

**Weiterentwicklung eines Seidenfibroin Implantats
für den Meniskusersatz –
eine *in vivo* Studie**

von Svenja Emmi Catherine Klose

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

**Weiterentwicklung eines Seidenfibroin Implantats
für den Meniskusersatz -
eine *in vivo* Studie**

von Svenja Emmi Catherine Klose
aus Ulm

München 2018

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

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm

Mentor: Prof. Dr. Lutz Dürselen

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/-in: Prof. Dr. Susanne Lauer

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Für meinen Onkel
in liebevoller Erinnerung und Dankbarkeit

Ziele nach dem Mond.
Selbst wenn du ihn verfehlst, wirst du zwischen den Sternen landen.

Friedrich Nietzsche

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Anatomie der Menisken	1
1.1.1. Makroskopische Anatomie des Meniskus	1
1.1.2. Mikroskopischer Aufbau	3
1.1.3. Blutversorgung und Innervation	5
1.2. Biomechanik der Menisken	6
1.2.1. Materialeigenschaften des Meniskus	6
1.2.2. Funktion der Menisken	7
1.3. Verletzungen des Meniskus	10
1.4. Therapie von Meniskusverletzungen	13
1.4.1. Konservative Behandlung.....	13
1.4.2. Resektion des Meniskus	14
1.4.3. Reparatur des Meniskus	15
1.4.4. Ersatz des geschädigten Meniskus.....	16
1.5. Ziel der Studie	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Optimiertes Seidenfibroin Implantat	23
2.2. Tierversuch	24
2.2.1. Tiere und Haltung	24
2.2.2. Versuchsdesign	25
2.2.3. Operation	25
2.2.4. Postoperative Versorgung.....	33
2.2.5. Versuchsende.....	34
2.3. Aufarbeitung der Proben	34
2.3.1. Präparation.....	34
2.3.2. Makroskopische Untersuchung.....	36
2.3.3. Biomechanische Untersuchung.....	37
2.3.4. Bildgebung (MRT).....	44
2.3.5. India Ink	46
2.3.6. Histologische Untersuchung.....	48
2.4. Statistik	53
3. Ergebnisse	55
3.1. Operationsverlauf	55

3.2. Klinischer Verlauf	55
3.3. Makroskopische Untersuchung	56
3.3.1. Allgemeine Untersuchung der operierten Gliedmaße	56
3.3.2. Menisken/Implantate.....	56
3.3.3. Gelenkknorpel.....	60
3.4. Biomechanische Untersuchung	66
3.4.1. Seidenfibroin Implantat und Meniskus.....	66
3.4.2. Tibialer Knorpel.....	67
3.5. Bildgebende Untersuchung	70
3.6. Färbung mit India Ink	73
3.7. Histologische Untersuchung	78
3.7.1. Synovialmembran	78
3.7.2. Meniskus/Implantat.....	83
3.7.3. Tibialer Gelenkknorpel	89
4. Diskussion	99
4.1. Wichtigste Ergebnisse und Einordnung in die Literatur	99
4.1.1. Untersuchung des operierten Kniegelenks	99
4.1.2. Synovialmembran	99
4.1.3. Medialer Meniskus.....	100
4.1.4. Seidenfibroin Implantat.....	102
4.1.5. Gelenkknorpel.....	106
4.2. Kritische Betrachtung der Methodik	110
4.2.1. Tiermodell.....	110
4.2.2. Versuchsdesign	112
4.3. Ausblick	115
5. Zusammenfassung	117
6. Summary	120
7. Abbildungsverzeichnis	122
8. Tabellenverzeichnis	129
9. Literaturverzeichnis	130
Danksagung	141

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
A_G	Summe der Pixel des gesamten segmentierten Bildes
A_i	India Ink gefärbte Knorpelfläche
Abs.	Absatz
Art.	Artikel
CMF	<i>Condylus medialis femoris</i>
CMI®	Collagen Meniscus Implant®
CMT	<i>Condylus medialis tibiae</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_{eq}	Gleichgewichtsmodul
ε	Dehnung
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
F_{eq}	Kraft im Gleichgewichtszustand
FFE	Fast-Field-Echo
FI	Fibrillationsindex
FoV	Sichtfeld
GAG	Glykosaminoglykane
h₀	Knorpeldicke
H_A	Elastizitätsmodul im Gleichgewichtszustand (Aggregate Modulus)
HE	Hämatoxin-Eosin
HI-Viren	Humane Immundefizienz-Viren
ISAKOS	International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine
KG	Körpergewicht
k_{eq}	Steifigkeit im Gleichgewichtszustand
L	Lateral
l₀	Initiale Probenhöhe
LCM	<i>Ligamentum collaterale mediale</i>
Lig.	<i>Ligamentum</i>
Δl	Verformung
Δl_{eq}	Verformung im Gleichgewichtszustand
M	Medial
MM	<i>Meniscus medialis</i>

MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
SI	Seidenfibroin Implantat
σ	Spannung der Probe (Kraft pro Fläche)
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
USP	United States Pharmacopeia
μ-CT	Mikro-Computertomographie
3D	Dreidimensional

1. Einleitung

Rund 37 % aller Sportverletzungen betreffen das Kniegelenk, was dessen Vulnerabilität deutlich macht. Hierzu führten Majewski et al. eine Studie an circa 17 000 Patienten mit Sportverletzungen in der Schweiz durch [Majewski, et al. 2006]. Die zweit-häufigste Verletzung innerhalb des Kniegelenks war dabei eine Läsion des medialen Meniskus (24 %), wovon rund 80 % operativ versorgt werden mussten. So belegten auch in Deutschland Operationen an den Menisken und den Gelenkknorpeln des Kniegelenks mit rund 270 000 durchgeführten Eingriffen im Jahr 2015 Rang vier der 50 häufigsten Operationen an vollstationären Patienten in deutschen Krankenhäusern [Gesundheitsberichterstattung 2015]. Die Therapie besteht in den meisten Fällen aus einer Resektion des verletzten Meniskusgewebes. Man weiß jedoch seit einiger Zeit, dass es nach Meniskektomie auf lange Sicht zur Degeneration des artikulären Knorpels kommen kann. Daher werden Alternativtherapien, welche die biomechanische Funktion des Meniskus wiederherstellen, dringend benötigt.

1.1. Anatomie der Menisken

1.1.1. Makroskopische Anatomie des Meniskus

Die zwei halbmondförmigen Menisken des humanen Kniegelenks bestehen aus Faserknorpel und befinden sich zwischen den artikulierenden Flächen von Femur und Tibia (Abbildung 1 A, B). Der mediale, sichelförmige Meniskus und der eher ovale, laterale Meniskus sind über ihre anterioren und posterioren Verankerungsligamente am Tibiaplateau, im Bereich der *Area intercondylaris* befestigt [Aumüller, et al. 2014] (Abbildung 1 C). Zusätzlich sind beide Menisken an ihrem peripheren Rand mit der Gelenkkapsel verbunden. Der mediale Meniskus verfügt, im Gegensatz zum lateralen Meniskus, hier auch über eine feste Verbindung zum medialen Seitenband (*Ligamentum collaterale tibiale mediale*) des Kniegelenks. Dies führt zu einer deutlich geringeren Beweglichkeit, verglichen mit dem lateralen Meniskus.

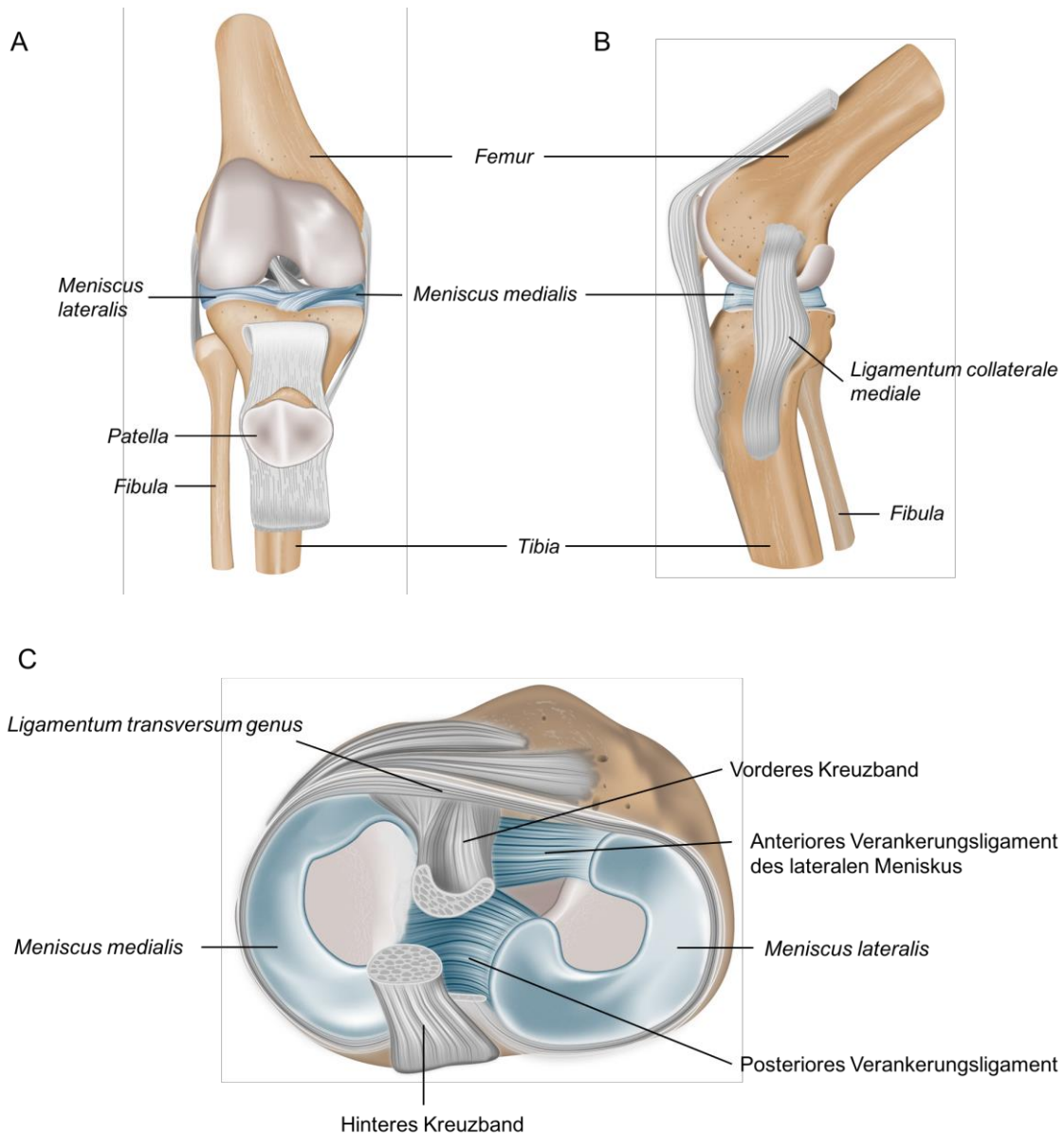


Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Kniegelenks. (A) Frontalansicht. (B) Ansicht von medial. (C) Aufsicht aus das Tibiaplateau. Eigene Abbildungen in Anlehnung an Schünke, et al. 2014.

Im Querschnitt wird die Keilform der Menisken mit einem hohen peripheren Rand (Meniskusbasis), der nach zentral flach ausläuft, deutlich. Sie sind dadurch in der Lage, die Kongruenz zwischen den konvexen Femurcondylen und dem relativ flachen Tibiaplateau zu erhöhen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass rund 70% der Gelenkfläche von den Menisken bedeckt ist [Fukubayashi and Kurosawa 1980].

Die Menisken können in Vorderhorn, *Pars intermedia* und Hinterhorn unterteilt werden. Die Vorderhörner des medialen und lateralen Meniskus sind über das intermeniskale Band (*Ligamentum transversum genus*) miteinander verbunden. Der laterale Meniskus verfügt außerdem in unterschiedlicher Ausprägung über ein anteriores (Humphrey-

Ligament) und/oder ein posteriores meniskofemorales Band (Wrisberg-Ligament), die vom posterioren Horn des lateralen Meniskus an die Innenseite des medialen Femurkondylus ziehen [Radoievitch 1931]. Diese können sowohl gemeinsam, als auch unabhängig voneinander vorkommen [Gupte, et al. 2002].

Die grundsätzliche Form der Menisken stimmt bei allen Säugetieren überein [Parsons 1900]. Jedoch unterscheidet sich die Verankerung der Menisken bei Vierfüßern von der beim Menschen beschriebenen Fixierung [Parsons 1900, Gupte, et al. 2007]. Zwar ist bei vierbeinigen Säugetieren das Hinterhorn des lateralen Meniskus auch über eine dem posterioren meniskofemorale Ligament entsprechende Struktur an der Innenseite der medialen Femurkondyle fixiert, jedoch ist diese wesentlich stärker ausgeprägt als beim Mensch. Die posteriore tibiale Verankerung des lateralen Meniskus fehlt gänzlich oder besteht nur aus einzelnen Fasern [Parsons 1900, Gupte, et al. 2007]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei Vierfüßern das Kniegelenk in ständiger Flexion belastet wird. Zusammen mit einer stärkeren Reklination der Tibia führt dies zu einer erhöhten Rollbewegung der lateralen Femurkondyle nach posterior. Um diese Bewegung einzugrenzen und der damit verbundenen hohen Belastung standzuhalten, ist das posteriore meniskofemorale Band hier entsprechend stark ausgebildet.

1.1.2. Mikroskopischer Aufbau

Mit rund 72 % ist Wasser der Hauptbestandteil des gesunden humanen Meniskus [Herwig, et al. 1984]. Von seinem Trockengewicht entfallen 75 % auf Kollagen, 8-13 % auf Nicht-Kollagen-Proteine und 1 % auf Hexosamin [Peters and Smillie 1972, Ingman, et al. 1974]. Bezeichnend für das histologisch als Faserknorpel klassifizierte Meniskusgewebe ist dessen spezifischer Aufbau aus einem fibrösen Netzwerk aus Kollagenfasern. In dieses Geflecht sind spezielle Zellen eingelagert, welche die extrazelluläre Matrix produzieren und aufrechterhalten. Hier können verschiedene Arten von Zellen unterschieden werden [Ghadially, et al. 1983, Mcdevitt and Webber 1990, Le Graverand, et al. 2001, Nakata, et al. 2001]: Spindelförmige Zellen ohne Fortsätze an der Oberfläche des Meniskus, längliche fibroblastenartige Zellen mit Zytoplasma-Ausläufern in peripheren Bereichen des Meniskus und schließlich ovale Zellen ohne Fortsätze, die eher im zentralen Bereich gefunden werden. Diese Zellen ähneln sowohl Fibroblasten, also auch Chondrozyten, weswegen Webber et al. [Webber, et al. 1985] die Bezeichnung „Fibrochondrozyten“ einführte.

Im Meniskus sind vier verschiedene Kollagentypen in unterschiedlicher Menge und Lokalisation zu finden. Kollagen I macht dabei mit 90 % den größten Anteil aus und trägt hauptsächlich zum Aufbau des Fasernetzwerkes bei. Daneben finden sich auch Kollagen II und geringe Mengen an Kollagen III, V und VI [Eyre and Wu 1983]. Der basisnahe Bereich des Meniskus besteht fast ausschließlich aus Kollagen I. Kollagen II überwiegt hingegen im zentralen Bereich [Cheung 1987]. Durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen des Meniskus wiesen Petersen und Tillmann nach, dass die Kollagenfasern in drei Schichten verlaufen. An der femoralen und tibialen Oberfläche befindet sich eine circa 10 µm dicke Schicht, bestehend aus einem sehr feinen fibrillären Netzwerk ohne spezifische Orientierung. Darunter liegt femur- und tibiaseitig eine 150-200 µm dicke lamelläre Schicht aus sich kreuzenden Kollagenfaserbündeln. Und schließlich befindet sich im Inneren eine zentrale Hauptportion aus zirkumferent verlaufenden Faserbündeln, in die radiär verlaufende Verankerungsfasern eingewoben sind [Petersen and Tillmann 1998] (Abbildung 2).

