmoduln waren außerdem insgesamt deutlich höher als die medianen Gleichgewichtsmoduln.

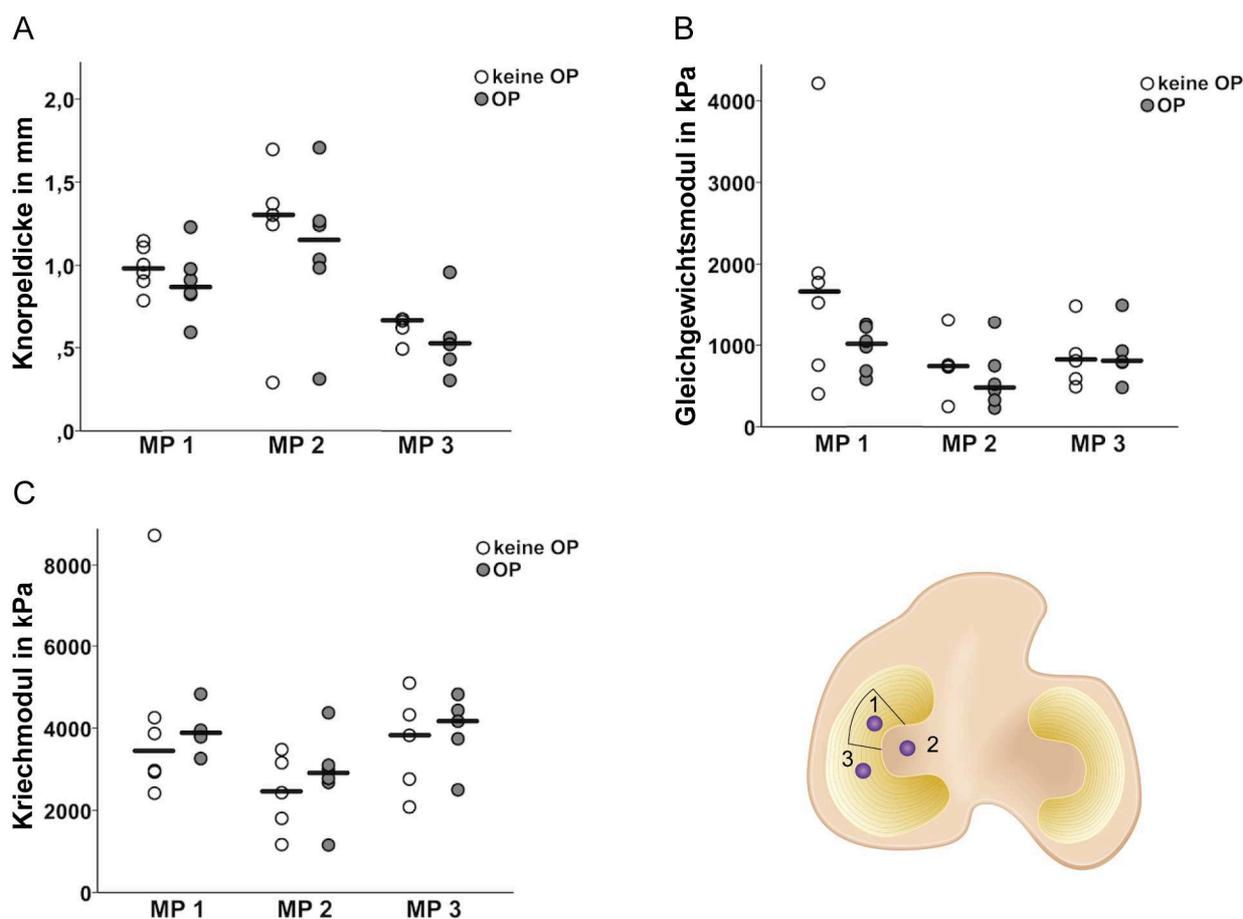


Abb. 49: Dicke und biomechanische Eigenschaften des tibialen Knorpels in der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit in den operierten Gelenken verglichen mit den kontralateralen nicht operierten Gelenken

#### Sechsmonatsgruppen (Sham-, Teilresektion- und Scaffold-6-Monatsgruppe)

In den Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit zeigte sich bei der Ermittlung der Knorpeldicken ein ähnliches Bild wie in Gruppe 1 (Sc3). Auch hier war der Knorpel an Messpunkt 2 in allen Gruppen am dicksten und an Messpunkt 3 am dünnsten (Abb. 50 A). Die größten interindividuellen Differenzen traten an Messpunkt 2 auf. Zwischen den einzelnen Gruppen gab es aber an keinem der drei Messpunkte signifikante Unterschiede.

Anders stellte es sich bei Erhebung der viskoelastischen Knorpel Eigenschaften, ausgedrückt durch den Gleichgewichtsmodul und den Kriechmodul, dar. Der mediane Gleichgewichtsmodul war an Messpunkt 1 in der Teilresektion-Gruppe 60 % niedriger als der Gleichgewichtsmodul in der Sham-Gruppe und 53 % niedriger als der Gleichgewichtsmodul in der Scaffold-Gruppe (Abb. 50 B). Der Unterschied zwischen der Sham- und der Teilresektion-Gruppe war statistisch signifikant. Die

Gleichgewichtsmoduln der Sham- und der Scaffold-Gruppe unterschieden sich an diesem Messpunkt hingegen nicht. An Messpunkt 2 waren die Gleichgewichtsmoduln in der Sham- und der Scaffold-Gruppe deutlich niedriger als an Messpunkt 1 und 3. Im Gegensatz dazu gab es in der Teilresektion-Gruppe keine deutlichen Unterschiede zwischen Messpunkt 1, 2 und 3. Dadurch war der Gleichgewichtsmodul des Knorpels an Messpunkt 2 in der Teilresektion-Gruppe signifikant höher als in der Sham-Gruppe. Zwischen der Sham- und der Scaffold-Gruppe gab es hingegen auch an diesem Messpunkt keinen Unterschied. An Messpunkt 3 gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den medianen Gleichgewichtsmoduln der drei Gruppen.

Ähnlich wie die Gleichgewichtsmoduln unterschieden sich auch die Kriechmoduln der Sham- und der Teilresektions-Gruppe an Messpunkt 1 signifikant (Abb. 50 C). Der mediane Modul war in der Teilresektion-Gruppe um rund ein Viertel niedriger als in der Sham-Gruppe. Zwischen der Scaffold-Gruppe und der Sham-Gruppe gab es keinen Unterschied an diesem Messpunkt. An Messpunkt 2 war der mediane Kriechmodul in der Scaffold-Gruppe um ca. ein Fünftel niedriger als in der Teilresektion-Gruppe und damit bestand ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Zwischen den Kriechmoduln der Scaffold- und der Sham-Gruppe bestand allerdings kein Unterschied. An Messpunkt 3 unterschieden sich die medianen Kriechmoduln der drei Gruppen kaum.

Auch in den Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit waren die Kriechmoduln des tibialen Knorpels insgesamt deutlich höher als die Gleichgewichtsmoduln.

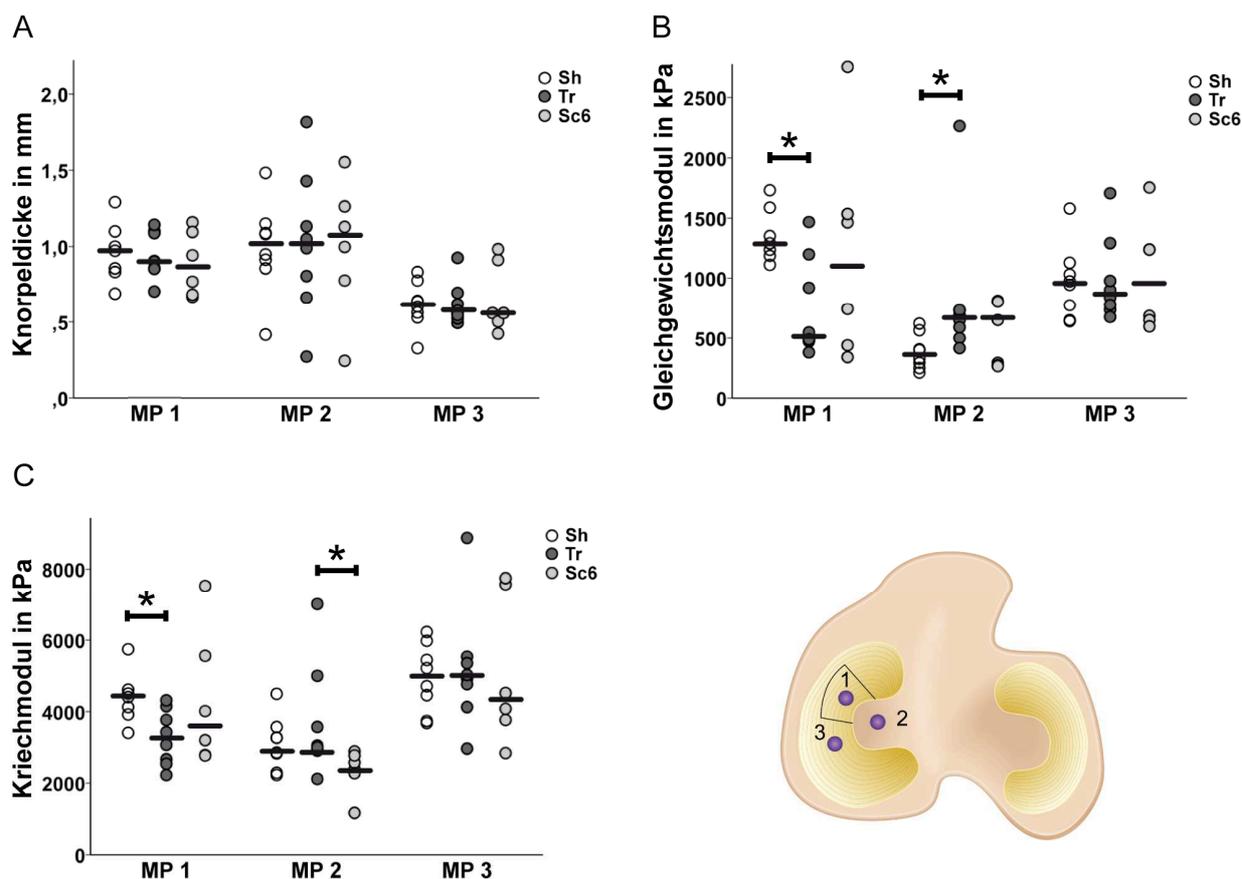


Abb. 50: Tibiale Knorpeldicke (A), Gleichgewichtsmodul (B) und Kriechmodul (C) des Knorpels in den Gruppen 2 (Sh), 3 (Tr) und 4 (Sc6) in den operierten Gelenken;

\* signifikanter Unterschied der Gleichgewichtsmoduln zw. Gruppe 2 (Sh) und 3 (Tr) an MP 1 und MP 2,  $p < 0,05$

signifikanter Unterschied der Kriechmoduln zw. Gruppe 2 (Sh) und 3 (Tr) an MP 1 sowie zw. Gruppe 3 (Tr) und 4 (Sc6) an MP 2,  $p < 0,05$

Neben den operierten Kniegelenken wurden auch in diesen drei Gruppen die nicht operierten, kontralateralen Gelenke untersucht. Dadurch konnten die Auswirkungen des jeweiligen operativen Eingriffs auf die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels innerhalb der einzelnen Gruppen beurteilt werden.

An Messpunkt 1 wichen in allen drei Gruppen die tibialen Knorpeldicken der beiden Seiten kaum voneinander ab (Abb. 51). Auch an Messpunkt 2 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der nicht operierten und der operierten Seite, wenngleich der Knorpel der operierten Seiten in der Scaffold-Gruppe tendenziell dünner war als der Knorpel der nicht operierten Seite (Abb. 51 C). Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. An Messpunkt 3 war der tibiale Knorpel der operierten Gelenke in der Sham- sowie der Scaffold-Gruppe signifikant dicker als der Knorpel der

nicht operierten Kniegelenke. In der Teilresektion-Gruppe unterschieden sich die Knorpeldicken auch an diesem Messpunkt nicht voneinander.

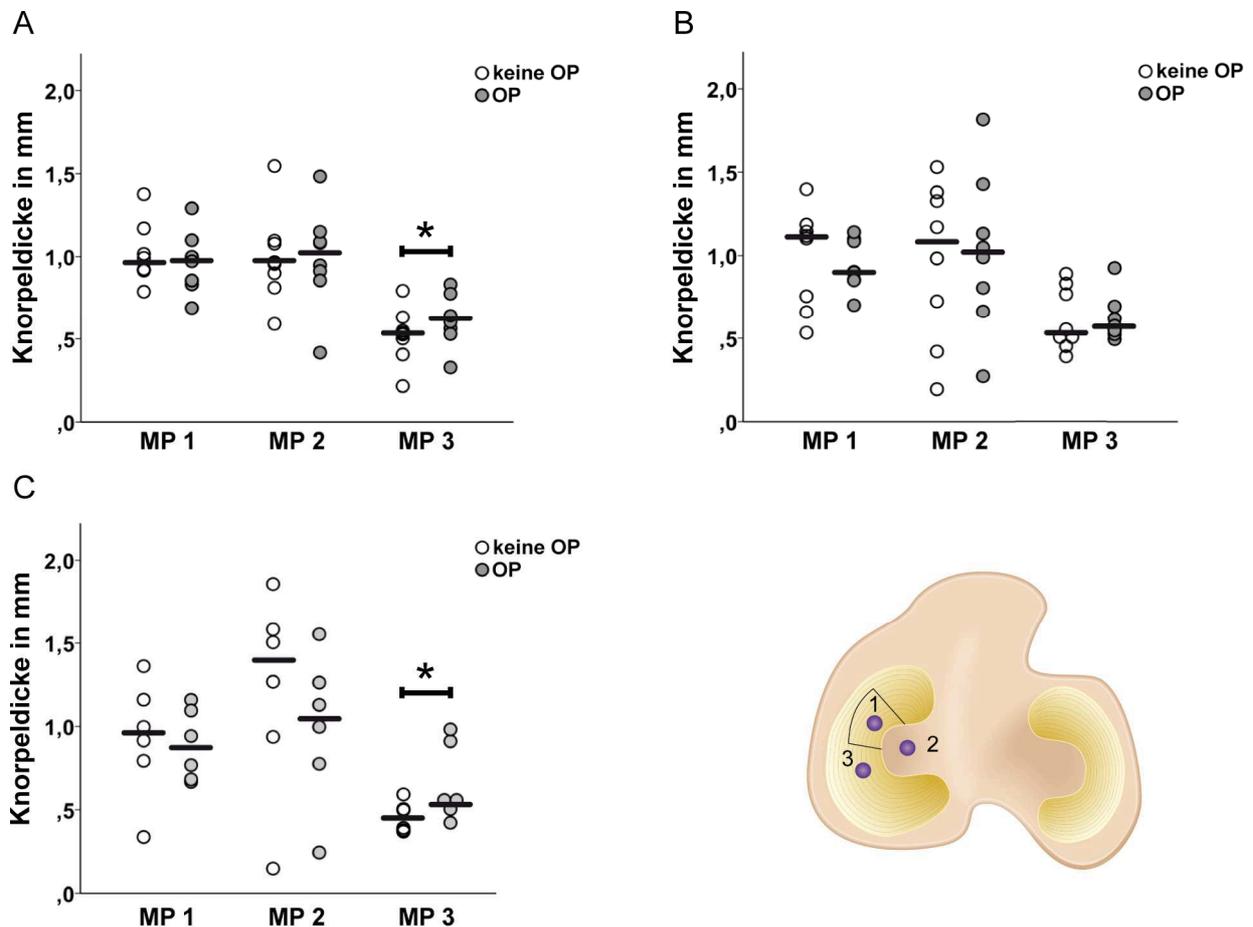


Abb. 51: Vergleich der tibialen Knorpeldicken der kontralateralen nicht operierten Kniegelenke mit den operierten Gelenken in den Gruppe 2 (Sh; A), 3 (Tr; B) und 4 (Sc6; C);

\* signifikanter Unterschied der Knorpeldicken der kontralateralen und der operierten Gelenke an MP 3 in den Gruppe 2 (Sh) und 4 (Sc6),  $p < 0,05$

Die Gleichgewichtsmoduln des Knorpels waren in allen drei Gruppen auf beiden Seiten größtenteils auf einem vergleichbaren Niveau. Es gab an keinem Messpunkt signifikante Unterschiede zwischen den operierten und den nicht operierten Gelenken. In der Teilresektion-Gruppe war der Gleichgewichtsmodul in den operierten Gelenken allerdings nur halb so hoch wie der Gleichgewichtsmodul in den nicht operierten Gelenken (Abb. 52 B). In der Sham-Gruppe gab es an diesem Messpunkt einen wesentlich geringeren Unterschied zwischen den Moduln der beiden Seiten und in der Scaffold-Gruppe bestand kaum ein Unterschied ( $< 3\%$ ) zwischen der operierten und der kontralateralen Seite (Abb. 52 A und C). An Messpunkt 2 gab es in allen drei

Gruppen keine großen Unterschieden zwischen den Gleichgewichtsmoduln der beiden Seiten. Auch an Messpunkt 3 unterschieden sich die medianen Gleichgewichtsmoduln in den Gruppen 2 (Sh) und 3 (Tr) kaum. In der Scaffold-Gruppe war der mediane Gleichgewichtsmodul des Knorpel der operierten Gelenke höher als der Gleichgewichtsmodul der nicht operierten Gelenke (Abb. 52 C). Der Unterschied war allerdings nicht signifikant.

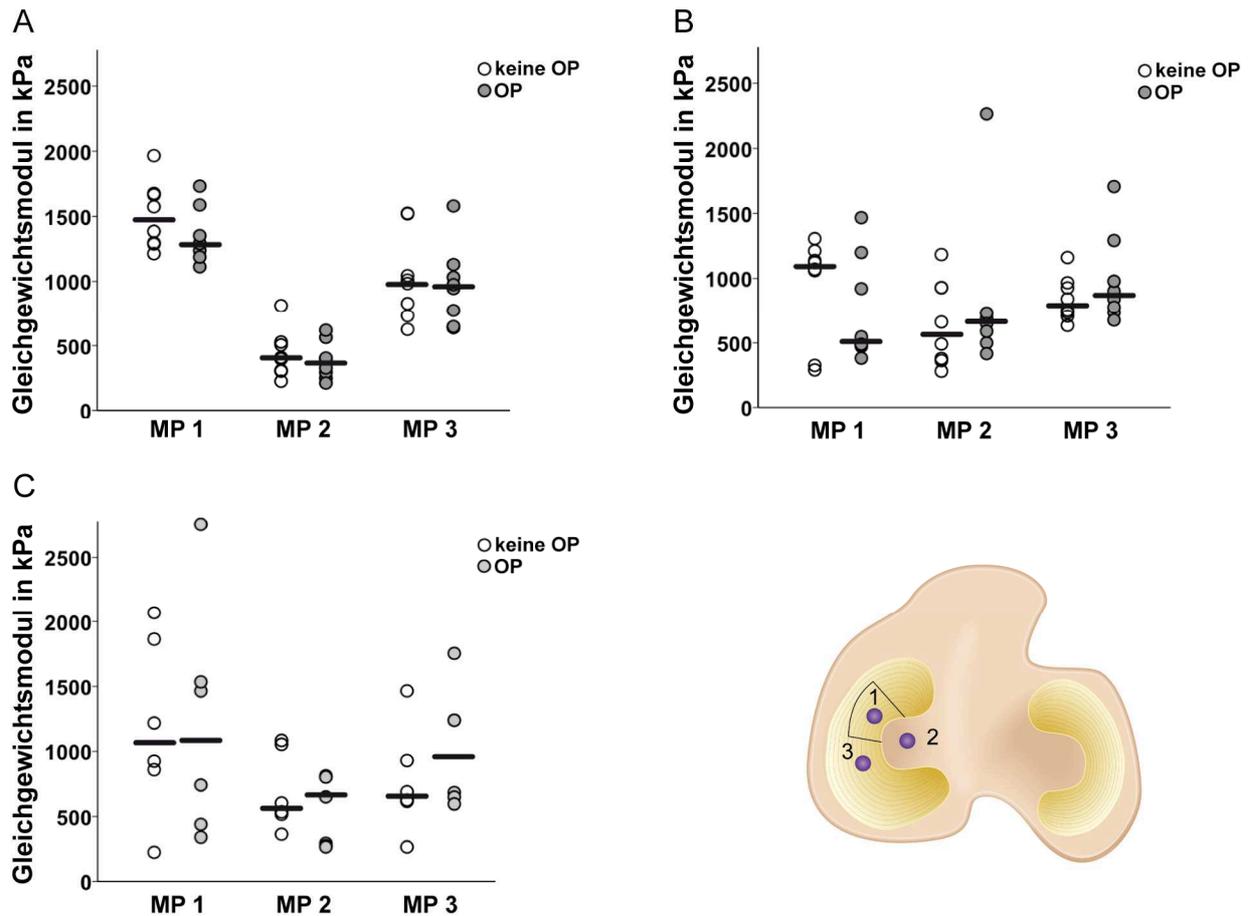


Abb. 52: Gleichgewichtsmoduln des tibialen Knorpels der kontralateralen nicht operierten Gelenke mit den Moduln der operierten Gelenke in Gruppe 2 (Sh; A), 3 (Tr; B) und 4 (Sc6; C)

Der Kriechmodul an Messpunkt 1 war in allen drei Gruppen auf der operierten Seite höher als auf der nicht operierten Seite (Abb. 53 A, B und C). In der Scaffold-Gruppe unterschieden sich die Kriechmoduln an diesem Messpunkt sogar signifikant um 40 % (Abb. 53 C). An Messpunkt 2 bestand nur in der Teilresektion-Gruppe ein etwas deutlicherer Unterschied zwischen dem Kriechmodul des Knorpels der kontralateralen und der operierten Gelenke. Dieser war allerdings nicht signifikant. In den beiden anderen Gruppen (Sh und Sc6) unterschieden sich die Kriechmoduln an Messpunkt 2

kaum. Die Kriechmoduln an Messpunkt 3 waren in der Sham-Gruppe beidseits beinahe identisch (Abb. 53 A) und auch in der Scaffold-Gruppe war der Unterschied sehr gering (Abb. 53.) In der Teilresektion-Gruppe war der mediane Kriechmodul der operierten Seite an diesem Messpunkt etwas höher als auf der nicht operierten Seite. Es bestand allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und den nicht operierten Gelenken.

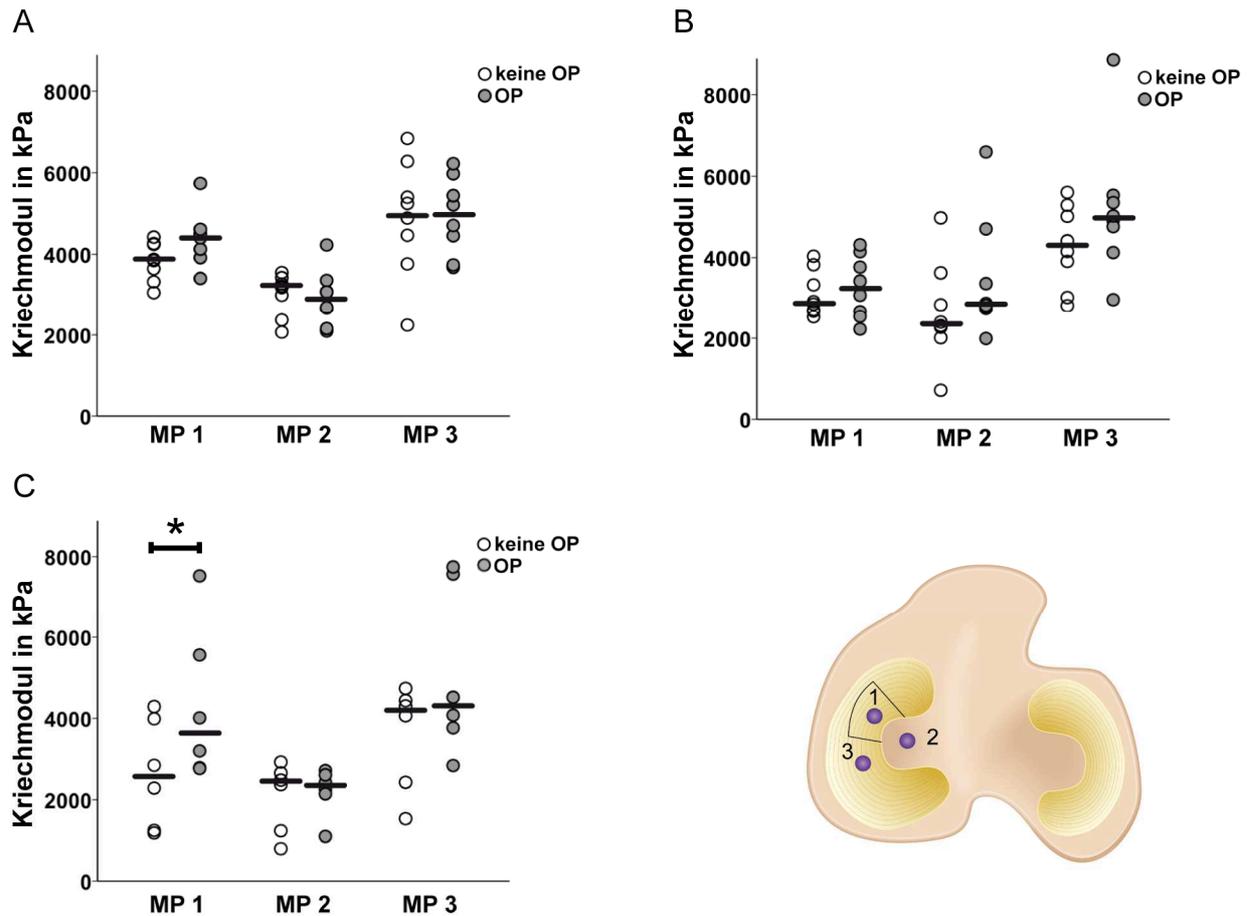


Abb. 53: Vergleichende Darstellung der Kriechmoduln des tibialen Knorpels der kontralateralen nicht operierten Gelenke mit den Moduln der operierten Gelenke in den Gruppen 2 (Sh; A), 3 (Tr; B) und 4 (Sc6; C);

\*signifikanter Unterschied an MP 1 zwischen den Kriechmoduln auf der nicht operierten Seite und der operierten Seite in Gruppe 4 (Sc6),  $p < 0,05$

### *Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Biomechanik des tibialen Knorpels*

In allen Gruppen traten deutliche interindividuelle Unterschiede der biomechanischen Eigenschaften des tibialen Knorpels auf. Dennoch zeigte sich, dass die Scaffoldimplantation weder nach drei noch nach sechs Monaten Auswirkungen auf die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels hatte.

An dem Messpunkt, der direkt unterhalb des Scaffolds lag (MP 1), traten in der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Implantationszeit nur sehr geringe Unterschiede zwischen dem Gleichgewichtsmodul bzw. dem Kriechmodul der operierten und der nicht operierten kontralateralen Kniegelenke auf. In der Scaffold-6-Monatsgruppe unterschieden sich die Gleichgewichtsmoduln an Messpunkt 1 kaum und der Kriechmodul war an diesem Messpunkt auf der operierten Seite sogar höher als auf der kontralateralen Seite. In der Teilresektion-Gruppe war der Gleichgewichtsmodul der operierten Gelenke hingegen nur halb so hoch wie der Gleichgewichtsmodul der kontralateralen nicht operierten Gelenke.

Besonders aussagekräftig beim Vergleich der biomechanischen Ergebnisse der verschiedenen Gruppen ist der Bereich des Knorpels, der unterhalb des Meniskusdefekts bzw. des Scaffolds lokalisiert war (Messpunkt 1). In diesem Bereich traten in den operierten Gelenken signifikante Unterschiede zwischen dem Gleichgewichtsmodul sowie dem Kriechmodul der Sham- und der Teilresektion-Gruppe auf. Der Gleichgewichtsmodul in der Teilresektion-Gruppe war an diesem Messpunkt um 60 % und der Kriechmodul um 26 % niedriger als in der Sham-Gruppe. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Moduln in der Sham- und der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit kaum und es bestanden keine signifikanten Unterschiede an Messpunkt 1 zwischen diesen beiden Gruppen.

#### **3.4.2 Biomechanik der Menisken und Scaffolds**

Der Erfolg eines Implantats für den Meniskusersatz hängt unter anderem entscheidend von der mechanischen Belastbarkeit des eingesetzten Materials ab. Daher wurden in dieser Studie die mechanischen Eigenschaften der Seidenfibrin-Scaffolds mit den Eigenschaften des nativen Meniskus verglichen. Im Stress-Relaxations-Test der Meniskusstanzen ergab sich bei 20 % Dehnung ein medianer Gleichgewichtsmodul von 95 kPa für das Meniskusgewebe (Abb. 54). Das zuvor nicht implantierte Scaffoldmaterial erreichte im Stress-Relaxations-Test einen medianen Gleichgewichtsmodul von 44 kPa und wies daher eine signifikant niedrigere Steifigkeit

auf als das Meniskusgewebe. Bereits nach dreimonatiger Implantation war das Scaffoldmaterial mit einem medianen Gleichgewichtsmodul von 64 kPa deutlich steifer als vor der Implantation. Die Steifigkeit der Scaffolds nach dreimonatiger Implantation war allerdings immer noch signifikant niedriger als die Steifigkeit des Meniskus. Mit längerer Implantationszeit schien die Steifigkeit des Scaffoldmaterials weiter zuzunehmen, wodurch nach sechsmonatiger Implantation ein Gleichgewichtsmodul von 76 kPa erreicht wurde. Damit unterschied sich der Gleichgewichtsmodul des Scaffoldmaterials nach sechs Monaten nicht mehr signifikant von dem Gleichgewichtsmodul des Meniskusgewebes. Bei 10 % und 15 % Dehnung verhielten sich die Gleichgewichtsmoduln von Meniskus und Scaffold entsprechend.

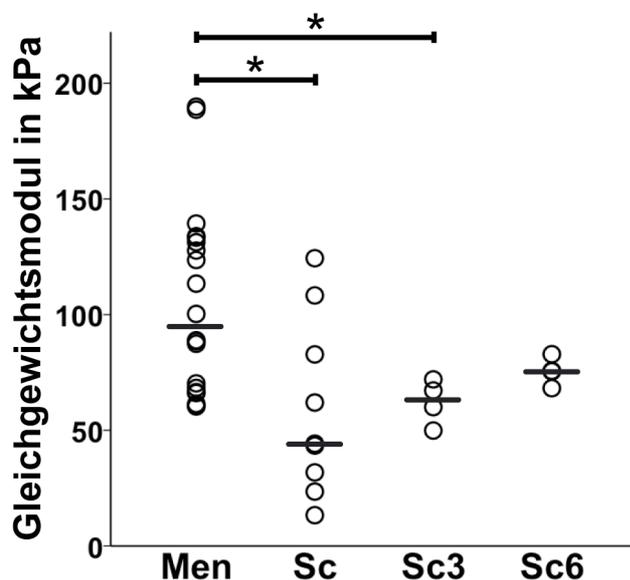


Abb. 54: Gleichgewichtsmoduln der Meniskusstanzen (Men), der Stanzen aus nicht implantiertem Scaffoldmaterial (Sc) sowie aus Scaffolds nach dreimonatiger (Sc3) bzw. sechsmonatiger (Sc6) Implantation; ermittelt bei 20 % Dehnung;

\* signifikante Unterschiede zw. Meniskusgewebe und nicht implantiertem Scaffold bzw. Scaffold nach dreimonatiger Implantation,  $p < 0,05$

### 3.5 India Ink Färbung

Die India Ink Färbung der Femur- und Tibiakondylen ergänzte die makroskopische Beurteilung der Knorpelflächen, da durch die Tinte die degenerierten Knorpelareale deutlich sichtbar dargestellt werden konnten.

Wie bereits die makroskopische Beurteilung der Gelenkflächen zeigte auch die India Ink Färbung, dass grundsätzlich die medialen Gelenkkompartimente stärker degenerativ verändert waren als die lateralen Kompartimente (Abb. 55, 56, 57 und 58). Außerdem bestätigte sich, dass vor allem der zentrale Bereich der Femur- und Tibiakondylen Veränderungen aufwies. Auffällig waren auch hier die starken interindividuellen Unterschiede. Diese traten unabhängig von der Gruppen-

zugehörigkeit der Tiere auf. Außerdem zeigte die Auswertung mit der Bildanalysesoftware Metamorph<sup>®</sup>, dass die degenerativen Veränderungen an den Tibiakondylen grundsätzlich ausgeprägter waren als an den Femurkondylen (Abb. 60, 61, 62 und 63).