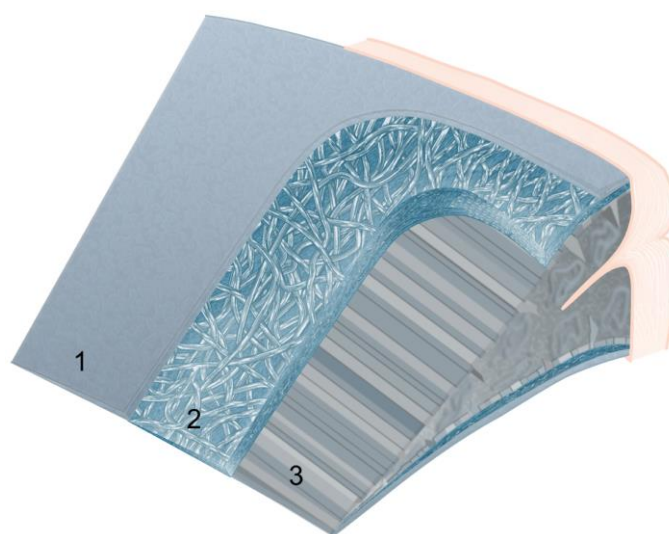


Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau des Meniskus in drei Schichten. (1) Oberflächliche Schicht aus einem sehr feinen fibrillären Netzwerk ohne spezifische Orientierung der Fasern. (2) Lamelläre Schicht aus sich kreuzenden Kollagenfasern. (3) Zentrale Hauptportion aus zirkumferent verlaufenden Faserbündeln. Eigene Abbildung in Anlehnung an Petersen and Tillmann 1998.

Einen weiteren Bestandteil der extrazellulären Matrix stellen die Proteoglykane dar. Dies sind große, negativ geladene, hydrophile Moleküle, bestehend aus einem zentralen Proteinfilament mit kovalent gebundenen polyanionischen Glykosaminoglykanen (GAG). Sie liegen häufig als Komplex mit Hyaluronsäure vor. Die Proteoglykane im Meniskus enthalten ungefähr 40 % Chondroitin-6-Sulfat, 10-20 % Chondroitin-4-Sulfat, 20-30 % Dermatan-Sulfat, und 15 % Keratan-Sulfat [Herwig, et al. 1984, Verbruggen, et

al. 1996]. Durch ihre negativen Ladungen sind sie in der Lage große Mengen an Wasser im Meniskus zu binden. Durch die gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen tragen sie außerdem erheblich zur Druckresistenz des Meniskus bei. Dies ist vor allem im zentralen und mittleren Bereich des Meniskus von Bedeutung. Der Gehalt an Proteoglykanen ist hier entsprechend höher [Sanchez-Adams, et al. 2011].

Zusammenfassend kann man sagen, dass der basisnahe Bereich des Meniskus aufgrund der vorrangig fibroblastenartigen Zellen und der extrazellulären Matrix aus Kollagen I eher faserknorpeligem Gewebe gleicht. Der innere Bereich, mit den chondrozytenartigen Zellen und dem hohen Gehalt an Kollagen II und Proteoglykanen, gleicht hyalinem Knorpel [Makris, et al. 2011]. So wird eine optimale Anpassung an die lokalen mechanischen Belastungen erreicht.

1.1.3. Blutversorgung und Innervation

Die Blutversorgung der Menisken erfolgt über die *Arteria superior genus (lateralis und medialis)*, sowie über die *Arteria inferior genus (lateralis und medialis)* [Arnoczky and Warren 1982, Day, et al. 1985]. Diese formen ein die Menisken umgebendes Kapillarnetz in der synovialen Umgebung der Meniskusbasis [Policard 1936]. Von hier ziehen dann in kurzen Abständen radiär verlaufende Gefäße in den Meniskus, mit einer umfangreicheren Versorgung von Vorder- und Hinterhorn [Day, et al. 1985].

Zum Zeitpunkt der Geburt ist der komplette Meniskus von Gefäßen durchzogen [Petersen and Tillmann 1995]. Mit fortschreitender Entwicklung ziehen sich jedoch die Gefäße aus dem zentralen Bereich zurück, sodass sie im Erwachsenenalter nur noch im äußeren Drittel des Meniskus nachzuweisen sind. Dies ist vermutlich auf die zunehmende Gewichtsbelastung und Kniebewegung zurückzuführen. Arnoczky et al. konnten zeigen, dass maximal die äußeren 10-30 % des medialen Meniskus und 10-25 % des lateralen Meniskus von Gefäßen durchzogen sind [Arnoczky and Warren 1982]. Das genannte Ausmaß der Gefäßversorgung hat vor allem Einfluss auf die Heilungseigenschaften im Falle eines Risses. Eine Wundheilung ist folglich nur im äußeren vaskularisierten Abschnitt möglich. Aufgrund der unterschiedlichen Heilungskapazität in den verschiedenen Bereichen, wird der Meniskus vor allem im klinischen Gebrauch in drei Abschnitte eingeteilt: Die äußere rot-rote Zone, die rot-weiße Übergangszone, und die innere, gefäßlose weiß-weiße Zone (Abbildung 3).

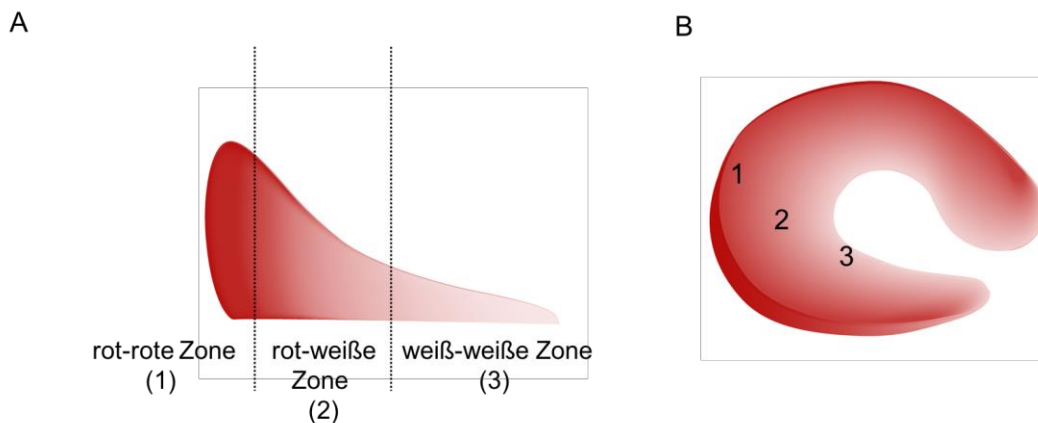


Abbildung 3: Gefäßversorgung des Meniskus und Einteilung in 3 Zonen. (A) Querschnitt. (B) Aufsicht. 1 = rot-rote Zone; 2 = rot-weiße Übergangszone; 3 = weiß-weiße Zone.

Gemeinsam mit den Gefäßen ziehen Nervenfasern vom perimeniskalen Gewebe in die Meniskusbasis. Dabei bleibt auch die Innervation auf das äußere Drittel des Meniskus beschränkt [Day, et al. 1985, Zimny, et al. 1988]. Der Nachweis von Mechanorezeptoren (Vater-Pacini-Lamellenkörperchen, Ruffini-Körperchen, Golgi-Sehnenorgane, freie Nervenendigungen) lässt außerdem auf eine Bedeutung der Menisken in der Tiefensensibilität des Kniegelenks schließen [Zimny, et al. 1988]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass durch eine isolierte Meniskusverletzung die Propriozeption erheblich gestört ist [Jerosch, et al. 1996].

1.2. Biomechanik der Menisken

1.2.1. Materialeigenschaften des Meniskus

Die mikrostrukturelle Anatomie des Meniskus bestimmt dessen Materialeigenschaften und folglich auch sein Verhalten unter Belastung [Beaupre, et al. 1986, Bullough, et al. 1970, Fithian, et al. 1990, Petersen and Tillmann 1998].

Charakteristisch hierbei ist vor allem sein Aufbau in zwei Phasen. Das Netzwerk aus Kollagen I (15-25 %) und Proteoglykanen (1-2 %) bildet die feste Phase, interstitielle Flüssigkeit (60-70 %) bildet die flüssige Phase [Mow and Huiskes 2005]. Nach der „Biphasischen Theorie“ tragen die Eigenschaften der elastischen Kollagen-Proteoglykan-Matrix und der interstitielle Flüssigkeitsstrom durch diese poröse und permeable Matrix in gleichem Maße zum Verhalten des Meniskus unter Belastung bei [Mow and Huiskes 2005, Fithian, et al. 1990]. Das sich daraus ergebende viskoelastische Verhalten unter

Belastung ist zeitabhängig und kann in Hysterese-, Kriech- (Aufbringen einer konstanten Kraft) und Relaxations-Versuchen (Aufbringen einer konstanten Verformung) näher untersucht werden. In diesen Versuchen können unter anderem die Permeabilität des Meniskus und die Steifigkeit unter Druck in Form des Elastizitätsmoduls im Gleichgewicht (Aggregate Modulus, H_A) bestimmt werden. Für die Permeabilität, als Maß für die „Leichtigkeit“ mit der eine Flüssigkeit durch die poröse Matrix strömen kann, finden sich in der Literatur Werte von circa $1,9 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ und für den Aggregate Modulus von circa 0,15 – 0,2 MPa [Joshi, et al. 1995, Sweigart, et al. 2004].

Die unterschiedliche Organisation der Kollagenfasern in verschiedenen Schichten, führt zur Inhomogenität des Meniskusgewebes und macht für die genaue Charakterisierung eine biomechanische Testung in verschiedenen Schichten und Regionen des Meniskus nötig. So können sich die Materialeigenschaften in Vorderhorn, *Pars intermedia* und Hinterhorn deutlich unterscheiden [Sweigart, et al. 2004].

Da der Großteil der Kollagenfasern im Meniskus in zirkumferenter Richtung verläuft, sind die Materialeigenschaften auch abhängig von der Belastungsrichtung. Diese Anisotropie impliziert eine Testung parallel zu den zirkumferent verlaufenden Kollagenfasern, sowie eine Testung senkrecht dazu. In verschiedenen Zugversuchen wurde für den Meniskus, ein mittleres Elastizitätsmodul von 110 MPa in zirkumferenter Belastungsrichtung und von 10 MPa in radiärer Richtung ermittelt [Fithian, et al. 1990, Lechner, et al. 2000, Tissakht and Ahmed 1995].

Der Meniskus ist unter Druckbelastung weniger steif als unter Zugbelastung. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass er sich unter Belastung verformen kann und sich so während des gesamten Bewegungszyklus an die sich verändernden artikulären Oberflächen anpassen kann.

1.2.2. Funktion der Menisken

Die Menisken sind essentiell für eine physiologische Lastverteilung und Lastübertragung im Kniegelenk. Dies wird durch ein Zusammenspiel ihrer anatomischen Form, ihrer anterioren und posterioren Verankerungsligamente und ihrer speziellen Materialeigenschaften erreicht [Masouros, et al. 2010, Bullough, et al. 1970, Fukubayashi and Kurosawa 1980, Seedhom 1976, Walker and Erkman 1975]. Durch ihre Form verbessern die Menisken die Kongruenz zwischen dem relativ flachen Tibiaplateau und den konvexen Femurkondylen und vergrößern so die Kontaktfläche im Kniegelenk. Unter normaler Belastung kommt es zu einer axialen Kompression des

Kniefelenks. Die einwirkende Kraft wird dabei gleichmäßig über die artikuläre Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia verteilt. Je größer diese Kontaktfläche ist, umso geringer ist der auf die Knorpeloberflächen einwirkende Kontaktdruck [Masouros, et al. 2010]. So konnte gezeigt werden, dass nach einer operativen Entfernung der Menisken (Meniskektomie), die Kontaktfläche im Kniegelenk deutlich verringert ist und so der Kontaktdruck um bis zu 235 % erhöht wird [Baratz, et al. 1986, Seedhom and Hargreaves 1979]. Man weiß heute, dass es nach Meniskektomie zur Degeneration des artikulären Knorpels kommen kann [Hede, et al. 1992, Roos, et al. 1998, Englund and Lohmander 2004]. Bedingt durch ihre Keilform tendieren die Menisken dazu, bei axialer Belastung aus dem Gelenkspalt gedrückt zu werden. Dies wird durch die anterioren und posterioren Verankerungsligamente effektiv verhindert. Dabei bauen sich in den Menisken zirkumferente Zugspannungen auf, die auf die Verankerungsligamente übertragen werden [Masouros, et al. 2008]. Die Fähigkeit zur Lastübertragung ist also darauf zurückzuführen, dass axial einwirkende Kräfte im Meniskusgewebe in zirkumferente Spannungen umgewandelt werden (Abbildung 4). Die hierfür notwendige hohe Zugsteifigkeit und -festigkeit des Meniskusgewebes wird durch den überwiegenden Anteil an zirkumferent verlaufenden Kollagenfasern erreicht [Masouros, et al. 2010].

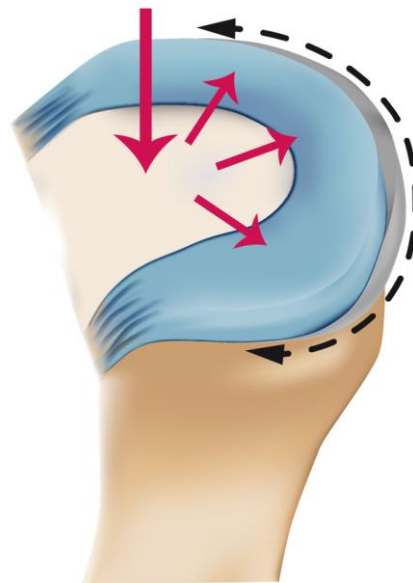


Abbildung 4: Beteiligung des Meniskus an der Lastübertragung im Kniegelenk. Axial einwirkende Kräfte werden innerhalb des Meniskusgewebes in zirkumferente Zugspannungen umgewandelt und über die Verankerungsligamente auf das Tibiaplateau übertragen. Eigene Abbildung in Anlehnung an Dürselen and Freutel 2015.

Durch eine hohe Mobilität der Verankerungsligamente können die Menisken während des gesamten Bewegungsumfangs den Roll-Gleitbewegungen der Femurkondylen folgen und sich so an der Lastübertragung beteiligen [Thompson, et al. 1991]. Aufgrund seiner zusätzlichen Verbindung zum medialen Seitenband, ist der mediale Meniskus im Vergleich zum lateralen jedoch in seiner Bewegung eingeschränkt. Dies wird vor allem bei starker Beugung des Kniegelenks ($> 90^\circ$) deutlich. Der laterale Meniskus kann aufgrund der anatomischen Gegebenheiten dem lateralen Femurkondylus in seiner Bewegung besser folgen und verlagert sich weiter nach posterior. Das Vorderhorn des lateralen Meniskus bewegt sich dabei um bis zu 10 mm nach posterior. Der laterale Meniskus geht „downhill“ [Thompson, et al. 1991, Vedi, et al. 1999]. Diese geringere Mobilität des medialen Meniskus ist eine mögliche Erklärung dafür, dass mediale Meniskusverletzungen häufiger auftreten als laterale und zudem meistens im Hinterhorn des medialen Meniskus lokalisiert sind [Metcalf and Barrett 2004].

Für die Stabilität des Kniegelenks sind primär die beiden Kreuzbänder (*Ligamentum cruciatum anterior* und *Ligamentum cruciatum posterior*) verantwortlich. So kommt es im Falle einer Verletzung des vorderen Kreuzbandes zu einer signifikant erhöhten antero-posterioren Translationsbewegung im Kniegelenk ($18,8 \pm 5,7$ mm). Diese Beweglichkeit wird bei zusätzlicher Meniskektomie nochmals um bis zu 5,8 mm erhöht [Allen, et al. 2000]. Die Menisken agieren also als sekundäre Stabilisatoren im Kniegelenk. Auch die Rotationsstabilität wird durch die Menisken beeinflusst. Wang und Walker konnten zeigen, dass eine Meniskektomie das Rotationsausmaß um 5° erhöht [Wang and Walker 1974]. Diese Instabilität wurde durch sukzessive Entfernung der Ligamente des Kniegelenks (Kreuzbänder und Seitenbänder) auf bis zu 49° erhöht. In der Literatur wird dem Meniskus auch eine stoßdämpfende Funktion im Kniegelenk zugesprochen [Krause, et al. 1976, Kurosawa, et al. 1980, Voloshin and Wosk 1983]. Jedoch werden diese Studien und folglich auch die Rolle des Meniskus als Stoßdämpfer durch neuere Literatur in Frage gestellt [Andrews, et al. 2011]. Zusätzlich sind die Menisken an der Schmierung des Kniegelenks und der Verteilung von Nährstoffen beteiligt [Renstrom and Johnson 1990]. Sie erfüllen eine sensorische Funktion und sind deshalb wichtig für die Propriozeption [Messner and Gao 1998].

1.3. Verletzungen des Meniskus

Nach einer Ruptur des Kreuzbandes, stellen Meniskusverletzungen die zweit häufigste Verletzung im Kniegelenk dar [Majewski, et al. 2006]. Metcalf und Kollegen konnten in einer Untersuchung von 1370 Patienten mit Meniskusriss zeigen, dass sich fast drei Viertel dieser Patienten (73 %) eine isolierte Verletzung des medialen Meniskus zuzogen und nur 19 % eine isolierte Verletzung des lateralen Meniskus [Metcalf and Barrett 2004]. Als Grund dafür ist die bereits genannte geringere Beweglichkeit des medialen Meniskus anzusehen. Im medialen Meniskus waren fast alle Verletzungen (98 %) im posterioren Abschnitt oder an dessen Übergang zur *Pars intermedia* lokalisiert. Während der normalen Bewegung des Kniegelenks sind die Menisken sowohl Druck-, Scher- sowie radiären Zugkräften ausgesetzt [Abraham, et al. 2011, Guo, et al. 2013, Nishimuta and Levenston 2012]. Dies hat nicht nur Konsequenzen für Verletzungen des Meniskus selbst, sondern auch für das gesamte Gelenk nach Meniskusverletzung [Fayard, et al. 2010].



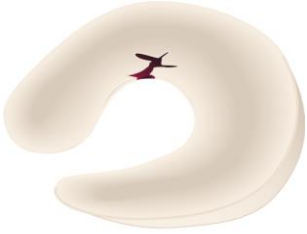
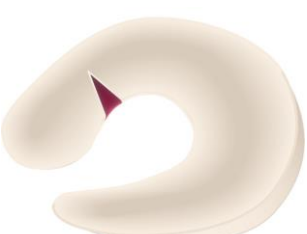


Meniskusrisse können sowohl traumatisch, wie auch degenerativ bedingt sein. Eine sekundäre Instabilität des Kniegelenks aufgrund vorheriger Verletzungen des Bandapparates (Kreuz- oder Seitenband) prädisponiert für eine Verletzung des Meniskus [Baker, et al. 1985]. Zu einer traumatischen Verletzung des gesunden Meniskus kommt es häufig bei einer Rotationsbewegung der Tibia in Kombination mit axialer Belastung und gebeugtem Kniegelenk. In den meisten Fällen tritt dies in Zusammenhang mit sportlichen Aktivitäten auf [Nielsen and Yde 1991]. Zu den Risikosportarten zählen vor allem Fußball, Skifahren, American Football, Basketball und Wrestling. Diese sogenannten Kontaktsportarten machen rund ein Drittel aller Fälle aus [Makris, et al. 2011]. Dabei kommt es häufig zur Verletzung mehrerer Weichteilstrukturen im Gelenk. So sind bei der „unhappy Triad“ neben dem medialen Meniskus auch das vordere Kreuzband und das mediale Seitenband rupturiert [O'Donoghue 1964]. Männer sind deutlich häufiger betroffen als Frauen (3:1), was darin begründet sein könnte, dass diese Sportarten hauptsächlich von Männern ausgeführt werden [Baker, et al. 1985]. Obwohl Meniskusverletzungen in jeder Altersgruppe auftreten können, hat das Alter des Patienten einen signifikanten Einfluss auf ätiologische und pathophysiologische Faktoren [Noble and Hamblen 1975, Salata, et al. 2010]. So treten traumatische Verletzungen des Meniskus gehäuft bei den 20-29-Jährigen auf [Garrett, et al. 2006, Makris, et al. 2011, Baker, et al. 1985]. Davon

abzugrenzen sind degenerativ bedingte Meniskusverletzungen. Sie treten vor allem bei Patienten mittleren Alters sowie bei älteren Patienten auf und können spontane Risse sowie Risse durch geringe Krafteinwirkung sein [Englund, et al. 2008]. Diese Art von Meniskusverletzungen sind die Folge chronischer, das heißt über Jahre andauernder degenerativer Veränderungen des Meniskusgewebes im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses (Mukoide Degeneration) [Kumm, et al. 2016, Ferrer-Roca and Vilalta 1980, Hodler, et al. 1992, Noble 1977, Noble and Hamblen 1975]. Sie unterscheiden sich von den traumatischen Verletzungen unter anderem darin, dass sie oft ohne Symptome bleiben [Englund, et al. 2008, Noble and Hamblen 1975]. Degenerative Meniskusrisse treten mit einer Prävalenz von 16 % bei 50-59-Jährigen Frauen und bis über 50 % bei 70-90-Jährigen Männern auf [Englund, et al. 2008]. Morphologisch stellen sich degenerative Risse als Horizontal- und/oder Lappenriss des mittleren und posterioren Abschnitts des medialen Meniskus dar [Englund, et al. 2008, Poehling, et al. 1990].

Die Symptome einer Meniskusverletzung variieren in Abhängigkeit der Chronizität der Verletzung und werden vor allem durch die Instabilität des rupturierten Fragments verursacht, das zwischen Femur und Tibia bei Bewegung eingeklemmt wird. Bei einer akuten Verletzung des Meniskus kommt es häufig zu Schwellung und Schmerzen. Bei der klinischen Untersuchung zeigt sich unter anderem eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit und ein Gelenkerguss. Patienten mit chronischer Verletzung leiden häufig unter intermittierenden Schmerzen sowie Gelenkblockade. Bei der klinischen Untersuchung zeigt sich auch hier Gelenkerguss, Schmerz bei forcierter Hyperflexion und eine Atrophie des *Musculus quadriceps femoris* [Verdonk and Vererfve 2010].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Meniskusverletzungen zu klassifizieren. Die „International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine“ (ISAKOS) veröffentlichte 2006 ein Dokumentationsschema um eine international standardisierte Erfassung von Meniskusverletzungen bei Arthroskopie zu ermöglichen. [Jakobson 2007]. Die Klassifizierung erfolgt anhand morphologischer Eigenschaften der Meniskusverletzung. Beurteilt werden Länge des Risses, Tiefe und Lokalisation. Die Lokalisation innerhalb einer der drei Zonen des Meniskus ist wichtig bei der Beurteilung der Heilungstendenz (*siehe 1.1.3. Blutversorgung und Innervation*). In der Literatur werden verschiedene Verletzungsmuster beschrieben [Bernstein 2010]. Sie können jeweils stabil oder instabil und komplett oder unvollständig sein [Pellacci, et al. 1997] (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verschiedene Verletzungsmuster des Meniskus [Pellacci, et al. 1997, Pereira, et al. 2016].

Verletzungsmuster	Beschreibung	Morphologie
Vertikaler Longitudinalriss	Häufigstes Verletzungsmuster. Stellt 29% aller medialen und 33% aller lateralen Meniskusverletzungen dar.	
Korbhenkelriss	Entsteht aus einem Longitudinalriss, wenn das abgerissene Fragment nach zentral disloziert. Kommt vor allem im medialen Kompartiment vor.	
Lappenriss	Meistens am Übergang der <i>Pars intermedia</i> zum Hinterhorn.	
Komplexer Riss	Häufig durch wiederholtes Knie trauma.	
Radiärer Riss	Verläuft meist vom zentralen freien Rand bis zur Peripherie (Meniskusbasis).	
Horizontalriss	Häufig degenerativ bedingt.	

1.4. Therapie von Meniskusverletzungen

Sobald Meniskusgewebe geschädigt ist, können dessen biomechanische Funktionen nicht mehr optimal erfüllt werden und die Entstehung degenerativer Veränderungen im Kniegelenk wird begünstigt. Der Funktionsverlust des Meniskus, der nach einer Verletzung eintritt, ist jedoch abhängig von der Morphologie des Risses. So kommt es bei einem vertikalen Longitudinalriss zu keinem Kontinuitätsverlust der für die Lastübertragung wichtigen zirkumferenten Fasern, sondern zu einer Ruptur der schwächeren radial verlaufenden Verankerungsfasern. Im Gegensatz dazu ist bei einem kompletten radiären Riss des Meniskus oder einem Abriss der Meniskuswurzel dessen lastübertragende Funktion vollkommen aufgehoben, was biomechanisch einer kompletten Entfernung des Meniskus gleichzusetzen ist [Allaire, et al. 2008]. Diese Verletzungen führen zu einer beschleunigten Entwicklung von Gelenkdegeneration [Choi, et al. 2012, Han, et al. 2010, Costa, et al. 2004, Lerer, et al. 2004, Pagnani, et al. 1991]. Für die Behandlung von Meniskusverletzungen stehen verschiedene Verfahren zu Verfügung.

1.4.1. Konservative Behandlung

Nicht alle Meniskusverletzungen führen zu klinischen Symptomen [Casscells 1980]. So kann zum Beispiel bei stabilen longitudinal oder radiär verlaufenden Meniskusrissen, die kürzer als 5 mm sind, ein konservativer Therapieversuch unternommen werden [Verdonk and Almqvist 2005]. Dies stellt vor allem bei Patienten mit geringer körperlicher Aktivität eine Behandlungsoption dar. Ein Meniskusriss wird als stabil bezeichnet, wenn der Spalt durch Manipulation während eines arthroskopischen Eingriffs um weniger als 3 mm bewegt werden kann [Weiss, et al. 1989]. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem bei degenerativ bedingten Meniskusrissen durch gezielte Übungen Schmerzen gelindert und die Kniefunktion verbessert werden kann [Borjesson, et al. 1996, Matthews and StPierre 1996]. Somit könnte kontrolliertes Training die primäre Behandlungsoption bei degenerativen Meniskusläsionen darstellen [Herrlin, et al. 2007]. Es gibt keine Studien über den Erfolg einer konservativen Behandlung bei akuten Meniskusverletzungen junger Patienten.

1.4.2. Resektion des Meniskus

Bei der Meniskektomie wird der verletzte und eventuell dislozierte Teil des Meniskus arthroskopisch entfernt. Je nach Resektionsausmaß unterscheidet man eine partielle Meniskektomie von einer subtotalen oder sogar totalen Meniskektomie. Indiziert ist eine Resektion des Meniskus bei ausgedehnten Verletzungen in der weiß-weißen Zone, wo aufgrund der fehlenden Blutversorgung keine Heilung zu erwarten ist [Arnoczky and Warren 1982].

Bereits durch die partielle Resektion des Meniskus kommt es zu einer verringerten Kontaktfläche im Kniegelenk und somit zu einem erhöhten Kontaktdruck zwischen den artikulierenden Knorpeloberflächen von Femur und Tibia [Fukubayashi and Kurosawa 1980]. Dabei bestimmt das Resektionsausmaß inwieweit sich der Druck erhöht. Je mehr Gewebe entfernt wird, umso höher steigt der Druck [Lee, et al. 2006, Seitz, et al. 2012]. So kann der Kontaktdruck auf den Gelenkflächen im Kniegelenk auf bis zu 235 % ansteigen [Baratz, et al. 1986]. Seit einiger Zeit weiß man, dass eine Meniskektomie in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung von Arthrose steht [Fairbank 1948, Hede, et al. 1992, Roos, et al. 1998, Englund and Lohmander 2004]. Eine Entfernung von Meniskusgewebe erhöht aber nicht nur die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung degenerativer Veränderungen im Kniegelenk, es kommt auch zur Beschleunigung degenerativer Veränderungen bei bereits bestehender Arthrose [Andriacchi, et al. 2004, Hunter, et al. 2006, McDermott and Amis 2006, Roos 2005]. Aufgrund dieser Erkenntnisse stand in den letzten Jahren mehr und mehr der Erhalt oder der Ersatz des Meniskus im Zentrum der Therapie.

Dennoch wird immer noch bei den meisten Patienten mit Meniskusriss eine partielle- und bei sehr umfangreichen Verletzungen auch eine totale Meniskektomie durchgeführt [Garrett, et al. 2006]. Grund dafür könnte das schnelle Abklingen der Symptome nach Resektion des verletzten Teils des Meniskus und die rasche Wiederherstellung der Funktion sein [Hede, et al. 1992, Schimmer, et al. 1998]. Betroffene Patienten profitieren so zunächst von einer schnellen Rückkehr zum Sport und einer raschen Wiederherstellung der Arbeitsfähigkeit. Langfristig kann jedoch aufgrund der genannten degenerativen Gelenkveränderungen ein totaler Gelenkersatz nötig werden.

1.4.3. Reparatur des Meniskus

Um die so wichtige biomechanische Funktion des Meniskus zu erhalten, gewann in den letzten Jahren die Refixation von verletztem Gewebe zunehmend an Bedeutung bei der Therapie von (akuten) Meniskusrissen [Sanchez-Soler, et al. 2016]. So kam es zwischen 2005 und 2011 zu einem signifikanten Anstieg der durchgeführten Meniskusreparaturen in den USA [Abrams, et al. 2013]. Dies ist wohl vor allem darauf zurückzuführen, dass in den letzten Jahren großer Wert auf die Schulung der Chirurgen bezüglich der knorpelschützenden Eigenschaften des Meniskus gelegt wurde. Weiterhin kam es zu großen Fortschritten auf dem Gebiet der arthroskopischen Technik und des Instrumentariums [Abrams, et al. 2013].

Ob die Refixation eines Meniskusrisses möglich ist, wird von Faktoren wie Alter und Aktivität der Patienten, Verletzungsmuster, Chronizität der Verletzung, eventuelle Begleitverletzungen und Gefäßversorgung des geschädigten Bereichs bestimmt [Bernstein 2010]. Letztere ist entscheidend für eine natürliche Wundheilung und kann nur in der rot-roten, sowie in der rot-weißen Zone erwartet werden [Rubman, et al. 1998, Ahn, et al. 2010].

Primäres Ziel bei der Refixation von Meniskusgewebe ist das Erreichen einer stabilen Adaptation, da nur so eine Chance auf Heilung besteht [Matsubara, et al. 2012]. Hierfür standen zunächst verschiedene primäre Nahttechniken zur Verfügung. Da die arthroskopische Durchführung dieser Nahttechniken jedoch sehr anspruchsvoll ist, wurden in den letzten Jahren viele verschiedene chirurgische Techniken und Medizinprodukte, wie resorbierbare Klammern, Stifte, Anker und Schrauben entwickelt. Die Refixation kann auf diese Weise minimal-invasiv ohne zusätzliche Hautinzision (all-inside) durchgeführt werden und so das Risiko von Gefäß- oder Nervenverletzungen minimiert werden [Barber and Herbert 2000]. Die neueste Generation, sogenannte Meniskus-Refixationssysteme, vereinen den Vorteil der Festigkeit einer primären Naht mit der Sicherheit einer minimal-invasiven all-inside Technik.

Im Vergleich zur Meniskektomie werden bei der Reparatur von Meniskusgewebe sowohl bessere biomechanische als auch klinische Ergebnisse erzielt [Huber, et al. 2013, Paxton, et al. 2011]. Obwohl dieses Prozedere mit einer höheren Re-Operationsrate verbunden ist, kann auf lange Sicht der Knorpel vor Degeneration geschützt werden [Paxton, et al. 2011]. Wenn eine Refixation aufgrund der richtigen Indikationsstellung erfolgt, werden mittel- bis langfristig 70-80 % der Fälle erfolgreich therapiert [Seil and

Pape 2010].

Es gibt drei Hauptindikationen für die Refixation von geschädigtem Meniskusgewebe [Seil and Pape 2010]. Am häufigsten erfolgt diese aufgrund eines vertikalen Längsrisses im mittleren oder hinteren Bereich des Meniskus oder aufgrund eines Korbhenkelrisses im mittleren Bereich des Meniskus. Horizontal- oder radiär verlaufende Risse werden dagegen selten refixiert. Schwieriger zu diagnostizieren und weitaus seltener ist die Indikation des basisnahen Risses im Bereich der meniskosynovialen Verbindung. Als dritte Indikation ist schließlich der Riss der meniskotibialen Ligamente (Meniskuswurzelriss) zu nennen. Der Meniskus verliert dabei seine Funktion eine axiale Last in zirkumferente Zugspannungen umzuwandeln. Dies resultiert in einem Zustand, der mit der Entfernung des Meniskus vergleichbar ist [Allaire, et al. 2008].

1.4.4. Ersatz des geschädigten Meniskus

Ziel eines (partiellen) Meniskusersatzes soll sowohl die Linderung von Symptomen nach (partieller) Meniskusresektion, als auch die Wiederherstellung der Funktion und schließlich die Prävention degenerativer Gelenkerkrankungen sein. Hierfür stehen derzeit verschiedene Verfahren zur Verfügung.