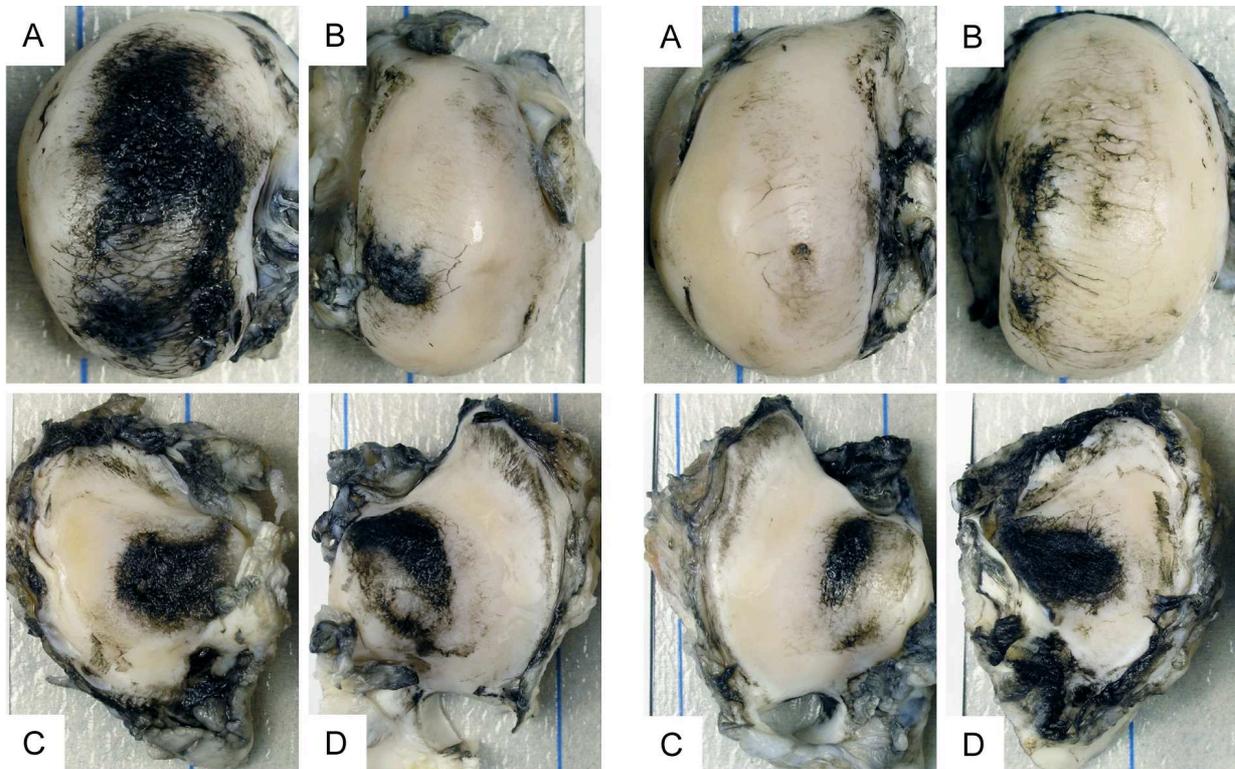


Abb. 55: Mediale (A) und laterale (B) Femurkondyle sowie mediale (C) und laterale (D) Tibiakondyle der nicht operierten Hintergliedmaße eines Tieres aus Gruppe 4 (Sc6); v. a. die mediale Femurkondyle weist sehr ausgeprägte degenerative Veränderungen auf

Abb. 56: Laterale (A) und mediale (B) Femurkondyle sowie laterale (C) und mediale (D) Tibiakondyle der operierten Hintergliedmaße eines Tieres aus Gruppe 4 (Sc6); der Knorpel ist deutlich schwächer degenerativ verändert als der Knorpel der nicht operierten Hintergliedmaße (vgl. Abb. 55)

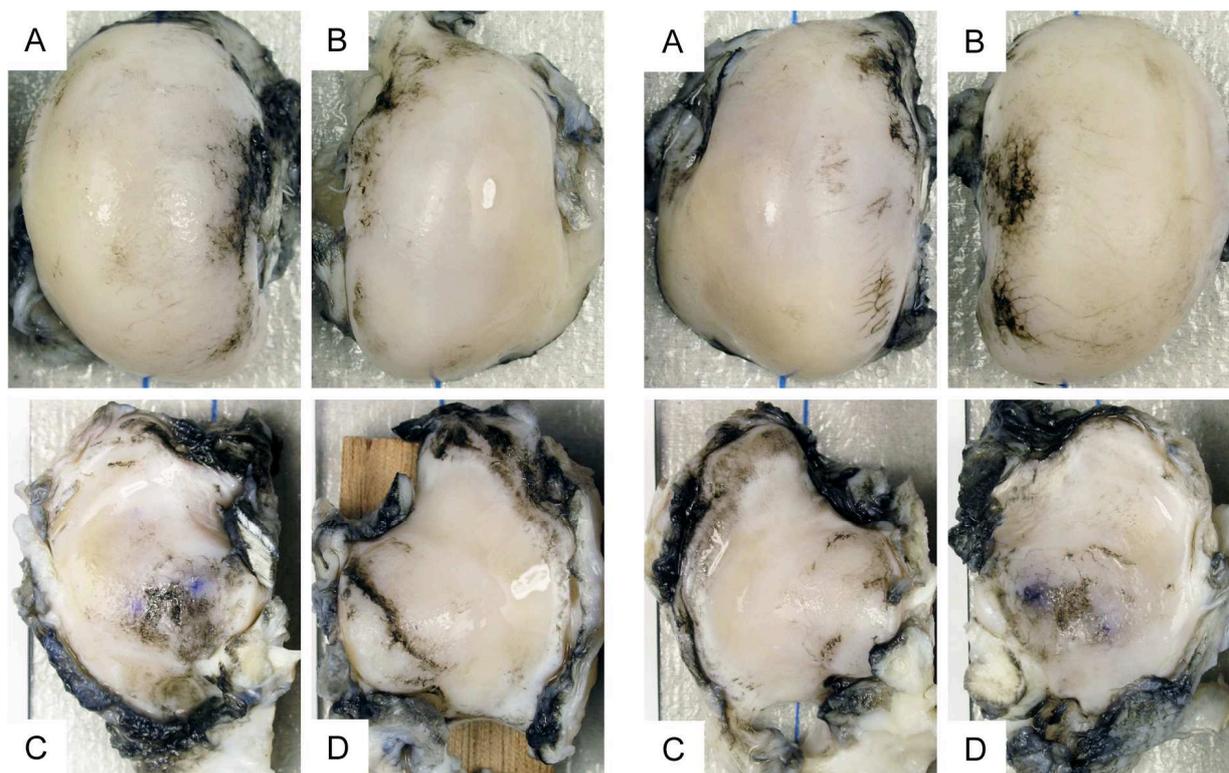


Abb. 57: Mediale (A) und laterale (B) Femurkondyle sowie mediale (C) und laterale (D) Tibiakondyle der nicht operierten Hintergliedmaße eines Tieres aus Gruppe 4 (Sc6); die degenerativen Veränderungen sind fast ausschließlich auf die zentralen Bereiche der Kondylen begrenzt

Abb. 58: Laterale (A) und mediale (B) Femurkondyle sowie laterale (C) und mediale (D) Tibiakondyle der operierten Hintergliedmaße eines Tieres aus Gruppe 4 (Sc6); das Ausmaß der Knorpeldegeneration ist mit dem Ausmaß an der nicht operierten Hintergliedmaße vergleichbar (vgl. Abb. 57)

#### *Dreimonatsgruppe (Scaffold-3-Monatsgruppe)*

Abbildung 59 zeigt, dass die Tibiakondylen der operierten und der nicht operierten Kniegelenke deutlich ausgeprägtere degenerative Veränderungen aufweisen als die Femurkondylen. Betrachtet man die medialen Femurkondylen, so waren diese auf der operierten Seite stärker von Degeneration betroffen als auf der nicht operierten Seite (Abb. 59 A). Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant. Bei den lateralen Femurkondylen gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Seiten. Insgesamt deutlich stärker ausgeprägte Veränderungen traten an den Knorpelflächen der medialen Tibiakondylen auf (Abb. 59 B). Ein Unterschied zwischen den kontralateralen und den operierten Gelenken bestand hier jedoch nicht. Lateral traten auf der nicht operierten Seite ca. 30 % ausgedehntere degenerative Veränderungen auf als auf der operierten Seite (Abb. 59 B). Auch dieser Unterschied war nicht

signifikant.

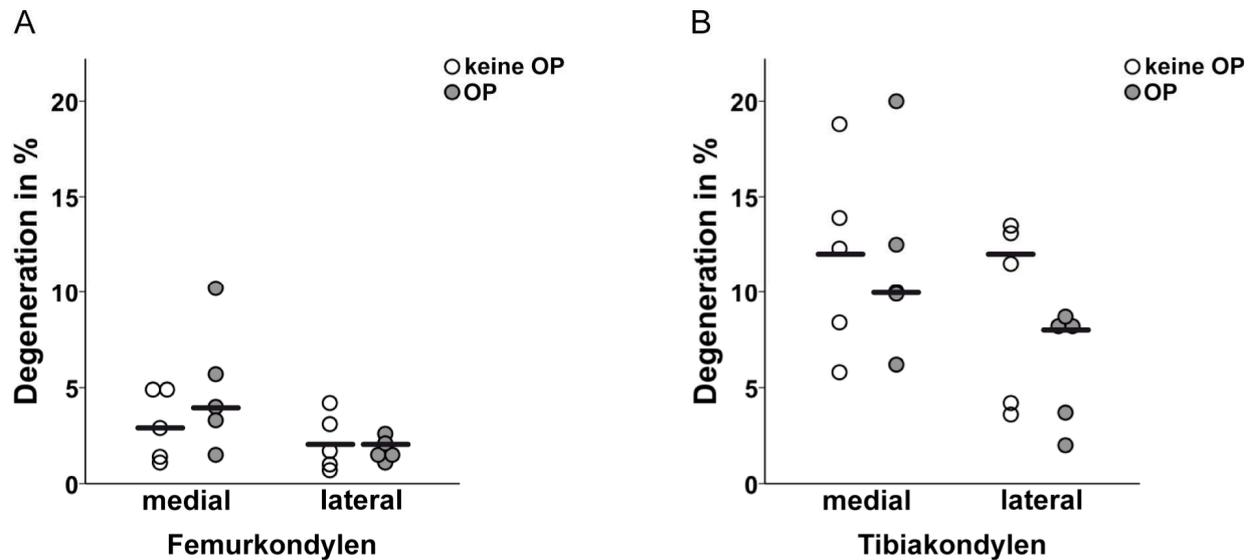


Abb. 59: Prozentualer Anteil der degenerierten Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche von Femur- (A) bzw. Tibiakondylen (B) in Gruppe 1 (Sc3)

#### Sechsmonatsgruppen (Sham-, Teilresektion- und Scaffold-6-Monatsgruppe)

Die Tiere mit sechsmonatiger Standzeit wiesen wesentlich ausgeprägtere Knorpeldegenerationen auf als die Tiere der Scaffold-3-Monatsgruppe (vgl. Abb. 59 und Abb. 60).

Verglichen mit den anderen beiden Gruppen traten an den medialen Femurkondylen in der Teilresektion-Gruppe besonders großflächige degenerative Veränderungen auf (Abb. 60 A). Es war ein fast doppelt so großer Anteil der Knorpelfläche von Degeneration betroffen als in der Sham- und der Scaffold-Gruppe. Damit war die degenerierte Knorpelfläche in der Teilresektion-Gruppe signifikant größer als die degenerierte Knorpelfläche in der Sham-Gruppe. Die lateralen Femurkondylen in der Teilresektion- und der Scaffold-Gruppe waren stärker degeneriert als in der Sham-Gruppe. Dieser Unterschied war allerdings nur gering und statistisch nicht signifikant.

In der Teilresektion-Gruppe waren 26 % der Knorpelfläche der medialen Tibiakondylen degenerativ verändert. In der Sham- bzw. der Scaffold-Gruppe hingegen nur 18 % bzw. 20 %. Es bestand allerdings kein signifikanter Unterschied (Abb. 60 B). Die lateralen Tibiakondylen der Tiere aus der Sham-Gruppe waren zu einem geringeren Anteil degenerativ verändert als die lateralen Tibiakondylen der Tiere aus der Teilresektion- und der Scaffold-Gruppe. Auch diese Unterschiede waren

statistisch nicht signifikant.

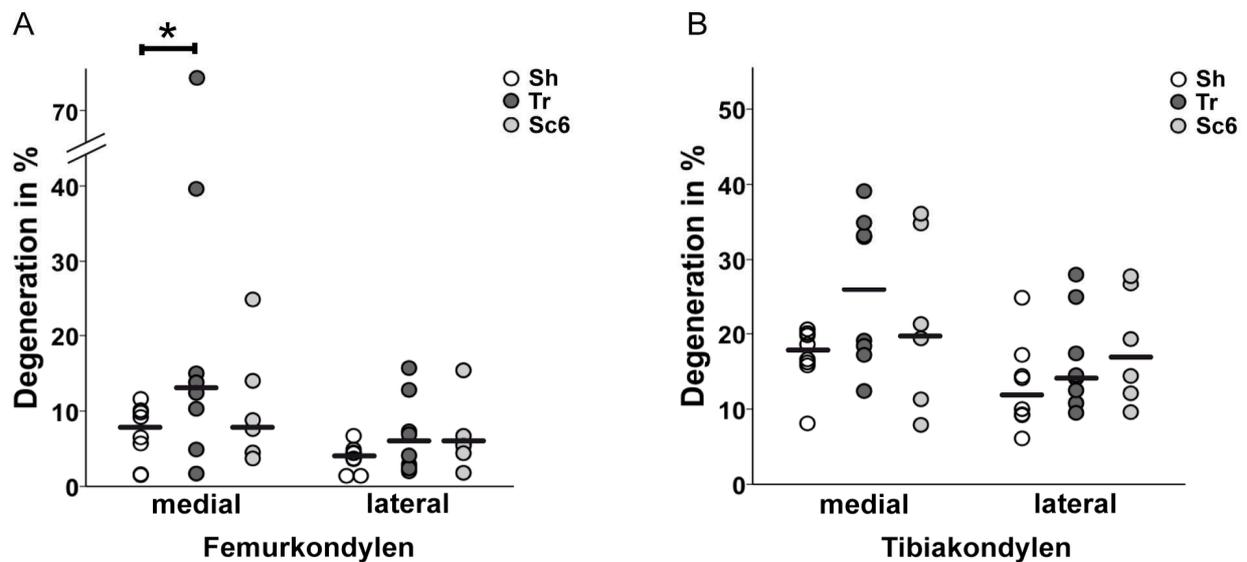


Abb. 60: Prozentualer Anteil der degenerierten Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche von Femur- (A) bzw. Tibiakondylen (B) in Gruppe 2 (Sh), 3 (Tr) und 4 (Sc6);

\* signifikanter Unterschied im Degenerationsgrad zwischen Gruppe 2 (Sh) und 3 (Tr) an den medialen Femurkondylen,  $p < 0,05$

Der Vergleich der Knorpelflächen der operierten Gelenke mit den Knorpelflächen der nicht operierten kontralateralen Gelenke zeigte, dass die medialen Femurkondylen der operierten Gelenke in der Sham-Gruppe signifikant weniger Degeneration aufwiesen als die Kondylen der nicht operierten Gelenke (Abb. 61 A). Genau umgekehrt war das Verhältnis bei den medialen Tibiakondylen. Hier war auf der operierten Seite ein signifikant größerer Anteil der Knorpelfläche degenerativ verändert als auf der kontralateralen Seite (Abb. 61 A).

In der Teilresektion-Gruppe war die degenerierte Fläche an den medialen Femurkondylen der operierten Gelenke fast doppelt so groß wie in den nicht operierten Gelenken (Abb. 61 B). Die Unterschiede zwischen den beiden Gelenken waren allerdings nicht signifikant. Bei den medialen Tibiakondylen waren ebenfalls die operierten Gelenke stärker degenerativ verändert als die nicht operierten Gelenke. Der Unterschied zwischen den beiden Seiten war aber niedriger als an den Femurkondylen und es bestand auch hier keine Signifikanz.

In der Scaffold-Gruppe entsprach das Ausmaß der Degeneration an den medialen Femurkondylen der operierten Gelenke dem Ausmaß an den Femurkondylen der kontralateralen Kniegelenke (Abb. 61 C). Auch an den medialen Tibiakondylen gab es

kaum einen Unterschied zwischen den operierten und den nicht operierten Gelenken. In den lateralen Gelenkkompartimenten traten in keiner Gruppe signifikante Unterschiede zwischen den operierten und den nicht operierten Gelenken auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

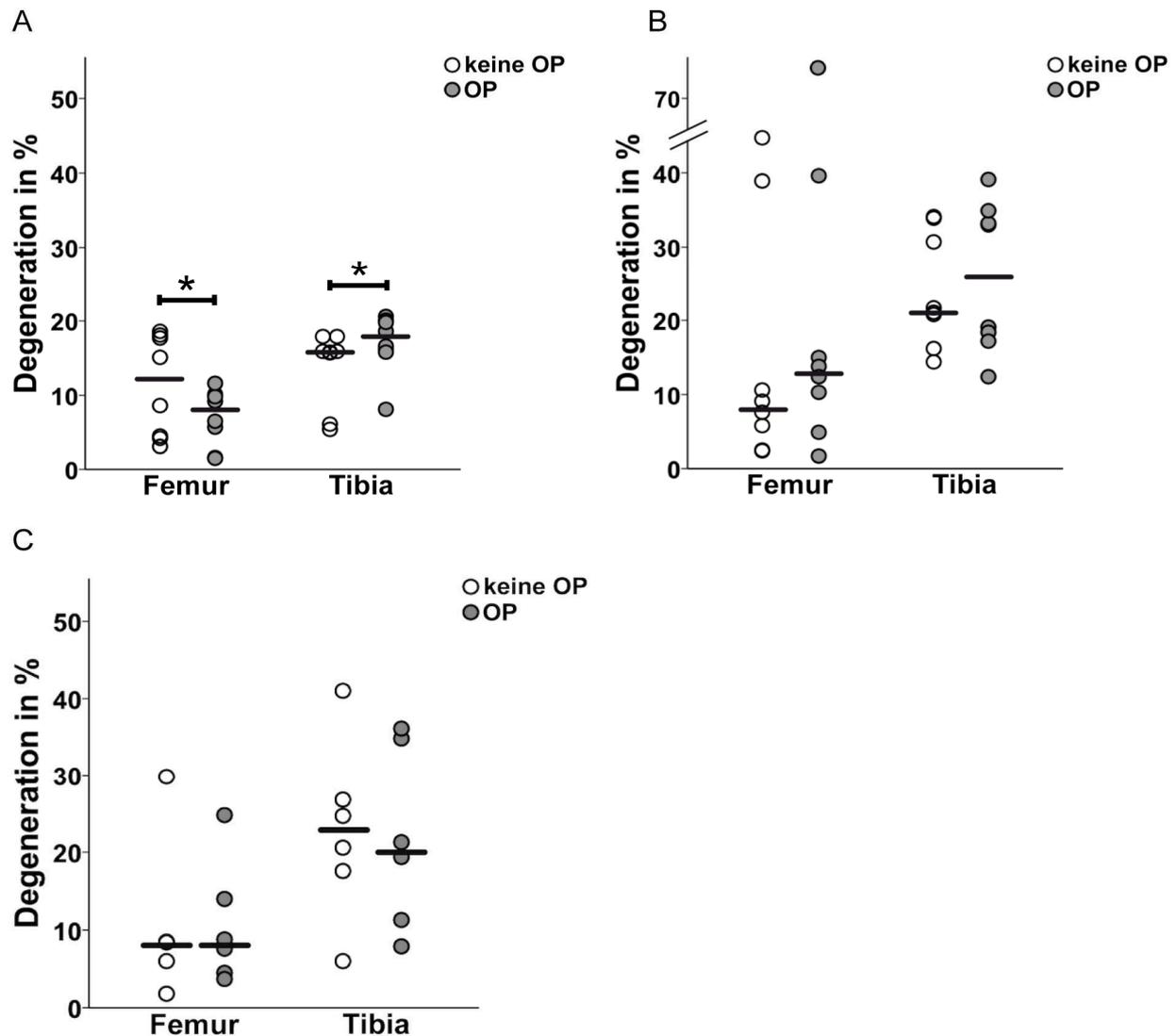


Abb. 61: Vergleich des Anteils degenerierter Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche in den operierten Gelenken mit dem Anteil in den nicht operierten Gelenken in den Gruppen 2 (Sh; A), 3 (Tr; B) und 4 (Sc6; C); dargestellt sind jeweils die medialen Kondylen;

\*signifikante Unterschiede zwischen den nicht operierten und den operierten Gelenken im Degenerationsgrad der medialen Femur- und Tibiakondylen in Gruppe 2 (Sh),  $p < 0,05$

## 3.6 Histologische Auswertung

### 3.6.1 Gelenkkapsel

Der innere Anteil der *Membrana synovialis* der Gelenkkapsel besteht aus den sogenannten Synovialdeckzellen. Im gesunden Gelenk setzt sich diese Synovialdeckzellschicht aus bis zu vier Zellreihen zusammen. Irritation im Gelenk führen rasch zu einer Hyertrophie sowie Hyperplasie dieser Zellen. Die Synovialdeckzellschicht besteht in diesen Fällen aus über vier Zellreihen. Die Hypertrophie und -plasie der Synovialzellen ist häufig mit einer villösen Proliferation sowie mit einer Hyperämie der *Membrana synovialis* verbunden. Allerdings wird vor allem die villöse Proliferation der Gelenkkapsel auch in ansonsten unveränderten Gelenken beobachtet. Je nach Ursache der Irritation kann es zusätzlich zur Infiltration der *Membrana synovialis* mit Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, und anderen Immunzellen kommen. Zwischen der *Membrana synovialis* und der *Membrana fibrosa* der Gelenkkapsel sind auch in gesunden Gelenken häufig Fettzellen eingelagert.

Um die Auswirkungen der Arthrotomie im Allgemeinen sowie der Scaffoldimplantation im Besonderen auf die Gelenkgesundheit genauer beurteilen zu können, wurden die mit HE gefärbten histologischen Schnitte der Gelenkkapseln auf Veränderungen untersucht. Nicht bei allen Tieren wurde die richtige Ebene bei der Anfertigung der histologischen Schnitte getroffen und daher standen pro Gruppe nur fünf bzw. sechs Schnitte zur Auswertung zur Verfügung. Das Augenmerk der Untersuchung lag neben der Beurteilung struktureller Veränderungen auch auf dem Vorkommen von Entzündungszellen.

In der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit trat vor allem in den operierten Gelenken eine Hyperplasie der Synovialdeckzellen auf (Tab. 5). Ein vereinzelt Vorkommen von Entzündungszellen war hauptsächlich in den Gelenkkapseln der operierten Gliedmaßen zu beobachten (Tab. 5; Abb. 62).

In der Sham-Gruppe trat eine Hyperplasie der Synovialzellen hingegen deutlich seltener auf (Tab. 5). Abgesehen von der villösen Proliferation bei fast allen Tieren waren auf beiden Seiten kaum Veränderungen der Gelenkkapsel zu sehen (Tab. 5; Abb. 63 und 64).

In der Teilresektion-Gruppe war die Gelenkkapsel bei allen Tieren beidseits villös proliferiert (Tab. 5; Abb. 65). Eine Hyperplasie der Synovialzellen trat wesentlich

seltener auf. Bei einigen Tiere waren die Blutgefäße dilatiert (Tab. 5; Abb. 66). In dieser Gruppe wurden keine Entzündungszellen in den histologischen Schnitten gefunden (Tab. 5).

In der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit trat bei einzelnen Tieren zumeist beidseits eine Synovialdeckzellhyperplasie auf (Tab. 5; Abb. 67). Eine villöse Proliferation war hauptsächlich in den nicht operierten kontralateralen Gelenken zu beobachten (Tab. 5). Bei den Tieren, bei denen zum Zeitpunkt der Tötung das Scaffold im Meniskusdefekt fixiert war, wurden keine Entzündungszellen in den Gewebeproben der Gelenkkapseln der operierten Seite gefunden (Tab. 5). Es wurden allerdings auch histologische Schnitte von Gewebeproben der Gelenkkapsel von Tieren angefertigt, bei denen die Scaffolds disloziert waren. In diesen Fällen war die Gelenkkapsel lokal mit Entzündungszellen infiltriert (Abb. 68).

Tab. 5: Befunde der histologischen Untersuchung der Gelenkkapsel (ausgenommen sind die Tiere mit disloziertem Scaffold)

	Kontralaterale Gelenke				Operierte Gelenke			
	Hyper- plasie	Villöse Proliferation	Hyper- ämie	Entzün- dungszellen	Hyper- plasie	Villöse Proliferation	Hyper- ämie	Entzün- dungszellen
<b>Sc3</b>								
1					x	x		x
2		x		x		x	x	x
3	x	x			x	x		
4		kein Schnitt			x			x
5		x			x	x		
<b>Gesamt</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Sh</b>								
1						x		
2		x			x	x	x	
3		x				x		
4		x				x		
5								
<b>Gesamt</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Tr</b>								
1		x	x		x	x		
2		x			x	x	x	
3		x				x	x	
4	x	x				x		
5		x			x	x		
6	x	x				x		
<b>Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>Sc6</b>								
1	x	x			x	x		
2		x						
3		x		x				
4	x	x			x	x		
5	x	x	x					
<b>Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

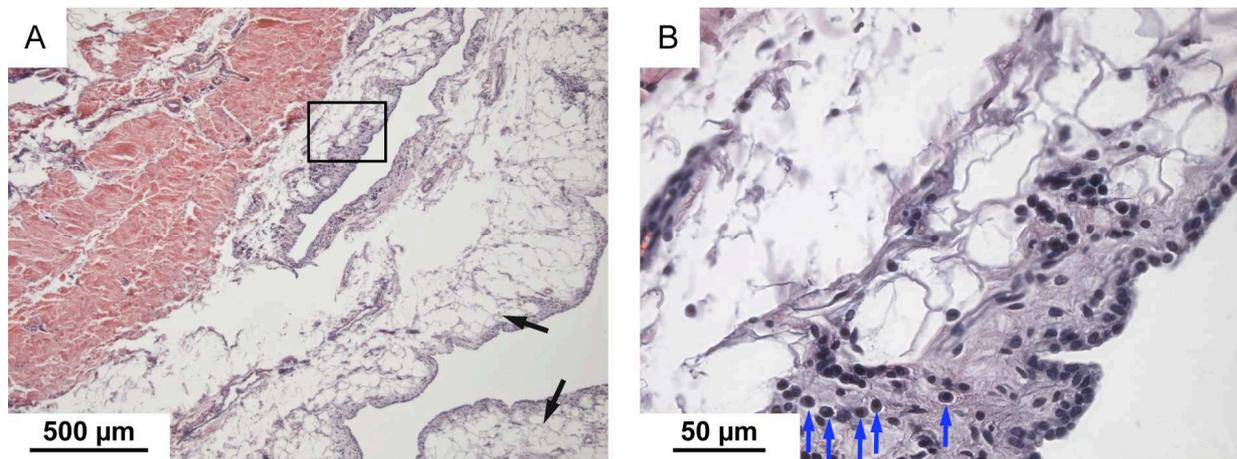


Abb. 62: Histologischer Schnitt durch die Kniegelenkkapsel eines Tieres aus Gruppe 1 (Sc3; operierte Seite); Hypertrophie der Synovialzotten (schwarze Pfeile); vereinzelte Entzündungszellen in der Membrana synovialis (blaue Pfeile); A: 50-fache Vergrößerung; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 400-fache Vergrößerung

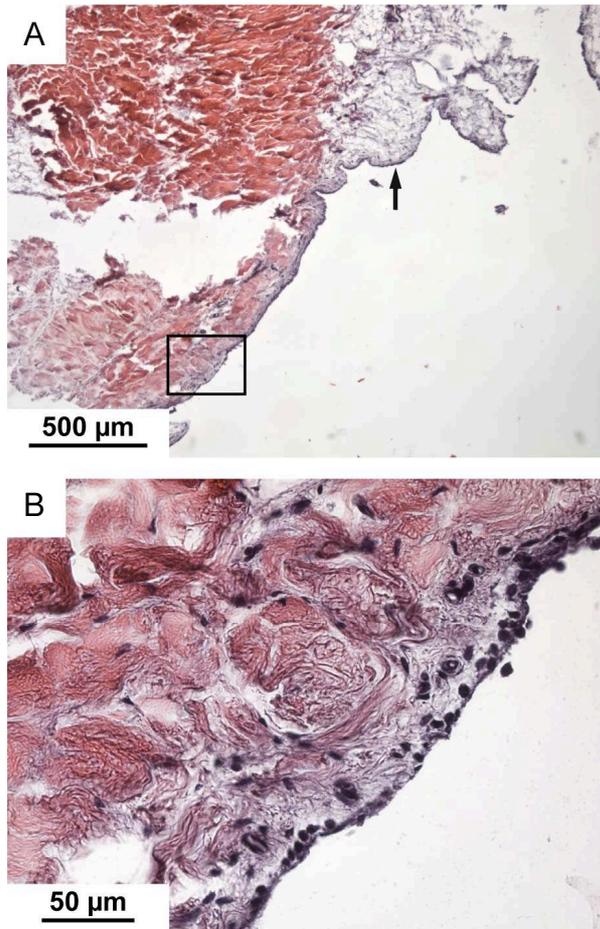


Abb. 63: Histologischer Schnitt durch die Gelenkkapsel eines nicht operierten Kniegelenks der Sham-Gruppe; Fettzelleinlagerung zwischen der Membrana synovialis und der Membrana fibrosa (A; Pfeil); Synovialzellschicht mit 2-3 Zellreihen (B); A: 50-fache Vergrößerung; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 400-fache Vergrößerung

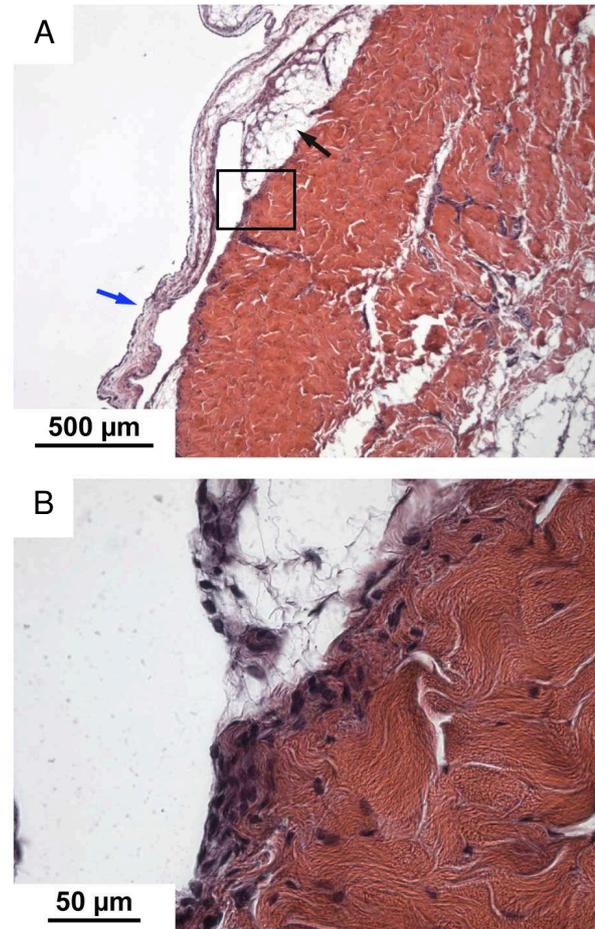


Abb. 64: Histologischer Schnitt durch die Gelenkkapsel eines operierten Gelenks der Sham-Gruppe (gleiches Tier wie in Abb. 63); Fettzelleinlagerung zwischen Membrana synovialis und Membrana fibrosa (schwarzer Pfeil); Membrana synovialis bildet eine lange Synovialzotte aus (blauer Pfeil); Synovialzellschicht mit 2-4 Zellreihen (B); A: 50-fache Vergrößerung; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 400-fache Vergrößerung

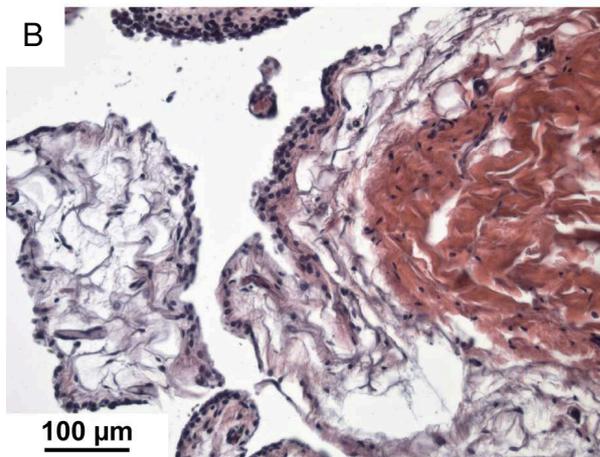
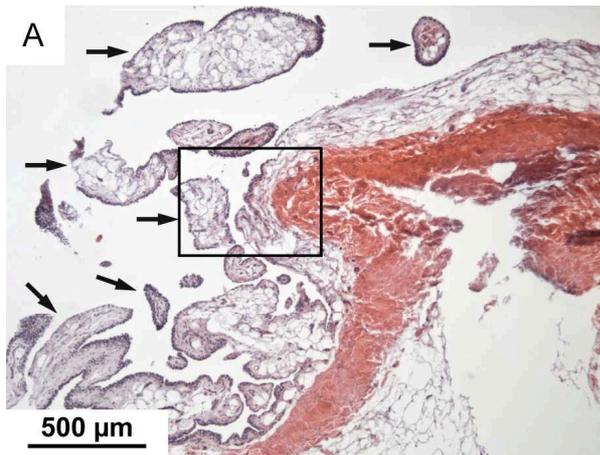


Abb. 65: Histologischer Schnitt durch die Kniegelenkkapsel eines Tieres der Teilresektion-Gruppe (nicht operierte Seite); Membrana synovialis mit zahlreichen Synovialzotten (A; Pfeile); die Synovialzellschicht umfasst 2-4 Zellreihen (B); A: 50-fache Vergrößerung; B: Vergrößerung aus A (Kasten), 200-fache Vergrößerung