Spender-Meniskus

Für den Totalersatz des Meniskus steht klinisch derzeit nur die Transplantation eines Spendermeniskus (Allograft) zur Verfügung. Indikation hierfür besteht bei jüngeren Patienten unter 50 Jahren, die unter den Symptomen einer Meniskektomie leiden. Entscheidend für den Erfolg des Eingriffs ist ein stabiles Kniegelenk ohne Achsenfehlstellung sowie ein begrenztes Ausmaß an bestehenden degenerativen Knorpelveränderungen [Lubowitz, et al. 2007, Verdonk, et al. 2007]. Obwohl diese Technik bereits im Jahr 1989 von Milachowski beschrieben wurde [Milachowski, et al. 1989], ist bis heute unklar, ob auf lange Sicht die Entstehung sowie Progression bestehender degenerativer Gelenkveränderungen effektiv verhindert werden kann [Wirth, et al. 2002]. Kurz- und mittelfristig führt die Meniskustransplantation zur Schmerzlinderung und Verbesserung der Kniegelenkfunktion bei alltäglichen Aktivitäten [Crook, et al. 2009]. In den meisten Fällen werden für die Transplantation gefrorene oder kryokonservierte Spendermenisken verwendet, da bei frischen Menisken unter anderem das Problem der begrenzten Haltbarkeit besteht und selten in so kurzer Zeit ein passender Empfänger gefunden werden kann [Cole, et al. 2003, Crook,

et al. 2009]. Zu nennende Nachteile dieses Verfahrens sind die begrenzte Verfügbarkeit passender Spendermenisken, mögliche mit der Transplantation assoziierte Immunreaktionen des Empfängers und die Gefahr der Krankheitsübertragung [Lubowitz, et al. 2007]. Letzteres wird oft in Zusammenhang mit Allografts genannt, da eine effektive Sterilisation des Transplantats nicht erreicht werden kann. Gamma-Strahlung, die nötig ist um HI-Viren effektiv zu zerstören, führt auch zur Zerstörung des Transplantats [Vangness, et al. 2003]. Auch die Sterilisation mit Ethylenoxid ist aufgrund der damit in Zusammenhang stehenden Gelenkentzündungen nicht möglich [Jackson, et al. 1990].

Alloplastischer Meniskusersatz

Grundlegend lassen sich hier zwei verschiedene Ansätze unterscheiden. Nicht-resorbierbare Implantate, die wie eine Prothese dauerhaft die Funktion des geschädigten Meniskus übernehmen oder resorbierbare Scaffolds, die diese Funktion nur zeitweise übernehmen. Letztere sollen wie ein „Gerüst“ das Einwachsen von Zellen sowie die Regeneration von Gewebe fördern, während sie selbst einem langsamen Abbauprozess unterliegen. Dieses Prinzip wird als „Tissue Engineering“ bezeichnet [Rongen, et al. 2014]. Während des chirurgischen Eingriffs wird der verletzte Teil des Meniskus entfernt und ein Ersatz entsprechend der Defektform eingesetzt. Bei sehr umfangreichen Verletzungen, die eine totale Entfernung des Meniskus erfordern, oder bei wiederholten partiellen Meniskusresektionen kann letztendlich ein (sub-) totaler Meniskusersatz erforderlich sein.

Für den künstlichen Meniskusersatz wurde bereits eine Vielzahl an verschiedenen Materialien untersucht [Vrancken, et al. 2013]. Aufgrund ihrer besonderen physikalischen Eigenschaften spielen dabei natürliche oder synthetische Polymere eine besondere Rolle [Rongen, et al. 2014]. Ein großer Vorteil bei der Herstellung dieser Polymere ist, dass spezifische Eigenschaften genau an die Anforderungen des Meniskus-Tissue Engineering angepasst werden können. Dies betrifft vor allem Biokompatibilität, Porosität, Degradationsprofil und mechanische Eigenschaften [Odiان 2004]. Gemäß den Anforderungen an ein Scaffold oder Implantat für den Meniskusersatz sollen die mechanischen Eigenschaften und das Reibungsverhalten bei Implantation den Eigenschaften des nativen Meniskusgewebes entsprechen [Stone, et al. 1997, Rongen, et al. 2014]. So muss ein Ersatzmaterial bei der Kraftübertragung im Kniegelenk mitwirken und für eine gleichmäßige Druckverteilung sorgen. Adäquate Reibungseigenschaften

verhindern frühzeitigen Abrieb und somit eine Zerstörung der Gelenkoberfläche. Das Implantat oder Scaffold sollte in seiner Größe mit dem zu ersetzenden Meniskus übereinstimmen. Außerdem dürfen weder das Material selbst, noch die bei der Degradation anfallenden Abbauprodukte zytotoxisch oder kanzerogen sein. Ein Scaffold für das Tissue Engineering des Meniskus muss die Zelladhäsion fördern und so als Gerüst für die Regeneration von Zellen, extrazellulärer Matrix und Gefäßen dienen [Stone, et al. 1997, Rongen, et al. 2014]. Hierfür sind große Makroporen (200-300 µm), eine hohe Interkonnektivität durch kleinere Mikroporen (10-50 µm) und eine hohe Gesamtporosität ($\geq 70\%$) erforderlich. Im Falle von resorbierbaren Scaffolds soll die Degradation in dem Maße voranschreiten wie neues Gewebe einwachsen, sich organisieren und so eine ausreichende mechanische Belastbarkeit erreichen kann.

Momentan sind zwei alloplastische Scaffolds für den partiellen Meniskusersatz klinisch verfügbar. Das CMI® (Collagen Meniskus Implantat, Ivy Sports Medicine GmbH, Gräfelfing, Deutschland) ist ein biologisches, resorbierbares Scaffold aus hoch gereinigtem bovinem Kollagen I [Stone, et al. 1990]. In ersten *in vitro* und *in vivo* Studien konnte zwar gezeigt werden, dass das Scaffold das Einwachsen von neuem Gewebe fördert [Stone, et al. 1990], in einer weiteren *in vivo* Studie war jedoch nach 12 Monaten kein Vorteil gegenüber einer Meniskusresektion nachzuweisen [Stone, et al. 1992]. In einer prospektiven randomisierten Studie in der das CMI® im Vergleich zur partiellen Meniskektomie untersucht wurde, wurde die Infiltration des Scaffolds mit regenerativem Gewebe bestätigt [Rodkey, et al. 2008]. Bei Patienten mit chronischen Beschwerden (mehr als 1 vorangegangener chirurgischer Eingriff am Meniskus), kam es außerdem zu verbesserten klinischen Ergebnissen, was die Autoren auf eine verbesserte Meniskusfunktion zurückführten. Diese klinische Verbesserung blieb bei Patienten mit akuten Meniskusverletzungen (kein vorangegangener Eingriff am Meniskus) aus. Jedoch kam es auch bei Patienten dieser Studie, die meniskektomiert wurden (Kontrollgruppe), zu einer klinischen Verbesserung. Diese Patienten erlangten aber nur 29 % ihrer ursprünglichen physischen Aktivität wieder, im Vergleich zu den Patienten mit chronischer Verletzung und Therapie mit CMI®, die 42 % ihrer früheren Aktivität wiedergewannen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das CMI® zwar sicher in der Anwendung am Patienten ist, bisher jedoch keine eindeutigen Beweise dafür vorliegen, dass es im Vergleich zur Meniskektomie tatsächlich zu einer verbesserten Kniefunktion und Chondroprotektion kommt [Rongen, et al. 2014]. Außerdem bleibt die Anwendung des CMI® auf Fälle beschränkt, bei denen die Meniskusrandleiste völlig

intakt ist, was den Einsatz limitiert.

Das zweite klinisch verfügbare Scaffold besteht aus einem Kompositmaterial aus 80 % Poly- ϵ -Caprolacton und 20 % Polyurethane (Actifit®, Orteq Ltd., London, UK) [Heijkants, et al. 2004]. Poly- ϵ -Caprolacton ist ein resorbierbarer Kunststoff und soll eine ausreichende Flexibilität des Materials gewährleisten. Das teilweise resorbierbare Polyurethan ist steifer und soll für eine ausreichende mechanische Belastbarkeit sorgen. In ersten *in vivo* Studien wurde die Eignung des Materials für den Totalersatz des Meniskus untersucht. Obwohl sich die mechanischen Eigenschaften des Scaffolds über den Implantationszeitraum von sechs Monaten verbesserten, waren diese nicht vergleichbar mit den Eigenschaften des nativen Meniskus. Folglich kam es zu degenerativen Veränderungen mit Zerstörung des Gelenkknorpels [Tienen, et al. 2006]. Nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Monaten blieb eine weitere Verbesserung der Druckeigenschaften des Scaffolds aus. Stattdessen kam es zum Bruch der Scaffolds und einer stärkeren Zerstörung des Knorpels als nach Meniskektomie [Welsing, et al. 2008, Hannink, et al. 2011]. Ursache könnten minderwertige biomechanische Eigenschaften und ein schlechtes Reibungsverhalten zum Zeitpunkt der Implantation sein [Galley, et al. 2011]. Als Konsequenz sollte das Scaffold zukünftig nur noch für den partiellen Meniskusersatz verwendet werden [Brophy, et al. 2010]. Daraufhin konnten in einer Studie am Schaf jedoch nach 12 Monaten keine signifikanten Unterschiede zur partiellen Meniskektomie festgestellt werden [Maher, et al. 2010]. In einer klinischen Studie an Patienten mit irreparabilem Meniskusriss oder partiellem Verlust des Meniskus konnten zwar Biokompatibilität und Fähigkeit zur Gewebeinduktion des Scaffolds nachgewiesen werden, es fehlte jedoch der Vergleich zu einer Kontrollgruppe [Verdonk, et al. 2011]. Weitere kontrollierte randomisierte klinische Studien sind also nötig, um eine definitive Aussage über die Wirksamkeit des Scaffolds treffen zu können. Zusätzlich müssen Ergebnisse von Langzeitstudien abgewartet werden, um die tatsächliche knorpelschützende Wirkung zu belegen. Folglich konnte bisher keines dieser Scaffolds eine knorpelschützende Wirkung über einen längeren Implantationszeitraum beweisen. Es bestehen keine eindeutigen Vorteile gegenüber der konventionellen Meniskusresektion, was dazu führt, dass keines der beiden von der Ärzteschaft allgemein anerkannt ist.

Aufgrund der intensiven Forschung auf diesem Gebiet befinden sich zurzeit neben den genannten, klinisch bereits verfügbaren Scaffolds einige Materialien für den Meniskusersatz in der Entwicklung [Vrancken, et al. 2013, Rongen, et al. 2014].

NuSurface® (Active Implants Israel Ltd., Israel) ist ein Implantat für den totalen Meniskusersatz, welches sich bereits in der klinischen Testphase befindet. Es besteht aus einem Polycarbonat-Urethan-Polymer, das durch zirkumferent verlaufende Kevlarfasern verstärkt wurde. Dieses wurde zuvor in einer Studie am Schaf über drei und sechs Monate untersucht [Zur, et al. 2011]. Bezüglich des Zustands des artikulären Knorpels konnten keine Unterschiede zur kontralateralen, nicht-operierten Kontrollgliedmaße nachgewiesen werden. Jedoch wurden zu jedem Zeitpunkt nur drei Tiere untersucht, was eine definitive Aussage bezüglich der Wirksamkeit des Implantats nicht zulässt. Außerdem unterscheidet sich das humane Implantat in seiner Form und auch hinsichtlich der Implantationstechnik deutlich von dem in dieser Studie verwendeten ovinen Implantat. Im Gegensatz zu dem scheibenförmigen humanen Implantat, das ohne weitere Fixierung in das Kniegelenk eingesetzt werden soll, ist das ovine Implantat anatomisch geformt und mit Schrauben zur Verankerung am Tibiaplateau versehen [Elsner, et al. 2010, Zur, et al. 2011].

Ein weiteres sehr vielversprechendes Implantat für den totalen Meniskusersatz besteht aus einem Kollagen-Hyaluronsäure-Schwamm der durch anatomisch platzierte resorbierbare Fasern verstärkt wurde (Meniscofix™, Novopedics Inc.) [Balint, et al. 2012]. In einer Funktionalitätsprüfung am Schafmodell konnten über einen Implantationszeitraum von 16- und 32-Wochen zelluläre Infiltration der Implantate mit nachfolgender Matrixproduktion nachgewiesen werden [Merriam, et al. 2015]. Zusätzlich war das Material aufgrund seiner biomechanischen Eigenschaften in der Lage, im Vergleich zur Meniskektomie den artikulären Knorpel vor Degeneration zu schützen. Diese Eigenschaften konnten auch über einen längeren Untersuchungszeitraum von 52 Wochen nachgewiesen werden [Patel, et al. 2016]. Im nächsten Schritt sollen Verbesserungen bezüglich der Form des Implantats vorgenommen werden und ein Implantat für den Einsatz am Mensch entwickelt werden. In einer eigenen Studie des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik wurde ein Implantat aus Seidenfibroin für den partiellen Meniskusersatz (FibroFix™, Orthox Ltd., Abingdon, Vereinigtes Königreich) über sechs Monate am Schafmodell getestet [Gruchenberg, et al. 2015]. Dabei wurde ein partieller Ersatz von Meniskusgewebe am Übergang des Vorderhorns zur *Pars intermedia* durchgeführt. Nach sechs Monaten zeigten sich weder makroskopisch noch histologisch Entzündungszeichen, woraus auf eine gute Biokompatibilität des Materials geschlossen werden konnte. Zudem konnte durch die Implantation des Ersatzmaterials die

Entstehung von Arthrose im Vergleich zur Meniskektomie verhindert werden. Jedoch waren einige Implantate zum Teil nicht mehr im Defekt fixiert und es konnte keine feste Verbindung des Materials zu nativem Meniskusgewebe nachgewiesen werden. Für den erfolgreichen Einsatz auf lange Sicht sind Verbesserungen der Implantationstechnik nötig. Es muss eine feste Verbindung zu nativem Meniskusgewebe geschaffen werden, da nur so eine Integration des Materials möglich ist. Grundvoraussetzung für die Ausbildung einer Gewebebrücke zwischen Implantat und Restmeniskus ist neben der stabilen Fixierung auch der Anschluss an das periphere Gefäßsystem des Meniskus. Auf Grundlage dieser Untersuchung und der dabei gewonnenen Erkenntnisse wurde das Seidenfibroin Implantat einem Optimierungsprozess unterzogen. Die Untersuchung dieser zweiten Generation an Implantaten ist Gegenstand der vorliegenden Studie.

1.5. Ziel der Studie

Aufgrund fehlender adäquater Alternativtherapien ist die partielle Meniskektomie trotz genannter negativer Langzeit-Auswirkungen noch immer der häufigste durchgeführte Eingriff bei Meniskusverletzungen. Momentan sind zwei artifizielle Scaffolds für den partiellen Meniskusersatz klinisch verfügbar, beide sind jedoch von der Ärzteschaft nicht allgemein anerkannt. Zudem ist noch nicht ausreichend bewiesen, ob diese in der Lage sind den Gelenkknorpel auch auf lange Sicht zu schützen. Im Gegensatz dazu, ist für den Totalersatz des Meniskus kein alloplastisches Material klinisch verfügbar. Es besteht nur die Möglichkeit einer Meniskustransplantation (Allograft), wobei passende Spendermenisken oft schwer verfügbar sind. Auch hier herrscht Unklarheit bezüglich der Langzeit-Chondroprotektion eines Allografts. Aufgrund des dringenden Bedarfs eines geeigneten Materials für den Meniskusersatz entwickelte die Firma Orthox (Orthox Ltd. Abingdon, Vereinigtes Königreich) ein Implantat aus Seidenfibroin. Dieses zeigte in einer ersten tierexperimentellen Studie vielversprechende Ergebnisse [Gruchenberg, et al. 2015]. Jedoch wurden auch Defizite hinsichtlich der Fixierung des Implantats am Restmeniskus aufgezeigt. Daraufhin wurde das Material einem Optimierungsprozess unterzogen.

In der vorliegenden Studie sollte nun diese zweite Generation der Implantate aus Seidenfibroin am Schafmodell über sechs Monate getestet werden. Die Defektgröße wurde im Vergleich zur ersten Studie erweitert und es wurde ein subtotaler Meniskusersatz durchgeführt. Nach sechs Monaten erfolgte die makroskopische,

biomechanische und histologische Auswertung. Zentrale Fragestellung dabei war, ob das Implantat im Vergleich zur Meniskektomie den femoralen und tibialen Knorpel vor Degeneration schützen kann.

2. Material und Methoden

2.1. Optimiertes Seidenfibroin Implantat

Die Seidenfibroin Implantate wurden von der Firma Orthox Ltd. (Orthox Ltd., Abingdon, Vereinigtes Königreich) entwickelt und hergestellt. Seidenfasern des Kokons der Seidenspinnerraupe (*Bombyx mori*) dienten dabei als Ausgangsmaterial. Native Seidenfasern der Seidenspinnerraupe bestehen im Wesentlichen aus zwei langkettigen Eiweißmolekülen: Fibroin und Sericin [Altman, et al. 2003]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Sericin, welches die Fibroinmoleküle umgibt, stark immunogen ist und so in der Lage ist Überempfindlichkeitsreaktionen auszulösen [Zaoming, et al. 1996, Wen, et al. 1990, Dewair, et al. 1985]. Während des Herstellungsprozesses des Implantats wurde daher der Fibroin-Anteil extrahiert und anschließend in eine offenporige Matrix überführt. Im Unterschied zur porösen Matrix ist die Oberfläche des Materials glatt. Strukturelle Analysen der ersten Generation von Implantaten zeigten, dass das Material eine hohe Porosität (85 %), bei einer Porengröße von 150-300 µm besitzt [Gruchenberg, et al. 2015]. Biomaterialien aus Seide werden von der amerikanischen Arzneimittel-Behörde (US-Pharmacopeia, USP) als nicht-resorbierbar klassifiziert, da es nach Implantation über 60 Tage seine ursprüngliche Festigkeit behält. Tatsächlich konnten mehrere Studien nachweisen, dass Seide im Körper einem langsamen Abbauprozess unterliegt und somit auf lange Sicht resorbierbar ist [Rossitch, et al. 1987, Soong and Kenyon 1984, Salthouse, et al. 1977].

Im Zuge der Materialoptimierung wurden MRT (Magnetresonanztomographie)-Scans von ovinen medialen Menisken angefertigt, auf deren Grundlage ein Prototyp in Form eines 3D-Drucks hergestellt wurde. So konnten im Gegensatz zur ersten Generation anatomisch geformte Implantate hergestellt werden, die der tatsächlichen Form des ovinen Meniskus entsprechen. Außerdem wurde ein Fasernetz aus Seidenfibroin in die poröse Matrix integriert, wodurch eine erhöhte Ausrissfestigkeit der Fixierungsnaht und damit eine stabile Fixierung an der Meniskus-Randleiste erreicht werden sollte.

Die in dieser Studie verwendeten Implantate wurden beim Hersteller bereits durch Gamma-Strahlung sterilisiert, einzeln in gepufferter Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline) abgepackt und mit der Chargenbezeichnung und Nummer des Implantats versehen.

2.2. Tierversuch

Der Versuch wurde am 06. Juli 2015 unter der Regierungs-Nummer 1229 vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Die Durchführung erfolgte streng nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. Mai 2006 (zuletzt geändert durch Art. 4 Abs. 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016), der Tierschutz Versuchstierverordnung in der Fassung vom 01. August 2013 (zuletzt geändert durch Art. 394 der Verordnung vom 31. August 2015) und der Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

2.2.1. Tiere und Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 27 jungadulte (2 ± 1 Jahre) weibliche Merino-Schafe aus landwirtschaftlicher Haltung mit einem mittleren Gewicht von 93 ± 8 kg. In der vorhergehenden Studie wurden bei einigen Schafen bereits während der Operation deutliche degenerative Veränderungen des artikulären Knorpels festgestellt, was eine spätere Beurteilung der chondroprotektiven Funktion des Implantats erschwerte [Gruchenberg, et al. 2015]. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie darauf geachtet jüngere Tiere zu verwenden. Die Unterbringung der Schafe erfolgte am Tierforschungszentrum der Universität Ulm. Hier wurden die Tiere bereits sechs Wochen vor Versuchsbeginn eingestallt und circa eine Woche vor dem chirurgischen Eingriff einer Ultraschalluntersuchung unterzogen. So konnten eventuell vorliegende Trächtigkeiten ausgeschlossen werden. Die Schafe wurden präoperativ zu zweit oder zu dritt in mit Stroh eingestreuten Boxen gehalten. Circa zwei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff erfolgte die Unterbringung in einem Offenstall mit ganztägigem Weidezugang. Den Tieren standen stets Selbsttränken und Heu ad libitum zur Verfügung.

2.2.2. Versuchsdesign

Die 27 Schafe wurden randomisiert in drei Operationsgruppen zu jeweils neun Tieren eingeteilt (Tabelle 2). Gruppe 1 diente als Sham-operierte Kontrollgruppe. Hier wurde nur der chirurgische Zugang zum medialen Meniskus durchgeführt (*siehe 2.2.3 Operation*). Es sollte untersucht werden, in wie weit die Operationsmethode allein zu Veränderungen des artikulären Knorpels führt. Bei allen Tieren der Gruppe 2 und 3 wurde eine subtotale Meniskusresektion durchgeführt (*siehe 2.2.3. Operation*). Dieser Defekt blieb bei den Tieren der Gruppe 2 leer. In Gruppe 3 wurde nach der subtotalen Meniskektomie das Seidenfibroin-Implantat in den Defekt eingesetzt und fixiert. In allen Gruppen erfolgte die Auswertung nach sechs Monaten.

Tabelle 2: Übersicht über die drei Versuchsgruppen.

	Eingriff	Standzeit	Tierzahl
Gruppe 1	Sham-Operation	6 Monate	9
Gruppe 2	Subtotale Meniskektomie	6 Monate	9
Gruppe 3	Meniskusersatz durch Seidenfibroin Implantat	6 Monate	9

2.2.3. Operation

Die Operations-Vorbereitung sowie der chirurgische Eingriff am medialen Meniskus wurden in Anlehnung an die von Gruchenberg et al. [Gruchenberg, et al. 2015] beschriebenen Methoden durchgeführt.

Operations-Vorbereitung

Vor dem operativen Eingriff mussten die Tiere für 48 Stunden fasten, wobei die Wasseraufnahme über Selbsttränken weiterhin ungehindert möglich war. Durch diese

Maßnahme sollte das Risiko der Regurgitation und Aspiration von Pansen-Inhalt vor oder während der Intubation gesenkt werden.

Am Operationstag wurde den Schafen zur Sedation bereits im Stall 0,2 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2 % Injektionslösung für Tiere: Rinder, Pferde, Hunde, Katzen, Bayer Vital GmbH) intramuskulär verabreicht. Zusätzlich bekamen die Tiere zur prophylaktischen antibiotischen Abdeckung 10 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl® LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH, Deutschland) und 2 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Pfizer GmbH, Deutschland) zur intraoperativen Analgesie, subkutan appliziert. Im Operationsvorbereitungsraum wurde nach Scheren und Desinfektion des linken Ohres ein 20 G Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunüle®, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) in die *Vena auricularis lateralis* gelegt und mit Klebeband fixiert (Leukoplast®, BSN medical GmbH, Deutschland). Über diesen erfolgte anschließend die intravenöse Narkoseeinleitung mit 10-20 mg/kg KG Thiopental-Natrium (Thiopental Inersa 0,5 g, Inersa Arzneimittel GmbH, Deutschland). Bei ausreichender Narkosetiefe, die durch Kontrolle des Lid- und Schluckreflexes überprüft wurde, wurden die Tiere orotracheal intubiert und an ein Inhalationsnarkosegerät angeschlossen. Die Aufrechterhaltung der Narkose über die gesamte Operationsdauer erfolgte mit 1-2 % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Deutschland). Die Spontanatmung blieb dabei stets erhalten. Zur intraoperativen Flüssigkeitssubstitution wurde eine isotone Vollelektrolytlösung (Jonosteril®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) per Dauertropfinfusion verabreicht. Die Schafe erhielten außerdem eine Magensonde, um die Aufgasung des Pansens während der Narkose zu verhindern. Schließlich wurde ein Augengel (Vidisc®, Bausch und Lomb GmbH, Deutschland) eingebracht, um einer Austrocknung des Auges während der Operation vorzubeugen. Die linke Hintergliedmaße wurde großzügig geschoren, mit Jodseife (Jodosept PVP®, Vetoquinol GmbH, Deutschland) gereinigt und anschließend mit Alkohol desinfiziert. Die Tiere wurden dann im Operationsraum auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert und die linke Hintergliedmaße erneut mit einem Hautantiseptikum (Kodan® Tinktur forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Deutschland) desinfiziert. Nun wurden ein Bauchtuch und zwei sterile Handschuhe über die linke Klaue bis über das Sprunggelenk gezogen und die Schafe bis auf den Kopf und das linke Hinterbein mit mehreren sterilen Tüchern abgedeckt. Während des Eingriffs wurden Kreislaufparameter und Sauerstoffsättigung stetig kontrolliert.

Zugang zum medialen Meniskus

Der operative Zugang zum Kniegelenk erfolgte von medial und wurde in allen Versuchsgruppen gleich durchgeführt. Zunächst wurden *Patella*, *Ligamentum patellae* und *Tuberositas tibiae* palpirt sowie der Kniegelenkspalt und das mediale Kollateralband aufgesucht. Die circa 6-8 cm lange Hautinzision erfolgte nun mit einer Skalpellklinge Nr. 20 (Carbon Steel Skalpellklingen #20, B. Braun Aesculap Division, Tuttlingen, Deutschland) parallel zum medialen Seitenband in proximo-distaler Richtung (Abbildung 5). Ebenso wurden anschließend unter Verwendung einer Skalpellklinge Nr. 15 (Carbon Steel Skalpellklingen #15, B. Braun Aesculap Division, Tuttlingen, Deutschland) das Unterhautgewebe, die oberflächliche (*Fascia femoralis superficialis*) sowie die tiefe Faszie (*Fascia genus*) durchtrennt.



Abbildung 5: Medialer Zugang zum Kniegelenk mit proximo-distaler Schnittführung, parallel zu medialen Kollateralband.

Auch die gemeinsame Aponeurose des *Musculus rectus femoris* und *Musculus vastus medialis* wurde inzidiert, wodurch der femorale Ansatz des medialen Kollateralbandes (*Epicondylus medialis*) dargestellt werden konnte. Dieser wurde knöchern mit einem Lambot Meißel abgelöst und zusammen mit dem anhaftenden medialen Kollateralband vorsichtig nach distal frei präpariert (Abbildung 6 A). Dadurch war eine Subluxation des Kniegelenks als Voraussetzung für die Darstellung des medialen Meniskus möglich (Abbildung 6 B). Anschließend wurde die Gelenkkapsel oberhalb des Meniskus horizontal nach kranial und kaudal eröffnet. Unter Beugung, Außenrotation und Valgusstellung konnte der mediale Meniskus dargestellt werden.

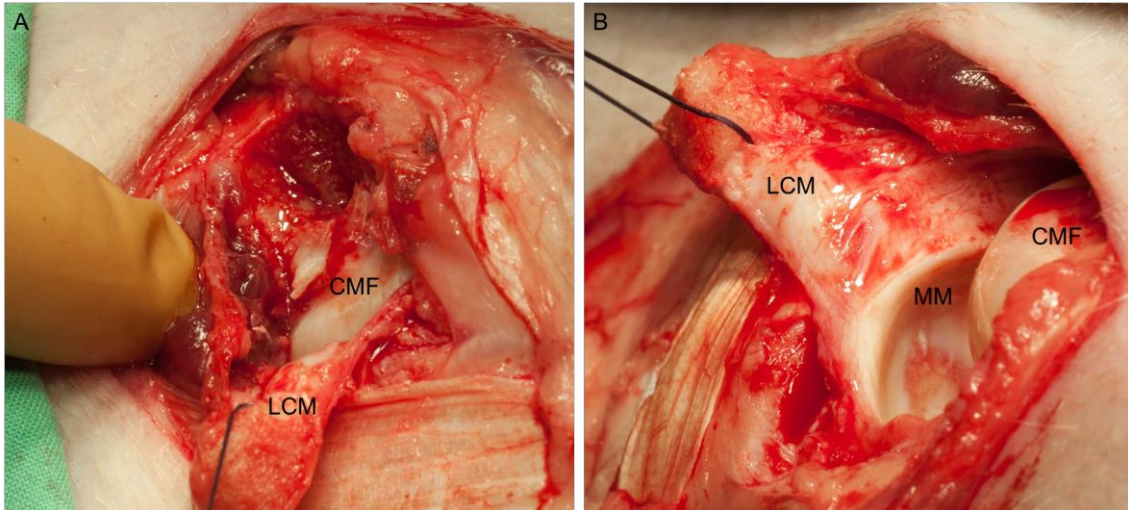


Abbildung 6: (A) Zustand nach knöcherner Ablösung des Ansatzes des medialen Kollateralbandes an der medialen Femurkondyle und Präparation nach distal. LCM = Ligamentum collaterale mediale; CMF = Condylus medialis femoris. (B) Subluxation des Kniegelenks mit Blick auf den medialen Meniskus. MM = Meniscus medialis.

Resektion des Meniskus

Bei allen Tieren der Gruppe 2 und 3 wurde nach der Eröffnung des Gelenks und Darstellung des medialen Meniskus eine subtotale Meniskusresektion durchgeführt (Abbildung 7 A, B). Das Resektionsausmaß erstreckte sich hierbei vom Vorderhorn bis zum Hinterhorn des Meniskus. Die Meniskuswurzeln blieben unberührt. Außerdem wurde stets eine Meniskus-Randleiste von ca. 2 mm belassen. Dies war insofern von Bedeutung, als dass beim Schaf nur ca. 1-2 mm der Peripherie des Meniskus durchblutet sind. Der Anschluss an diese Gefäße ist Voraussetzung für die erfolgreiche Einheilung des Implantats. Bei senkrechter Schnitfführung wurde vor allem darauf geachtet, den Knorpel unterhalb des Meniskus nicht zu schädigen. Zur Resektion wurde eine Mikro-Skalpellklinge verwendet (Mikro-Skalpellklinge #367, B. Braun Aesculap Division, Tuttlingen, Deutschland).

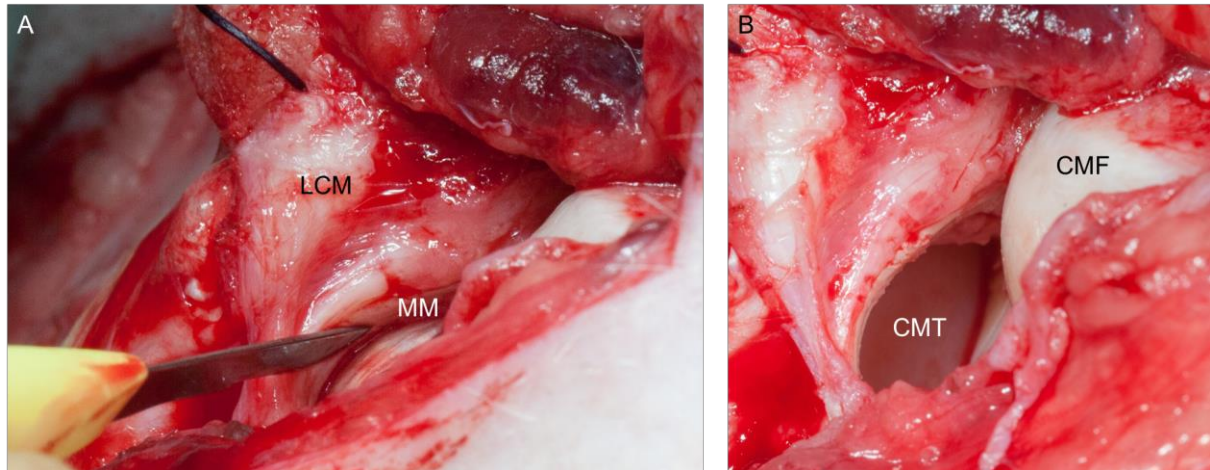


Abbildung 7: (A) Resektion des medialen Meniskus unter Verwendung einer Mikro-Skalpellklinge. Es wurde stets auf eine senkrechte Schnittführung geachtet. MM = Meniscus medialis; LCM = Ligamentum collaterale mediale. (B) Zustand nach subtotaler Meniskusresektion mit Blick auf den Knorpel des medialen Tibiaplateaus. CMT = Condylus medialis tibiae; CMF = Condylus medialis femoris.

Implantation des Ersatzmaterials

In Operationsgruppe 3 wurde das resezierte Meniskusgewebe durch das Seidenfibroin-Implantat ersetzt. Dazu wurde das Implantat zuvor anhand des resezierten Meniskusstückes mit einem Skalpell Nr. 15 (Carbon Steel Skalpellklingen #15, B. Braun Aesculap Division, Tuttlingen, Deutschland) passgenau in die richtige Form und Größe gebracht (Abbildung 8 A, B). Während der Vorbereitung des Implantats wurde das Wundgebiet mit Kochsalz-getränkten Tupfern (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) abgedeckt um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern.