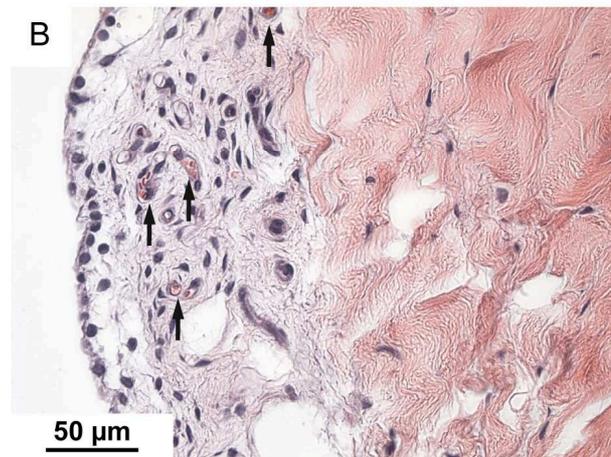
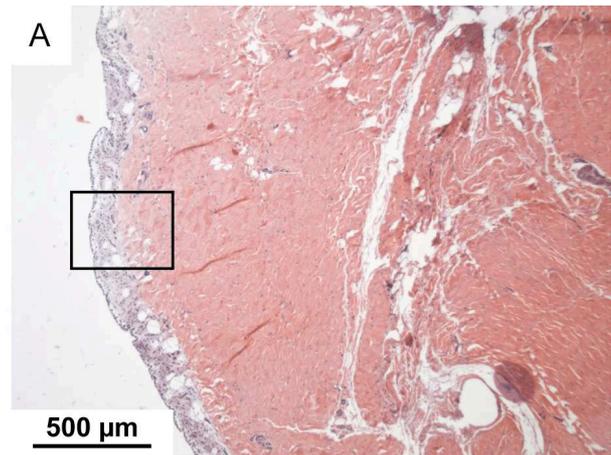


Abb. 66: Histologischer Schnitt durch die Kniegelenkkapsel eines Tieres der Teilresektion-Gruppe (operierte Seite; gleiches Tier wie in Abb. 65); Hyperämie in der Membrana synovialis (B; Pfeile); Synovialzellschicht mit 2-4 Zellreihen (B); A: 50-fache Vergrößerung; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 400-fache Vergrößerung

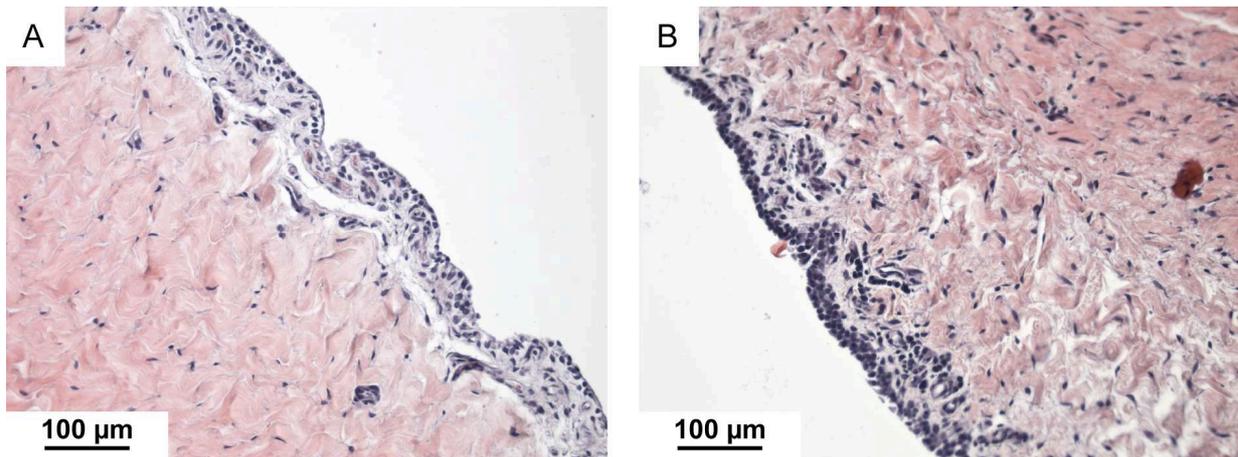


Abb. 67: Histologische Schnitte durch die Gelenkkapseln eines Tieres aus Gruppe 4 (Sc6); Membrana synovialis und membrana fibrosa der nicht operierten Seite (A) sind unauffällig, auf der operierten Seite (B) geringgradige Hyperplasie der Synoviadeckzellschicht; A und B: 200-fache Vergrößerung

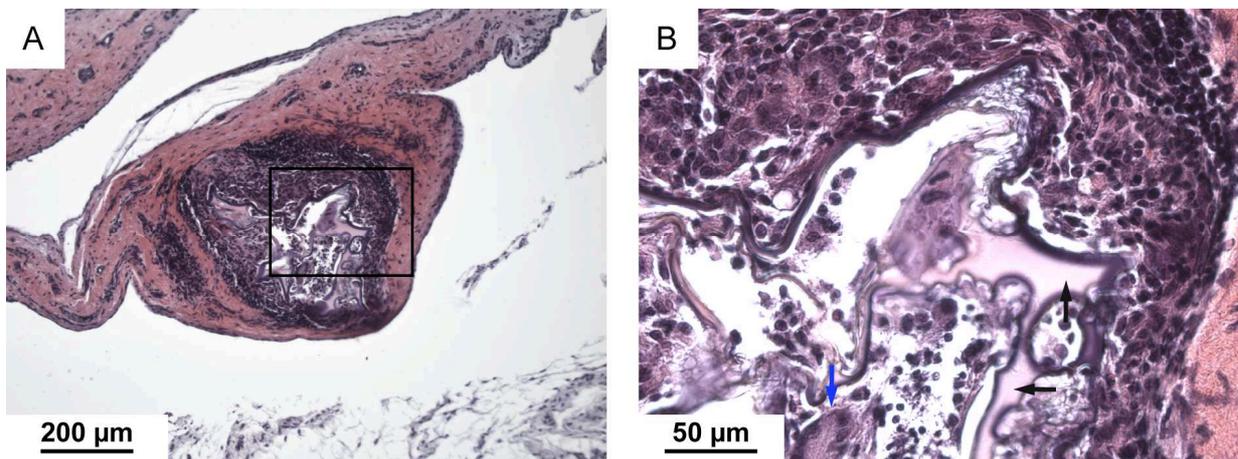


Abb. 68: Histologischer Schnitt durch die Gelenkkapsel eines Tieres der Scaffold-Gruppe (Sc6); Gelenkkapsel umgibt Scaffoldstück (schwarze Pfeile); vereinzelt Entzündungszellen (u.a. mehrkernige Riesenzellen) im Bereich des Scaffolds (blauer Pfeil); A: 100-fache Vergrößerung; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 400-fache Vergrößerung

### 3.6.2 Meniskus und Scaffold

Histologische Schnitte von Meniskus und Scaffold wurden angefertigt, um einschätzen zu können, ob die Implantation eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen hatte. Außerdem konnten in den histologischen Schnitten der Scaffolds eingewachsene Zellen sowie neu gebildete Matrix identifiziert und charakterisiert werden.

Bei der Vorbereitung der Meniskus-Scaffold-Proben lösten sich in fast allen Fällen die Scaffolds aus dem Defekt. Aufgrund dieser Artefakte war es nur bei wenigen Proben möglich, den Übergang von Meniskusgewebe zu Scaffold im histologischen Schnitt darzustellen. Hatte sich das Scaffold bei der Probenbearbeitung aus dem Defekt gelöst, wurden von Meniskus und Scaffold jeweils separate Schnitte angefertigt.

#### *Meniskus*

Der Meniskus besteht zum größten Teil aus Kollagenen mit azidophilem Charakter. Dadurch sind histologische Präparate von Meniskusgewebe nach HE-Färbung gleichmäßig rot bis pink gefärbt (Abb. 69). Im Bereich der Resektionskanten war das Meniskusgewebe allerdings sowohl in beiden Scaffold-Gruppen als auch in der Teilresektion-Gruppe häufig schwächer mit Eosin angefärbt und erschien in den vertikalen Schnitten daher leicht bläulich. Der Bereich, in dem das Färbeverhalten des Gewebes verändert war, umfasste in allen drei Gruppen wenige Mikrometer (Abb. 71, 78 und 79). In diesem Bereich schienen die Kollagenbündel außerdem ihren Zusammenhalt verloren zu haben. Sie wirkten daher aufgefasert (Abb. 70 und 71).

In den beiden Scaffold-Gruppen war entlang der Resektionskanten stellenweise eine Zellclusterbildung zu sehen (Abb. 73 C). Die Cluster bestanden aus Fibrochondrozyten. In der Teilresektion-Gruppe wurden keine Zellcluster gefunden. Abgesehen von dieser Clusterbildung sahen die Fibrochondrozyten im resektionsnahen Gebiet unverändert aus.

An einem Meniskuspräparat der Teilresektion-Gruppe überzog stellenweise eine dünne, zellreiche Gewebsschicht die Schnittkante. Diese Schicht hatte sich offensichtlich nach der Resektion gebildet (Abb. 72). Auch in einem Schnitt durch den Meniskus eines Tieres der Gruppe 4 (Sc6) hatte sich im Bereich der Schnittkante lokal neues Gewebe gebildet. Das neugebildete Gewebe schien chondrozytäre Zellen zu enthalten (Abb. 70).

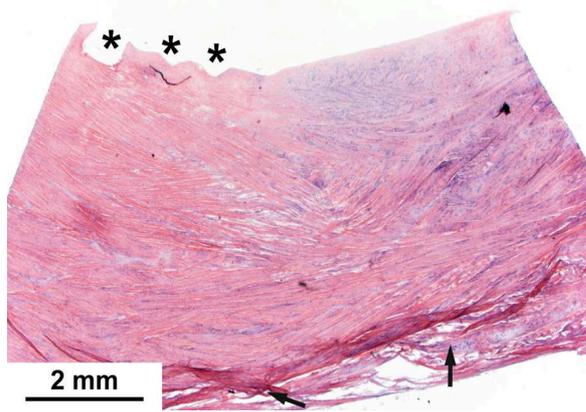


Abb. 69: Horizontaler Schnitt durch einen medialen Meniskus der nicht operierten Seite; die Färbung mit HE ist gleichmäßig; Übergang des Meniskus in Kapselgewebe am unteren Bildrand (Pfeile); Schneideartefakte auf der linken Seite (Sternchen); 12,5-fache Vergrößerung

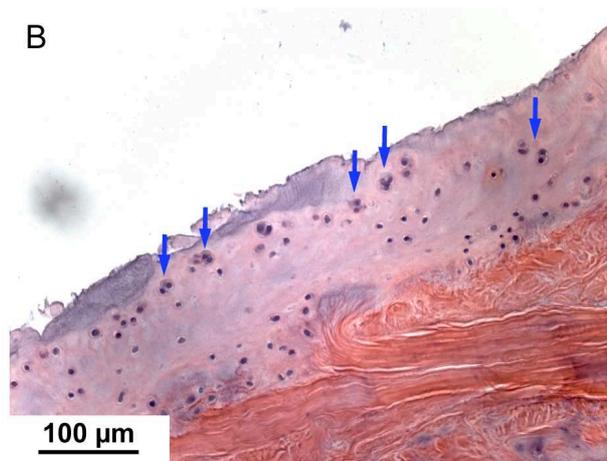
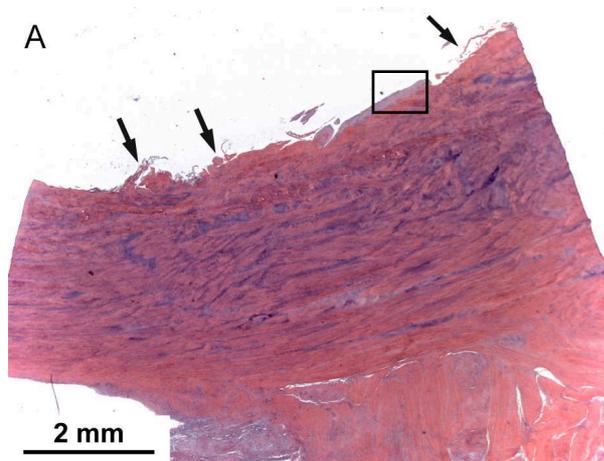


Abb. 70: Horizontaler Schnitt durch einen medialen Meniskus (operierte Seite) aus Gruppe 4 (Sc6); aufgefaserte Schnittkante (A, schwarze Pfeile); neu gebildetes Gewebe u. a. mit chondrozytären Zellen (B; blaue Pfeile); A: 12,5-fache Vergrößerung; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 200-fache Vergrößerung

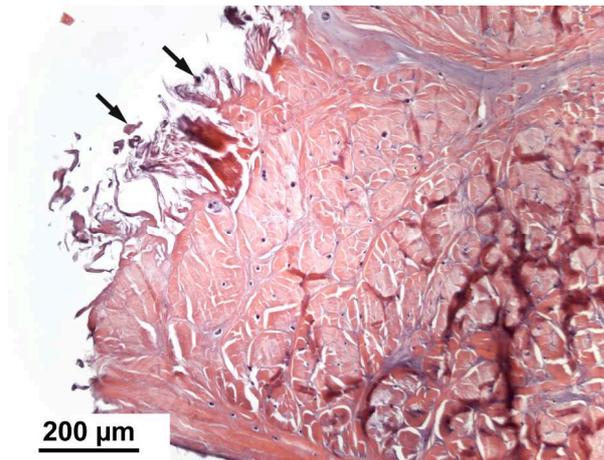


Abb. 71: Vertikaler Schnitt durch einen Meniskus der Gruppe 4 (Sc); aufgefaserte Schnittkante mit reduzierter Rotfärbung (Pfeile); 100-fache Vergrößerung

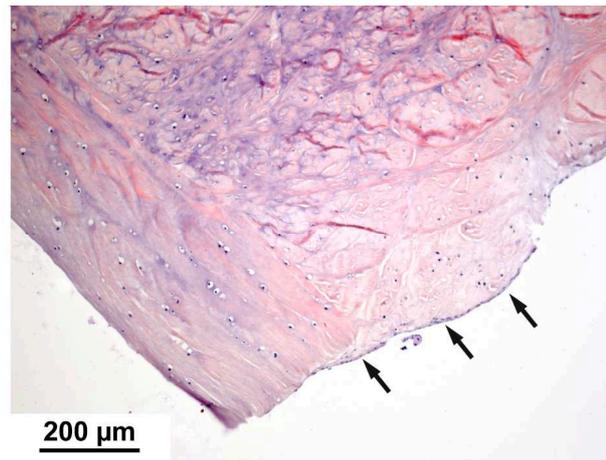


Abb. 72: Vertikaler Schnitt durch einen Meniskus der Gruppe 3 (Tr); eine dünne, zellreiche Schicht überzieht die Schnittkante (Pfeile); 100-fache Vergrößerung

### Scaffolds

Die vertikalen Schnitte durch die Scaffolds zeigten, dass sowohl in der Scaffold-3-Monats- als auch in der Scaffold-6-Monatsgruppe die Beschaffenheit der einzelnen Scaffolds sehr uneinheitlich war (Tab. 6). Die femoralen und tibialen Oberflächen erschienen in den Übersichtsaufnahmen einiger Scaffolds mehr oder weniger glatt (Tab. 6; Abb. 74 und 80 C). Meist waren allerdings in den Übersichtsaufnahmen sowohl auf der femoralen als auch auf der tibialen Oberfläche bis zu 1 mm tiefe Faltungen zu sehen (Tab. 6; Abb. 75, 80 A und 80 B). Zudem traten deutliche Unterschiede in der Porengröße und der Beschaffenheit der Porenwände sowohl innerhalb der einzelnen Scaffolds als auch zwischen den verschiedenen Scaffolds auf (Tab. 6). Stellenweise waren die Porenwände  $> 10 \mu\text{m}$  dick und gut mit Eosin angefärbt (Abb. 77 und 79). Die Hohlräume der Scaffolds waren nicht mehr rund sondern unterschiedlich stark komprimiert. Viele dieser Hohlräume waren in den histologischen Schnitten leer, einige enthielten allerdings auch amorphes Material, fibroblastozytäre und seltener fibrochondrozytäre Zellen sowie fibröses Gewebe (Tab. 6; Abb. 73 A, 73 B und 81). Vereinzelt waren auch Immunzellen zu finden. Daneben gab es auch Bereiche, in denen hauptsächlich Mikroporen vorkamen (Abb. 80 B und 82). Die Porenwände der Mikroporen waren nur wenige Mikrometer dick und schwach gefärbt. Diese Mikroporen waren meist stark komprimiert und enthielten weder Gewebe noch Zellen (Abb. 76 und 82). In beiden Scaffold-Gruppen gab es Scaffolds,

die fast ausschließlich aus komprimierten Mikroporen bestanden (Abb. 75 A und 82). Diese Scaffolds enthielten weder Zellen noch Gewebe und durch die Kompression der Mikroporen war die Höhe der Scaffolds in diesen Fällen sehr gering (Abb. 75 A).

Neben vertikalen Schnitten durch die Scaffolds wurde in beiden Scaffold-Gruppen auch jeweils ein horizontaler Schnitt von einer zusammenhängenden Meniskus-Scaffold-Probe angefertigt (Abb. 73 und 78). Diese Horizontalschnitte standen für die Beurteilung des Übergangs von Scaffold zu Meniskus zur Verfügung. In beiden Schnitten war fast über den gesamten Kontaktbereich von Meniskus und Scaffold ein 80-320 µm breiter Spalt zu sehen. Dieser wurde an keiner Stelle von Bindegewebe überbrückt. Es gab auch keine Hinweise, dass *in vivo* eine bindegewebige Verankerung des Scaffolds bestanden hatte. Die Vermutung der makroskopischen Untersuchung, dass während der Implantationszeit keine Integration der Scaffolds in das Meniskusgewebe stattgefunden hatte, wurde durch die histologische Untersuchung bestätigt.

In dem horizontalen Schnitt der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit fiel außerdem auf, dass anstelle der porösen Scaffoldschnittkante dem Meniskus über einen großen Bereich die glatte Scaffoldoberfläche direkt an lag (Abb. 78). Dies lässt darauf schließen, dass sich die tibiale Fläche des Scaffolds im Bereich des Meniskus nach oben und damit zwischen Meniskus und den porösen Anteil des Scaffolds geschoben hatte. Auch bei einigen vertikalen Schnitten war die tibiale glatte Oberfläche des Scaffolds an der Kontaktstelle zum Meniskus über mehrere Mikrometer nach proximal eingefaltet und die Meniskuschnittfläche hatte in diesem Bereich Kontakt zur glatten Oberfläche des Scaffolds (Abb. 79 und 80 A).

Grundsätzlich war kein Unterschied in der Beschaffenheit der Scaffolds zwischen den beiden Gruppen zu erkennen (Tab. 6). Außerdem schienen die Zellen und das Gewebe in den Hohlräumen die gleiche Qualität und Quantität aufzuweisen. In beiden Gruppen fiel auf, dass hauptsächlich Poren nahe der Meniskuschnittfläche oder im Bereich des Nahtkanals mit Gewebe und Zellen gefüllt waren (Abb. 73, 74, 78 und 79). Zentral bzw. in der Spitze der Scaffolds traten nur vereinzelte Zellen sowie teilweise amorphes Gewebe auf.

Tab. 6: Befunde der histologischen Untersuchung der Scaffolds nach drei- und sechsmonatiger Implantation

	Integration	Faltungen	Makroporen	Mikroporen	Amorphes Material	Zellen/Gewebe
<b>Sc3</b>						
1			x	x	x	x
2			x		x	x
3		x	x	x	x	
4		x	x	x	x	
5		x	x		x	x
6		x	x		x	x
<b>Gesamt</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>Sc6</b>						
1		x	x	x	x	x
2		x	x	x	x	x
3		x		x		
4		x	x	x	x	x
5		x	x		x	x
6			x	x	x	
<b>Gesamt</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>

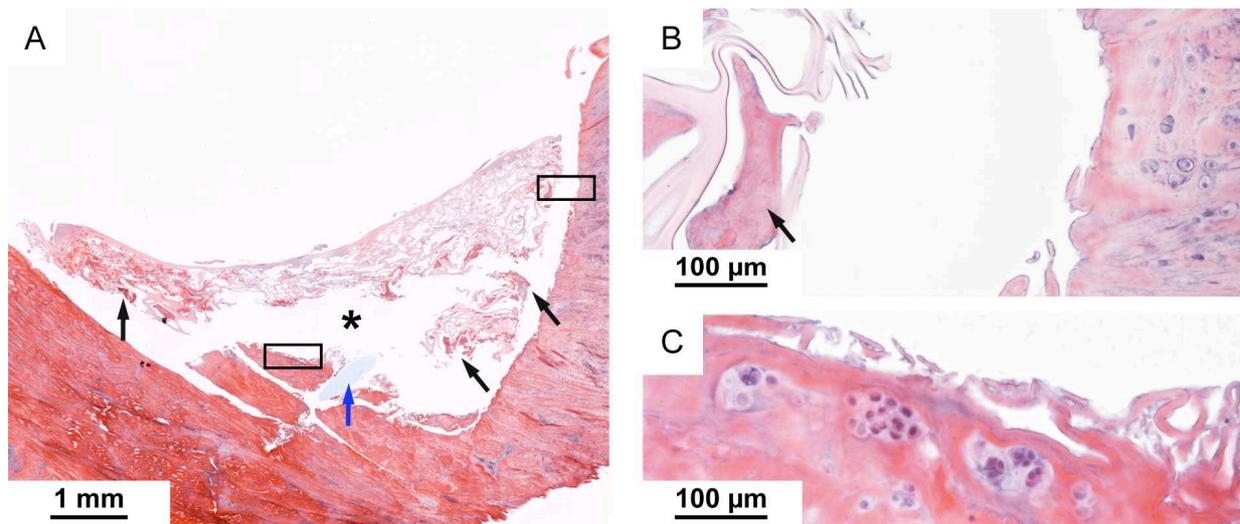


Abb. 73: HE-gefärbter Horizontalschnitt durch Meniskus und Scaffold eines Tieres der Gruppe 1 (Sc3); keine gewebige Verbindung zwischen Meniskus und Scaffold über den gesamten Kontaktbereich, daher ist ein 80-320  $\mu\text{m}$  breiter Spalt zwischen Scaffold und Meniskus zu sehen (A); auch im meniskusnahen Scaffoldbereich ist ausschließlich amorphes, zellfreies Material in den Poren (A, B; schwarze Pfeile); Chondrozyten-Cluster im Meniskus nahe dem Resektionsbereich (C); zentral Schneideartefakt (Sternchen); A: Übersichtsaufnahme; B und C: Ausschnitte aus A (Kästen), 200-fache Vergrößerung

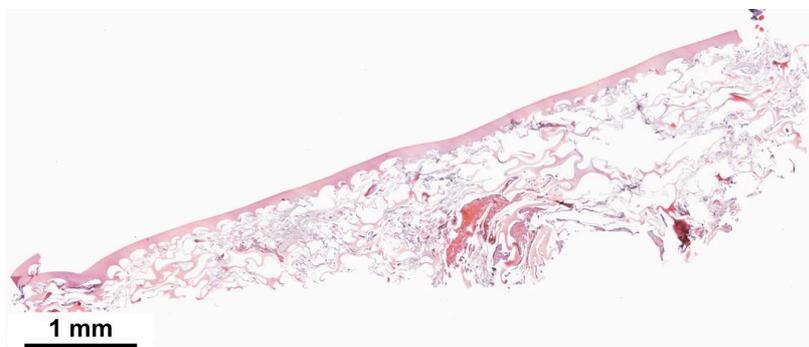


Abb. 74: Vertikaler Schnitt durch das Scaffold aus Abbildung 73; die Poren sind größtenteils leer; die Scaffoldoberfläche ist glatt; 100-fache Vergrößerung

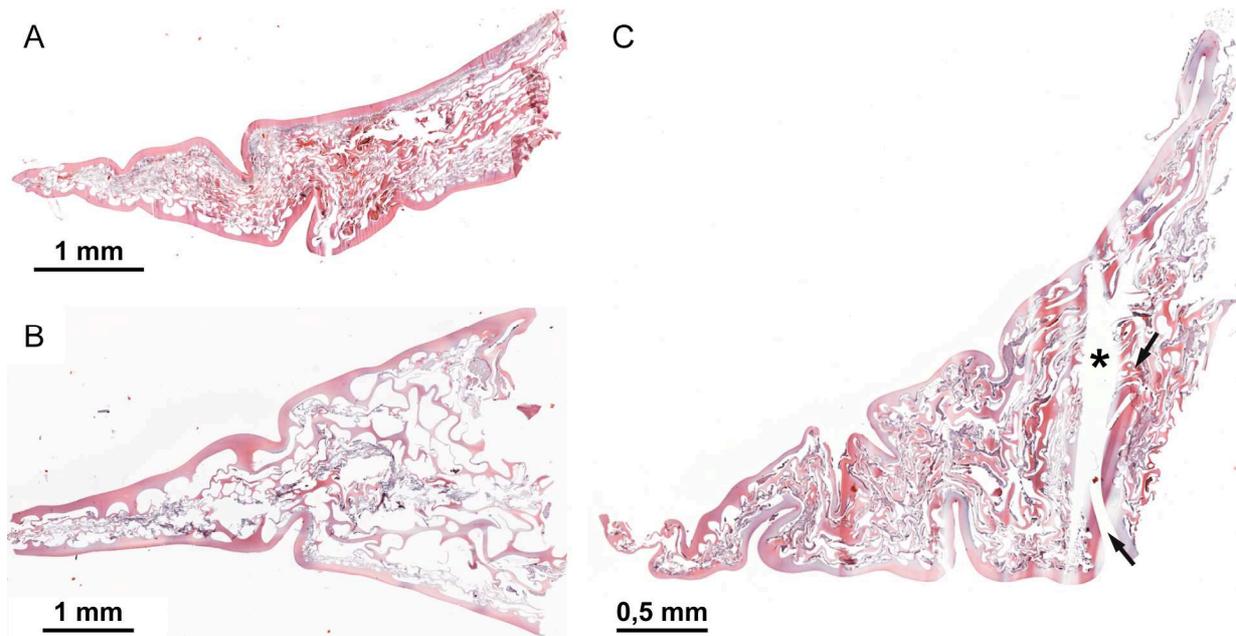


Abb. 75: Übersichtsaufnahmen vertikaler Schnitte durch verschiedene Scaffolds aus Gruppe 1 (Sc3); z. T. bis zu 1 mm tiefe Faltungen in den Oberflächen der Scaffolds (C; Pfeile); Schneideartefakt (Sternchen)

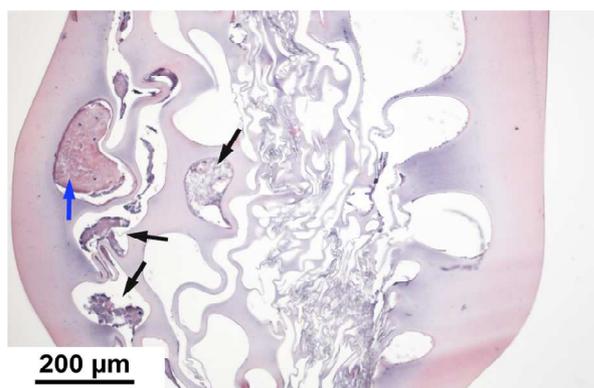


Abb. 76: Vertikaler Schnitt durch ein Scaffold aus Gruppe 1 (Sc3); ca. 100 µm dicke, glatte Außenschicht; großlumige Poren im Randbereich, z. T. gefüllt mit amorphem Material (schwarze Pfeile) und fibroblastozytären Zellen (blauer Pfeil); leere Mikroporen mit dünnen Porenwänden im zentralen Bereich; 100-fache Vergrößerung

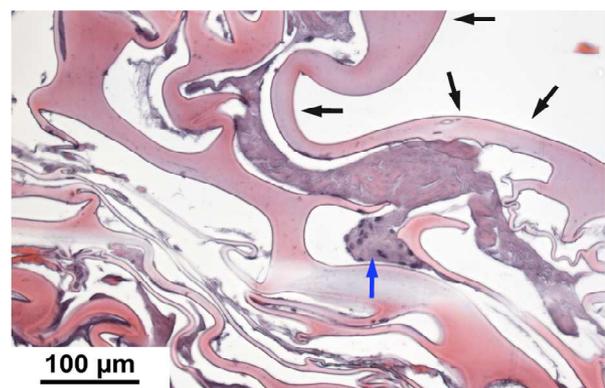


Abb. 77: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 75 C; deutlich schmalere Außenschicht des Scaffolds verglichen mit dem Scaffold aus Abb. 76 (schwarze Pfeile); großlumige, komprimierte Poren; z. T. mit zellreichem, z. T. mit amorphem Material gefüllt; die Zellen haben fibroblastozytären Charakter (blauer Pfeil); 200-fache Vergrößerung

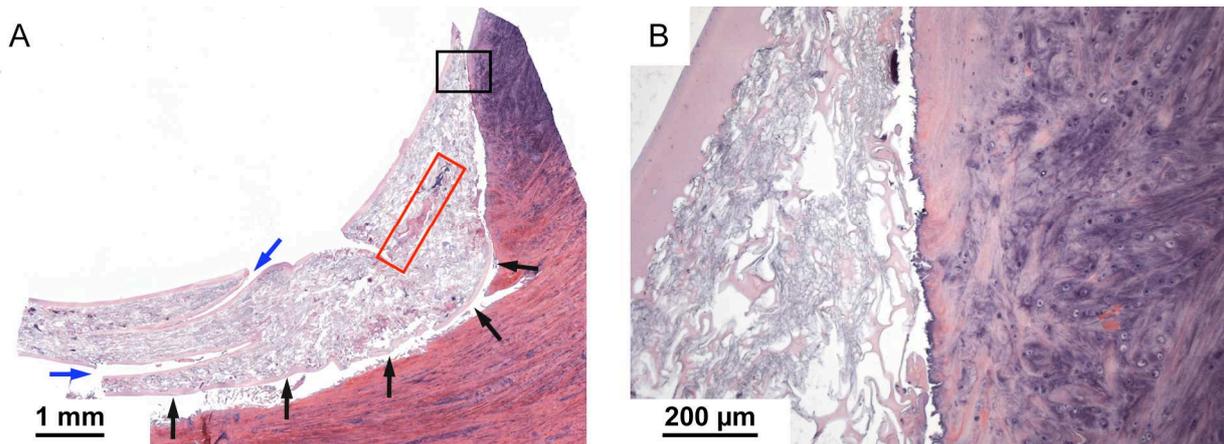


Abb. 78: Horizontaler Schnitt durch ein Scaffold der Gruppe 4 (Sc6); große Teile der Scaffoldaußenwand sind eingeschlagen und liegen dem Meniskusgewebe direkt an (A; schwarze Pfeile); Scaffold mit tiefen Faltungen (blaue Pfeile) und größtenteils kollabierten Mikroporen (B); nur im Bereich des Nahtkanals sind einzelne Poren mit Bindegewebe gefüllt (A; roter Kasten); in einem Bereich liegt das Scaffold dem Meniskus direkt an, dennoch tritt kein Gewebe aus dem Meniskus in das Scaffold über (B); A: Übersichtsaufnahme, B: Ausschnitt aus A (schwarzer Kasten), 100-fache Vergrößerung

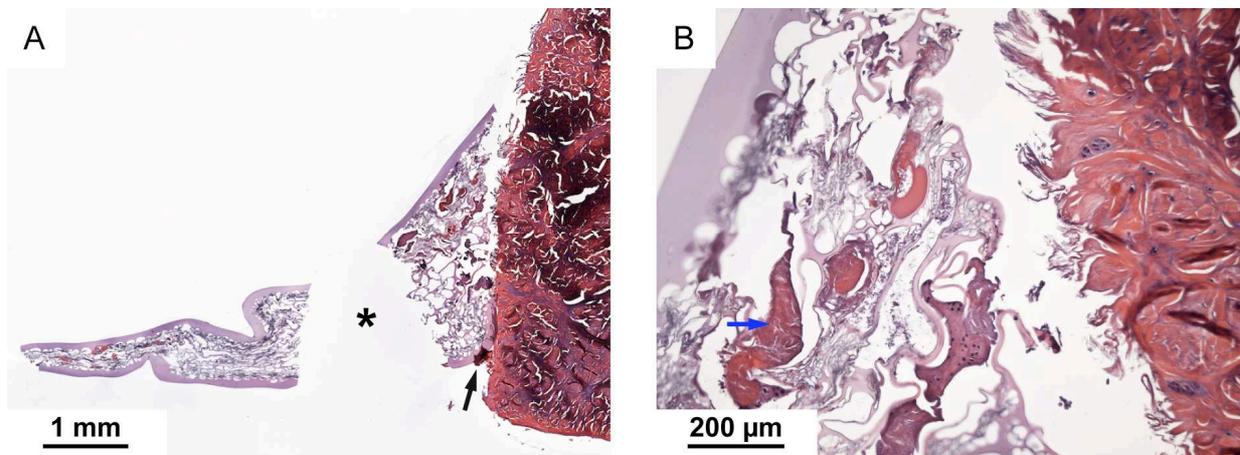


Abb. 79: Vertikaler Schnitt durch ein Scaffolds aus Gruppe 4 (Sc6); die Scaffoldhöhe ist geringer als die Meniskushöhe (A); die Scaffoldaußenfläche hat sich auf der femoralen Seite eingefaltet (Pfeil); es besteht keine Gewebsverbindung zwischen Scaffold und Meniskus (B); meniskusnah sind die großlumigen Poren des Scaffolds mit amorphen Material, fibroblastozytären Zellen und Bindegewebe gefüllt; das Bindegewebe im Scaffold ähnelt dem Meniskusgewebe deutlich (blauer Pfeil); Schneideartefakt (Sternchen); A: Übersichtsaufnahme; B: Ausschnitt aus A, 100-fache Vergrößerung

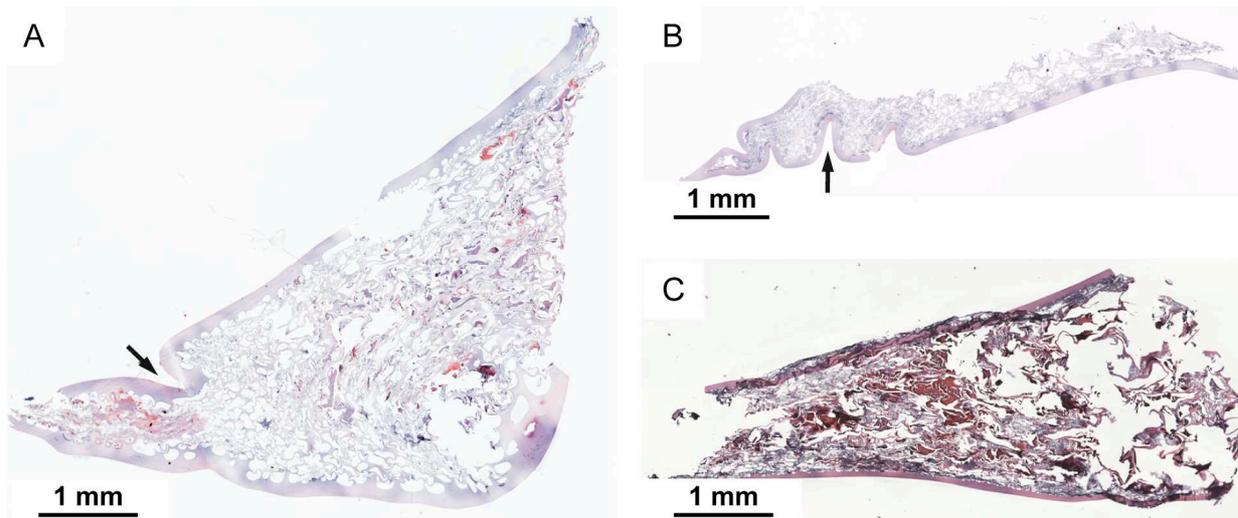


Abb. 80: Übersichtsaufnahmen vertikaler Schnitte durch verschiedene Scaffolds aus Gruppe 4 (Sc6); zum Teil bis zu 500  $\mu\text{m}$  tiefe Faltungen in den Oberflächen der Scaffolds (A, B; Pfeile); ein Scaffold mit glatten Oberflächen (C)

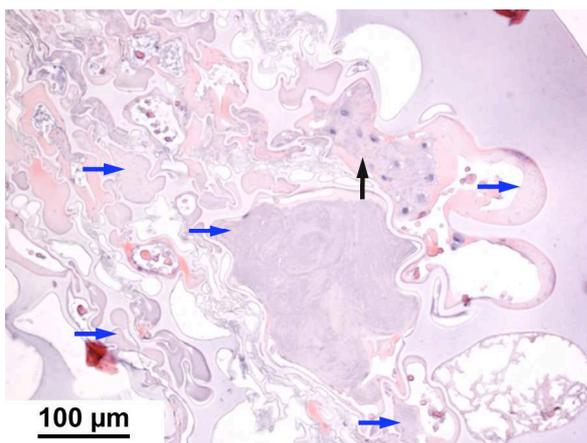


Abb. 81: Vergrößerung des Scaffolds aus Abb. 80 A; z. T. sehr großlumigen Poren; v. a. mit amorphem Material (blaue Pfeile) aber auch mit fibrochondrozytären Zellen (schwarzer Pfeil) gefüllt; 200-fache Vergrößerung

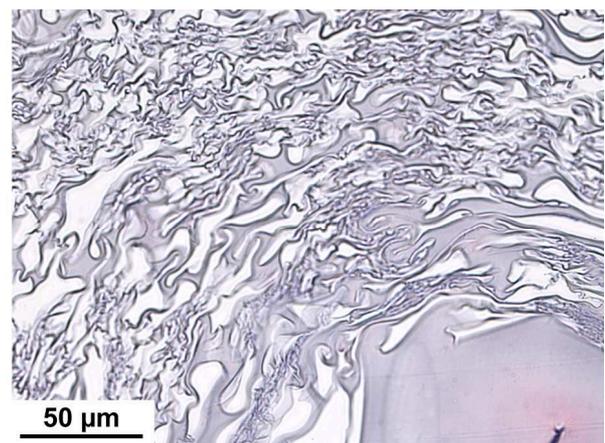


Abb. 82: Vergrößerung des Scaffolds aus Abb. 80 B; hauptsächlich Mikroporen mit stark komprimierten Lumina; alle Poren sind leer; 400-fache Vergrößerung

### Dislozierte Scaffolds

Auch die Scaffolds, die zum Zeitpunkt der Sektion nicht mehr am Meniskus fixiert waren, wurden histologisch aufbereitet. Hier gab es ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Scaffolds.