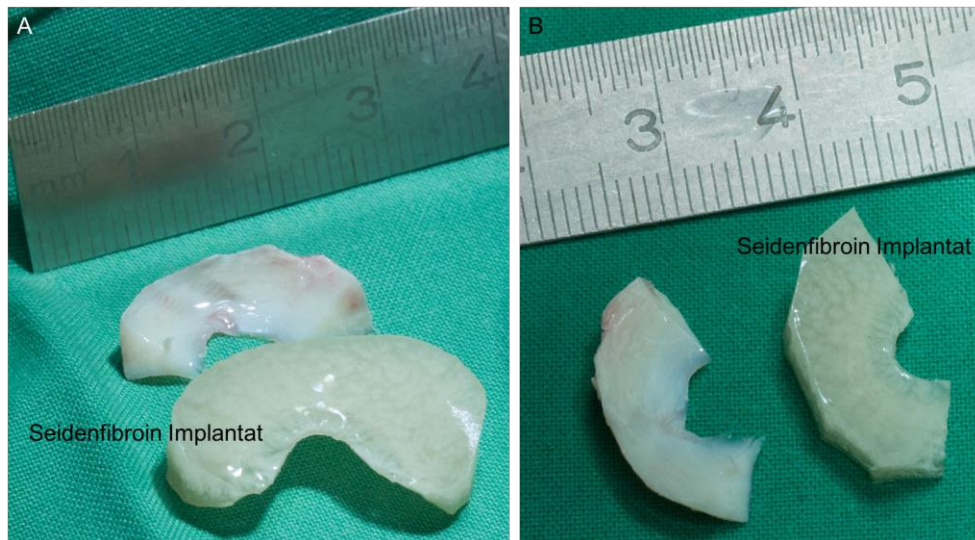


Abbildung 8: (A) Reseziertes Stück des medialen Meniskus im Vergleich zur Grundform des Implantats aus Seidenfibroin. (B) Meniskusstück und Implantat nach Anpassung von Größe und Form des Ersatzmaterials.

Zur Fixierung wurden drei doppelt armierte Fäden in Form einer U-förmigen Matratzennaht in das Implantat vorgelegt (Ethibond EXCEL 3-0, Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Deutschland). Bei der Stichführung wurde dabei stets darauf geachtet, das Fasernetz in der Mitte des Implantats in die Naht zu integrieren um eine hohe Ausrissfestigkeit zu gewährleisten (Abbildung 9). Das Konstrukt wurde schließlich in den Defekt verbracht, die Fäden von innen durch die Meniskusrandleiste gestochen und an der Meniskusbasis mit chirurgischen Knoten per Hand fixiert (Abbildung 10).

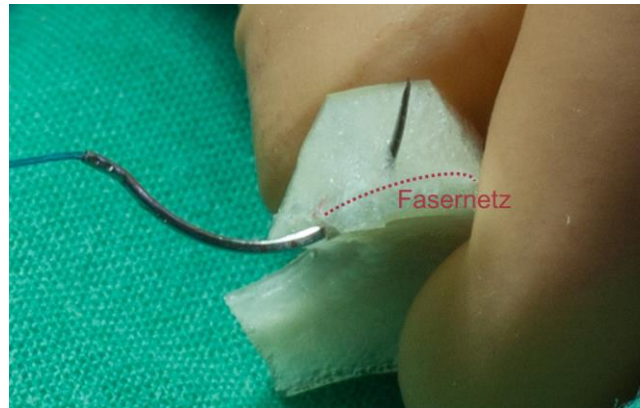


Abbildung 9: Stichführung für die Fixierung des Seidenfibroin Implantats. Das horizontalverlaufende Fasernetz wurde stets in die Naht integriert.

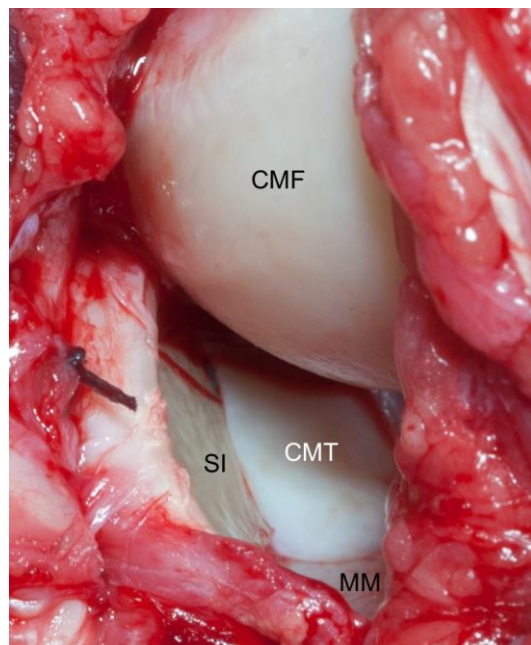


Abbildung 10: Innerhalb des Defekts des medialen Meniskus fixiertes Seidenfibroin Implantat. MM = Meniscus medialis; SI = Seidenfibroin Implantat; CMT = Condylus medialis tibiae = CMT; CMF = Condylus medialis femoris.

Wundverschluss

Der Wundverschluss wurde in allen Operationsgruppen in gleicher Weise durchgeführt. Zunächst wurde der *Epicondylus medialis* inklusive des medialen Seitenbandes reponiert. Ein Krallenplättchen (Bandfixationsplatte, HUG, Synthes) wurde auf dem *Epicondylus medialis* positioniert und mit Hilfe einer bikortikalen Schraube fixiert. Hierfür musste zunächst ein 2,5 mm-Bohrloch durch die proximale und distale Kortikalis des Femurs geschaffen werden (Abbildung 11 A). Nach Bestimmung der benötigten Schraubenlänge wurde eine passende selbstschneidende 3,5 mm-

Kortikalisschraube (Kortikalisschraube $\varnothing = 3,5$ mm, selbstschneidend, DePuy Synthes, Deutschland) per Hand eingedreht (Abbildung 11 B, Abbildung 12).

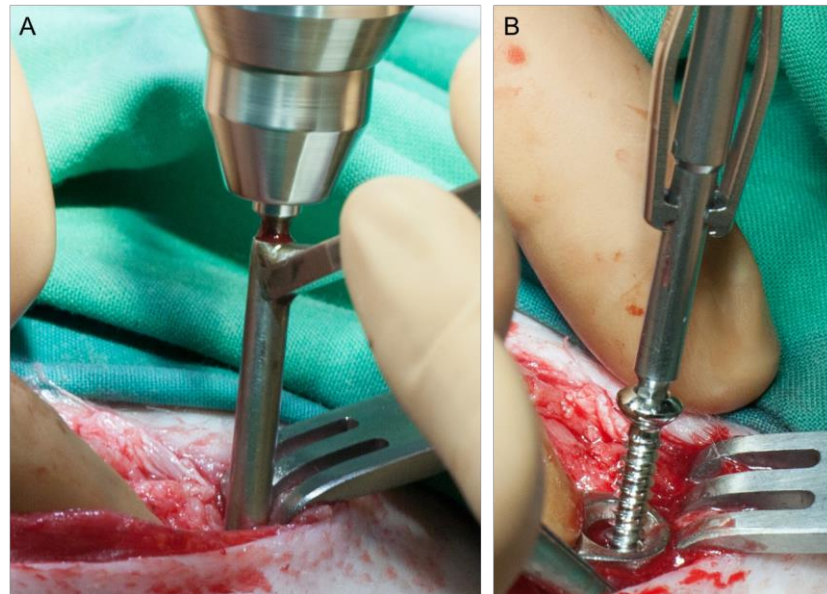


Abbildung 11: (A) Bohrung durch proximale und distale Kortikalis (2,5 mm). (B) Eindrehen der selbstschneidenden Kortikalisschraube (3,5 mm).

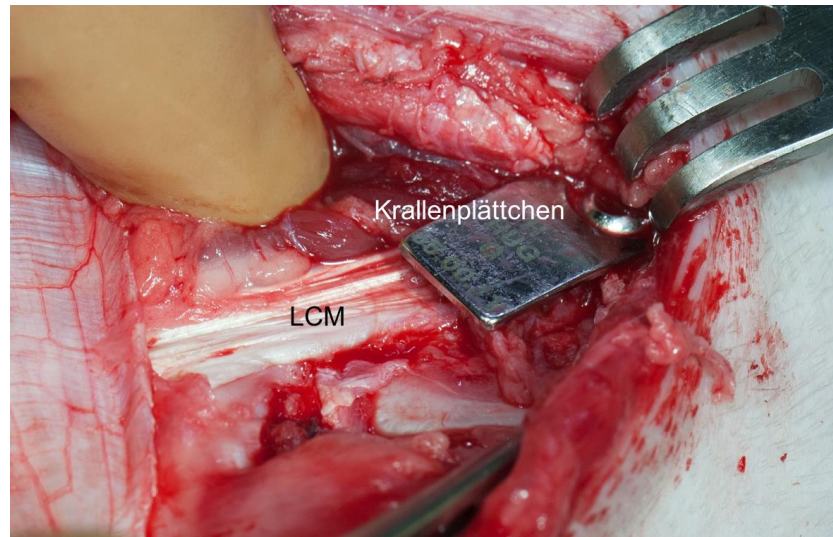


Abbildung 12: Mit Hilfe eines Krallenplättchens und einer Kortikalisschraube refixiertes mediales Kollateralband. LCM = Ligamentum collaterale mediale.

Durch zwei bis drei Streck- und Beugebewegungen der Gliedmaße wurde überprüft, ob das mediale Kollateralband unter ausreichender Spannung refixiert wurde. Nach Spülung des Operationsgebietes (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) folgte der schichtweise Verschluss von Gelenkkapsel, Faszien und Unterhaut durch Einzelhefte. Hierfür wurde ein resorbierbarer Faden verwendet (Vicryl 2-0, Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Deutschland). Für die Hautnaht wurde ein nicht-resorbierbarer Faden gewählt (Resolon® 3-0, RESORBA Medical GmbH). Auch hier erfolgte die Adaptation durch Einzelhefte. Das Wundgebiet wurde abschließend mit steriler Spüllösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) und einem Hautantiseptikum (Octenisept®, Schülke & Mayr, Deutschland) gereinigt und ein Sprühverband (OPSITE Spray, Smith & Nephew GmbH, Deutschland) aufgebracht.

Soweit dies aufgrund der eingeschränkten Einsehbarkeit des Kniegelenks möglich war, wurde bei allen Tieren intraoperativ der Zustand des femoralen und tibialen Knorpels beurteilt. Dabei wurden bereits bestehende degenerative Veränderungen des artikulären Knorpels oder sonstige Auffälligkeiten im Operationsprotokoll des Tieres vermerkt.

2.2.4. Postoperative Versorgung

Nach Narkoseende wurden die Tiere in eingestreute Boxen gebracht und hier nach Einsetzen des Schluckreflexes extubiert. Sie blieben während der gesamten Aufwachphase unter Beobachtung, bis sie ihr volles Stehvermögen wiedererlangt hatten. In den ersten drei postoperativen Tagen erfolgte täglich eine Allgemeinuntersuchung mit Temperaturkontrolle und Wundpflege mit einem Hautantiseptikum (Octenisept®, Schülke & Mayr, Deutschland). Außerdem wurde die antibiotische Behandlung mit 10 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl® LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH, Deutschland) zur Infektionsprophylaxe sowie die analgetische Behandlung mit 2 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Pfizer GmbH, Deutschland) über diese drei Tage fortgesetzt. Im weiteren Verlauf wurden Allgemeinuntersuchung und Wundkontrolle alle zwei Tage durchgeführt, bis nach zehn Tagen die Hautfäden entfernt wurden. Nach zwei bis drei Wochen erfolgte die Umstellung auf eine Haltung in Offenstall und Weide.

2.2.5. Versuchsende

Sechs Monate nach dem chirurgischen Eingriff erfolgte die Auswertung. Die Schafe wurden nach Betäubung mittels Bolzenschuss durch sofortigen Blutentzug von geschulten Tierpflegern des Tierforschungszentrums getötet.

2.3. Aufarbeitung der Proben

2.3.1. Präparation

Die Präparation der linken und rechten (Kontrolle) Hintergliedmaßen erfolgte direkt im Anschluss an die Tötung. Beide Gliedmaßen wurden hierfür im Hüftgelenk abgetrennt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden fotografisch dokumentiert und die Befunde in einem Präparationsprotokoll vermerkt. Nach der Entfernung von Haut, Muskulatur und Bindegewebe wurde beidseits die Kapsel des Kniegelenks vorsichtig eröffnet und Synovialflüssigkeit mit einer Spritze aspiriert. Anschließend wurde jeweils kaudomedial eine Probe der Synovialmembran in einer Größe von ca. 0,7 x 0,7 cm entnommen. Diese wurde für die spätere histologische Untersuchung sofort zur Fixierung in Formaldehyd (4 %) eingelegt.

Um das Femur von der Tibia zu trennen, wurden das mediale und laterale Seitenband sowie unter starker Beugung des Gelenks das vordere und hintere Kreuzband durchtrennt. Auch die meniskofemorale Verbindung (*Ligamentum meniscofemorale*) des lateralen Meniskus wurde dabei gelöst. An der linken Gliedmaße mussten dafür zunächst medial die Kortikalisschraube und das Krallenplättchen entfernt werden. Anschließend wurden die Menisken vom Tibiaplateau entfernt, indem die anterioren und posterioren Insertionsligamente sowie die Verbindung zur Gelenkkapsel durchtrennt wurden. Aus Vorder- und Hinterhorn der medialen Menisken der linken (Sham-Gruppe) und rechten Gliedmaßen (Sham- und Implantat-Gruppe) wurde zunächst jeweils eine zylinderförmige Probe mit Hilfe einer Biopsie-Stanze ($\varnothing = 5$ mm) senkrecht zur femoralen Oberfläche entnommen und in phosphat-gepufferte Salzlösung (Gibco® PBS pH 7.4, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) eingelegt (Abbildung 13 A). Bei den Tieren der Implantat-Gruppe wurden auf gleiche Weise, wenn möglich zwei Proben aus jedem Implantat entnommen. Das restliche Meniskusgewebe/Implantat wurde in Vorderhorn, *Pars intermedia* und Hinterhorn geteilt und in Formaldehyd (4 %)

für die histologische Aufarbeitung fixiert (Abbildung 13 B). Ebenso wurde mit den medialen Menisken der linken und rechten Gliedmaße der Leerdefekt-Gruppe verfahren.

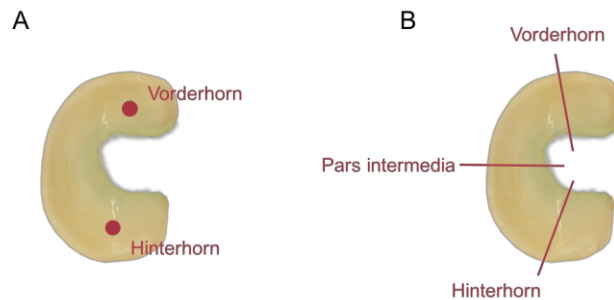


Abbildung 13: (A) Entnahmestellen der Proben aus Vorder- und Hinterhorn der medialen Menisken/Implantate. (B) Anfertigung vertikaler Schnitte aus Vorderhorn, Pars intermedia und Hinterhorn der medialen Menisken/Implantate für die histologische Untersuchung.

Für die anschließende biomechanische Untersuchung des tibialen Knorpels wurde in allen Versuchsgruppen an der linken und rechten Gliedmaße das Tibiaplateau vom Tibiaschaft mit einer Diamant-Bandsäge (Exakt 300/30-1198, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Deutschland) ca. 2 cm unterhalb der Gelenkfläche abgesetzt. Zusätzlich wurde das Tibiaplateau in der *Area intercondylaris* längs durchtrennt und so in den *Condylus lateralis* und den *Condylus medialis* geteilt. Der *Condylus medialis* wurde bis zur biomechanischen Testung, die am selben Tag stattfand, mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) befeuchtet. Der *Condylus lateralis* wurde in Formaldehyd (4 %) fixiert. Ebenso wurde die Gelenkfläche des Femurs über der *Trochlea ossis femoris* vom Femurschaft abgesetzt und in Formaldehyd (4 %) fixiert. Bei zwei Tieren pro Versuchsgruppe wurden Femur und Tibia zunächst intakt belassen und erst nach der Untersuchung mit Hilfe eines bildgebenden Verfahrens (Magnetresonanztomographie, MRT) in Formaldehyd (4 %) fixiert. Während der Untersuchung im MRT wurden die Proben mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten.