Ein Scaffold war vollständig von einer Gewebekapsel umgeben (Abb. 83 A). Das Scaffold war von fibrozytären Zellen umgeben und im Bereich der porösen

Schnittfläche wuchs Gewebe in das Scaffoldinnere ein (Abb. 83 A). Das Gewebe im Scaffoldinneren enthielt zahlreiche Fibrozyten, Blutgefäße und vereinzelte Fremdkörperriesenzellen sowie andere Immunzellen (Abb. 83 B und C). Die Scaffoldoberflächen sowie die Porenwände im Randbereich waren noch gut erhalten, aber teilweise vom eingewachsenen Gewebe verdrängt.

Ein weiteres disloziertes Scaffold sah im histologischen Schnitt den Scaffold sehr ähnlich, die sich zum Zeitpunkt der Sektion noch im Meniskusdefekt befunden hatten (Abb. 84 A). Viele der Poren waren leer. Nur in dem Bereich, in dem die Porenstruktur zerstört war, trat ein zellreiches Gewebe auf (Abb. 84 B).

Bei einem anderen dislozierten Scaffold war die Struktur deutlich stärker verändert. Die Scaffoldoberfläche war stellenweise aufgeraut und die Porenwände wirkten brüchig (Abb. 85 B und C). Die ursprüngliche Form des Scaffolds war nicht mehr zu erkennen (Abb. 85 A). Im Inneren des Scaffolds kamen vergleichsweise viele Fremdkörperriesenzellen sowie andere phagozytierende Immunzellen vor.

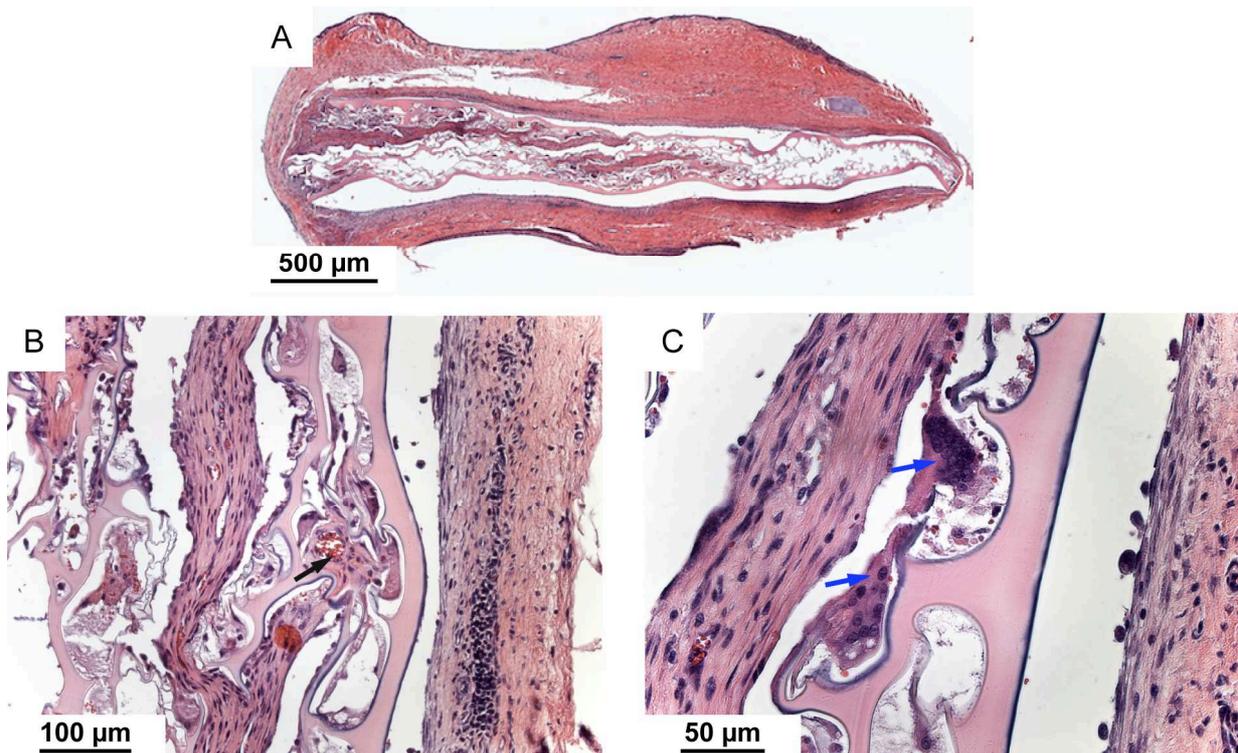


Abb. 83: Histologischer Schnitt durch ein disloziertes Scaffold; eine Gewebekapsel umgibt das Scaffold vollständig (A); im Bereich der Schnittkante des Scaffolds wächst Gewebe in das Scaffoldinnere ein; dieses enthält v. a. Fibrozyten, stellenweise auch Blutgefäße (B; schwarzer Pfeil) und vereinzelte Fremdkörperriesenzellen (C; blaue Pfeile); A: Übersichtsaufnahme; B: 200-fache Vergrößerung; C: 400-fache Vergrößerung

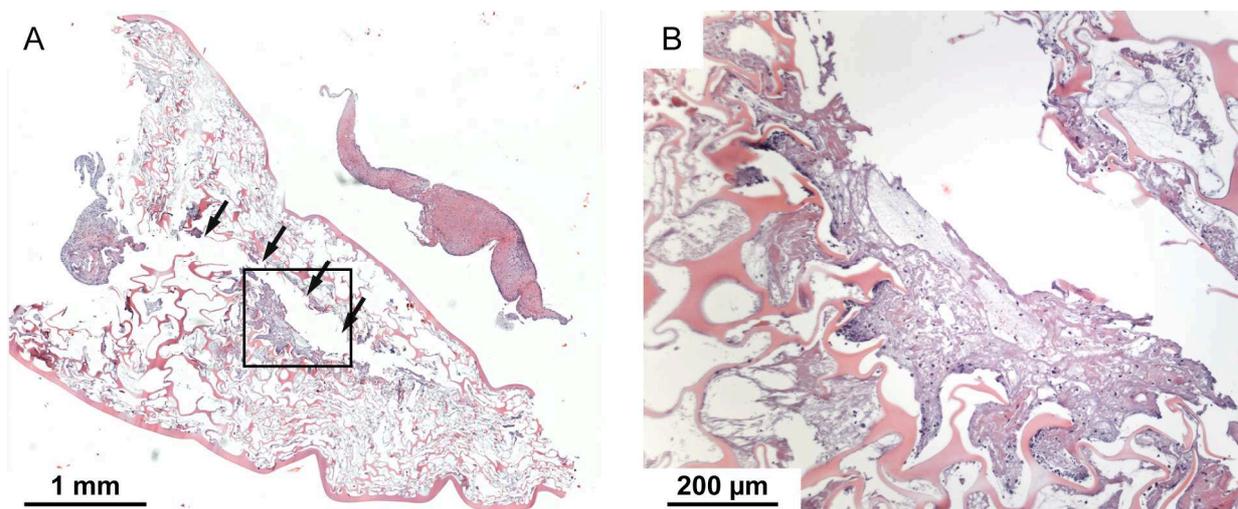


Abb. 84: Histologischer Schnitt durch ein disloziertes Scaffold; die Form des Scaffolds ist noch weitestgehend erhalten (A); stellenweise ist die Porenstruktur zerstört (Pfeile), in diesem Bereich sind fibrozytäre Zellen und Bindegewebe in die Poren eingelagert (B); A: Übersichtsaufnahme; B: Ausschnitt aus A (Kasten), 100-fache Vergrößerung

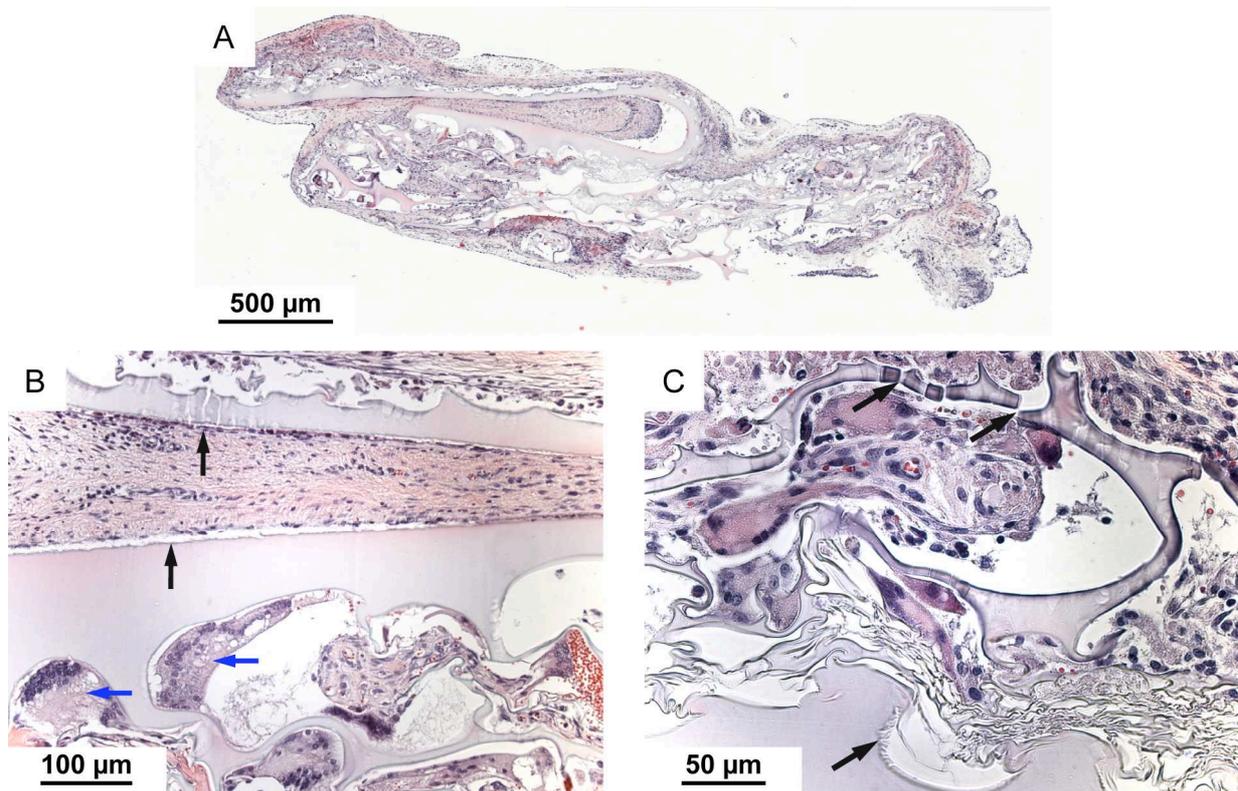


Abb. 85: Histologischer Schnitt durch ein disloziertes Scaffold; die Oberfläche der Scaffoldwände wirkt angeraut und stellenweise brüchig (schwarze Pfeile); neben Fibrozyten befinden sich auch Fremdkörperriesenzellen im Scaffoldinneren (blaue Pfeile); A: Übersichtsaufnahme; B: 200-fache Vergrößerung; C: 400-fache Vergrößerung

### 3.6.3 Gelenknorpel der medialen Tibiakondylen

Neben der makroskopischen und biomechanischen Untersuchung des tibialen Knorpels fand auch eine histologische Beurteilung des Gelenknorpels statt. Histologische Schnitte der medialen Tibiakondylen wurden hierfür mit HE und Saf-O gefärbt. Um die Auswirkungen der Scaffoldimplantation auf die Knorpelgesundheit einschätzen zu können, wurden jeweils die medialen Tibiakondylen der operierten Gliedmaßen mit den Tibiakondylen der nicht operierten Gliedmaßen verglichen. Zusätzlich fand ein Vergleich zwischen den drei Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit statt.

Die entkalkten Knorpel-Knochen-Proben ließen sich nur schwer verarbeiten. Einige Proben brachen bei der Anfertigung der histologischen Schnitte oder die Knorpelschicht löste sich stellenweise vom Knochen. Aus diesem Grund gab es nicht von allen Proben auswertbare Schnitte. Zum Teil standen daher nur sehr wenige Schnitte pro Gruppe und Schnittebene zur Auswertung zur Verfügung. Von jeder

medialen Tibiakondyle wurden histologische Schnitte aus drei Regionen untersucht (vgl. Kapitel 2.4.5.1). Schnitt 1 lag im anterioren Bereich der Tibiakondyle, Schnitt 2 im zentralen Bereich. Dieser war *in vivo* unterhalb des Scaffolds bzw. unterhalb des Meniskusdefekts lokalisiert. Schnitt 3 befand sich im posterioren Bereich der Tibiakondyle. Insgesamt zeigte Schnitt 2 die stärksten degenerativen Veränderungen und Schnitt 1 war in allen Gruppen am wenigsten verändert. Auffällig war auch, dass in allen Schnitten sowie in allen Gruppen im zentralen Anteil der Tibiakondylen die stärksten degenerativen Veränderungen auftraten. Der periphere Anteil wies teilweise keine oder nur leichte Anzeichen von Degeneration auf.

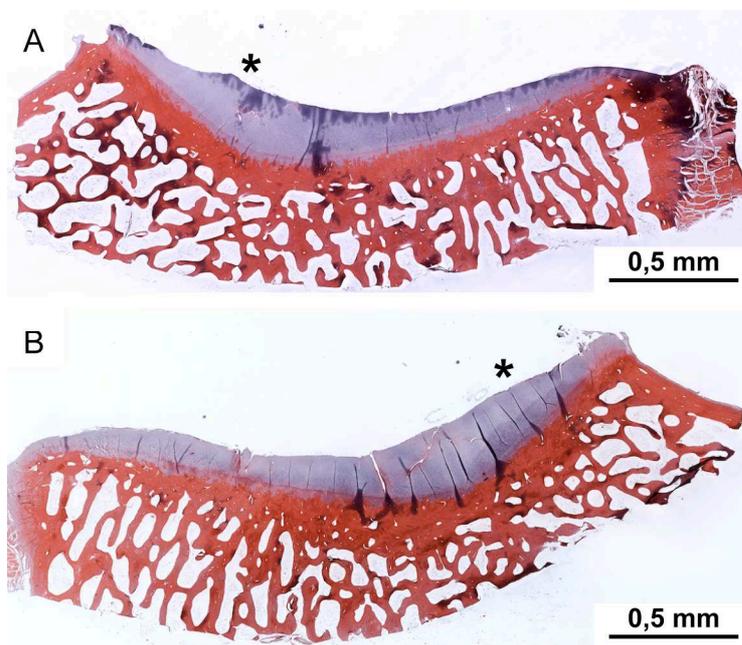


Abb. 86: Schnitt 2 der medialen Tibiakondylen aus Gruppe 1 (Sc3); A: nicht operierte Seite, B: operierte Seite; die Knorpeloberfläche ist auf beiden Seiten größtenteils intakt, es treten nur geringgradige Unregelmäßigkeiten auf; das Sternchen markiert den zentralen Bereich der Tibiakondylen; Übersichtsaufnahmen, HE-Färbung

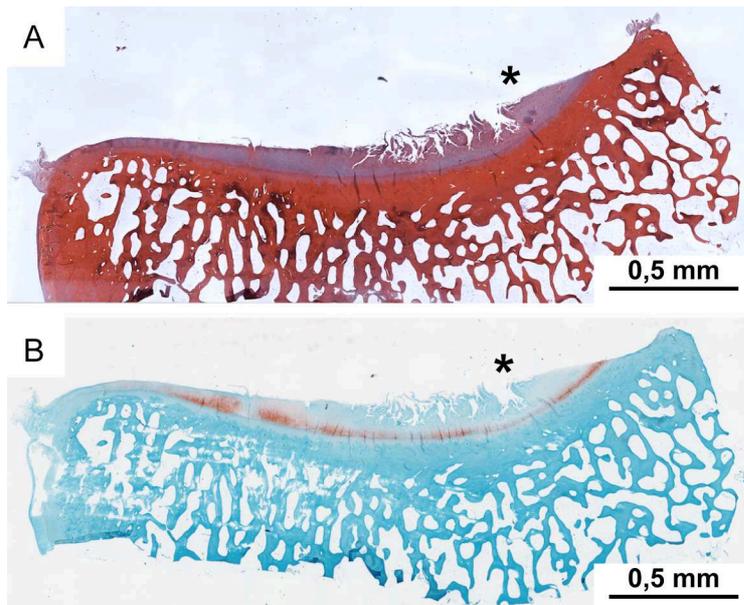


Abb. 87: Mediale Tibiakondylen der operierten Seite aus der Teilresektion-Gruppe (Schnitt 2); die Knorpeloberfläche ist im zentralen Bereich (Stern) stark aufgefasert; die Risse reichen bis in die radiale Zone des Knorpels; der Knorpel ist nur schwach mit Safranin O angefärbt (B); A: HE-Färbung; B: Saf-O-Färbung; Übersichtsaufnahmen

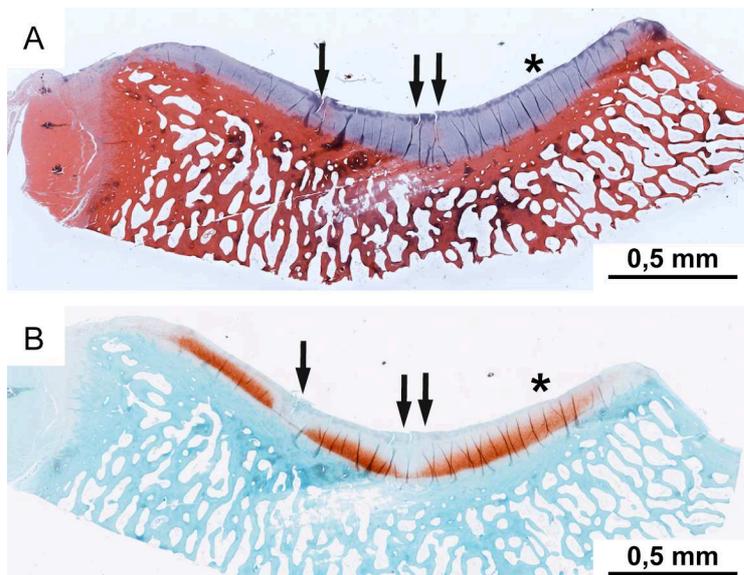


Abb. 88: Mediale Tibiakondylen (Schnitt 2) der operierten Gliedmaße aus Gruppe 4 (Sc6); in dem HE-gefärbten Schnitt (A) sind einzelne Risse in der Knorpeloberfläche zu erkennen (Pfeile); im Bereich der Risse ist die Saf-O-Färbung deutlich schwächer als im restlichen Knorpel (B); das Sternchen markiert den zentralen Bereich der Kondylen

Bei intakter Knorpeloberfläche war meist auch die Knorpel-Knochen-Grenze intakt und die Saf-O-Intensität nur leicht reduziert (Abb. 89 und 90). Knorpelbereiche, die tiefere Risse aufwiesen, waren hingegen meist nur sehr schwach mit Saf-O angefärbt (Abb. 88 und 91). Sobald der Knorpel stark aufgefasert war, traten auch häufig Zellveränderungen auf. Die Chondrozyten bildeten in diesen Bereichen Cluster oder es lag eine Hypozellularität vor (Abb. 92). Im peripheren Anteil der Tibiakondylen kam hingegen häufiger eine diffuse Hyperzellularität vor (Abb. 90). Vor allem peripher traten teilweise auch Blutgefäße über die Knorpel-Knochen-Grenze, obwohl die Knorpeloberfläche intakt war (Abb. 93). In allen vier Gruppen gab es Knorpelproben, die kaum Veränderungen aufwiesen, aber auch Proben, die deutlich verändert waren.

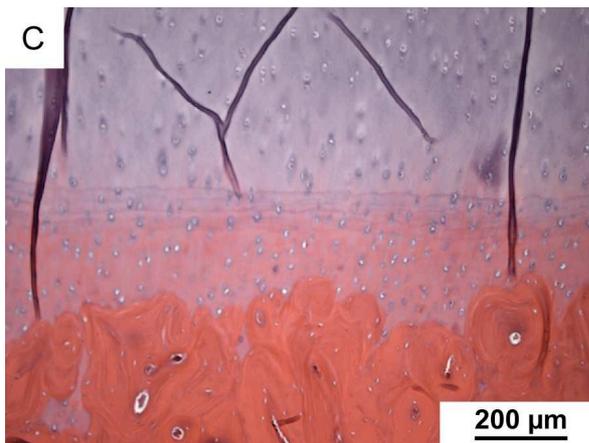
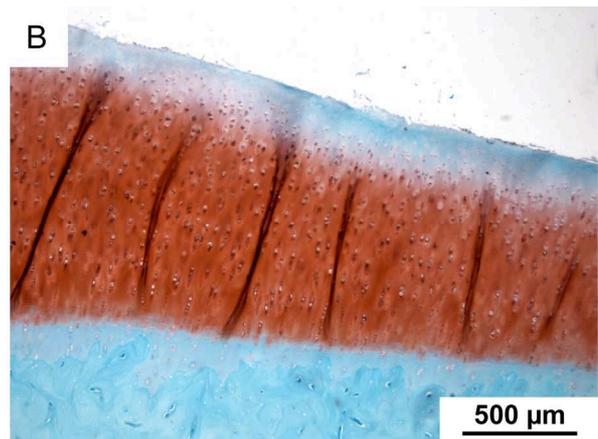
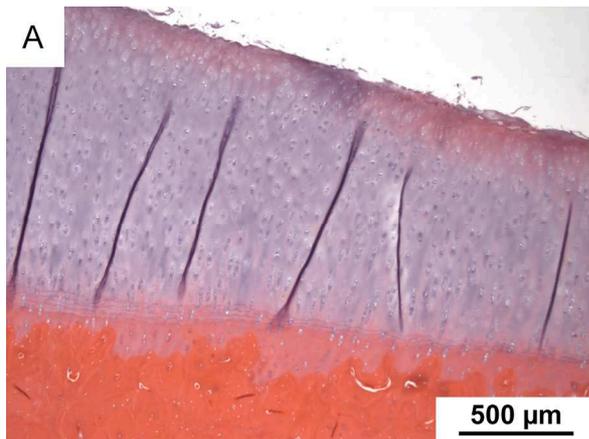


Abb. 89: Mit HE- und Saf-O-gefärbte histologische Schnitte durch die Tibiakondyle eines Tieres der Gruppe 2 (Sh); zentraler Bereich; Knorpeloberfläche mit leichten Unregelmäßigkeiten sowie stellenweise Pannusbildung (A, B), unveränderte Zellzahl (A-C), intakte Knorpel-Knochen-Grenze (C), leichte Reduktion der Safranin O Intensität (B); A und B: 50-fache Vergrößerung, C: 100-fache Vergrößerung

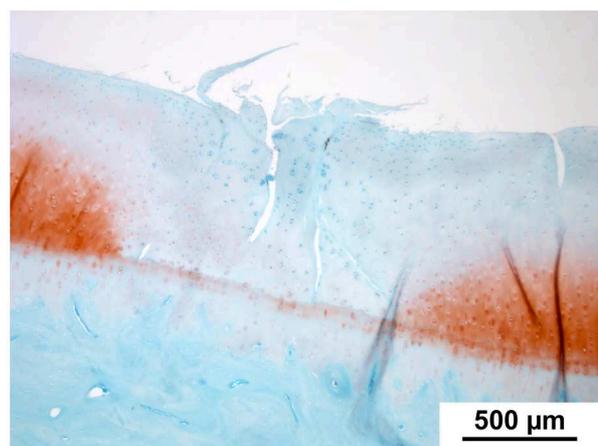
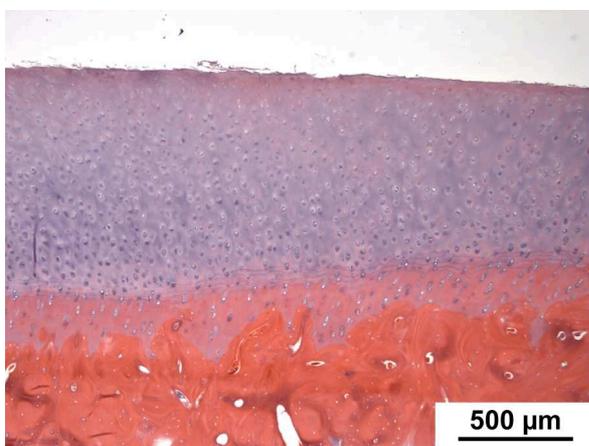


Abb. 90: HE-gefärbter Schnitt durch die mediale Tibiakondyle eines Tieres aus Gruppe 4 (Sc6); Unregelmäßigkeiten der Knorpeloberfläche mit Pannusbildung, diffuse Hyperzellularität und intakte Knorpel-Knochen-Grenze; 50-fache Vergrößerung

Abb. 91: Saf-O-gefärbter Schnitt durch die mediale Tibiakondyle eines Tieres der Gruppe 4 (Sc6); Risse bis in die radiale Zone; in diesem Bereich keine Saf-O Färbung und Zellclusterbildung; intakte Knorpel-Knochen-Grenze; 50-fache Vergrößerung

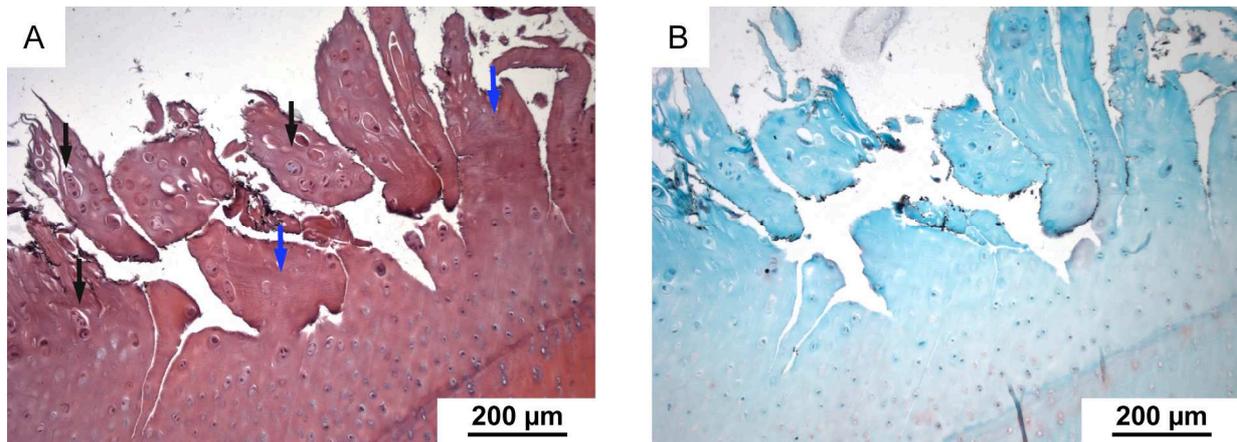


Abb. 92: HE-gefärbter (A) und Saf-O-gefärbter (B) Schnitt durch die mediale Tibiakondyle eines Tieres der Gruppe 2 (Sh); multiple Risse bis in die radiale Zone; neben Zellclusterbildung (schwarze Pfeile) auch lokale Hypozellularität (blaue Pfeile); keine Färbung mit Saf-O (B); intakte Knorpel-Knochen-Grenze; 100-fache Vergrößerung

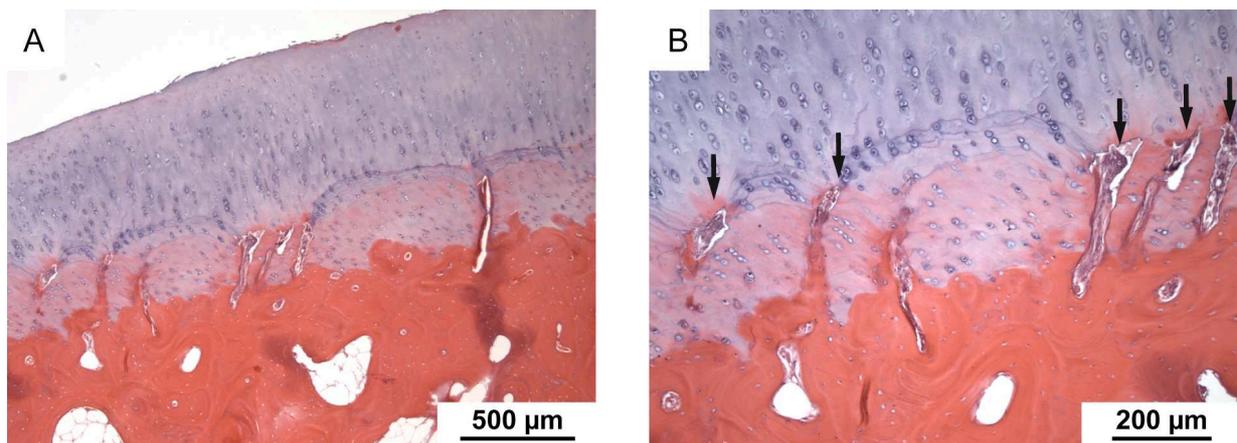


Abb. 93: Schnitte durch die mediale Tibiakondyle eines Tieres aus Gruppe 1 (Sc3); Blutgefäße aus dem subchondralen Knochen durchbrechen die kalzifizierte Zone sowie die Knorpel-Knochen-Grenze (Pfeile); die Knorpel-Knochen-Grenze ist daher deutlich wellenförmig; A: 50-fache Vergrößerung, B: 100-fache Vergrößerung

### 3.6.3.1 Fibrillationsindex

Der Fibrillationsindex gibt Auskunft über die Oberflächenbeschaffenheit des tibialen Knorpels. Zur Berechnung der Indices wurde neben der Länge der direkten Knorpeloberfläche auch die Länge der Knorpel-Knochen-Grenze bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.5.3.1). Je aufgefaserter die Knorpeloberfläche, desto länger wurde sie. Da aber die Länge der Knorpel-Knochen-Grenze unverändert blieb, stieg der Fibrillationsindex. Geschädigter Knorpel hat somit einen höheren Fibrillationsindex als

gesunder Knorpel.

In allen vier Gruppen war der durchschnittliche Fibrillationsindex im anterioren Schnitt (Schnitt 1) am niedrigsten, gefolgt von dem Fibrillationsindex im posterioren Schnitt (Schnitt 3). Im mittleren Schnitt (Schnitt 2) war der Fibrillationsindex durchschnittlich in allen 4 Gruppen höher als in den anterioren und posterioren Schnitten.