2.3.2. Makroskopische Untersuchung

Bereits vor der Entfernung von Haut, Muskulatur und Bindegewebe wurde auf pathologische Veränderungen geachtet und jegliche Auffälligkeit im Präparationsprotokoll vermerkt. Die Kniegelenksregion wurde vor allem hinsichtlich möglicher entzündlicher Veränderungen oder Wundheilungsstörungen untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auch auf den Zustand des medialen Seitenbandes gelegt. Bei der Untersuchung der Gelenkkapsel wurde auf Fibrose und Entzündungsanzeichen geachtet. Die entnommene Synovialflüssigkeit wurde makroskopisch hinsichtlich Menge, Konsistenz und Farbe beurteilt.

Menisken/Implantate

Die lateralen und medialen Menisken der operierten (linken) Gliedmaße (jeweils n = 27) sowie der nicht-operierten Gliedmaße (jeweils n = 27) wurden auf Vorliegen von degenerativen Veränderungen oder möglichen Läsionen untersucht. Bei der Operationsgruppe mit Leerdefekt (Gruppe 2) wurde beurteilt, ob und in welchem Ausmaß sich Regenerationsgewebe im Defekt gebildet hat. In der Implantat-Gruppe (Gruppe 3) wurde untersucht, ob das Implantat intakt ist und eine feste Verbindung zur Meniskus-Randleiste aufgebaut wurde.

Gelenkknorpel

Für die makroskopische semiquantitative Beurteilung des artikulären Knorpels wurde ein modifiziertes Beurteilungsschema nach Outerbridge an den medialen und lateralen Kondylen von Femur und Tibia (jeweils n = 27) in allen Operationsgruppen gleichermaßen durchgeführt [Outerbridge 1961] (Tabelle 3). Die medialen und lateralen Femur- und Tibiakondylen der rechten Gliedmaßen dienten als Kontrolle (jeweils n = 27).

Tabelle 3: Beurteilungsschema nach Outerbridge für die semiquantitative Beurteilung des artikulären Knorpels von Femur und Tibia [Outerbridge 1961].

Grad	Beschreibung
0	Keine sichtbaren Veränderungen
1	Erweichung und Aufquellen des Knorpels
2	Aufbrechen und Fissurbildung in Bereich ≤ 1 cm
3	Aufbrechen und Fissurbildung in Bereich ≥ 1 cm
4	Abtragung des Knorpels bis auf den Knochen

2.3.3. Biomechanische Untersuchung

Biomechanische Untersuchung des Seidenfibroin Implantats und des Meniskus

Mit Hilfe eines Stress-Relaxationstests wurden die viskoelastischen Eigenschaften des Seidenfibroin Implantats im Vergleich zum nativen Meniskus ermittelt. Hierfür wurden, wenn möglich zwei zylinderförmige Proben ($\varnothing = 4,6$ mm) aus dem Implantat ($n = 10$) sowie jeweils eine Probe aus Vorder- ($n = 9$) und Hinterhorn ($n = 8$) des medialen Meniskus der Sham-Gruppe verwendet (siehe 2.3.1. Präparation). Mediale Meniskusproben der rechten Gliedmaßen dieser Tiere dienten als Kontrolle ($n = 34$). Die Entnahme der Zylinder erfolgte jeweils mit Hilfe einer Biopsie-Stanze ($\varnothing = 5$ mm). Vor dem Test wurden die zylindrischen Proben mit Hilfe eines Mikrotoms jeweils planparallel zur femoralen Meniskusoberfläche zurechtgeschnitten. Um Änderungen der Eigenschaften des Meniskusersatzmaterials über den Versuchszeitraum zu erfassen, wurden zusätzlich identische zylindrische Proben aus nicht-implantiertem Seidenfibroin Material untersucht ($n = 5$; $\varnothing = 4,6$ mm). Hierfür wurden zusätzliche flache Materialproben (FibroFix™ Flatsheets) von der Firma Orthox bereitgestellt.

Der Relaxationstest wurde mit einem Prüfzylinder (BXC-EZ001.A50-000) der Firma Zwick/Roell (Zwick GmbH und Co.KG, Ulm, Deutschland) durchgeführt. Der Prüfaufbau bestand aus einem Probenhalter in Form eines Zylinders aus Plexiglas (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm), der mit PBS

(Phosphate buffered saline, Gibco® PBS pH 7.4, Thermo Fisher Scientific Inc.) aufgefüllt wurde (Abbildung 14). In der Mitte des Zylinders befand sich eine flache Stahlplatte, auf die später die Proben mit der femoralen Seite nach oben, mittig aufgelegt wurden. Dies ermöglichte eine seitliche Ausdehnung des Materials während des Tests („unconfined compression“). Über einen Druckstempel ($\varnothing = 10 \text{ mm}$) wurde die Probe einer axialen Belastung ausgesetzt. Die auftretenden Kräfte wurden mit Hilfe eines 50 N Kraftsensors (KAP-S, A.S.T. GmbH, Wolnzach, Deutschland) mit einer Genauigkeit von $\leq 0,27 \%$ aufgenommen. Die dabei auftretende Verformung der Probe wurde über einen Lasersensor (optoNCDT 2200 ILD220-20, μ -Epsilon Messtechnik GmbH und Ko. KG, Ortenburg, Deutschland) erfasst.

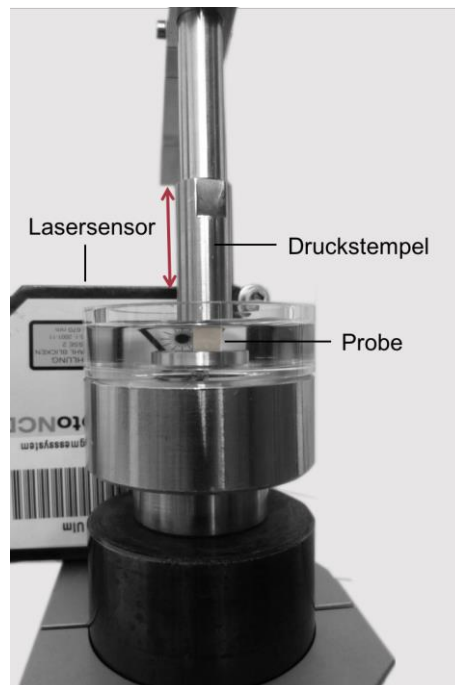


Abbildung 14: Prüfaufbau des Stress-Relaxationstest. Über den Druckstempel wurde eine axiale Belastung auf die mittig aufgelegte Probe ausgeübt. Die während der Belastung auftretende Verformung wurde mit Hilfe des Lasersensors erfasst.

Vor Einlegen der Probe musste zunächst eine Referenzfahrt durchgeführt werden. Hierfür wurde mit dem Druckstempel in Richtung Probenhalter gefahren, bis dieser die Stahlplatte gerade berührte. Dort wurde der Nullpunkt festgelegt. Das nachfolgende Prüfprotokoll wurde nach Chia und Hull erstellt [Chia and Hull 2008]: Zunächst wurde eine Vorkraft von 0,5 N mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min positionsgeregelt angefahren. Durch das Aufbringen einer Vorkraft wurde die Probe in einen definierten Ausgangszustand versetzt. Anschließend wurde die Probe zyklisch zwischen 0,1 % und 12 % Dehnung komprimiert. Nach diesen 10 Setzzyklen wurde eine

Dehnung von 12 % für 60 min gehalten (Abbildung 15 A). Durch die dabei auftretende Relaxation der Probe kam es bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes zu einem kontinuierlichen Absinken der Kraft (Abbildung 15 B). Die Geschwindigkeit, mit der die Dehnungen angefahren wurden, war abhängig von der zuvor ermittelten individuellen Probenhöhe (L_0) und betrug $32 \% L_0/\text{min}$. Die Probenhöhe (L_0) wurde automatisch nach Erreichen der Vorkraft von 0,5 N erfasst. Eine konstante relative Belastungsgeschwindigkeit aller Proben war insofern wichtig, als dass diese einen Einfluss auf das Materialverhalten hat. So ist die Steifigkeit eines viskoelastischen Materials abhängig von der Belastungsgeschwindigkeit.

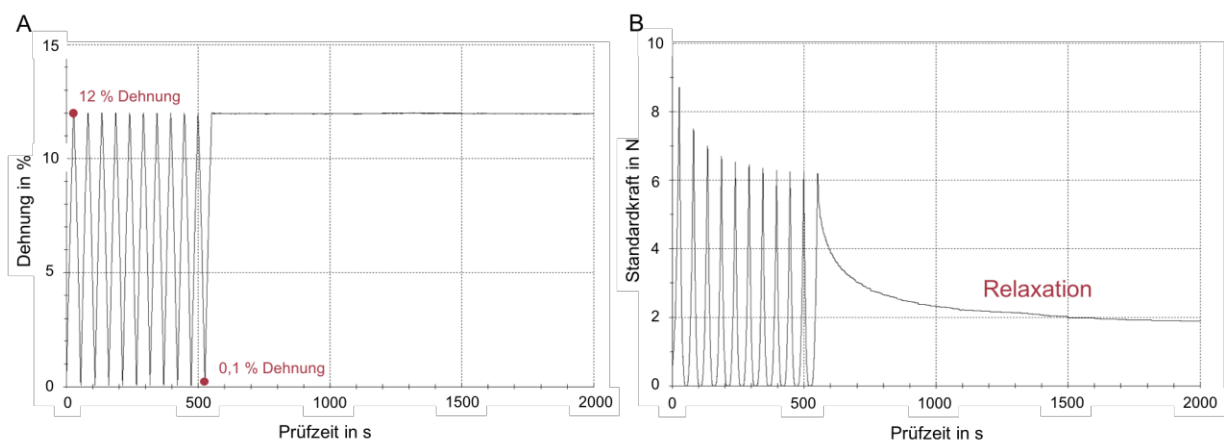


Abbildung 15: (A) Verlauf der Probendehnung über die Zeit. Nach 10 Setzzyklen zwischen 0,1 % und 12 % Dehnung, wurde eine konstante Dehnung von 12 % über 60 min gehalten. (B) Während dieser Relaxation kam es zum Absinken der Kraft.

Die Erfassung und Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der Standardsoftware der Firma Zwick/Roell (TestXpert II, Zwick GmbH und Co. KG). Die anschließende Verarbeitung der Daten erfolgte mit MATLAB® R2016a (MathWorks, Natick, MA, USA), einer speziellen Software zur Analyse von Daten. Ermittelt wurde das Gleichgewichtsmodul E_{eq} (MPa) der Probe. Dieses beschreibt die Steifigkeit eines biphasischen Materials im Gleichgewichtszustand:

$$E_{eq} = \frac{\sigma_{t \rightarrow \infty}}{\varepsilon_i}; \varepsilon_i = 0,12$$

$\sigma_{t \rightarrow \infty}$: Spannung der Probe im Gleichgewichtszustand (Kraft pro Fläche, hier: gemittelte Werte über die letzten 10 Minuten des Tests)

ε_i : Dehnung der Probe; hier festgelegt auf 12 %

Biomechanische Untersuchung des tibialen Knorpels

Die Materialeigenschaften des artikulären Knorpels werden maßgeblich von dessen Zusammensetzung sowie Ultrastruktur beeinflusst. So kommt es im Rahmen degenerativer Veränderungen von Knorpelgewebe auch zu einer Änderung der mechanischen Eigenschaften [Mow and Huiskes 2005, Roth and Mow 1980]. Um den Zustand des Gelenkknorpels in den drei Operationsgruppen zu erfassen, wurde ein Eindrückttest an der Knorpeloberfläche der medialen Tibiakondyle durchgeführt (jeweils n = 7, Gruppe 3: n = 6). Zusätzlich diente die mediale Tibiakondyle der kontralateralen, nicht-operierten Gliedmaßen als Kontrolle (jeweils n = 7, Gruppe 3: n = 6). Der Eindrückttest wurde auf jedem Tibiaplateau jeweils an drei verschiedenen Punkten durchgeführt (Abbildung 16). Ein Messpunkt lag im Bereich der *Eminentia intercondylaris*. Dieser ist *in vivo* nicht vom Meniskus bedeckt, sondern steht in direktem Kontakt mit der medialen Femurkondyle. Zwei weitere Messpunkte befanden sich jeweils unter dem Vorder- und Hinterhorn des Meniskus bzw. des Implantats. Diese drei Punkte auf dem Tibiaplateau wurden zunächst mit einem speziellen Gewebestift markiert (Devon™ Surgical Skin Marker Regular Tip, Covidien, Medtronic, Minneapolis, USA).



Abbildung 16: Mediale Tibiakondyle mit den drei Messpunkten für den Eindrückttest. Messpunkt 1 im Bereich der Eminentia intercondylaris war in vivo nicht von Meniskus/Implantat bedeckt und stand in direktem Kontakt mit der Knorpeloberfläche der medialen Femurkondyle. Die Messpunkte 2 und 3 befanden sich in vivo jeweils unter Vorder- und Hinterhorn des medialen Meniskus/Implantats.

Die Durchführung des Tests erfolgte an einer Materialprüfmaschine der Firma Zwick/Roell (Z10 480481, Zwick GmbH und Co.KG, Ulm, Deutschland). Ein Lasersensor (optoNCDT 2200 ILD220-20, μ -Epsilon Messtechnik GmbH und Co. KG, Ortenburg, Deutschland) mit einem Messbereich von 20 mm wurde verwendet, um die auftretende Verformung der Probe zu erfassen. Der Prüfaufbau bestand aus einer Plexiglas-Wanne (Eigenbau des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm), in der die mediale Tibiakondyle über eine kleine Metallplatte mit zwei Schrauben befestigt war (Abbildung 16 ; Abbildung 17). Mit dieser war es möglich die Kondyle in alle Richtungen zu bewegen oder zu schwenken, so dass sichergestellt werden konnte, dass der Eindrückttest immer senkrecht zur Knorpeloberfläche erfolgte. In dieser Prüfkammer befand sich außerdem physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung Plastipur®, Fresenius Kabi, Deutschland) um das Tibiaplateau während des Tests feucht zu halten.

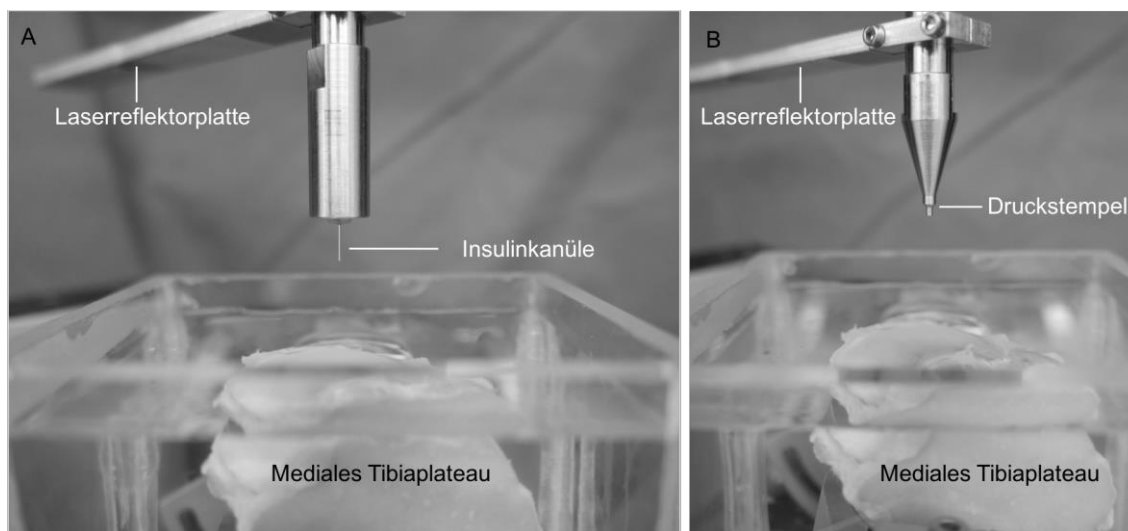


Abbildung 17: Testaufbau für die Messung der Knorpeldicke (A) und den Eindrückttest des tibialen Knorpels (B). Für beide Untersuchungen wurde das mediale Tibiaplateau in einer Wanne aus Plexiglas befestigt, sodass die Prüfung immer senkrecht zur Knorpeloberfläche erfolgte.