#### *Dreimonatsgruppe (Scaffold-3-Monatsgruppe)*

In der Gruppe mit dreimonatiger Scaffoldimplantation unterschieden sich die medianen Fibrillationsindices in den operierten Gelenken in keinem Schnitt signifikant von den Fibrillationsindices in den nicht operierten Gelenken (Abb. 94). In den Schnitten 1 und 2 waren die Fibrillationsindices der operierten Seite tendenziell etwas niedriger als die Indices der kontralateralen Seite. In Schnitt 3 hingegen war der Fibrillationsindex der operierten Seite tendenziell höher als der Index der nicht operierten Seite.

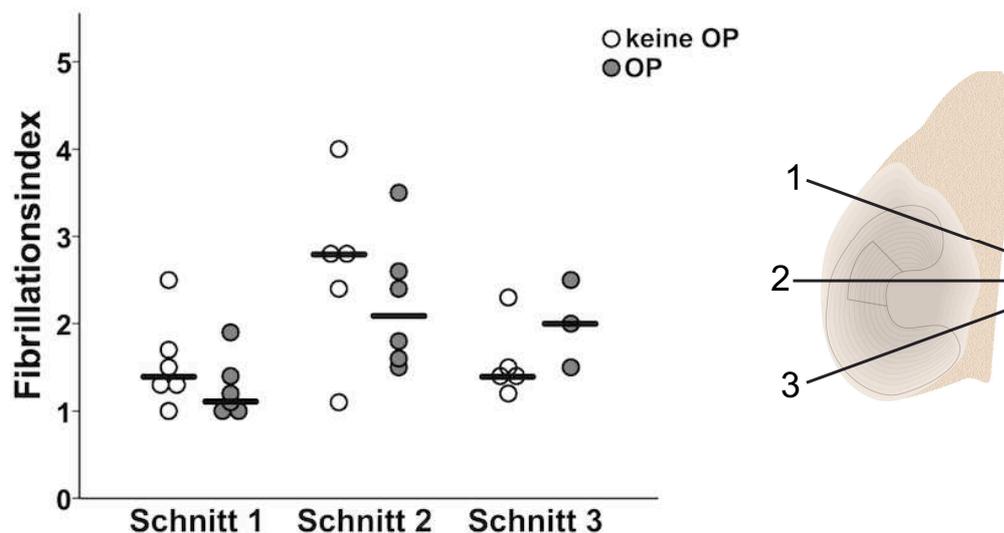


Abb. 94: Fibrillationsindices des tibialen Knorpels in Gruppe 1 (Sc3)

#### *Sechsmonatsgruppen (Sham-, Teilresektion- und Scaffold-6-Monatsgruppe)*

Der Vergleich der Fibrillationsindices der operierten Gelenke in den drei Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit zeigte ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 95). In Schnitt 1 lagen die medianen Fibrillationsindices der Teilresektion-Gruppe und der Scaffold-Gruppe bei 1,6 und damit leicht über dem Wert in der Sham-Gruppe (FI = 1,3). In Schnitt 2 lag der mediane Fibrillationsindex in der Teilresektion-Gruppe geringfügig über dem Fibrillationsindex der Sham-Gruppe. Der

Fibrillationsindex in der Scaffold-Gruppe (Sc6) hingegen lag geringfügig unter dem Fibrillationsindex der Sham-Gruppe. Die medianen Fibrillationsindices in Schnitt 3 lagen in allen drei Gruppen sehr nah beieinander.

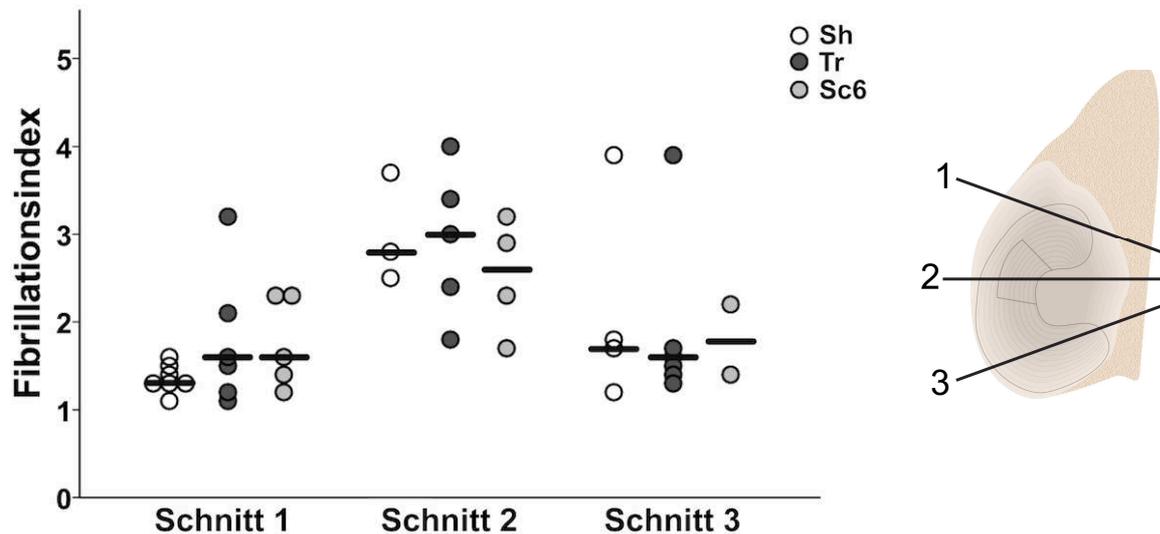


Abb. 95: Vergleich der Fibrillationsindices des tibialen Knorpels der operierten Seite (Gruppen 2 (Sh), 3 (Tr) und 4 (Sc6))

In den Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit gab es ebenfalls keine großen Unterschiede zwischen den operierten und den nicht operierten Gelenken (Abb. 96). In der Sham-Gruppe entsprachen die medianen Fibrillationsindices der operierten Seite in den Schnitten 1 und 2 den medianen Fibrillationsindices der nicht operierten Seite (Abb. 96 A). In Schnitt 3 unterschieden sich die Fibrillationsindices nur um eine Stelle hinter dem Komma.

In der Teilresektion-Gruppe unterschieden sich vor allem die Fibrillationsindices in Schnitt 2 recht deutlicher voneinander (Abb. 96 B). Der mediane Fibrillationsindex der operierten Seite war in diesem Schnitt doppelt so groß wie der Fibrillationsindex der nicht operierten Seite, der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant. In den anderen beiden Schnitten gab es nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Seiten.

In der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit bestand in allen Schnitten kaum ein Unterschied zwischen den Fibrillationsindices der operierten Gelenke und den Fibrillationsindices der nicht operierten Gelenke. Vor allem in Schnitt 2 unterschieden sich die Werte in dieser Gruppe nur um 4 % (Abb. 96 C).

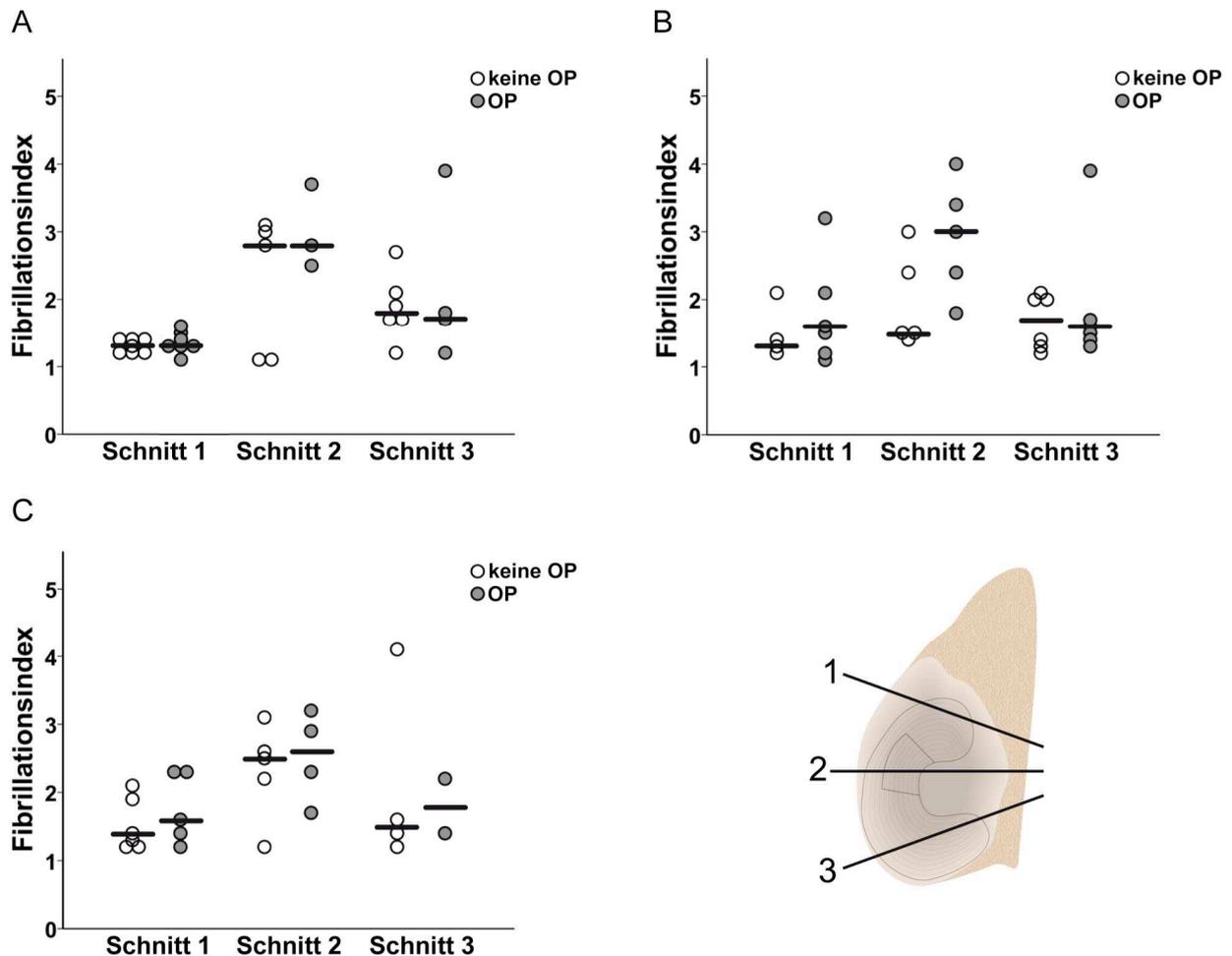


Abb. 96: Vergleich der Fibrillationsindices des tibialen Knorpels der operierten Seite mit denen der nicht operierten Seite in den Gruppen 2 (Sh; A), 3 (Tr; B) und 4 (Sc6; C)

### 3.6.3.2 Degenerationsgrad nach Mankin

In die Beurteilung des Knorpels nach Mankin flossen neben der Oberflächenbeschaffenheit auch die Zellzahl, die Anfärbbarkeit mit Safranin O sowie der Zustand der Knorpel-Knochen-Grenze ein. Dadurch wurde es möglich, degenerative Knorpelveränderungen differenzierter und gleichzeitig semiquantitativ zu erfassen. In den vier Kategorien wurden jeweils Punkte vergeben, die addiert den Gesamtgrad nach Mankin ergaben (vgl. Kapitel 2.4.5.3.2). Gesunder, unveränderter Knorpel würde den Degenerationsgrad 0 erhalten. Sehr stark degenerierter Knorpel könnte maximal Grad 14 erreichen.

In den vier Versuchsgruppen lag der Gesamtgrad nach Mankin zwischen 5 und 9. Diese Werte liegen im mittleren Bereich der Grading-Skala nach Mankin. Kein Tier erhielt den Grad 0. Das heißt, bei keinem Tier war der Knorpel völlig unverändert.

Allerdings erreichte auch kein Tier einen Grad über 11. Die Höhe des durchschnittlichen Gesamtgrades nach Mankin korrelierte in den einzelnen Gruppen und Schnitten deutlich mit der Höhe des Fibrillationsindex.

#### *Dreimonatsgruppe (Scaffold-3-Monatsgruppe)*

In der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit war in Schnitt 1 nur ein Grad Unterschied zwischen der nicht operierten und der operierten Seite (Abb. 97). In Schnitt 2 gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Seiten und auch in Schnitt 3 war nur ein Grad Unterschied zwischen der operierten und der nicht operierten, kontralateralen Gliedmaße.

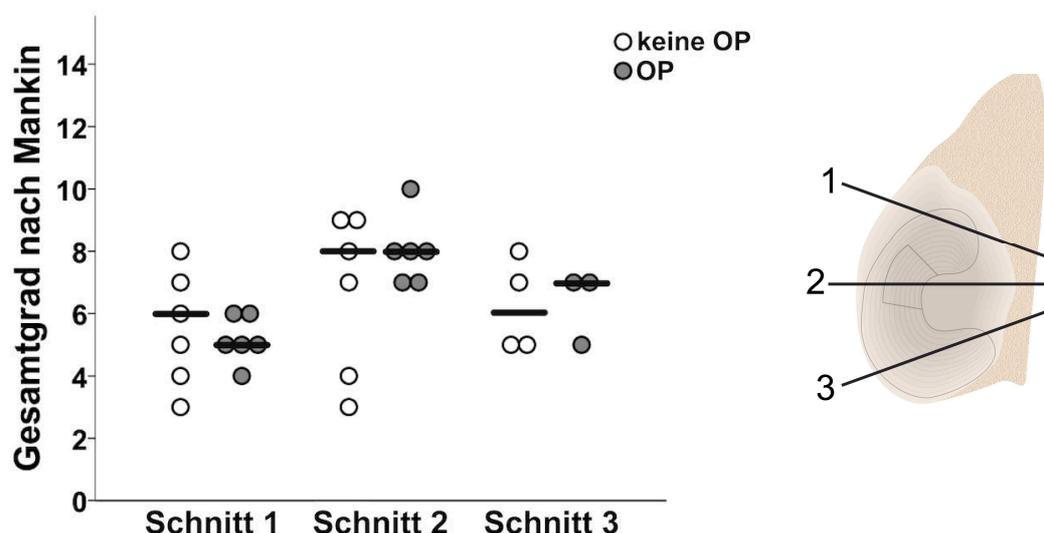


Abb. 97: Ergebnisse der Beurteilung der medialen Tibiakondylen nach Mankin in Gruppe 1 (Sc3)

#### *Sechsmonatsgruppen (Sham-, Teilresektion- und Scaffold-6-Monatsgruppe)*

Der Vergleich des Degenerationsgrades nach Mankin der operierten Seite der drei Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit zeigte ein ähnliches Bild wie schon der Vergleich der Fibrillationsindices (Abb. 95 und 98). Die Gesamtgrade in Schnitt 1 waren niedriger als die Grade in Schnitt 2 und 3 (Abb. 98). In Schnitt 1 gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Gesamtgrad nach Mankin lag in allen Gruppen bei 6. In Schnitt 2 lagen die Gesamtgrade zwischen 9 in der Sham-Gruppe und 7 in der Scaffold-Gruppe. In Schnitt 3 wiesen die drei Gruppen mit Grad 8 in der Sham-Gruppe bzw. Grad 7 in den anderen beiden Gruppen ebenfalls sehr ähnliche Werte auf.



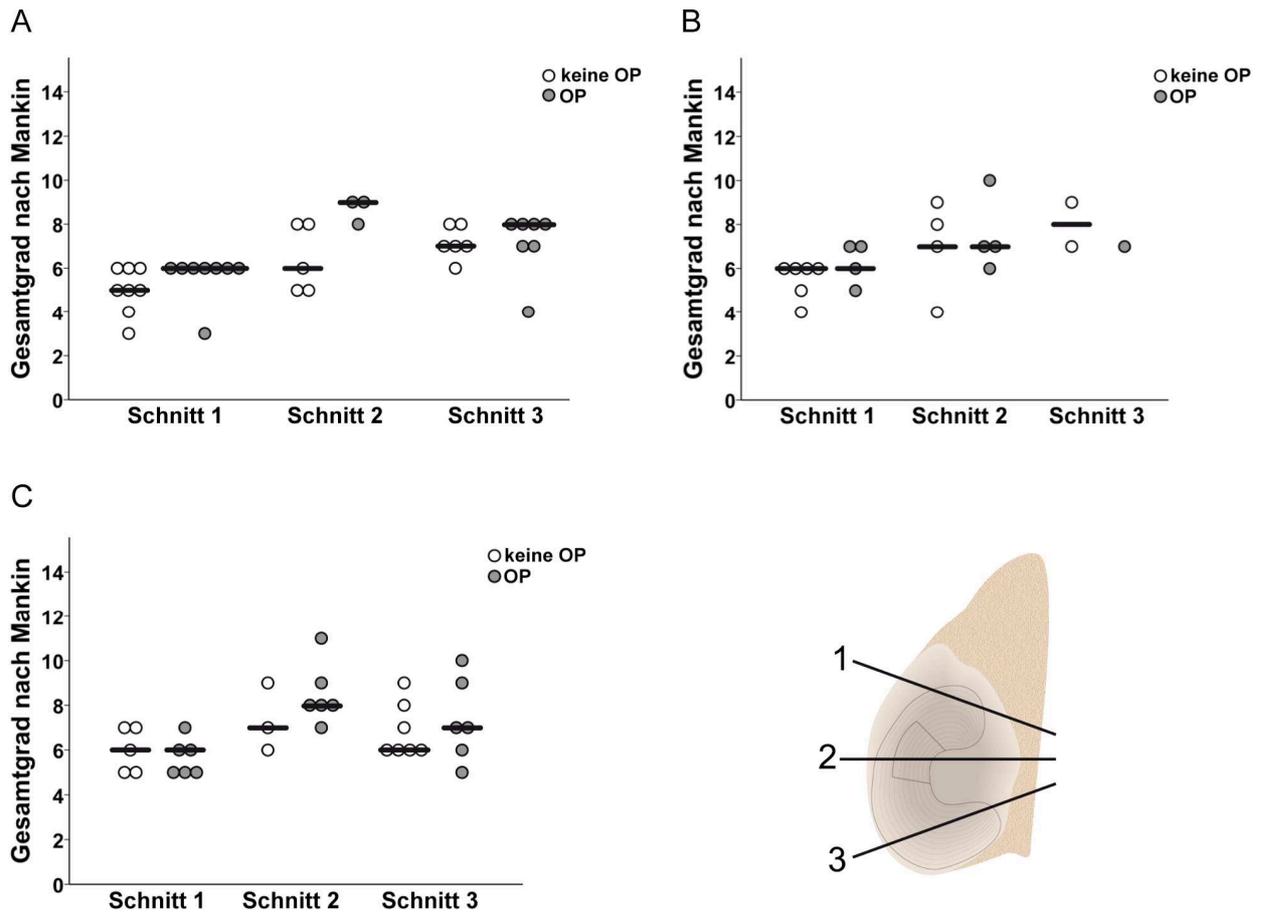


Abb. 99: Beurteilung des tibialen Knorpels nach Mankin in den Gruppen 2 (Sh; A), 3 (Tr; B) und 4 (Sc6; C)

### 3.7 Immunchemie

Der Entzündungsmediator Prostaglandin  $E_2$  und die Zytokine Interleukin  $1\beta$  und 6 sind inflammatorische Parameter, deren Konzentrationen bei entzündlichen Prozessen sowie bei Arthrose in der Synovialflüssigkeit erhöht sind. In dieser Studie wurde daher der  $PGE_2$ -, der IL- $1\beta$ - und der IL-6-Gehalt in der Synovialflüssigkeit der Kniegelenke prä- und postoperativ ermittelt. So konnten die Auswirkungen der Operation im Allgemeinen sowie der Scaffoldimplantation im Besonderen beurteilt werden.

Da bei einigen Tieren keine bzw. nur sehr wenig Synovialflüssigkeit während der Operation oder zum Zeitpunkt der Tötung gewonnen werden konnte, war es nicht in allen Fällen möglich die  $PGE_2$ -, IL- $1\beta$ - und IL-6-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit zu bestimmen. Außerdem wurden einige Proben bei der Entnahme durch Einblutungen verunreinigt und mussten von den Auswertungen ausgeschlossen werden. Dadurch ergaben sich z. T. sehr kleine Gruppengrößen.

#### 3.7.1 $PGE_2$ -Bestimmung

Die untere Nachweisgrenze des  $PGE_2$  EIA-Kits betrug laut Hersteller 9,86 pg/ml. Die Standardkurve des Kits erfasste allerdings nur  $PGE_2$ -Konzentrationen zwischen 31,25 und 1000 pg/ml. Traten  $PGE_2$ -Konzentrationen unterhalb des Standardkurvenbereichs auf, wurde nicht der ermittelte Wert sondern der niedrigste Wert der Standardkurve (31,25 pg/ml) für die Auswertung verwendet.

In den beiden Scaffold-Gruppen wurde ein Anstieg der  $PGE_2$ -Konzentration von den präoperativen Werten bis zum Zeitpunkt der Tötung beobachtet (Abb. 100). In allen vier Gruppen waren die  $PGE_2$ -Konzentrationen der einzelnen Tiere sowohl prä- als auch postoperativ individuell sehr unterschiedlich. Alle Tiere der Gruppe 1 (Sc3) und ein Großteil der Tiere der Teilresektion-Gruppe wiesen präoperativ Konzentrationen  $< 31,25$  pg/ml auf. In der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit lagen die präoperativen  $PGE_2$ -Konzentrationen zwischen 31 und 298 pg/ml. Damit lagen in dieser Gruppe die höchsten präoperativen Werte vor. Zum Zeitpunkt der Tötung wurden v. a. in Gruppe 1 (Sc3) im Vergleich zu dem präoperativen  $PGE_2$ -Gehalt erhöhte Werte gemessen. Aber auch in der Teilresektion-Gruppe waren die Werte bei einzelnen Tieren postoperativ deutlich erhöht. In der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit war der mediane Gehalt an  $PGE_2$  in der Synovialflüssigkeit postoperativ ebenfalls höher als präoperativ. Der insgesamt höchste gemessene  $PGE_2$ -Wert war 625 pg/ml bei einem Tier der Gruppe 4 (Sc6).

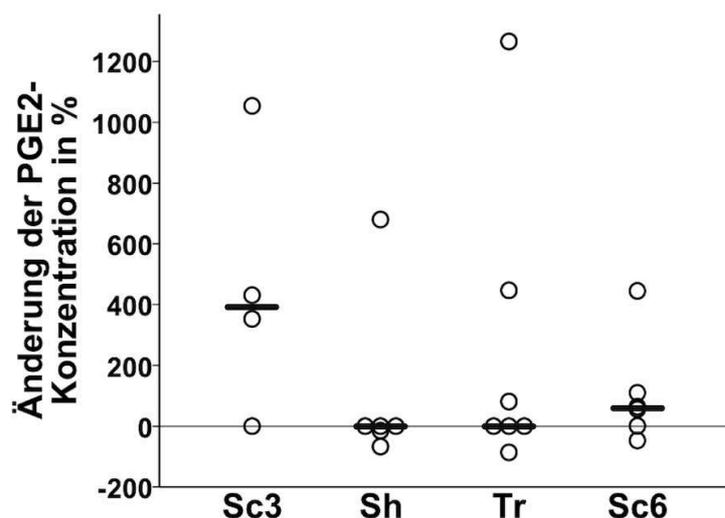


Abb. 100: Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit nach der Operation

### 3.7.2 IL-1 $\beta$ -Bestimmung

Die Standards des IL-1 $\beta$ -ELISA-Kits ergaben eine Standardkurve mit IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zwischen 46,87 und 3000 pg/ml. Bei vielen Tieren konnte IL 1 $\beta$  nicht in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. Bei den anderen Tieren lagen die gemessenen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen unterhalb der Standardkurve. Daher waren keine verlässlichen Aussagen über die Veränderung des IL-1 $\beta$ -Gehalts nach der Operation möglich.

### 3.7.3 IL-6-Bestimmung

Mit dem IL-6-ELISA-Kit konnten IL-6-Konzentrationen zwischen 3,2 pg/ml und 80 pg/ml zuverlässig detektiert werden. Die IL-6-Konzentrationen in den Proben lagen alle innerhalb dieses Bereichs. In allen vier Versuchsgruppen bewegte sich der mediane IL-6-Gehalt in der Synovialflüssigkeit sowohl prä- als auch postoperativ in einem sehr engen Rahmen (8,4 pg/ml bis 11,4 pg/ml). Ein geringfügiger Anstieg der IL-6-Konzentration war bei den Tieren der beiden Scaffold-Gruppen zu beobachten (Abb. 101). Bei einzelnen Tieren der Sham-Gruppe kam es postoperativ zu einem sehr starken Anstieg des IL-6-Gehalts. Das erklärt den recht hohe Gesamtanstieg des IL-6-Gehalts in dieser Gruppe (Abb. 101). In der Teilresektion-Gruppe kam es insgesamt sogar zu einer geringfügigen Abnahme der IL-6-Konzentration.

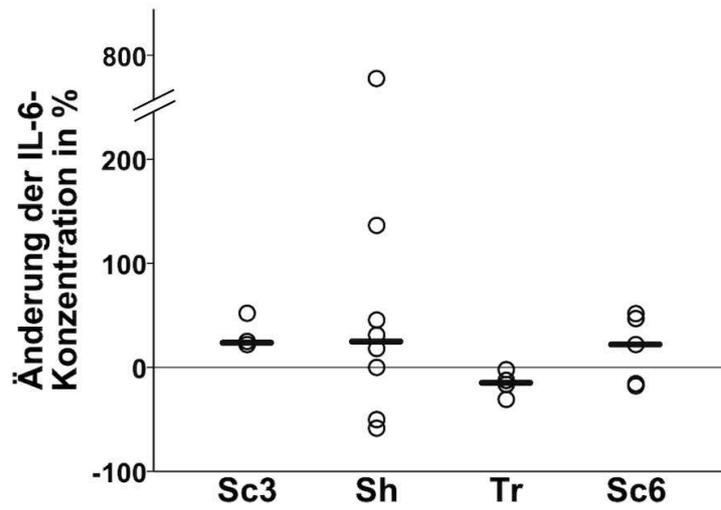


Abb. 101: Postoperative Änderung der IL-6-Konzentration in den Proben der Gelenkflüssigkeit

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Eignung des Modells**

#### **4.1.1 Tiermodell**

In der orthopädischen Forschung ist das Schaf ein weit verbreitetes Großtiermodell. Zum Beispiel wurden am Schafmodell im Bereich des Kniegelenks neben Studien zur Reparatur von Knorpelverletzungen und Rupturen der Kreuzbänder bereits zahlreiche Studien zur Behandlung von Meniskusläsionen durchgeführt (Burger et al., 2006; Kon et al., 2010; Zur et al., 2010; Galley et al., 2011; Kondo et al., 2012; Milano et al., 2012; Tovar et al., 2012).

Fragestellungen in der orthopädischen Forschung können am Schafmodell angemessen beantwortet werden, da sowohl das Körpergewicht als auch die anatomischen Dimensionen von Schafen in der Größenordnung des Körpergewichts und der Dimensionen des Menschen liegen (Martini et al., 2001). Obwohl das Kniegelenk von Schafen nicht wie beim Menschen vollständig gestreckt werden kann, sondern maximal eine Streckung von ca. 140 Grad erreicht wird (Govoni et al., 2012), ist das ovine Kniegelenk ein geeignetes Modell für das humane Kniegelenk (Ghadially et al., 1986; Armstrong et al., 1995; Dye, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Belastungsverhältnisse im ovinen Kniegelenk den Verhältnissen im humanen Kniegelenk gleichkommen. Bei beiden Spezies ist die Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia im medialen Gelenkkompartiment größer als im lateralen Kompartiment und der größere Anteil der Lasten wird im medialen Kompartiment übertragen (Lee-Shee et al., 2007; Winby et al., 2009; Hosseini et al., 2010; Taylor et al., 2011). Die auftretenden maximalen Kontaktkräfte sind im ovinen Kniegelenk trotz vergleichbarem Körpergewicht unter anderem deswegen kleiner als beim Menschen, da sich das Körpergewicht beim Schaf auf vier Gliedmaßen verteilt (Heller et al., 2005). Gleichzeitig ist allerdings auch die Kontaktfläche von Femur und Tibia im ovinen Kniegelenk kleiner. Es wird daher davon ausgegangen, dass die einzelnen Strukturen einer ähnlichen relativen Belastung ausgesetzt sind wie die entsprechenden Strukturen beim Menschen (Taylor et al., 2006).

Darüber hinaus eignet sich das Schafmodell für Untersuchungen am Meniskus, da die ovinen und die humanen Menisken deutliche Ähnlichkeiten bezüglich ihrer strukturellen und mechanischen Eigenschaften aufweisen (JOSHI et al., 1995,

CHEVRIER et al., 2009). Chevrier et al. konnten zeigen, dass unter anderem die Verteilung der Blutgefäße, die Zelldichte sowie die Kollagenstruktur in ovinen und humanen Menisken sehr ähnlich sind (2009). Da gerade diese Eigenschaften die Regenerationsfähigkeit eines Gewebes entscheidend beeinflussen, empfehlen die Autoren Untersuchungen zum Heilungsverhalten der Menisken am Schafmodell durchzuführen. Die mechanischen Eigenschaften der Menisken verschiedener Spezies (Schwein, Hund, Rind, Affe, Schaf, Mensch) wurden von Joshi et al. untersucht (1995). Dabei zeigte sich, dass die Permeabilität sowie die Kompressionsmoduln von ovinen und humanen Menisken weitestgehend übereinstimmen.

Ein weiterer Vorteil des Schafmodells ist, dass Schafe nach totaler sowie partieller Meniskektomie rasch arthrotische Veränderungen im Kniegelenk ausbilden. Burger et al. beschrieben 2007, dass bereits sechs Monate nach chirurgischer Simulation eines Radialrisses, der die gesamte Meniskusbreite umfasste, deutliche degenerative Veränderungen im Gelenk zu sehen waren. Die beobachteten Veränderungen waren dabei den Veränderungen bei der Arthrose des Menschen sehr ähnlich. Der Vergleich einer Meniskektomie mit einer neuen Therapiestrategie lässt daher am Schafmodell schon nach einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne eine Aussage über einen möglichen Therapieerfolg zu (Little et al., 1997; Aagaard et al., 1999; Chiari et al., 2006; Kelly et al., 2006; Maher et al., 2010; Zur et al., 2010).

Zusätzlich sind Schafe sehr genügsame und gelassene Tiere. Ihre Haltung ist verhältnismäßig unproblematisch und dadurch preiswert. Das Schafmodell ist daher im Vergleich zu anderen Tiermodellen ein recht unkompliziertes Großtiermodell (Martini et al., 2001).

Aus den aufgeführten Gründen schien das Schaf zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Studie als Modelltier am besten geeignet zu sein.

Schafe scheinen allerdings natürlicherweise schon in relativ jungen Jahren Degenerationen im Kniegelenk zu entwickeln (Zur et al., 2010). Aufgrund des recht hohen durchschnittlichen Alters der Tiere (vergleiche Kap. 2.2) traten in dieser Studie bereits zu Versuchsbeginn Knorpeldegenerationen in unterschiedlichem Ausmaß auf. Dies erschwerte die Beurteilung der Auswirkungen von Scaffoldimplantation und Meniskusteilresektion auf den Gelenkknorpel am Versuchsende.

Zudem konnte nicht verhindert werden, dass die Schafe die operierte Gliedmaße unmittelbar postoperativ belasteten. Somit fand anders als beim Menschen keine Schonung des operierten Gelenks statt.

#### 4.1.2 Versuchsdesign

##### *Kontrollgruppen*

Der Zugang zum Kniegelenk erforderte das knöcherne Ablösen des medialen Seitenbandes (vgl. Kapitel 2.3.2). Nach der Teilresektion in der Teilresektion-Gruppe bzw. Implantation des Scaffolds in den beiden Scaffold-Gruppen wurde der knöcherne Ursprung des Seitenbandes durch ein Krallenplättchen und eine bikortikale Schraube wieder am Femur fixiert. Das mediale Seitenband trägt allerdings einen wesentlichen Anteil zur Stabilität des Kniegelenks bei (Grood et al., 1981; Matsumoto et al., 2001) und eine Laxizität dieses Bandes verursacht eine Kniegelenksinstabilität und in Folge dieser Instabilität entstehen arthrotische Veränderungen (Pape et al., 2006). Trotz Refixation des Bandes konnte eine Veränderung der Gelenkstabilität durch den erfolgten Eingriff nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurde eine Sham-Gruppe operiert. In dieser Gruppe erfolgte eine Arthrotomie mit Ablösen des medialen Seitenbandes, aber kein Eingriff am Meniskus. Die anschließende Refixation des Seitenbandes wurde wie in den anderen drei Versuchsgruppen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Tötung gab es keinen Unterschied im Degenerationsgrad zwischen den operierten und den nicht operierten Kniegelenken in dieser Gruppe. Das knöcherne Ablösen des Seitenbandes und die Refixation mittels Krallenplättchen und Kortikalisschraube hatten offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die Stabilität des Kniegelenks. In ähnlichen Studien wurde für den Eingriff am Meniskus das Seitenband ebenfalls knöchern vom Femur gelöst oder eine vergleichbare Technik angewandt (Jackson et al., 1992; Chiari et al., 2006; Kelly et al., 2006; Martinek et al., 2006). Auch in diesen Studien hatte dieses Vorgehen keinen Einfluss auf die Gelenkstabilität oder -gesundheit. Auswirkungen der Operationstechnik auf die Ergebnisse in der Teilresektion-Gruppe oder den Scaffold-Gruppen konnten also mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Resektion von Meniskusgewebe induziert nachweislich progressive degenerative Veränderungen im Kniegelenk (Burks et al., 1997; McNicholas et al., 2000; Roos et al., 2001). Durch den Ersatz von geschädigtem Meniskusgewebe soll ein Fortschreiten der Degeneration aufgehalten werden. Auch in dieser Studie wurden Seidenfibrin-Scaffolds nach partieller Meniskektomie implantiert, um die Entstehung von Arthrose möglichst vollständig zu verhindern. Daher wurde in der Teilresektion-Gruppe sowie den beiden Scaffold-Gruppen ein in Lokalisation und Größe vergleichbares Meniskusstück reseziert. So sollte im direkten Vergleich der Scaffold- mit der

Teilresektion-Gruppe beurteilt werden, ob die Implantation der Seidenfibroin-Scaffolds tatsächlich die Entstehung von Degenerationen im Kniegelenk verhindern konnte.

#### *Lokalisation und Größe des Meniskusdefekts*

Da beim Menschen Meniskusverletzungen deutlich häufiger am medialen als am lateralen Meniskus auftreten (Baker et al., 1985), wurde in der vorliegenden Studie die Meniskektomie bzw. die Scaffoldimplantation ebenfalls am medialen Meniskus durchgeführt. Die Verletzungen des medialen Meniskus sind beim Menschen dabei in den meisten Fällen im posterioren Bereich lokalisiert (Greis et al., 2002a). Operativ ist dieser Bereich des Meniskus sehr schwer zugänglich und eine Behandlung von Läsionen des Hinterhorns erfolgt daher fast ausschließlich arthroskopisch. Wegen der kleineren Dimensionen sowie der ausgesprochen rigiden Bandstrukturen des ovinen Kniegelenks war es in dieser Studie nicht möglich, die Eingriffe arthroskopisch durchzuführen. Aus diesem Grund wurde eine mediale Arthrotomie vorgenommen. Im Zuge der Arthrotomie wurde das mediale Seitenband knöchern vom Femur gelöst. Diese Technik ermöglichte einen Zugang zu Vorderhorn und Teilen der *Pars intermedia* des medialen Meniskus. Ohne die Zerstörung weiterer Haltestrukturen konnte der Eingriff daher nur im anterioren Bereich des Meniskus durchgeführt werden. Obwohl die Belastungsverhältnisse am Vorderhorn möglicherweise von den Belastungsverhältnissen am Hinterhorn abweichen, war mit diesem Modell eine Beurteilung der Belastbarkeit der Scaffolds generell möglich. Zudem wird beim Menschen nach einem vergleichbaren Eingriff eine postoperative Ruhigstellung und Entlastung der Gliedmaße für mehrere Wochen verordnet (Rodkey et al., 2008), in der vorliegenden Studie belasteten die Tiere die operierte Gliedmaße hingegen unmittelbar postoperativ und bereits nach wenigen Tagen war kein Schonverhalten mehr sichtbar. Daher waren die unmittelbar postoperativ auftretenden Belastungen im Tiermodell sicherlich höher, als sie es beim Menschen gewesen wären.

Insgesamt wirkten in dem verwendeten Modell durchaus relevante Kräfte auf die Seidenfibroin-Scaffolds ein und eine Beurteilung der Belastbarkeit der Scaffolds war somit möglich.

Wie bereits beschrieben, ermöglichte die Arthrotomie die Resektion eines Meniskusstücks im Bereich des Vorderhorns des medialen Meniskus. Die Länge der Meniskektomie betrug durchschnittlich 9 mm und bei einer Gesamtlänge des ovinen Meniskus von ca. 45 mm entsprach dies etwa 20 % der gesamten Meniskulänge. Der mediale Meniskus des Menschen ist durchschnittlich ca. 100 mm lang (Murlimanju et

al., 2012). Lee et al. führten in einer *in vitro* Studie eine partielle Menishektomie mit 20 mm anterior-posteriorer und 50 bzw. 75 % radialer Ausdehnung im humanen Kniegelenk durch (2006). Sie konnten zeigen, dass durch einen Defekt dieser Größe die Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia signifikant reduziert wurde und gleichzeitig die Druckbelastung des tibialen Knorpels signifikant anstieg. Ein Meniskusdefekt, der 20 % der Meniskuslänge umfasst, scheint demnach die Belastungsverhältnisse im medialen Gelenkkompartiment entscheidend zu verändern. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch einen Defekt dieser Größe auf lange Sicht degenerative Knorpelveränderungen hervorgerufen werden. Beim Schaf treten wie bereits erwähnt nach partieller Menishektomie sehr rasch arthrotische Veränderungen im Kniegelenk auf und dementsprechend war bei einem Defekt von 9 mm Länge mit deutlichen Knorpeldegenerationen in der Teilresektion-Gruppe zu rechnen.

#### *Fixationstechnik*

In der Klinik erfolgt die Meniskusreparatur und die Implantation bisher verwendeter Ersatzmaterialien vorwiegend durch vertikale oder horizontale Einzelnähte (Abb. 102). Diese treten auf der femoralen und bzw. oder der tibialen Oberfläche des Meniskus bzw. des Ersatzmaterials aus dem Gewebe aus und stehen postoperativ im direkten Kontakt zum Gelenkknorpel (Müller-Rath & Höher, 2007).

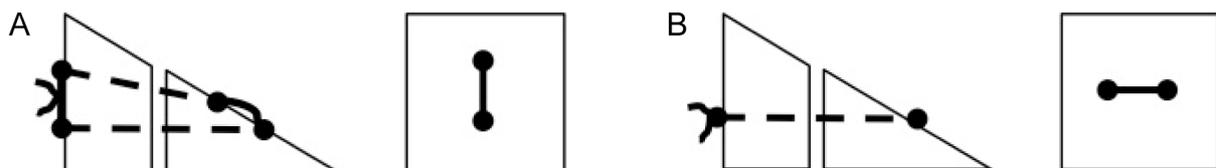


Abb. 102: Schemazeichnungen einer vertikalen (A) und einer horizontalen (B) Meniskusnaht; die jeweils linken Abbildungen zeigen einen Querschnitt durch den Meniskus, die rechten Abbildungen eine Aufsicht auf die femorale Meniskusfläche

Es ist nicht auszuschließen, dass diese Nähte den Knorpel vor allem in der frühen Phase nach der Operation schädigen können. Später werden die Nähte in der Regel durch eine dünne Gewebsschicht abgedeckt, die den artikulären Knorpel vor Schäden schützt. Um nach der Operation entstandene Knorpelschäden direkt dem Einfluss der Scaffolds zuordnen zu können, wurden in der vorliegenden Tierstudie Horizontalnähte verwendet, welche die Oberfläche der Scaffolds nicht penetrieren (Abb. 103). Bei dieser Nahttechnik verlief der Faden ausschließlich durch den porösen Anteil der

Scaffolds, die stabile Außenfläche der Scaffolds wurde nicht durchstochen. Durch die relativ geringe Länge des Defekts von 9 mm war die Fixation des Scaffolds dabei nur mit zwei Horizontalnähten möglich.

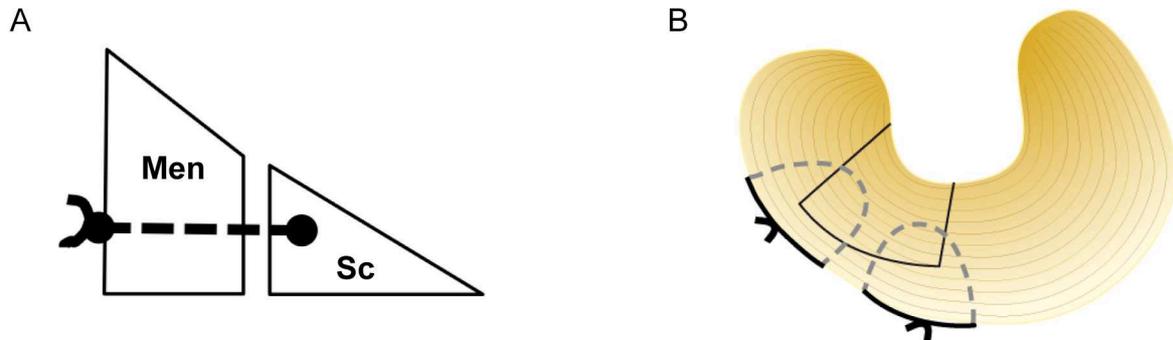


Abb. 103: Schemazeichnungen der nicht penetrierenden Horizontalnähte; Querschnitt durch Meniskus und Scaffold (A) sowie Aufsicht auf die femorale Fläche des Meniskus (B)

In den beiden Scaffold-Gruppen kam es insgesamt bei sechs Tieren zu Scaffolddislokationen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die stellenweise recht dünnen Porenwände den auftretenden Belastungen nicht standhalten konnten und der Faden die Porenwände zerrissen hatte. Mit einer Nahttechnik, welche die stabile Scaffoldaußenfläche penetriert, hätte das Scaffold eventuell bei allen Tieren zuverlässig im Meniskusdefekt fixiert werden können. Daneben ist sicherlich auch die Anzahl der Fixationspunkte ausschlaggebend für eine erfolgreiche Scaffoldfixation. Martinek et al. fixierten zellbesiedelte und unbesiedelte Kollagenscaffolds (CMI) mit vier Einzelnähten an der Meniskusbasis (2006). Obwohl die Autoren das verwendete Scaffold als biomechanisch instabil beschrieben, gelang es ihnen mit dieser Technik das Scaffold in sieben von acht (besiedelte Scaffolds) bzw. in fünf von acht Fällen (unbesiedelte Scaffolds) stabil am Meniskus zu fixieren. Auch Maher et al. befestigten ein Polycaprolacton-Polyurethan-Scaffold (Actifit®) als Meniskusteilersatz mit drei Horizontalnähten am Meniskus und erreichten dadurch eine stabile Fixierung der Scaffolds (2010). Eine Fixation mit mehr als zwei Einzelnähten wäre vermutlich auch in der vorliegenden Studie wesentlich stabiler gewesen, da sich die Lasten auf mehrere Fixationspunkte aufgeteilt hätten.

#### *Versuchsdauer*

Wie bereits unter 4.1.1 beschreiben, treten beim Schaf nach Meniskusteilresektion innerhalb kürzester Zeit degenerative Knorpelveränderungen auf. Daher war damit zu

rechnen, dass der Gelenkknorpel in der Teilresektion-Gruppe nach sechs Monaten deutliche degenerative Veränderungen aufweisen würde und bei einem Vergleich der Scaffold- mit der Teilresektion-Gruppe ein Nachweis chondroprotektiver Eigenschaften der Seidenfibroin-Scaffolds möglich wäre.

In vergleichbaren Studien mit anderen Meniskusersatzmaterialien konnte außerdem gezeigt werden, dass schon nach sechs Monaten eine Integration und beginnende Resorption der implantierten Materialien stattgefunden hatte (Chiari et al., 2006; Tienen et al., 2006a; Maher et al., 2010). Nach sechsmonatiger Implantationsdauer konnte somit ebenso eine Aussage zur biologischen Aktivität der Scaffolds getroffen werden.

Zusätzlich zu den drei Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit gab es eine Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Implantationszeit. Mit dieser Gruppe sollte eine potenzielle Immunogenität der Seidenfibroin-Scaffolds möglichst frühzeitig erkannt werden.

## **4.2 Eignung der Scaffolds für den Meniskusteilersatz**

### **4.2.1 Biologische Wechselwirkungen**

#### **4.2.1.1 Biokompatibilität der Seidenfibroin-Scaffolds**

Biokompatibilität ist eine Grundvoraussetzung für den Erfolg eines Materials im medizinischen Einsatzbereich. Ein Material, das direkt nach Implantation oder auch erst nach einer gewissen Zeitspanne eine starke Entzündungsreaktion im Empfängergewebe hervorruft, würde trotz möglicher anderer Vorteile nie zur klinischen Anwendung kommen.

In der vorliegenden Studie wurde ein Scaffold aus Seidenfibroin als Meniskusteilersatz verwendet. Das Seidenfibroin für die Produktion der Scaffolds wurde aus Rohseide von Seidenspinnerraupe gewonnen. Seide ist neben Catgut eines der ältesten Nahtmaterialien in der Chirurgie (Halsted, 1913). Sowohl Seide als auch Catgut wurden allerdings nach Einführung des ersten synthetischen Nahtmaterials 1931 nach und nach von synthetisch hergestellten Nahtmaterialien verdrängt. Dies lag unter anderem sicherlich auch an dem immunogenen Potential der Seide (Macintosh et al., 2008). Panilaitis et al. konnten jedoch 2003 zeigen, dass die immunogene Wirkung der Seide durch die Sericin-Ummantelung der Fibroinfasern hervorgerufen wird und Fibroin alleine keine Aktivierung des Immunsystems bewirkt. Seide wird daher heutzutage vor ihrer Verwendung als Medizinprodukt einem Prozess unterzogen, der

das Sericin von den Fibroinfasern entfernt. Auch bei der Produktion der in dieser Studie verwendeten Scaffolds wurde zunächst das Sericin sorgfältig von den Seidenfasern gelöst. Erst dann wurden die Fibroinfasern zu den Scaffolds weiterverarbeitet. Die Biokompatibilität verschiedener Materialien aus isoliertem Seidenfibroin konnte *in vitro* sowie *in vivo* bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden (Santin et al., 1999; Dal Pra et al., 2005; Meinel et al., 2005; Cassinelli et al., 2006; Seo et al., 2009).

Da die Herstellung und die Implantationsstelle dieser Materialien mit den in dieser Studie verwendeten Scaffolds nicht identisch waren, konnten die Ergebnisse dieser Studien nicht auf die verwendeten Scaffolds übertragen werden. Ein mögliches immunogenes Potential der Seidenfibroin-Scaffolds sollte in dieser Studie durch makroskopische, histologische sowie immunchemische Methoden aufgedeckt werden. Makroskopisch waren weder nach dreimonatiger noch nach sechsmonatiger Implantationszeit Anzeichen einer Entzündungsreaktion an der *Membrana synovialis* der Gelenkkapsel oder am Meniskus zu erkennen. Auch die histologische Untersuchung zeigte, dass sowohl in den Scaffolds und dem umliegenden Meniskusgewebe als auch in der *Membrana synovialis* der Gelenkkapsel nur sporadische inflammatorische Zellen auftraten. Lediglich in der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit wurden bei einzelnen Tieren lokal mehrere Entzündungszellen gefunden. In der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Implantationszeit bestand hingegen kein Unterschied zu der Sham- oder der Teilresektion-Gruppe. Das vermehrte Auftreten von Entzündungszellen in der Gruppe 1 (Sc3) ist daher möglicherweise Nachwirkung des zuvor erfolgten operativen Eingriffs. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass das Scaffold in der frühen Phase der Implantation eine geringgradige Entzündung hervorrief.

Die Bestimmung inflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren ist eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung von Entzündungsreaktionen nach Erkrankungen oder Verletzungen sowie nach operativen Eingriffen (Chen et al., 1999; Vila et al., 2000; Grellner, 2002; Riera et al., 2011). Neben anderen Markern werden häufig die Konzentration des Entzündungsmediators PGE<sub>2</sub> und der proinflammatorischen Zytokine IL 1 $\beta$  und IL 6 bestimmt. Liegt eine Entzündung des untersuchten Gewebes vor sind die Konzentrationen dieser Faktoren erhöht. Auch in der vorliegenden Studie wurden diese drei Entzündungsmarker untersucht. Der durchschnittliche PGE<sub>2</sub>-Gehalt war zum Zeitpunkt der Sektion im Vergleich zum

präoperativen PGE<sub>2</sub>-Gehalt in den beiden Scaffold-Gruppen erhöht und in allen Gruppen traten starke interindividuelle Unterschiede auf. Der stärkste Anstieg wurde in der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit beobachtet. Der Anstieg in der Scaffold-Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit war hingegen deutlich niedriger. Obwohl in beiden Scaffold-Gruppen ein postoperativer Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen zu beobachten war, lagen die medianen PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit zum Zeitpunkt der Sektion lediglich bei 123 pg/ml und in der Gruppe mit sechsmonatiger Standzeit bei 322 pg/ml. Das proinflammatorische Zytokin IL 1 $\beta$  kam in allen vier Versuchsgruppen wenn überhaupt nur in sehr geringen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit der operierten Gelenke vor. Auch die Konzentrationen des Zytokins IL 6 waren insgesamt sehr gering. Zudem stiegen die Konzentrationen in den beiden Scaffold-Gruppen postoperativ kaum an. Für die Konzentrationen dieser Entzündungsmarker in der Gelenkflüssigkeit von Schafen konnten in der Literatur keine Vergleichswerte gefunden werden. Daher konnten die ermittelten Konzentrationen nur mit den Konzentrationen bei Hund und Mensch verglichen werden. In einer *in vivo* Studie wurde der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in der Synovialflüssigkeit von Hunden ermittelt (Mastbergen et al., 2006). Hier lagen die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Kontrollgruppe zu Beginn der Studie bei ca. 300 pg/ml ( $\pm$  200 pg/ml SEM). In einer klinischen Studie wurden die PGE<sub>2</sub>-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von gesunden Probanden ermittelt und diese lag bei 620 pg/ml ( $\pm$  230 pg/ml SD) (Shao et al., 2009). Damit waren die in der vorliegenden Studie ermittelten PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen unter bzw. im Bereich der Konzentrationen in gesunder, caniner sowie humaner Synovialflüssigkeit. In einer anderen klinischen Studie wurden als Referenz für gesunde Probanden IL-6-Konzentrationen von 2 pg/ml in der humanen Synovialflüssigkeit angegeben (Hayward et al., 2011). Sechs Stunden nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes stiegen die Werte auf über 4000 pg/ml an. Obwohl sicherlich von gewissen speziesspezifischen Unterschieden auszugehen ist, dienen diese Werte als Hinweis, dass die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Scaffoldimplantation nicht pathologisch erhöht waren und dass bei einer anhaltenden Entzündungsreaktion auf die Scaffolds wahrscheinlich mit weitaus höheren postoperativen IL-6-Konzentrationen zu rechnen gewesen wäre.

Vergleichbare *in vivo* Studien, die unterschiedliche Scaffoldmaterialien auf ihre Eignung als Meniskusersatz testeten, führten meist keine Untersuchungen zur Biokompatibilität der eingesetzten Materialien durch (Stone et al., 1992; Kelly et al.,

2007; Hannink et al., 2010). In anderen Studien wurden die Gelenke makroskopisch und histologisch auf Entzündungsanzeichen untersucht (Martinek et al., 2006; Tienen et al., 2006b; Maher et al., 2010; Zur et al., 2010). Die Ergebnisse waren in fast allen Studien unauffällig. Nur nach Implantation eines Polyesterurethan-Scaffolds (Estane) wurde nach histologischer Untersuchung der Synovialmembran eine etwas stärkere Entzündung (Grad 3 von 4) beschrieben (Tienen et al., 2006b). Die Arbeitsgruppe um Tienen et al. wies nach Implantation der Estane-Polymer-Scaffolds in einer anderen Arbeit auch eine deutliche Fremdkörperreaktion an der Oberfläche der Scaffolds nach (2006a). Chiari et al. untersuchten in einer Studie ein Polycaprolacton-Scaffold mit HYAFF®-Faserverstärkung auf dessen Eignung als Meniskusersatz (2006). In dieser Studie wurden Abstriche der Synovialflüssigkeit angefärbt und Biopsien der Gelenkkapseln genommen. Die Abstriche enthielten Lymphozyten aber keine weiteren Hinweise auf das Vorliegen einer akuten Inflammation. Auch in den Biopsien der Gelenkkapsel gab es keine Hinweise auf einen akuten inflammatorischen Prozess. In den Scaffolds wurden histologisch zahlreiche Riesenzellen nachgewiesen. Diese wurden dem Resorptionsprozess des Scaffoldmaterials zugeordnet. Maher et al. beschrieben nach Implantation eines Scaffolds auf Polyurethanbasis eine makroskopisch erkennbare Synovitis, die vor allem nach dreimonatiger Implantationszeit bei den meisten Tieren auftrat (2010). Die Synovialflüssigkeit war bei allen Tieren makroskopisch unverändert.

Das Entzündungspotential der Seidenfibroin-Scaffolds wurde in der vorliegenden Studie wesentlich eingehender untersucht als in vielen vergleichbaren Studien. Die durchgeführten Untersuchungen gaben weder nach drei noch nach sechs Monaten Hinweise auf das Vorliegen eines akuten Entzündungsgeschehens. Die Biokompatibilität der Seidenfibroin-Scaffolds für den Meniskusersatz konnte somit bestätigt werden.

#### **4.2.1.2 Bioaktivität und Einwachsverhalten der Seidenfibroin-Scaffolds**

Bioaktivität ist die Fähigkeit eines Materials eine Verbindung mit einem lebenden Gewebe eingehen zu können (Hench, 1988). Diese allgemeine Definition wurde 2011 von Makris et al. konkretisiert. Die Autoren beschrieben die Bioaktivität eines Materials für den Meniskusersatz als Fähigkeit die Bildung des gewünschten Zellphänotyps zu unterstützen, die Bildung extrazellulärer Matrix zu induzieren sowie sich in das Empfängergewebe zu integrieren. Gerade die Integration in das Empfängergewebe ist

äußerst wichtig, da das implantierte Material seine Funktion langfristig nur erfüllen kann, wenn es mit dem umliegenden Gewebe stabil verbunden ist. Ohne Integration kommt es früher oder später zur Implantatdislokation.

In der vorliegenden Studie wurde makroskopisch und histologisch untersucht, ob die Seidenfibroin-Scaffolds eine Verbindung mit dem Meniskusgewebe eingegangen waren. Makroskopisch schien keine Integration der Scaffolds in das Meniskusgewebe stattgefunden zu haben und auch die histologischen Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf eine bindegewebige Verankerung der Scaffolds. Die meisten Scaffolds lösten sich bereits während der Vorbereitung der Gewebeproben für die histologische Aufarbeitung vom Meniskus. Histologische Schnitte, die den Übergang von Meniskusgewebe zum Scaffold darstellten, konnten daher nur von einzelnen Proben angefertigt werden. In diesen Schnitten zeigte sich, dass der Spalt zwischen Meniskus und Scaffold nicht von Gewebe überbrückt wurde. Außerdem waren nur wenige Poren der Scaffolds mit Gewebe oder Zellen gefüllt und dies hauptsächlich im Bereich der Kontaktfläche zum Meniskus bzw. in der Nähe der Nahtkanäle (Abb. 104).

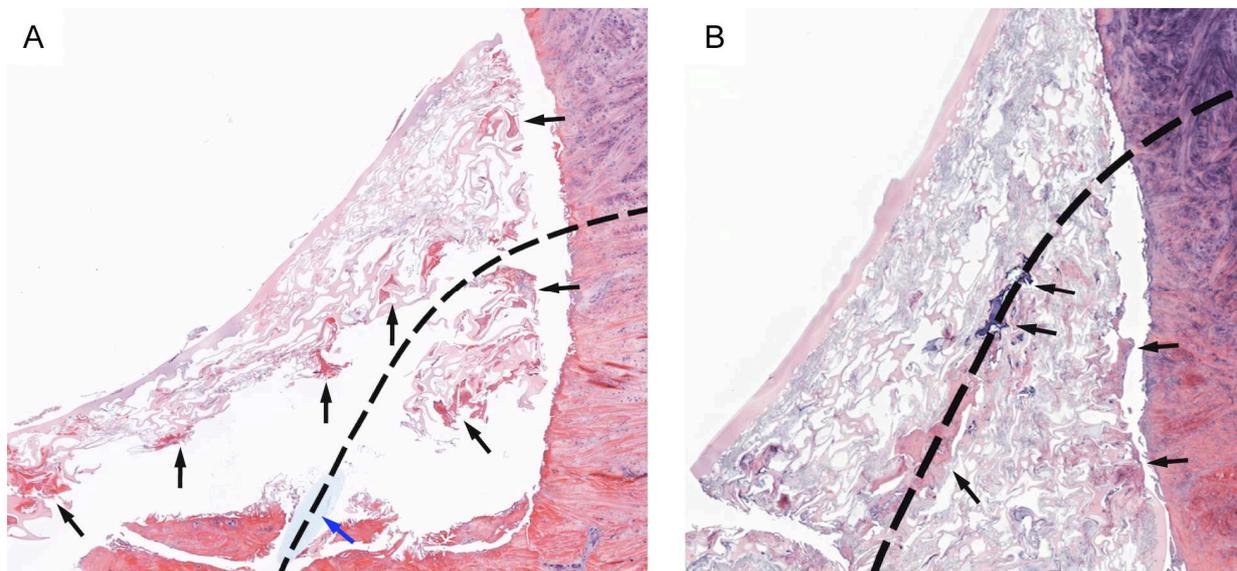


Abb. 104: Horizontale Schnitte durch ein Scaffold der Gruppe 1 (Sc3; A) und 4 (Sc6; B); die gestrichelte Linie markiert den Verlauf des Fadens zur Fixation der Scaffolds; an einer Stelle ist der Faden angeschnitten (A; blauer Pfeil); amorphes Material, Bindegewebe und Zellen treten hauptsächlich meniskusnah sowie in der Nähe der Nahtkanäle auf (schwarze Pfeile)

Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine geringe Interkonnektivität der Poren zurückzuführen. Bereits die Färbeversuche an nicht implantierten Scaffoldproben (vgl. Kapitel 2.1) ließen vermuten, dass die Interkonnektivität der Poren der Seidenfibroin-

Scaffolds gering ist. Die durch  $\mu$ -CT-Analysen ermittelte offene Porosität wurde möglicherweise aufgrund von Artefaktbildung während der CT-Scans zu hoch eingeschätzt und liegt tatsächlich unterhalb der ermittelten 85 %. Geht man davon aus, dass die Interkonnektivität der Seidenfibroin-Scaffolds in Wirklichkeit sehr gering ist, konnten die Zellen aus dem Meniskusgewebe ausschließlich in die Poren emigrieren, die durch das Zuschneiden der Scaffolds vor der Implantation oder durch die Fixation mittels Nähten eröffnet worden waren. Ein Einwachsen von Gewebe wäre in diesem Fall nur in einem Bereich von wenigen hundert Mikrometern möglich und würde nicht zu einer strapazierfähigen Verbindung zwischen Meniskus und Scaffold führen. In Kultivierungsversuchen dieser Seidenfibroin-Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen und einer präosteoblastären Mauszelllinie (MC3T3-E1) konnte ein gutes Zellwachstum auf der Oberfläche der Scaffolds nachgewiesen werden (Merkel, 2012; Kolbe, 2013). Merkel verwendete unter anderem auch Seidenfibroin-Scaffolds, die mit Hilfe eines Lasers kanalisiert worden waren. Sie konnte zeigen, dass die Zellen in die Mikrokanäle einwachsen und auch angrenzende offene Poren im Inneren der Scaffolds mit Zellen besiedelt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Zellwachstum auf den Seidenfibroin-Scaffolds durchaus möglich ist. Sie unterstützen außerdem die Vermutung, dass die Poren der Seidenfibroin-Scaffolds nicht interkonnektierend sind, weswegen Zellen und Gewebe nicht in das Innere der Scaffolds einwachsen können. Neben der Interkonnektivität der Poren ist aber auch die Porengröße entscheidend für das Einwachsen von Zellen sowie die Bildung extrazellulärer Matrix. Die erforderliche Porengröße für das Einwachsen von Meniskuszellen in ein Scaffold liegt laut Klompmaker et al. zwischen 150 und 500  $\mu\text{m}$  (1993). Die meisten Seidenfibroin-Scaffolds dieser Studie bestanden zu über 90 % aus Poren mit einem Durchmesser von  $> 100 \mu\text{m}$  wobei viele der Poren auch über 200  $\mu\text{m}$  groß waren. Einige Scaffolds wiesen in den histologischen Untersuchungen allerdings auch einen großen Anteil an Mikroporen mit wesentlich kleinerem Durchmesser auf. Diese Poren waren durchwegs leer. Da aber auch viele Poren mit ausreichender Größe nicht mit Zellen oder Gewebe gefüllt waren, kann die Porengröße der Scaffolds nicht ausschließlich für die ausgebliebene Besiedelung mit Zellen verantwortlich sein.

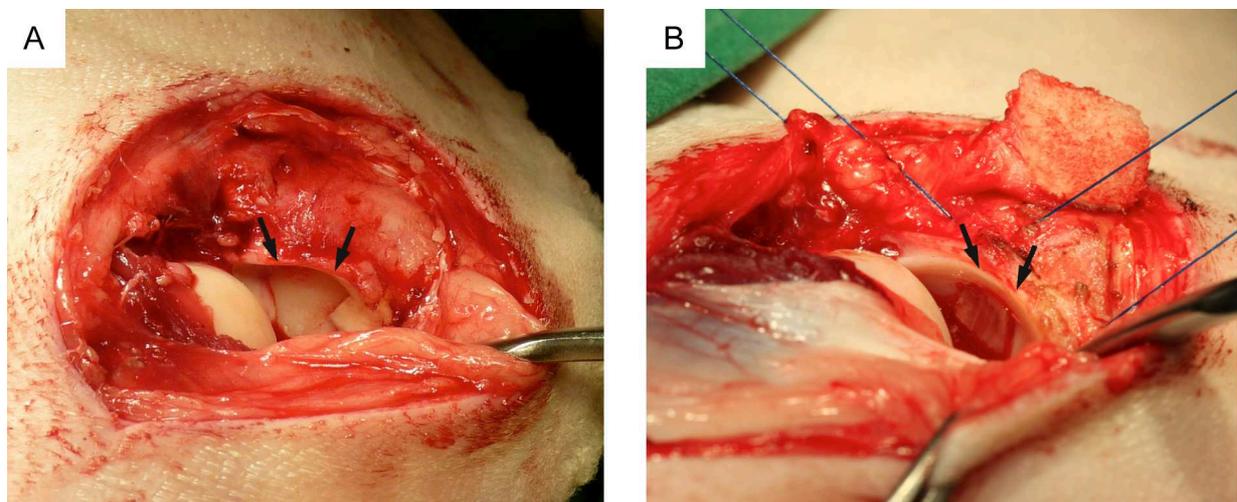
Eine andere mögliche Erklärung für die ausgebliebene Scaffoldintegration wäre, dass die Zellen zwar in die Scaffolds eindringen konnten, das Seidenfibroin den Zellen allerdings kein geeignetes Milieu zur Adhäsion und Proliferation bot. Gegen diese

Überlegung spricht jedoch, dass in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien eine gute und vollständige Besiedelung von Seidenfibroin-Scaffolds nachgewiesen werden konnte. Zum Beispiel wurden Stränge aus Seidenfibroin als Kreuzbandersatz getestet und es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine durchgängige Besiedelung der Scaffolds erreicht werden (Altman et al., 2002; Fan et al., 2009). In einer anderen Studie wurden mehrschichtige Seidenfibroin-Scaffolds für den Meniskusersatz mit Fibroblasten und Chondrozyten kultiviert (Mandal et al., 2011). Die Scaffolds bestanden aus drei Schichten mit jeweils unterschiedlicher Porengröße und Porenmorphologie. Nach achtundzwanzigtägiger Kultivierung waren die Poren aller Schichten mit Zellen gefüllt. Die Proliferationsrate der Zellen unterschied sich allerdings in den einzelnen Schichten. Wang et al. beschäftigten sich mit der *in vivo* Degradation von dreidimensionalen Seidenfibroin-Scaffolds (2008). In ihrer Studie wurden Scaffolds verwendet, die mit einem Lösungsmittel auf Wasserbasis hergestellt wurden, und Scaffolds, für deren Produktion ein organisches Lösungsmittel verwendet wurde. Von diesen beiden Scaffold-Typen wurden jeweils Scaffolds mit drei unterschiedlichen Porengrößen (ca. 150  $\mu\text{m}$ , ca. 550  $\mu\text{m}$  und ca. 900  $\mu\text{m}$ ) angefertigt. Die Scaffolds wurden subkutan implantiert und nach zwei- bzw. achtwöchiger sowie nach sechs- bzw. zwölfmonatiger Implantationszeit untersucht. Die Autoren konnten in allen Scaffold-Typen eingewachsenes Gewebe nachweisen, wobei in den kleinporigen Scaffolds, die mit organischem Lösungsmittel hergestellt wurden, auch nach 12 Monaten nicht alle Poren der Scaffolds mit Gewebe gefüllt waren. Das Einwachsen von Gewebe sowie die Degradation der Seidenfibroin-Scaffolds scheinen daher maßgeblich von dem angewendeten Produktionsprozess sowie der Porengröße der Scaffolds beeinflusst zu werden. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass ein Einwachsen von Gewebe in Scaffolds aus Seidenfibroin durchaus möglich ist. Eine Verbesserung der Interkonnektivität der Poren und der Gleichmäßigkeit der Porengröße können in Zukunft die Bioaktivität der verwendeten Seidenfibroin-Scaffolds verbessern und somit eine Integration in das Meniskusgewebe gewährleisten.

Für eine erfolgreiche Integration ist neben der Bioaktivität des implantierten Materials auch die Regenerationsfähigkeit des Gewebes ausschlaggebend. Diese ist im Meniskus grundsätzlich gering, da das Gewebe nur partiell mit Blutgefäßen versorgt wird. Martinek et al. führten eine subtotale Meniskektomie am medialen Meniskus von Schafen durch und implantierten besiedelte sowie unbesiedelte Scaffolds auf

Kollagenbasis (CMI) an die verbliebene Meniskusbasis (2006). Nach drei Wochen konnten die Autoren in den histologischen Schnitten bereits Zellen und extrazelluläre Matrix innerhalb der Scaffolds nachweisen. Nach drei Monaten waren unterschiedlich weit fortgeschrittene Umbauprozesse zu erkennen. Die Umbauprozesse in den besiedelten Scaffolds waren dabei meist stärker ausgeprägt als in den unbesiedelten Scaffolds. In dieser Studie wurde eine Lastaufnahme der operierten Gliedmaßen durch die Durchtrennung der Achillessehne für mindestens vier Wochen unterbunden. Über einen weitaus längeren Zeitraum belasteten die Tiere die entsprechende Gliedmaße nur teilweise. Die Scaffoldintegration wurde durch diese Maßnahme möglicherweise erleichtert. Eine andere Arbeitsgruppe führte einen Total- sowie einen Teilersatz des medialen Meniskus am Schafmodell durch (Chiari et al., 2006). In dieser Studie wurde ein Polycaprolacton-Scaffold mit HYAFF®-Faserverstärkung verwendet. Nach sechs Wochen konnte histologisch eine Integration der Scaffolds in das Kapselgewebe (Totalersatz) bzw. in das angrenzende Meniskusgewebe (Teilersatz) nachgewiesen werden. Im gesamten Scaffold hatte sich Bindegewebe gebildet. Maher et al. implantierten ein Polycaprolacton-Polyurethan-Scaffold (Actifit®) in einen Meniskusdefekt im Bereich der *Pars intermedia* des lateralen Meniskus (2010). Bereits zwei Wochen nach Implantation waren eine Infiltration mit Zellen sowie die Bildung von extrazellulärer Matrix histologisch nachweisbar. Eine Integration in das Meniskusgewebe hatte hingegen noch nicht stattgefunden. Nach dreimonatiger Implantation waren die Poren mit fibrovaskulärem Gewebe gefüllt und nach zwölf Monaten waren große Mengen Kollagen sowie Proteoglykan im gesamten Scaffold nachweisbar. Dieses Actifit®-Scaffold wurde bereits in einigen klinischen Studien eingesetzt und ist auf dem europäischen Markt nach CE-Zertifizierung als Meniskusteilersatz verfügbar (Efe et al., 2011; Verdonk et al., 2011; Verdonk et al., 2012). In einer dieser klinischen Studien wurden Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten nach Scaffoldimplantation beobachtet. In MRI-Aufnahmen zeigte sich dabei bei vier von zehn Patienten ein Spalt zwischen Meniskusgewebe und Scaffold (Efe et al., 2011). Ob eine Integration der Scaffolds in das Meniskusgewebe, wie in der *in vivo* Studie beobachtet, tatsächlich zuverlässig stattfindet, bleibt daher fraglich. In den aufgeführten *in vivo* Studien wurde außerdem die Bildung eines Regenerationsgewebes in den Meniskektomie-Kontrollgruppen beschrieben. In der vorliegenden Studie hingegen blieb die Bildung eines Regenerationsgewebes in der Teilresektion-Gruppe aus. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich der Defekt nicht bis in

den durchbluteten Bereich des Meniskus erstreckte. Da sich der Defekt in den Scaffold-Gruppen an der gleichen Lokalisation befand wie in der Teilresektion-Gruppe, wäre somit auch die Integration der Scaffolds beeinträchtigt gewesen. Beim Schaf dringen die Blutgefäße aus dem perimeniskalen Gewebe nur bis ca. 11 % der Meniskusbreite in das Meniskusgewebe ein (Chevrier et al., 2009). Der mediale Meniskus war bei den Merinoschafen dieser Studie im Bereich des Vorderhorns ca. 9 mm breit. Damit war wahrscheinlich nur ca. 1 mm des Meniskus vaskularisiert. Intraoperativ wurde soweit wie möglich an die Meniskusbasis reseziert (Abb. 105). Dabei sollte allerdings eine versehentliche Durchtrennung der Meniskusbasis vermieden werden.



*Abb. 105: Medialer Meniskus nach Teilresektion (A) bzw. nach Scaffoldimplantation (B); die Pfeile markieren die verbliebene Meniskusbasis im Bereich der Resektion; intraoperativ entstandene Aufnahmen*

Bei der Sektion stellte sich heraus, dass die Meniskusdicke intraoperativ unterschätzt worden war und tatsächlich eine über 3 mm breite Meniskusbasis bestehen blieb (Abb. 106).

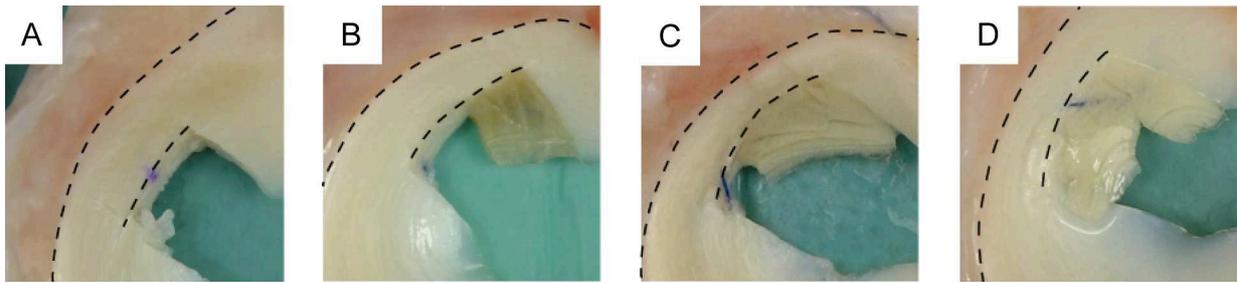


Abb. 106: Mediale Menisken von Tieren der Gruppen 1 (Sc3), 3 (Tr) und 4 (Sc6); die gestrichelten Linien markieren die Meniskusaußenkante sowie die Resektionskante; A: der Abstand zwischen Außenkante und Resektionskante beträgt ca. 3,5 mm (gleiches Tier wie in Abb. 105 A); B: der Abstand beträgt ca. 2 mm in der oberen Ecke und ca. 4 mm in der unteren Ecke (gleiches Tier wie in Abb. 105 B); C: Abstand ca. 2,5 mm; D: Abstand ca. 3 mm

Diese Fehleinschätzung ist einerseits durch den schrägen Blickwinkel während der Operation und andererseits auch durch die über den Meniskus quellende Gelenkkapsel zu erklären. Es ist daher davon auszugehen, dass die Implantation der Scaffolds nicht im vaskularisierten Bereich des Meniskus durchgeführt wurde. Dies erschwerte eine Integration der Scaffolds in das Meniskusgewebe zusätzlich.

Weder nach drei- noch nach sechsmonatiger Implantation waren histologisch Resorptions- bzw. Umbauprozesse an den Seidenfibroin-Scaffolds zu erkennen. Dies ist ein Hinweis, dass die Scaffolds wenn überhaupt sehr langsam abgebaut werden und somit einen dauerhaften Meniskusersatz darstellen. Je nach angewandtem Verfahren bei der Herstellung von Materialien aus Seidenfibroin ist mit einer sehr langen Degradationszeit zu rechnen (Altman et al., 2003).

#### 4.2.2 Mechanische Stabilität

Schon bei alltäglichen Aktivitäten treten sehr hohe Kräfte im Kniegelenk auf. Beim Treppensteigen beispielsweise steigt die Belastung im Kniegelenk auf das 3,2- bis 3,5-fache des Körpergewichts an (Kutzner et al., 2010). Es ist gut vorstellbar, dass die einwirkenden Kräfte bei unkontrollierten Bewegungen jedoch weitaus höher sind. Ein wesentlicher Anteil der auftretenden Lasten wird dabei nachweislich über die Menisken übertragen (Shrive et al., 1978; Kurosawa et al., 1980; Ahmed & Burke, 1983; Chen et al., 1996). Neben dieser erheblichen Druckbelastung sind die Menisken zusätzlich auch starken Zugbelastungen sowie Scherkräften ausgesetzt. Wird geschädigtes Meniskusgewebe durch ein Implantat ersetzt, wirken diese hohen Kräfte zunächst auch auf das implantierte Material ein. Jedes Meniskusersatzmaterial muss

daher eine ausreichende mechanische Anfangsstabilität aufweisen. Soll das Material, wie es bei dem Seidenfibroin-Scaffold der Fall ist, den Meniskus dauerhaft ersetzen, muss es den mechanischen Belastungen allerdings auch langfristig standhalten können. Nur dann kann der Knorpel vor degenerativen Veränderungen geschützt werden. Dazu müssen die mechanischen Eigenschaften des Materials den Eigenschaften von nativem Meniskusgewebe weitestgehend entsprechen.

Seide weist eine hohe Festigkeit und eine ausgezeichnete Elastizität auf (Altman et al., 2003; Macintosh et al., 2008; Yan et al., 2012). Daher eignet sich Seide besonders gut als Ersatzmaterial für mechanisch stark beanspruchtes Gewebe. Die mechanischen Eigenschaften von Scaffolds aus Seidenfibroin variieren dabei je nach Behandlung der Seide während der Scaffoldproduktion (Leal-Egana & Scheibel, 2010). Um zu überprüfen, ob die mechanischen Eigenschaften der in dieser Studie verwendeten Seidenfibroin-Scaffolds für den Ersatz von Meniskusgewebe geeignet sind, wurden die Gleichgewichtsmoduln der Scaffolds vor und nach Implantation mit den Gleichgewichtsmoduln des Meniskusgewebes verglichen. Bei 20 % Dehnung wurde ein medianer Gleichgewichtsmodul von 95 kPa für das Meniskusgewebe ermittelt. Scaffolds vor der Implantation wiesen einen signifikant niedrigeren Gleichgewichtsmodul auf. Der Gleichgewichtsmodul der Scaffolds stieg über die Implantationsdauer allerdings stetig an. Nach sechsmonatiger Implantation erreichten die Scaffolds einen medianen Gleichgewichtsmodul von 76 kPa. Die Steifigkeiten von Meniskus und Scaffolds nach sechsmonatiger Implantation unterschieden sich nicht mehr signifikant.

Dieser Anstieg der Steifigkeit kann nicht auf die stabilisierende Wirkung von eingewachsenem Gewebe zurückgeführt werden, da histologisch nur wenig Gewebe in den Scaffolds nachgewiesen werden konnte. Die Seidenfibroin-Scaffolds scheinen also im Laufe der Implantationsdauer steifer geworden zu sein. Dies könnte einerseits an einer Veränderung der Materialeigenschaften der Seidenfibroin-Scaffolds liegen. Andererseits könnte der Anstieg der Steifigkeit aber auch auf eine geringfügige Kompression der Scaffolds als Folge der anhaltenden Belastungen während der Implantation zurückzuführen sein. Durch eine Kompression steigt die Dichte des porösen Materials an und die Steifigkeit der Seidenfibroin-Scaffolds würde demzufolge zunehmen. Die histologischen Schnitte der Scaffolds deuten darauf hin, dass tatsächlich eine Kompression der Scaffolds über die Implantationszeit stattfand (vgl. Kapitel 3.6.2).

Die mechanischen Eigenschaften anderer bereits verwendeter Scaffoldmaterialien wurden bisher nur in wenigen Studien vor und nach Implantation untersucht (Maher et al., 2011). Auch ein direkter Vergleich der mechanischen Eigenschaften von Meniskus und Scaffold wurde nur selten angestellt. In zwei Studien wurden Scaffolds aus Polycaprolacton-Polyurethan und Estane mechanisch getestet und das Verhalten der Scaffolds mit nativem Meniskusgewebe verglichen (Tienen et al., 2006a; Tienen et al., 2006b). Dabei gab es vor allem zwischen den nicht implantierten Scaffolds und dem Meniskusgewebe große Unterschiede. Die Autoren beschrieben ebenfalls eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften nach Implantation. Dennoch wichen die Eigenschaften der Scaffolds auch nach Implantation immer noch deutlich von den Meniskuseigenschaften ab. Ein Vergleich der mechanischen Eigenschaften dieser beiden Materialien mit den Eigenschaften der Seidenfibroin-Scaffolds ist aufgrund der voneinander abweichenden Prüfbedingungen nicht möglich. Actifit® ein Scaffold, das sich bereits im klinischen Einsatz befindet, wird ausdrücklich als Material beschrieben, das im Kniegelenk keine mechanische Funktion übernehmen soll. Es soll lediglich als Leitschiene für neu gebildetes Gewebe dienen und innerhalb von ca. fünf Jahren vollständig abgebaut werden (Verdonk et al., 2011; Verdonk et al., 2012). Mit zunehmender Resorption des Scaffoldmaterials soll ein meniskusähnliches Gewebe den ehemaligen Defekt ausfüllen. Es gab keine präklinischen Studien, welche die mechanischen Eigenschaften dieser Scaffolds untersucht haben. In einer *in vitro* Studie von 2011 konnte allerdings gezeigt werden, dass nach Actifit®-Implantation eine gleichmäßigere Druckbelastung des Tibiaplateaus erfolgte als nach Meniskusteilresektion (Maher et al.). Weitere Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften des Materials wurden allerdings auch in dieser Studie nicht durchgeführt und es bleibt weiterhin fraglich, ob Scaffold bzw. Regenerat eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen. Für das CMI, das bereits im klinischen Einsatz war und von 2008 bis 2010 eine FDA-Zulassung besaß, gibt es ebenfalls keine Studien, welche die mechanische Funktionalität der Scaffolds bestätigten konnten (Müller-Rath et al., 2004; Martinek et al., 2006; Maher et al., 2011). Das Material an sich besitzt insuffiziente mechanische Eigenschaften und es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Scaffolds nach Implantation, wenn überhaupt, nur geringfügig zur Lastübertragung im Kniegelenk beitragen können (Buma et al., 2007). Martinek et al. beschreiben das CMI sogar als biomechanisch instabil, wobei diese Aussage nicht durch mechanische Daten begründet wurde (2006). Auch das Regenerationsgewebe,

das nach CMI-Implantation in verschiedenen klinischen Studien beschrieben wurde, wurde bisher noch nicht biomechanisch untersucht (Buma et al., 2007).

Während der Implantationszeit trat in der vorliegenden Studie weder eine Rissbildung noch eine Größenabnahme an den Seidenfibroin-Scaffolds auf. Diese Beobachtung unterstützt ebenfalls die Annahme, dass die Seidenfibroin-Scaffolds den mechanischen Belastungen im Kniegelenk über einen längeren Zeitraum standhalten können. In einigen anderen Studien wurden hingegen durchaus strukturelle Veränderungen der eingesetzten Scaffolds beschreiben (Kelly et al., 2007; Welsing et al., 2008; Hannink et al., 2010; Kon et al., 2012). Das Actifit®-Scaffold füllte nach sechs- sowie zwölfmonatiger Implantationszeit den Meniskusdefekt sogar nur noch zu rund 50 % aus (Maher et al., 2010). Die Autoren führen als mögliche Erklärung auf, dass der dünne, innere Bereich der Scaffolds den Belastungen im Gelenk nicht standhalten konnte und die Scaffolds daher abgenutzt wurden bevor einwachsendes Gewebe diesen Bereich der Scaffolds stabilisieren konnte. Möglicherweise ist der Materialverlust aber auch Folge bereits stattfindender Degradationsprozesse des Actifit®-Scaffolds.

Die mechanische Belastbarkeit der Seidenfibroin-Scaffolds ist nach den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen durchaus vielversprechend und scheint vielen anderen Materialien überlegen zu sein. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für ein Material, dass das Meniskusgewebe dauerhaft ersetzen soll. Dennoch kam es bei einigen Tieren zur Implantatdislokation. Dies liegt möglicherweise an der besonderen Fixationstechnik, die in der vorliegenden Studie angewandt wurde (vgl. Kapitel 4.1.2). Neben einer Veränderung der Fixationstechnik könnte durch das Einbringen von Fasern in das poröse Scaffold zusätzlich eine stabilere Fixation der Scaffolds erreicht und somit eine Dislokation der Scaffolds verhindert werden.

#### **4.2.3 Chondroprotektion**

Die Resektion von geschädigtem Meniskusgewebe nach Meniskusläsionen führt langfristig zu degenerativen Erkrankungen des artikulären Knorpels (Cox et al., 1975; Jaureguito et al., 1995; Maletius & Messner, 1996; Beveridge et al., 2011). Durch den Einsatz von Meniskusersatzmaterialien soll der artikuläre Knorpel vor Degeneration geschützt werden. Es ist allerdings auch möglich, dass Materialien aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften oder unzulänglichen mechanischen Eigenschaften zusätzlich zu Knorpeldegeneration führen. Dies wurde bereits in einigen *in vivo*

Studien beschrieben (Toyonaga et al., 1983; Messner, 1994; Hannink et al., 2010). Bei der Untersuchung eines neuen Materials auf seine Eignung als Meniskusersatz sollte daher ein besonderes Augenmerk auf deren Fähigkeit zur Chondroprotektion gerichtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Knorpel makroskopisch, biomechanisch und histologisch auf degenerative Veränderungen untersucht. Zunächst wurde der Zustand des Knorpels während der Operation beurteilt und schon hier fielen starke interindividuelle Unterschiede auf, wobei bei fast allen Tieren mindestens geringgradige Veränderungen zu sehen waren. Einige Tiere wiesen bereits intraoperativ deutliche Degenerationen im einsehbaren Bereich des Gelenks auf. Diese stark divergierenden Ausgangsbedingungen erschwerten die Beurteilung der Auswirkungen von Meniskusteilresektion und Scaffoldimplantation.

Zum Zeitpunkt der Sektion war der Knorpel in allen Gruppen im zentralen Bereich der Kondylen stärker von Degeneration betroffen als der periphere Bereich der Kondylen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein und ist vermutlich Ausdruck einer generell höheren Belastung des Knorpels im zentralen Bereich der Kondylen (Kelly et al., 2006; Maher et al., 2010).

Weder die makroskopische noch die biomechanische oder die histologische Untersuchung des Gelenkknorpels der Tiere aus Gruppe 2 (Sh) zeigte Unterschiede hinsichtlich des Degenerationsgrades zwischen den operierten und den nicht operierten Gelenken auf. Daher kann trotz der großen Abweichungen innerhalb der Gruppe davon ausgegangen werden, dass die Sham-Operation keinen Einfluss auf den Gelenkknorpel hatte. Bei den Tieren der Scaffold-Gruppe mit dreimonatiger Standzeit gab keine der durchgeführten Untersuchungen Hinweise, dass die Scaffoldimplantation zu degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels geführt hatte. Auch nach sechsmonatiger Scaffoldimplantation war das Ausmaß der degenerativen Veränderungen in den operierten Gelenken mit dem Ausmaß in den nicht operierten Gelenken vergleichbar. Der Knorpel, der direkten Kontakt zu den Scaffolds hatte, war nicht stärker degeneriert als in anderen Bereichen des Gelenks. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Seidenfibroin-Scaffolds an sich nicht zu Knorpelschäden führen. In der Teilresektion-Gruppe zeigten die makroskopische Beurteilung des Knorpels nach Outerbridge, die Färbung mit India Ink, die mechanische sowie die histologische Untersuchung der Knorpelflächen der operierten Gelenke zumindest tendenziell ausgeprägtere degenerative Veränderungen als in den nicht operierten Gelenken. Bei einigen dieser Untersuchungen war die Degeneration

in den operierten Gelenken sogar statistisch signifikant stärker als in den nicht operierten Gelenken. Vor allem im Bereich der Resektion wies der Knorpel in allen Untersuchungen deutlichere Veränderungen auf, als im entsprechenden Bereich der nicht operierten Gelenke. Die Ergebnisse aller Untersuchungen deuten darauf hin, dass durch die Teilresektion eine progressive Knorpeldegeneration ausgelöst wurde. Eindeutigere Unterschiede zwischen der operierten und der nicht operierten Seite waren wahrscheinlich nicht zu sehen, da bereits präoperativ eine unterschiedlich starke Knorpeldegeneration vorgelegen hatte. Möglicherweise war auch die Größe des Defekts von 20 % der Meniskulänge nicht ausreichend, um innerhalb des recht kurzen Versuchszeitraums von sechs Monaten zu deutlicheren arthrotischen Veränderungen in den operierten Gelenken zu führen. Im Vergleich der drei Gruppen mit sechsmonatiger Standzeit wiesen die Tiere der Teilresektion-Gruppe ebenfalls tendenziell ausgeprägtere Knorpeldegenerationen auf als die Tiere der Sham- und der Scaffold-Gruppe. Die biomechanischen Untersuchungen der medialen Tibiakondylen weisen darauf hin, dass zumindest im Bereich des Meniskusdefekts strukturelle Knorpelveränderungen in der Teilresektion-Gruppe aufgetreten waren. Sowohl die elastischen, als auch die viskösen Eigenschaften des Knorpels waren in dieser Gruppe signifikant schlechter als in der Sham-Gruppe und deutlich schlechter als in der Scaffold-Gruppe. Zwischen der Sham- und der Scaffold-Gruppe hingegen bestanden keine Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften des tibialen Knorpels. Ebenso waren die durch die India Ink Färbung deutlich dargestellten Strukturveränderungen des Knorpels in der Teilresektion-Gruppe wesentlich ausgedehnter als in der Sham-Gruppe. Auch bei dieser Untersuchung gab es keine Unterschiede zwischen der Scaffold-Gruppe und der Sham-Gruppe. Bei der Beurteilung des Knorpels nach Mankin sowie bei der Berechnung des Fibrillationsindex traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen auf. In der Teilresektion-Gruppe war der Fibrillationsindex im Bereich des Meniskusdefekts (Schnitt 2) in den operierten Gelenken allerdings sichtbar höher als in den nicht operierten Gelenken und auch der Degenerationsgrad nach Mankin war hier geringfügig höher. Die großen interindividuellen Unterschiede verbunden mit dem teilweise sehr geringen Probenumfang je Gruppe (vgl. Kap. 3.6.3) waren vermutlich verantwortlich für das Ausbleiben von signifikanten Unterschieden bei beiden histologischen Untersuchungsmethoden. Insgesamt weisen aber sowohl die makroskopischen, als auch die biomechanischen und histologischen

Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass in der Teilresektion-Gruppe tendenziell stärkere degenerative Veränderungen auftraten als in der Sham-Gruppe. Zugleich scheint die Scaffoldimplantation das Auftreten von Knorpeldegeneration nach Meniskusteilresektion verzögern zu können.

Die Auswirkungen der Scaffoldimplantation auf die Knorpelgesundheit konnten auch für viele andere Materialien bisher nicht eindeutig geklärt werden. Chiari et al. untersuchten die chondroprotektive Wirkung von Polycaprolacton-Scaffolds mit HYAFF®-Faserverstärkung als Total- und Teilersatz nach sechswöchiger Implantationszeit (2006). Als Kontrollgruppen dienten in dieser Arbeit die nicht operierten kontralateralen Kniegelenke sowie eine Meniskektomie-Gruppe. Sowohl die Meniskektomie als auch der Teil- und Totalersatz mit dem Polycaprolacton-Scaffold führten bereits nach sechs Wochen zu einer wesentlich stärkeren Knorpeldegeneration an Femur und Tibia als in den nicht operierten Kontrollen. In der Meniskektomie-Gruppe traten tendenziell stärkere Veränderungen auf als in den Scaffold-Gruppen. Vor allem in den posterioren Gelenkbereichen traten nach dem Teilersatz mit den Polycaprolacton-Scaffolds weniger Degenerationen auf als nach Totalersatz. Die Autoren vermuten, dass die chondroprotektive Wirkung der getesteten Scaffolds möglicherweise erst nach einer längeren Implantationsdauer eindeutig nachweisbar sei. Außerdem nehmen sie an, dass bereits der operative Zugang zu degenerativen Veränderungen geführt haben könnte. In Folgestudien dieser Arbeitsgruppe wurde das Polycaprolacton-Scaffold als Meniskustotalersatz mit und ohne vorhergehender Kultivierung mit autologen Chondrozyten getestet (Kon et al., 2008; Kon et al., 2012). In diesen Studien wurden die Gelenke der Scaffold-Gruppen mit den Gelenken der Meniskektomie-Gruppe sowie mit nicht operierten und shamoperierten Gelenken verglichen. Nach zwölf Monaten waren in den nicht operierten und den shamoperierten Gelenken makroskopisch und histologisch so gut wie keine degenerativen Veränderungen zu sehen. In den Scaffold-Gruppen und der Meniskektomie-Gruppe hingegen traten deutliche Degenerationen in den operierten Gelenken auf. Makroskopisch waren diese in den Scaffold-Gruppen zwar signifikant niedriger als in der Meniskektomie-Gruppe aber immer noch signifikant höher als in den nicht operierten bzw. shamoperierten Gelenken. Tendenzuell schienen die Polycaprolacton-Scaffolds den Knorpel vor Degenerationen schützen zu können, einen eindeutigen Beweis erbrachten allerdings auch die zwölfmonatigen Studien nicht. Das CMI wurde vor seiner klinischen Einführung *in vivo* am Hundemodell

untersucht (Stone et al., 1992). Hierbei lag das Augenmerk allerdings eindeutig auf dem Regenerationspotential der Scaffolds. Die Auswirkungen der Scaffoldimplantation auf den artikulären Knorpel wurden nicht überprüft. In einer weiteren *in vivo* Studie wurde das CMI als Teilersatz im Schafmodell verwendet (Martinek et al., 2006). Hauptaugenmerk lag auch in dieser Studie auf dem Regenerationspotential der Scaffolds, die Auswirkungen auf die Gelenkgesundheit wurden lediglich makroskopisch untersucht. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchung gingen die Autoren in der Diskussion nicht näher ein. In klinischen Studien verbesserte die CMI-Implantation die subjektive Schmerzempfindung und es konnte eine Aktivitätssteigerung der Patienten nach Scaffoldimplantation gezeigt werden. Ob durch die Implantation der Scaffolds allerdings tatsächlich eine fortschreitende Knorpeldegeneration verhindert werden kann, wurde auch in diesen Studien nicht eindeutig geklärt (Rodkey et al., 2008; Monllau et al., 2011; Zaffagnini et al., 2011; Spencer et al., 2012). In der Studie von Maher et al., in der das Actifit®-Scaffold über einen Zeitraum von zwölf Monaten im ovinen Kniegelenk getestet wurde, konnten weder durch makroskopische noch durch histologische oder MRT-Untersuchungen des tibialen Knorpels Unterschiede zwischen der Scaffold- und der Teilresektion-Gruppe gefunden werden. Da es in dieser Studie keine Kontrollgruppe mit intaktem Meniskus gab, fällt eine Beurteilung dieser Ergebnisse schwer. Einerseits könnte die durchgeführte Teilresektion keine Schäden am Knorpel hervorgerufen haben, andererseits könnte es aber auch sein, dass die Scaffoldimplantation die durch die Teilresektion induzierte Knorpeldegeneration nicht verhindern konnte. Allerdings zeigte diese Studie, dass das Actifit®-Scaffold zumindest als Teilersatz keine starken Knorpelschäden hervorruft, wie sie nach Meniskustotalersatz beobachtet wurden (Tienen et al., 2006b; Hannink et al., 2010). Die Ergebnisse der klinischen Studien lassen auf mögliche chondroprotektive Eigenschaften der Scaffolds schließen, diese müssen allerdings in weiteren Langzeitstudien mit einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden (Efe et al., 2011; Verdonk et al., 2011; Verdonk et al., 2012).

Aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns und Auswertemethoden der aufgeführten *in vivo* Studien ist ein direkter Vergleich der chondroprotektiven Eigenschaften der unterschiedlichen Scaffoldmaterialien schwierig. Meist konnte allerdings kein Vorteil der Scaffoldimplantation gegenüber der Meniskusresektion gezeigt werden oder die Ergebnisse der Studien waren widersprüchlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen hingegen alle darauf hin, dass die

Seidenfibroin-Scaffolds den Knorpel vor Degenerationen schützen können. Weitere Untersuchungen vor allem über einen längeren Zeitraum sind notwendig, um diesen Eindruck durch eindeutige Ergebnisse belegen zu können.

### 4.3 Ausblick

Der Einsatz von Allografts sowie von Scaffolds nach totaler Menishektomie erwies sich meist als unbefriedigend. Als Teilersatz konnten einige Materialien bereits gute Ergebnisse erzielen. Allerdings konnte keines der bisher eingesetzten Materialien alle Anforderungen erfüllen und trotz zahlreicher Studien blieben einige Fragen bisher ungeklärt. Das in dieser Studie untersuchte Seidenfibroin-Scaffold ist ein neuartiges Material für den dauerhaften Meniskusteilersatz. Es erwies sich in diesem Einsatzbereich als biokompatibel und seine mechanischen Eigenschaften erscheinen vielversprechend. Zusätzlich gab es Hinweise, dass das Scaffold den Knorpel möglicherweise vor Degeneration schützen kann. Für einen langfristigen erfolgreichen Einsatz der Scaffolds ist allerdings eine bessere Integration in das Meniskusgewebe unabdingbar. Daher sollte die Interkonnektivität der Poren verbessert und die Größe der Poren angepasst werden. Durch das Einbringen eines Fasernetzwerks kann die Fixierung der Scaffolds optimiert werden. Außerdem sollten verschiedene Fixationstechniken *in vitro* getestet werden, bevor eine weitere *in vivo* Studie mit den verbesserten Scaffolds durchgeführt wird. Zusätzlich muss in zukünftigen Versuchen zur Unterstützung der Scaffoldintegration die Resektion von Meniskusgewebe tatsächlich bis in den vaskularisierten Bereich des Meniskus erfolgen. Um eindeutigere Ergebnisse bezüglich der chondroprotektiven Eigenschaften der Scaffolds zu erhalten, könnte ein größerer Anteil des Meniskus reseziert werden und der Versuchszeitraum auf zwölf Monate ausgedehnt werden. Dadurch wären die degenerativen Veränderungen in der Teilresektion-Gruppe deutlicher ausgeprägt und die Vorteile einer Scaffoldimplantation könnten besser detektiert werden. Zudem wäre die Verwendung jüngerer Tiere mit einer engeren Altersspanne von Vorteil. Die Wahrscheinlichkeit präoperativer Knorpeldegenerationen sowie starker interindividueller Unterschiede wäre dadurch wesentlich geringer und postoperative Veränderungen könnten besser beurteilt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Da man sich den negativen Auswirkungen der totalen sowie partiellen Meniskektomie bewusst ist, wird seit mehreren Jahren nach einem geeigneten Ersatzmaterial für geschädigtes Meniskusgewebe gesucht. Bisher konnte allerdings keines der getesteten Materialien das Meniskusgewebe zufriedenstellend ersetzen. Daher war es Ziel der vorliegenden Studie, ein neuartiges Scaffold auf seine Fähigkeit geschädigtes Meniskusgewebe zu ersetzen zu untersuchen. Das getestete Scaffold wurde aus Seidenfibroin, einem Hauptbestandteil der Seide der Seidenspinnerraupe *Bombyx mori*, hergestellt. Viele Materialien aus Seide konnten bereits in anderen Einsatzgebieten durch ihre gute Biokompatibilität sowie durch hervorragende mechanische Eigenschaften überzeugen. Voruntersuchungen der neuartigen Seidenfibroin-Scaffolds zeigten eine durchschnittliche Porengröße von  $> 100 \mu\text{m}$ . Zusätzlich konnten *in vitro* geeignete mechanische Eigenschaften für den Meniskusersatz sowie eine gute Biokompatibilität der Scaffolds nachgewiesen werden. Daher sollte in der vorliegenden Studie *in vivo* am Schafmodell getestet werden, ob die Seidenfibroin-Scaffolds auch im Kniegelenk biokompatibel sind, ob sie eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen und ob sie die Entstehung degenerativer Knorpelveränderungen verzögern können. Am medialen Meniskus wurde eine partielle Meniskektomie durchgeführt und die Seidenfibroin-Scaffolds in den Meniskusdefekt implantiert. Es gab zwei Scaffold-Gruppen mit unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen. In einer Gruppe betrug die Implantationszeit drei Monate. Das Hauptaugenmerk lag in dieser Gruppe auf möglichen Immunreaktionen gegen das Scaffold. In der anderen Scaffold-Gruppe betrug die Implantationszeit sechs Monate. Als orientierende Vergleichsgruppen wurde eine Tiergruppe shamoperiert, bei einer anderen wurde eine Teilresektion durchgeführt. Der Untersuchungszeitraum dieser beiden Gruppen betrug ebenfalls sechs Monate. Im Vergleich der drei Sechsmontatsgruppen war es möglich die Auswirkungen der Scaffoldimplantation auf die Gelenkgesundheit zu beurteilen. Je Versuchsgruppe wurden 9-10 Tiere operiert. Durch makroskopische, histologische und immunochemische Untersuchungen von Gelenkkapsel, Meniskus und Scaffold sowie Gelenkflüssigkeit wurde die Biokompatibilität der Scaffolds im Kniegelenk überprüft. Die histologischen Untersuchungen der Scaffolds ließen Aussagen über die Bioaktivität und das Einwachsverhalten der Scaffolds zu. Mit makroskopischen, biomechanischen und histologischen Untersuchungsmethoden wurde der Degenerationsgrad des artikulären

Knorpels bestimmt, um mögliche chondroprotektive Eigenschaften der Scaffolds zu ermitteln. Zusätzlich wurden Scaffold- und Meniskusproben biomechanisch untersucht. So konnte überprüft werden, ob die Scaffolds vor sowie nach Implantation aus mechanischer Sicht geeignet sind, verletztes Meniskusgewebe adäquat zu ersetzen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Seidenfibroin-Scaffolds durchaus Potential für die Anwendung als Meniskusteilersatz haben. Die Biokompatibilität der Scaffolds konnte bestätigt und eine Schädigung des Gelenkknorpels durch die Scaffoldimplantation ausgeschlossen werden. Außerdem scheinen die Scaffolds das Auftreten degenerativer Knorpelveränderungen, wie sie nach partieller Meniskektomie zu beobachten sind, verzögern zu können. Vor Implantation wiesen die Scaffolds eine geringere Steifigkeit auf als das native Meniskusgewebe. Im Laufe der Implantation nahm die Steifigkeit der Scaffolds allerdings zu und unterschied sich nach sechs Monaten nicht mehr signifikant von der Steifigkeit des Meniskus. Auf lange Sicht scheinen die Scaffolds demnach das Meniskusgewebe mechanisch ersetzen zu können. Dies ist besonders wichtig, da die Seidenfibroin-Scaffolds einen dauerhaften Meniskusersatz darstellen und nicht wie andere Materialien einer raschen Resorption und Substitution durch Regenerationsgewebe unterliegen. Allerdings zeigte sich in dieser Studie auch, dass die Fixation der Scaffolds nicht in allen Fällen erfolgreich war. Zudem fand während der Implantationszeit keine Integration der Scaffolds in das Meniskusgewebe statt. Meniskusnah waren zwar einige Scaffoldporen mit Zellen und Bindegewebe gefüllt, eine bindegewebige Verwachsung zwischen Scaffold und Meniskus war hingegen weder nach drei- noch nach sechsmonatiger Implantation zu sehen.

Veränderungen der Poreninterkonnektivität, der Porengröße sowie der Fixierbarkeit sind daher vor einem weiteren Einsatz der Scaffolds notwendig. Zudem sollten in einer weiteren *in vivo* Studie die chondroprotektiven Eigenschaften der Seidenfibroin-Scaffolds über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

## 6. SUMMARY

The negative effects of partial and total meniscectomy are widely known. Therefore, many scientists are searching for an adequate material to replace damaged meniscal tissue. However, no tested material was able to replace the meniscus sufficiently. Thus, it was the objective of this study to investigate the ability of an innovative scaffold to replace damaged meniscal tissue. The tested scaffolds were manufactured from silk fibroin. Silk fibroin is one of the main components of the silkworm (*Bombyx mori*) silk and many materials manufactured from this silk already demonstrated a good biocompatibility and excellent mechanical properties in other fields of biomedical applications. *In vitro* investigations of the silk fibroin scaffolds used in this study showed an average pore size of  $> 100 \mu\text{m}$ . In addition, the *in vitro* investigations confirmed a good biocompatibility and suitable mechanical properties to replace meniscal tissue. In the present study, the silk fibroin scaffolds were tested in an *in vivo* sheep model to prove their biocompatibility, their mechanical stability and their ability to delay cartilage degeneration. A partial meniscectomy was carried out at the medial meniscus and the silk fibroin scaffold was implanted into the meniscal defect. There were two scaffold groups with differing observation periods. In one group the implantation period was three months with the primary focus on potential immunological responses to scaffold implantation. The implantation period in the other scaffold group was six months. A sham and a partial meniscectomy group were operated as references and the observation period in these groups was six months as well. This helped to assess the effects of scaffold implantation on joint health. Per group 9-10 animals were operated.

The biocompatibility of the scaffolds inside the knee joint was verified with macroscopic, histological and immunochemical analyses of joint capsule, meniscus and scaffold as well as synovial fluid. Furthermore, the histological examination of the fibroin scaffolds aimed to assess the bioactivity and the ingrowth behaviour of the scaffolds. Macroscopic, biomechanical and histological investigations helped to analyse the degree of cartilage degeneration in order to determine possible chondroprotective properties of the silk fibroin scaffolds. Moreover, specimens of scaffolds and menisci were investigated biomechanically. The aim of this investigation was to verify that the mechanical properties of the scaffolds are suitable to adequately replace meniscal tissue.

The results of this study show that the silk fibroin scaffolds have the potential to be

used as a meniscal replacement. The biocompatibility of the scaffolds was confirmed in this study and the scaffolds did not damage the surrounding articular cartilage. The scaffolds were able to delay the onset of cartilage degeneration in a time frame of six months. Prior to implantation the scaffolds showed a lower stiffness than did the meniscal tissue but over implantation time the stiffness of the scaffolds increased. After six months there was no longer a significant difference between the stiffness of the scaffolds and the meniscal tissue. Therefore, the scaffolds might be able to mechanically replace the meniscus in the long term. This is particularly important since the silk fibroin scaffolds will be used as a permanent meniscal substitute rather than being rapidly degraded and replaced by regeneration tissue like other scaffold materials. However, the fixation of the scaffolds has proved difficult in some cases and no integration of the scaffolds into the meniscus occurred during the implantation period.

Changes of the pore interconnectivity and pore size as well as the feasibility of fixation are necessary prior to further use as a replacement of meniscal tissue. Besides, the chondroprotective properties of the silk fibroin scaffolds should be investigated *in vivo* over an extended period of time.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aagaard H, Jorgensen U, Bojsen-Moller F. Reduced degenerative articular cartilage changes after meniscal allograft transplantation in sheep. *Knee Surg Sport Tr A* 1999; 7: 184-91.
- Ahmed AM, Burke DL. In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints-- Part I: Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng* 1983; 105: 216-25.
- Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 2002; 23: 4131-41.
- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003; 24: 401-16.
- Anderson DR, Woo SL, Kwan MK, Gershuni DH. Viscoelastic shear properties of the equine medial meniscus. *J Orthop Res* 1991; 9: 550-8.
- Andersson-Molina H, Karlsson H, Rockborn P. Arthroscopic partial and total meniscectomy: A long-term follow-up study with matched controls. *Arthroscopy* 2002; 18: 183-9.
- Andrews S, Shrive N, Ronsky J. The shocking truth about meniscus. *J Biomech* 2011; 44: 2737-40.
- Armstrong SJ, Read RA, Price R. Topographical variation within the articular cartilage and subchondral bone of the normal ovine knee joint: a histological approach. *Osteoarthr Cartilage* 1995; 3: 25-33.
- Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982; 10: 90-5.
- Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1988a; 70: 1209-17.
- Arnoczky SP, Adams M, DeHaven KE, Eyre DR, Mow VC. Chapter 12 Meniscus. In: *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Buckwalter JA, ed.: Amer Academy of Orthopaedic 1988b:
- Arnoczky SP. Building a meniscus. Biologic considerations. *Clin Orthop Relat Res* 1999: S244-53.
- Baker BE, Peckham AC, Puppato F, Sanborn JC. Review of meniscal injury and associated sports. *Am J Sports Med* 1985; 13: 1-4.

- Baker P, Coggon D, Reading I, Barrett D, McLaren M, Cooper C. Sports injury, occupational physical activity, joint laxity, and meniscal damage. *J Rheumatol* 2002; 29: 557-63.
- Becker R, Fink C. Epidemiologie und Konsequenz von Meniskusverletzungen. *Arthroskopie* 2008; 21: 221-2.
- Beveridge JE, Shrive NG, Frank CB. Meniscectomy causes significant in vivo kinematic changes and mechanically induced focal chondral lesions in a sheep model. *J Orthop Res* 2011; 29: 1397-405.
- Bradley MP, Fadale PD, Hulstyn MJ, Muirhead WR, Lifrak JT. Porcine small intestine submucosa for repair of goat meniscal defects. *Orthopedics* 2007; 30: 650-6.
- Bruns J, Kahrs J, Kampen J, Behrens P, Plitz W. Autologous perichondral tissue for meniscal replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80: 918-23.
- Bullough PG, Munuera L, Murphy J, Weinstein AM. The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg Br* 1970; 52: 564-7.
- Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RP. Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials* 2004; 25: 1523-32.
- Buma P, van Tienen T, Veth R. The collagen meniscus implant. Expert review of medical devices 2007; 4: 507-16.
- Burger C, Kabir K, Rangger C, Mueller M, Minor T, Tolba RH. Polylactide (LTS) causes less inflammation response than polydioxanone (PDS): a meniscus repair model in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2006; 126: 695-705.
- Burks RT, Metcalf MH, Metcalf RW. Fifteen-year follow-up of arthroscopic partial meniscectomy. *Arthroscopy* 1997; 13: 673-9.
- Calder SJ, Myers PT. Broken arrow: a complication of meniscal repair. *Arthroscopy* 1999; 15: 651-2.
- Caldwell G, Allen A, Fu FH. Functional anatomy and biomechanics of the meniscus. *Oper Techn Sport Med* 1994a; 2: 152-63.
- Caldwell GL, Allen AA, Fu FH. Functional anatomy and biomechanics of the meniscus. *Oper Techn Sport Med* 1994b; 2: 152-63.
- Canham W, Stanish W. A study of the biological behavior of the meniscus as a transplant in

- the medial compartment of a dog's knee. *Am J Sports Med* 1986; 14: 376-9.
- Cassinelli C, Cascardo G, Morra M, Draghi L, Motta A, Catapano G. Physical-chemical and biological characterization of silk fibroin-coated porous membranes for medical applications. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 881-92.
- Chen CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 213-8.
- Chen MI, Branch TP, Hutton WC. Is it important to secure the horns during lateral meniscal transplantation? A cadaveric study. *Arthroscopy* 1996; 12: 174-81.
- Chevrier A, Nelea M, Hurtig MB, Hoemann CD, Buschmann MD. Meniscus structure in human, sheep, and rabbit for animal models of meniscus repair. *J Orthop Res* 2009; 27: 1197-203.
- Chia HN, Hull ML. Compressive moduli of the human medial meniscus in the axial and radial directions at equilibrium and at a physiological strain rate. *J Orthop Res* 2008; 26: 951-6.
- Chiari C, Koller U, Dorotka R, Eder C, Plasenzotti R, Lang S, Ambrosio L, Tognana E, Kon E, Salter D, Nehrer S. A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. *Osteoarthr Cartilage* 2006; 14: 1056-65.
- Cisa J, Basora J, Madarnas P, Ghibely A, Navarro-Quilis A. Meniscal repair by synovial flap transfer. Healing of the avascular zone in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1995; 66: 38-40.
- Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *Am J Sports Med* 1999; 27: 658-65.
- Cox JS, Nye CE, Schaefer WW, Woodstein IJ. The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. *Clin Orthop Relat Res* 1975: 178-83.
- Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U. De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials* 2005; 26: 1987-99.
- Danzig L, Resnick D, Gonsalves M, Akeson WH. Blood Supply to the Normal and Abnormal Menisci of the Human Knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983; 172: 271-6.
- de Groot JH, Zijlstra FM, Kuipers HW, Pennings AJ, Klomp maker J, Veth RP, Jansen HW. Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly(L-lactide/epsilon-caprolactone)

- implants. *Biomaterials* 1997; 18: 613-22.
- Dye SF. Functional morphologic features of the human knee: an evolutionary perspective. *Clin Orthop Relat Res* 2003: 19-24.
- Efe T, Getgood A, Schofer MD, Fuchs-Winkelmann S, Mann D, Paletta JR, Heyse TJ. The safety and short-term efficacy of a novel polyurethane meniscal scaffold for the treatment of segmental medial meniscus deficiency. *Knee Surg Sport Tr A* 2011; 20: 1822-30.
- Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* 1948; 30B: 664-70.
- Fan H, Liu H, Toh SL, Goh JC. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials* 2009; 30: 4967-77.
- Fithian DC, Kelly MA, Mow VC. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res* 1990: 19-31.
- Ford GM, Hegmann KT, White GL, Jr., Holmes EB. Associations of body mass index with meniscal tears. *Am J Prev Med* 2005; 28: 364-8.
- Galley NK, Gleghorn JP, Rodeo S, Warren RF, Maher SA, Bonassar LJ. Frictional Properties of the Meniscus Improve After Scaffold-augmented Repair of Partial Meniscectomy: A Pilot Study. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469: 2817-23.
- Ghadially FN, Thomas I, Yong N, Lalonde JM. Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages. *J Anat* 1978; 125: 499-517.
- Ghadially FN, Wedge JH, Lalonde JM. Experimental methods of repairing injured menisci. *J Bone Joint Surg Br* 1986; 68: 106-10.
- Govoni VM, Rahal SC, Agostinho FS, Conceicao RT, Tsunemi MH, El-Warrak AO. Goniometric measurements of the forelimb and hindlimb joints in sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012; 25: 297-300.
- Greis PE, Bardana DD, Holmstrom MC, Burks RT. Meniscal injury: I. Basic science and evaluation. *J Am Acad Orthop Surg* 2002a; 10: 168-76.
- Greis PE, Holmstrom MC, Bardana DD, Burks RT. Meniscal injury: II. Management. *J Am Acad Orthop Surg* 2002b; 10: 177-87.
- Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-

- 1CE $\leq$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 2002; 130: 90-6.
- Grood ES, Noyes FR, Butler DL, Suntay WJ. Ligamentous and capsular restraints preventing straight medial and lateral laxity in intact human cadaver knees. *J Bone Joint Surg Am* 1981; 63: 1257-69.
- Gu YL, Wang YB. Treatment of meniscal injury: a current concept review. *C J Trauma* 2010; 13: 370-6.
- Halsted W. Ligature and suture material: The employment of fine silk in preference to catgut and the advantages of transfixion of tissues and vessels in control of hemorrhage also an account of the introduction of gloves, gutta-percha tissue and silver foil. *JAMA* 1913; 60: 1119-26.
- Hannink G, van Tienen TG, Schouten AJ, Buma P. Changes in articular cartilage after meniscectomy and meniscus replacement using a biodegradable porous polymer implant. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 19: 441-51.
- Hayward AL, Deehan DJ, Aspden RM, Sutherland AG. Analysis of sequential cytokine release after ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011; 19: 1709-15.
- Heller MO, Duda GN, Ehrig RM, Schell H, Seebeck P, Taylor WR. Muskuloskeletale Belastungen im Schafshinterlauf: Mechanische Rahmenbedingungen der Heilung. *Mater Wiss Werkst Tech* 2005; 36: 775-80.
- Hellio Le Graverand M, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hart DA, Natsume T, Rattner JB. The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat* 2001a; 198: 525-35.
- Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness IG, Hart DA. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I: Cellular and matrix alterations. *Osteoarthr Cartilage* 2001b; 9: 56-64.
- Hench LL. Bioactive ceramics. *Ann NY Acad Sci* 1988; 523: 54-71.
- Henning CE, Clark JR, Lynch MA, Stallbaumer R, Yearout KM, Vequist SW. Arthroscopic meniscus repair with a posterior incision. *Instructional course lectures* 1988; 37: 209-21.
- Henning CE, Lynch MA, Yearout KM, Vequist SW, Stallbaumer RJ, Decker KA. Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop Relat Res* 1990: 64-72.

- Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 635-40.
- Hoberg M, Uzunmehmetoglu G, Sabic L, Reese S, Aicher WK, Rudert M. [Characterisation of human meniscus cells]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2006; 144: 172-8.
- Hosseini A, Van de Velde SK, Kozanek M, Gill TJ, Grodzinsky AJ, Rubash HE, Li G. In-vivo time-dependent articular cartilage contact behavior of the tibiofemoral joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 909-16.
- Ignatius AA, Claes LE. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL- lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 1996; 17: 831-9.
- Ingman AM, Ghosh P, Taylor TKF. Variation of Collagenous and Non-Collagenous Proteins of Human Knee Joint Menisci with Age and Degeneration. *Gerontology* 1974; 20: 212-23.
- Jackson DW, McDevitt CA, Simon TM, Arnoczky SP, Atwell EA, Silvino NJ. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in goats. *Am J Sports Med* 1992; 20: 644-56.
- Jaureguito JW, Elliot JS, Lietner T, Dixon LB, Reider B. The effects of arthroscopic partial lateral meniscectomy in an otherwise normal knee: a retrospective review of functional, clinical, and radiographic results. *Arthroscopy* 1995; 11: 29-36.
- Joshi MD, Suh JK, Marui T, Woo SL. Interspecies variation of compressive biomechanical properties of the meniscus. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 823-8.
- Kaplan LD, Lu Y, Snitzer J, Nemke B, Hao Z, Biro S, Albiero W, Stampfli HF, Markel M, Popkin C, Baum SZ. The effect of early hyaluronic acid delivery on the development of an acute articular cartilage lesion in a sheep model. *Am J Sports Med* 2009; 37: 2323-7.
- Kelly BT, Potter HG, Deng XH, Pearle AD, Turner AS, Warren RF, Rodeo SA. Meniscal allograft transplantation in the sheep knee: evaluation of chondroprotective effects. *Am J Sports Med* 2006; 34: 1464-77.
- Kelly BT, Robertson W, Potter HG, Deng XH, Turner AS, Lyman S, Warren RF, Rodeo SA. Hydrogel meniscal replacement in the sheep knee: preliminary evaluation of chondroprotective effects. *Am J Sports Med* 2007; 35: 43-52.
- Kempson GE, Freeman MA, Swanson SA. The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests of the human femoral head. *J Biomech* 1971; 4: 239-50.

- Klomp maker J, Jansen HW, Veth RP, de Groot JH, Nijenhuis AJ, Pennings AJ. Porous polymer implant for repair of meniscal lesions: a preliminary study in dogs. *Biomaterials* 1991; 12: 810-6.
- Klomp maker J, Jansen HW, Veth RP, Nielsen HK, de Groot JH, Pennings AJ. Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage. *Clin Mater* 1993; 14: 1-11.
- Klomp maker J, Veth RP, Jansen HW, Nielsen HK, de Groot JH, Pennings AJ. Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog. *Biomaterials* 1996; 17: 1169-75.
- Kocabey Y, Taser O, Nyland J, Doral MN, Demirhan M, Caborn DN, Sarban S. Pullout strength of meniscal repair after cyclic loading: comparison of vertical, horizontal, and oblique suture techniques. *Knee Surg Sport Tr A* 2006; 14: 998-1003.
- Kohn D, Wirth CJ, 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* 1992; 74: 910-7.
- Kohn D, Rudert M, Wirth CJ, Plitz W, Reiss G, Maschek H. Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. An experimental study in sheep. *Int Orthop* 1997; 21: 232-8.
- Kolbe R. Tissue Engineering Meniskus [Dissertation]. Universität Ulm 2013
- Kon E, Chiari C, Marcacci M, Delcogliano M, Salter DM, Martin I, Ambrosio L, Fini M, Tschon M, Tognana E, Plasenzotti R, Nehrer S. Tissue engineering for total meniscal substitution: animal study in sheep model. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 1067-80.
- Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giavaresi G, Francioli S, Martin I, Pressato D, Arcangeli E, Quarto R, Sandri M, Marcacci M. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res* 2010; 28: 116-24.
- Kon E, Filardo G, Tschon M, Fini M, Giavaresi G, Reggiani LM, Chiari C, Nehrer S, Martin I, Salter DM, Ambrosio L, Marcacci M. Tissue Engineering for Total Meniscal Substitution: Animal Study in Sheep Model-Results at 12 Months. *Tissue Eng Part A* 2012; 18: 1573-82.
- Kondo E, Yasuda K, Katsura T, Hayashi R, Kotani Y, Tohyama H. Biomechanical and histological evaluations of the doubled semitendinosus tendon autograft after anterior

- cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med* 2012; 40: 315-24.
- Kopf S, Birkenfeld F, Becker R, Petersen W, Starke C, Wruck CJ, Tohidnezhad M, Varoga D, Pufe T. Local treatment of meniscal lesions with vascular endothelial growth factor. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92: 2682-91.
- Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58: 599-604.
- Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res* 1980: 283-90.
- Kutzner I, Heinlein B, Graichen F, Bender A, Rohlmann A, Halder A, Beier A, Bergmann G. Loading of the knee joint during activities of daily living measured in vivo in five subjects. *J Biomech* 2010; 43: 2164-73.
- Leal-Egana A, Scheibel T. Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2010; 55: 155-67.
- Lee SJ, Aadalen KJ, Malaviya P, Lorenz EP, Hayden JK, Farr J, Kang RW, Cole BJ. Tibiofemoral contact mechanics after serial medial meniscectomies in the human cadaveric knee. *Am J Sports Med* 2006; 34: 1334-44.
- Lee-Shee NK, Dickey JP, Hurtig MB. Contact mechanics of the ovine stifle during simulated early stance in gait. An in vitro study using robotics. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2007; 20: 70-2.
- Levy IM, Torzilli PA, Warren RF. The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64: 883-8.
- Little C, Smith S, Ghosh P, Bellenger C. Histomorphological and immunohistochemical evaluation of joint changes in a model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy in sheep. *J Rheumatol* 1997; 24: 2199-209.
- Macconail MA. The Function of Intra-Articular Fibrocartilages, with Special Reference to the Knee and Inferior Radio-Ulnar Joints. *J Anat* 1932; 66: 210-27.
- MacIntosh AC, Kearns VR, Crawford A, Hatton PV. Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 71-80.
- Maher SA, Rodeo SA, Doty SB, Brophy R, Potter H, Foo LF, Rosenblatt L, Deng XH, Turner

- AS, Wright TM, Warren RF. Evaluation of a porous polyurethane scaffold in a partial meniscal defect ovine model. *Arthroscopy* 2010; 26: 1510-9.
- Maher SA, Rodeo SA, Potter HG, Bonassar LJ, Wright TM, Warren RF. A Pre-Clinical Test Platform for the Functional Evaluation of Scaffolds for Musculoskeletal Defects: The Meniscus. *Hss J* 2011; 7: 157-63.
- Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 2011; 32: 7411-31.
- Maletius W, Messner K. Chondral damage and age depress the long-term prognosis after partial meniscectomy. A 12- to 15-year follow-up study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1996; 3: 211-4.
- Mandal BB, Park SH, Gil ES, Kaplan DL. Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32: 639-51.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971; 53: 523-37.
- Martinek V, Ueblacker P, Braun K, Nitschke S, Mannhardt R, Specht K, Gansbacher B, Imhoff AB. Second generation of meniscus transplantation: in-vivo study with tissue engineered meniscus replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 2006; 126: 228-34.
- Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep Model in Orthopedic Research: A Literature Review. *Comparative Medicine* 2001; 51: 292-9.
- Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, Zoer B, van Roermund PM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis. *Rheumatology* 2006; 45: 405-13.
- Matsumoto H, Suda Y, Otani T, Niki Y, Seedhom BB, Fujikawa K. Roles of the anterior cruciate ligament and the medial collateral ligament in preventing valgus instability. *J Orthop Sci* 2001; 6: 28-32.
- McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1990: 8-18.
- McNicholas MJ, Rowley DI, McGurty D, Adalberth T, Abdon P, Lindstrand A, Lohmander LS.

- Total meniscectomy in adolescence. A thirty-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 217-21.
- Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, Zichner L, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2005; 26: 147-55.
- Merkel M. Strukturanalyse, Dauerbelastbarkeit und Optimierung der Zellbesiedelung von Seidenfibroin-Scaffolds [Masterarbeit]. Hochschule Ulm 2012
- Messner K. The concept of a permanent synthetic meniscus prosthesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using Dacron and Teflon implants. *Biomaterials* 1994; 15: 243-50.
- Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 1998; 193 ( Pt 2): 161-78.
- Milachowski KA, Weismeier K, Wirth CJ. Homologous meniscus transplantation. Experimental and clinical results. *Int Orthop* 1989; 13: 1-11.
- Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A, Postacchini R, Saccomanno MF, Fabbriciani C. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy* 2012; 28: 688-701.
- Miller MD, Kline AJ, Jepsen KG. "All-inside" meniscal repair devices: an experimental study in the goat model. *Am J Sports Med* 2004; 32: 858-62.
- Monllau JC, Gelber PE, Abat F, Pelfort X, Abad R, Hinarejos P, Tey M. Outcome after partial medial meniscus substitution with the collagen meniscal implant at a minimum of 10 years' follow-up. *Arthroscopy* 2011; 27: 933-43.
- Müller-Rath R, Mumme T, Miltner O, Andereya S, Schneider U. [Meniscus replacement: current aspects in the field of tissue engineering]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2004; 142: 540-5.
- Müller-Rath R, Höher J. Meniskusschaden: Resektion - Refixation - Ersatz. *Knie* 2007; Volume 12: 39-49.
- Murlimanju BV, Nair N, Kumar B, Krishnamurthy A, Gupta C, Chethan P. Clinically oriented morphometric study of medial and lateral menisci of the knee joint in adult cadavers. *Clin*

Ter 2012; 163: 105-8.

Mutschler W, Claes L (1985) Knorpeltransplantation. Tierexperimentelle Untersuchungen über Biomechanik und Morphologie von autologen und homologen Knorpelstücktransplantaten sowie homologen Chondrozytensuspensionen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

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. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; 391: S208-S18.

Oretrop N, Gillquist J. Partial meniscectomy preferred. *Br Med J* 1978; 2: 55.

Otte S, Klinger HM, Beyer J, Baums MH. Complications after meniscal repair with bioabsorbable arrows: two cases and analysis of literature. *Knee Surg Sport Tr A* 2002; 10: 250-3.

Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br* 1961; 43-B: 752-7.

Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin H-J, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials* 2003; 24: 3079-85.

Pape D, Duchow J, Rupp S, Seil R, Kohn D. Partial release of the superficial medial collateral ligament for open-wedge high tibial osteotomy. A human cadaver study evaluating medial joint opening by stress radiography. *Knee Surg Sport Tr A* 2006; 14: 141-8.

Pastoureau P, Chomel A. Methods for cartilage and subchondral bone histomorphometry. *Methods Mol Med* 2004; 101: 79-91.

Petersen W, Tillmann B. Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl)* 1998; 197: 317-24.

Poehling GG, Ruch DS, Chabon SJ. The landscape of meniscal injuries. *Clin Sports Med* 1990; 9: 539-49.

Proctor CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res* 1989; 7: 771-82.

Rattner JB, Matyas JR, Barclay L, Holowaychuk S, Sciore P, Lo IK, Shrive NG, Frank CB, Achari Y, Hart DA. New understanding of the complex structure of knee menisci:

- implications for injury risk and repair potential for athletes. *Scand J Med Sci Sports* 2011; 21: 543-53.
- Ricklin P, Del Buono MS, R uttimann A (1971) Meniscus Lesions: Practical Problems of Diagnosis, Arthrography and Therapy. G. Thieme
- Riera K, Rothfusz N, Wilusz R, Weinberg J, Guilak F, L McNulty A. Interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 and integrative meniscal repair: influences on meniscal cell proliferation and migration. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R187.
- Rijk PC. Meniscal allograft transplantation--part II: alternative treatments, effects on articular cartilage, and future directions. *Arthroscopy* 2004; 20: 851-9.
- Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery WH, 3rd, Baker CL, Jr., Beck CL, Jr., Hormel SE, Steadman JR, Cole BJ, Briggs KK. Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90: 1413-26.
- Roos EM, Ostenberg A, Roos H, Ekdahl C, Lohmander LS. Long-term outcome of meniscectomy: symptoms, function, and performance tests in patients with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls. *Osteoarthr Cartilage* 2001; 9: 316-24.
- Ryu RK, Dunbar VW, Morse GG. Meniscal allograft replacement: a 1-year to 6-year experience. *Arthroscopy* 2002; 18: 989-94.
- Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 382-9.
- Seil R, Kohn D. [Meniscus reconstruction. Established and innovative methods]. *Unfallchirurg* 2001; 104: 274-87.
- Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, Park YS, Park JK. Increase in cell migration and angiogenesis in a composite silk scaffold for tissue-engineered ligaments. *J Orthop Res* 2009; 27: 495-503.
- Setton LA, Guilak F, Hsu EW, Vail TP. Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res* 1999: S254-72.
- Shao XT, Feng L, Gu LJ, Wu LJ, Feng TT, Yang YM, Wu NP, Yao HP. Expression of

- interleukin-18, IL-18BP, and IL-18R in serum, synovial fluid, and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* 2009; 9: 215-21.
- Shiramizu K, Vizesi F, Bruce W, Herrmann S, Walsh WR. Tibiofemoral contact areas and pressures in six high flexion knees. *Int Orthop* 2009; 33: 403-6.
- Shoemaker SC, Markolf KL. The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee. Effects of partial versus total excision. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68: 71-9.
- Shrive NG, O'Connor JJ, Goodfellow JW. Load-bearing in the knee joint. *Clin Orthop Relat Res* 1978: 279-87.
- Skaggs DL, Warden WH, Mow VC. Radial tie fibers influence the tensile properties of the bovine medial meniscus. *J Orthop Res* 1994; 12: 176-85.
- Sommerlath K, Gillquist J. The effect of a meniscal prosthesis on knee biomechanics and cartilage. An experimental study in rabbits. *Am J Sports Med* 1992; 20: 73-81.
- Spencer SJ, Saithna A, Carmont MR, Dhillon MS, Thompson P, Spalding T. Meniscal scaffolds: Early experience and review of the literature. *Knee* 2012: Epub ahead of print.
- Steadman JR, Rodkey WG. Tissue-Engineered Collagen Meniscus Implants: 5- to 6-Year Feasibility Study Results. *Arthroscopy* 2005; 21: 515-25.
- Stollsteimer GT, Shelton WR, Dukes A, Bomboy AL. Meniscal allograft transplantation: a 1- to 5-year follow-up of 22 patients. *Arthroscopy* 2000; 16: 343-7.
- Stone KR, Rodkey WG, Webber R, McKinney L, Steadman JR. Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. *Am J Sports Med* 1992; 20: 104-11.
- Stryer L (1996) *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verl.
- Sutton JB (1897) *Ligaments. Their Nature and Morphology*. H.K. Lewis & Co., London
- Taylor WR, Ehrig RM, Heller MO, Schell H, Seebeck P, Duda GN. Tibio-femoral joint contact forces in sheep. *J Biomech* 2006; 39: 791-8.
- Taylor WR, Poeplau BM, Konig C, Ehrig RM, Zachow S, Duda GN, Heller MO. The medial-lateral force distribution in the ovine stifle joint during walking. *J Orthop Res* 2011; 29: 567-71.

- Tienen TG, Heijkants RG, de Groot JH, Pennings AJ, Schouten AJ, Veth RP, Buma P. Replacement of the knee meniscus by a porous polymer implant: a study in dogs. *Am J Sports Med* 2006a; 34: 64-71.
- Tienen TG, Heijkants RG, de Groot JH, Schouten AJ, Pennings AJ, Veth RP, Buma P. Meniscal replacement in dogs. Tissue regeneration in two different materials with similar properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006b; 76: 389-96.
- Tovar N, Murthy NS, Kohn J, Gatt C, Dunn M. ACL reconstruction using a novel hybrid scaffold composed of polyarylate fibers and collagen fibers. *J Biomed Mater Res A* 2012; 14: 34229.
- Toyonaga T, Uezaki N, Chikama H. Substitute meniscus of Teflon-net for the knee joint of dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 291-7.
- Verdonk P, Beaufils P, Bellemans J, Djian P, Heinrichs EL, Huysse W, Laprell H, Siebold R, Verdonk R. Successful treatment of painful irreparable partial meniscal defects with a polyurethane scaffold: two-year safety and clinical outcomes. *Am J Sports Med* 2012; 40: 844-53.
- Verdonk R, Verdonk P, Huysse W, Forsyth R, Heinrichs EL. Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions. *Am J Sports Med* 2011; 39: 774-82.
- Vila Ns, Castillo J, D<sup>l</sup>evalos A, Chamorro Å. Proinflammatory Cytokines and Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke. *Stroke* 2000; 31: 2325-9.
- Voloshin AS, Wosk J. Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng* 1983; 5: 157-61.
- Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, Kirker-Head C, Kaplan DL. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29: 3415-28.
- Waters NE. The indentation of thin rubber sheets by cylindrical indentors. *Br J Appl Phys* 1965; 16: 1387.
- Webber RJ, Harris MG, Hough AJ. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: Proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *Journal of Orthopaedic Research* 1985; 3: 36-42.

- Weiler A, Hoffmann RF, Stahelin AC, Helling HJ, Sudkamp NP. Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy* 2000; 16: 305-21.
- Welch JA, Montgomery RD, Lenz SD, Plouhar P, Shelton WR. Evaluation of small-intestinal submucosa implants for repair of meniscal defects in dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63: 427-31.
- Welsing RT, van Tienen TG, Ramrattan N, Heijkants R, Schouten AJ, Veth RP, Buma P. Effect on tissue differentiation and articular cartilage degradation of a polymer meniscus implant: A 2-year follow-up study in dogs. *Am J Sports Med* 2008; 36: 1978-89.
- Winby CR, Lloyd DG, Besier TF, Kirk TB. Muscle and external load contribution to knee joint contact loads during normal gait. *J Biomech* 2009; 42: 2294-300.
- Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, Weismeier KG, Kohn D. Long-term results of meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med* 2002; 30: 174-81.
- Wood DJ, Minns RJ, Strover A. Replacement of the rabbit medial meniscus with a polyester-carbon fibre bioprosthesis. *Biomaterials* 1990; 11: 13-6.
- Yan LP, Oliveira JM, Oliveira AL, Caridade SG, Mano JF, Reis RL. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2012; 8: 289-301.
- Zaffagnini S, Marcheggiani Muccioli GM, Lopomo N, Bruni D, Giordano G, Ravazzolo G, Molinari M, Marcacci M. Prospective long-term outcomes of the medial collagen meniscus implant versus partial medial meniscectomy: a minimum 10-year follow-up study. *Am J Sports Med* 2011; 39: 977-85.
- Zhang Z, Arnold JA, Williams T, McCann B. Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats. *Am J Sports Med* 1995; 23: 35-41.
- Zimny ML, Albright DJ, Dabezies E. Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta anat* 1988; 133: 35-40.
- Zur G, Linder-Ganz E, Elsner JJ, Shani J, Brenner O, Agar G, Hershman EB, Arnoczky SP, Guilak F, Shterling A. Chondroprotective effects of a polycarbonate-urethane meniscal implant: histopathological results in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 19: 255-63.

## **8. DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Anita Ignatius und Herrn Prof. Lutz Dürselen für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik. Vielen Dank für die fachliche Unterstützung sowie das Vertrauen das mir während meiner Zeit am Institut entgegengebracht wurde.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Herrn Prof. Benedikt Friemert sowie Herrn Dr. Falk von Lübken vom Bundeswehrkrankenhaus Ulm gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Erlernung der Operationstechnik.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei all denen, die mir während der vielen Stunden im OP helfend zur Seite standen. Besonders zu erwähnen sind hier Sandra Reitmaier, Uschi Maile, Ronny Bindl und Stefan Recknagel.

Weiterhin möchte ich mich bei Uschi Maile für die große Hilfe bei der OP-Vorbereitung sowie Anfertigung der histologischen Präparate bedanken. Auch Marion Tomo danke ich für die Anfertigung der unzähligen histologischen Präparate.

Patrizia Horny danke ich für die geduldige Einführung in die biomechanischen Testverfahren sowie die Anfertigung der professionellen Computergrafiken für diese Arbeit.

Den Tierärzten des Tierforschungszentrums Oberberghof der Uniklinik Ulm, allen voran Frau Dr. Christina Sand, möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit sowie die tatkräftige Unterstützung während der Operationen danken. Den Tierpflegern des Tierforschungszentrums danke ich für die zuverlässige und liebevolle Versorgung der Schafe.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für das nette und kollegiale Arbeitsklima sowie die ausgesprochene Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemen.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung bedanken.