Für den Eindrückttest war es wichtig, zuvor die exakte Knorpeldicke an den drei Messpunkten zu bestimmen. Hierfür wurde an einen 20 N Kraftsensor (Xforce P, Genauigkeit $\leq 0,25\%$, Zwick GmbH und Co.KG, Ulm, Deutschland) eine Insulinkanüle ($\varnothing = 0,30$ mm; Omnican® 50, B. Braun Melsungen, Deutschland) angebracht (Abbildung 17 A). Die Insulinkanüle wurde anschließend mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min in die Knorpeloberfläche gefahren. Die Erfassung und Aufzeichnung der Daten erfolgte auch hier mit der Standardsoftware TestXpert II der Firma Zwick/Roell (TestXpert II, Zwick GmbH und Co. KG). Bei Durchdringung der Knorpeloberfläche

konnte ein Kraftanstieg gemessen werden, der bei Berührung des subchondralen Knochens exponentiell anstieg. Daraufhin wurde die Prüfung gestoppt. Anhand des erzeugten Kraft-Weg-Diagramms konnte die Knorpeldicke (h_0) ermittelt werden (Abbildung 18). Diese diente zur Bestimmung der Belastungsgeschwindigkeit im anschließenden Eindrückttest (100 % der Knorpeldicke pro Minute).

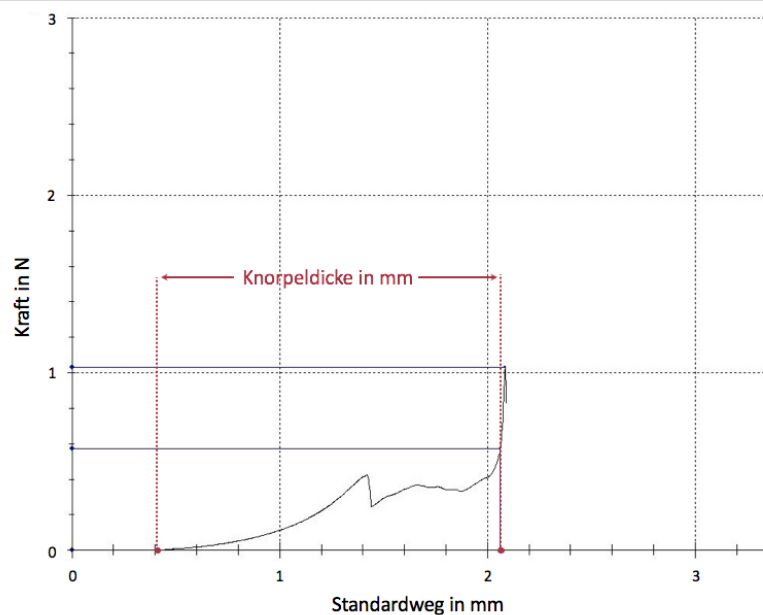


Abbildung 18: Beispielhaftes Kraft-Weg-Diagramm für die Messung der Knorpeldicke h_0 in mm. Bei Durchdringung der Knorpeloberfläche kam es zu einem Anstieg der Kraft (= Beginn Knorpeldicke), der bei nachfolgender Berührung des subchondralen Knochens exponentiell verlief (=Ende Knorpeldicke).

Für den nachfolgenden Eindrückttest des tibialen Knorpels wurde anstelle der Insulinkanüle ein zylindrischer Druckstempel mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einer Fläche von 1,77 mm² angebracht (Abbildung 17 B). Um gleiche Ausgangsbedingungen vor jedem Test sicherzustellen, wurde zunächst eine Vorkraft von 0,2 N mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min angefahren. Sobald diese erreicht war, wurde die Probe mit einer Geschwindigkeit von 100 % der Knorpeldicke pro Minute bis zu einer maximalen Kraft von 4,8 N belastet. Die maximale Kraft von 4,8 N wurde gewählt, da bei einer Indenterfläche von 1,77 mm² ein physiologischer Kontaktdruck von 2,7 N/mm² erreicht wurde [Mutschler and Claes 1985]. Mit Hilfe des Lasersensors wurde die bei der Belastung auftretende Verformung der Knorpelfläche (Δl) gemessen. Gemeinsam mit der zuvor ermittelten Knorpeldicke der Probe (h_0) konnte so die Probendehnung (ε) berechnet werden ($\varepsilon = \frac{\Delta l}{h_0}$). Die bei

4,8 N erzeugte Dehnung der Probe wurde für 20 min gehalten, wobei es zum Abfall der maximalen Kraft kam (Relaxation). Dieser Kraftverlauf wurde kontinuierlich von der Testsoftware TestXpert II (Zwick GmbH und Co. KG, Ulm, Deutschland) aufgezeichnet (Abbildung 19).

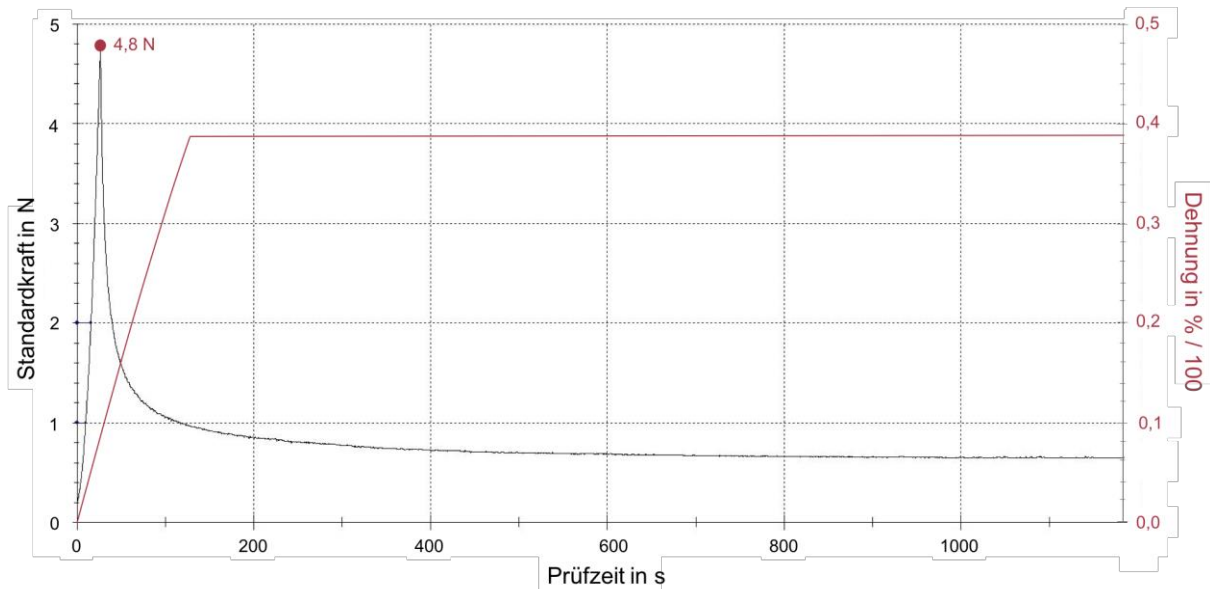


Abbildung 19: Exemplarischer Verlauf von Kraft (schwarze Kurve) und Dehnung (rote Kurve) während des Eindrückttests des tibialen Knorpels. Die bei einer Kraft von 4,8 N erreichte Dehnung der Probe wurde für 20 min gehalten. Dabei kam es zu einem Absinken der Kraft und zur Relaxation der Probe.

Die anschließende Verarbeitung der Daten erfolgte wiederum mit Hilfe der Analysesoftware MATLAB® R2016a (MathWorks, Natick, MA, USA). Bestimmt wurde das Gleichgewichtsmodul E_{eq} (in MPa) des tibialen Knorpels:

$$E_{eq} = \frac{F_{eq}}{A} \times \frac{h_0}{\Delta l_{eq}}$$

F_{eq} : Kraft im Gleichgewichtszustand

A : Fläche des Indenters

h_0 : Knorpeldicke

Δl_{eq} : Verformung der Knorpeloberfläche im Gleichgewichtszustand

Zusätzlich wurde als Maß für die Elastizität des Knorpelgewebes die Steifigkeit k (in N/mm) im Gleichgewichtszustand bestimmt:

$$k_{eq} = \frac{F_{eq}}{\Delta l_{eq}}$$

F_{eq} : Kraft im Gleichgewichtszustand

Δl_{eq} : Verformung der Knorpeloberfläche im Gleichgewichtszustand

Der Test wurde für alle drei Messpunkte des medialen Tibiaplateaus durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für die weitere histologische Aufarbeitung in Formaldehyd (4 %) fixiert.

2.3.4. Bildgebung (MRT)

Bei jeweils zwei Tieren pro Versuchsgruppe wurden die Gelenkflächen von Femur und Tibia der linken Hintergliedmaßen (insgesamt $n = 6$) einer bildgebenden Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) unterzogen. Ziel dieser Untersuchung war es, makroskopisch noch nicht sichtbare Veränderungen der Knorpelzusammensetzung, wie etwa Änderungen im Wassergehalt, darzustellen. Diese Untersuchung wurde an der Core Facility *Kleintier Bildgebung* der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. Volker Rasche durchgeführt. Die Einrichtung verfügt über ein dediziertes Hochfeld Kleintier MRT mit einer Feldstärke von 11,7 T (BioSpec 117/16, Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland). Zur Bildgebung wurde eine Sende- und Empfangspule (RES 500 1H 72 TR) verwendet. Das Untersuchungsprotokoll bestand aus einer T1-gewichteten 3 D-Fast Field Echo (FFE)-Sequenz mit folgenden Parametern (Tabelle 4):

Tabelle 4: Parameter der T1-gewichteten FFE-Sequenz zur bildgebenden Untersuchung des Gelenkknorpels von Femur und Tibia.

Parameter	Wert
Echozeit (TE)	3,17 ms
Repetitionszeit (TR)	10 ms
Sichtfeld (FoV)	85 x 85 mm ²
Voxel Größe	0,22 x 0,22 mm ²
Schichtdicke	0,24 mm
Abstand zwischen den Schichten	0,24 mm

Um die Proben über die Dauer des Scanvorgangs feucht zu halten wurden diese mit Frischhaltefolie umwickelt.

Die Auswertung der Scans erfolgte mit dem Open-Source-Bildverarbeitungs- und Analyseprogramm Image J (ImageJ 1.46 r, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>, Java 1.6.0_65). Da die Proben in der FFE-Sequenz isotrop gescannt wurden, konnten mit Hilfe des 3D-Volume-Viewers alle Bildebenen (sagittal, coronal, transversal) betrachtet werden. Für die Beurteilung der Knorpelbeschaffenheit wurden die Gelenkflächen jeweils in der sagittalen und in der coronalen Ebene untersucht. Es wurde ein gängiges Schema zur makroskopischen Klassifizierung degenerativer Knorpelveränderungen in präklinischen Arthrose-Modellen nach Yoshioka et al. verwendet [Yoshioka, et al. 1996] (Tabelle 5). Diese Klassifizierung wurde bereits in einer Studie zur Beurteilung degenerativer Veränderungen des artikulären Knorpels des Kniegelenks an MRT-Bildern verwendet [Batiste, et al. 2004].

Tabelle 5: Schema nach Yoshioka et al. zur makroskopischen Klassifizierung degenerativer Knorpelveränderungen [Yoshioka, et al. 1996].

Grad der Veränderung	Beschreibung
1	Intakte Oberfläche
2	Minimale Auffaserung
3	Deutliche Auffaserung, Unregelmäßigkeiten der Oberfläche oder Risse
4	0 mm < Durchmesser des größten Defekts ≤ 2 mm
5	2 mm < Durchmesser des größten Defekts ≤ 5 mm
6	5 mm < Durchmesser des größten Defekts

Die Gelenkflächen von Femur und Tibia wurden in vier Kompartimente eingeteilt: Laterale Femurkondyle (CLF), mediale Femurkondyle (CMF), laterales Tibiaplateau (CLT) und mediales Tibiaplateau (CMT). Anhand der Knorpelbeschaffenheit wurde jedem der vier Bereiche ein Degenerationsgrad zwischen eins und sechs zugeteilt. Bestimmend für den zugeteilten Grad war die schwerste vorliegende Veränderung im jeweiligen Kompartiment.

Nach der bildgebenden Untersuchung wurden die Proben für die anschließende Untersuchung mit India Ink sowie die spätere histologische Untersuchung in Formaldehyd (4 %) fixiert.

2.3.5. India Ink

Um makroskopisch die Knorpelbeschaffenheit genauer beurteilen zu können, wurde eine India Ink Färbung durchgeführt. Untersucht wurden die mediale und laterale Femur- sowie Tibiakondyle (jeweils n = 54) aller linken und rechten (Kontrolle) Gliedmaßen. Diese wurden vorher über 72 Stunden in Formaldehyd fixiert (4 %). Vor der Färbung wurden die Proben für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden sie mit einem Tuch leicht abgetupft, ein Tropfen

Tusche aufgetragen und gleichmäßig verteilt (Tusche A Drawing Ink, Pelikan). Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die überschüssige Tusche anschließend mit Leitungswasser abgespült. Die Tusche blieb nur an Stellen des Knorpels mit beschädigter Knorpeloberfläche haften. Für die nachfolgende Auswertung wurde jede Probe gemeinsam mit einem Lineal fotografiert. Aus diesen Aufnahmen der Gelenkfläche wurde in Photoshop CS 4 (Adobe Systems, San José, USA) jeweils die auszuwertende Knorpeloberfläche segmentiert. Diese segmentierten Bilder wurden anschließend in der Analysesoftware MATLAB® R2016a (MathWorks, Natick, MA, USA) in ein Graustufenbild umgewandelt. Alle Pixel mit einem Schwarzanteil > 50 % (Schwellenwert: 0,4) wurden als Teil der India Ink Färbung und somit als beschädigte Oberfläche definiert (Abbildung 20).



Abbildung 20: (A) Segmentiertes Bild einer India Ink-gefärbten medialen Femurkondyle. (B) Mit Hilfe der Analysesoftware erstelltes Graustufenbild.

Der Anteil (%) der durch India Ink schwarz gefärbten Fläche A_I ergibt sich aus:

$$\frac{A_I}{A_G} \times 100$$

A_G : Summe der Pixel des gesamten segmentierten Bildes

Um die Pixel in eine Fläche in mm^2 umzurechnen, wurde in jedem Bild ein Referenzmaß bekannter Länge aufgenommen und die Pixelzahl entsprechend umgerechnet.

2.3.6. Histologische Untersuchung

Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte

Eine Probe aus dem kaudomedialen Bereich der Kniegelenkkapsel wurde an der operierten sowie an der nicht-operierten rechten Gliedmaße aller Tiere entnommen und für 12 Stunden bei 4° C in Formaldehyd (4 %) fixiert. Vor der weiteren Verarbeitung mussten die Proben zunächst für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert werden, um das Formaldehyd vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) entwässert (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %, 100 %, für jeweils zwei Stunden), mit Xylol entfettet und in 60° C heißes Paraffin eingebettet, das dann bei Raumtemperatur zur Aushärtung gebracht wurde. Schließlich wurden mit einem Rotationsmikrotom (Cut 6062, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) histologische Schnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Als Übersichtsfärbung wurde anschließend eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung durchgeführt. Hierfür mussten die Proben im Wärmeschrank bei 70° C für 15 Minuten mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol) rehydriert werden (100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 70 %). Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Dieser basische Farbstoff färbt saure (basophile) Gewebebestandteile, wie Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA, blau-violett. Das Bläuen der Schnitte erfolgte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser, anschließend wurden die Schnitte in destilliertes Wasser gegeben. Es folgte schließlich die Gegenfärbung mit einer alkoholischen Lösung von 0,5 %-Eosin (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland). Im Gegensatz zum Hämalaun ist Eosin ein saurer Farbstoff, der alle basischen (acidophilen) Gewebebestandteile rot färbt. Hierzu zählen Proteine des Zytoplasmas, Kollagen oder Keratin. Die Schnitte wurden erneut mit destilliertem Wasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, 100 % Ethanol) entwässert und in Xylol getrocknet.

Wie bereits beschrieben (2.3.1. *Präparation*), wurden die medialen Menisken der Sham- und Leerdefekt-Gruppe, bzw. die Implantate in der Implantat-Gruppe in Vorderhorn, *Pars intermedia* und Hinterhorn geteilt und für 24 Stunden bei 21° C in Formaldehyd (4 %) fixiert. Ebenso wurden die medialen Menisken der kontralateralen Gliedmaße verarbeitet. Die Menisken wurden daraufhin je nach Probengröße für drei bis sieben

Tage in EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) entkalkt. Dieser Arbeitsschritt erleichterte die spätere Anfertigung der histologischen Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Präparate eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert, um Formaldehydrückstände vollständig zu entfernen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) wurden die Proben dann entwässert (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %, 100 %, jeweils zwei Stunden) und mit Xylol entfettet. Schließlich wurden die Meniskusproben in 60° C heißes Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur zur Aushärtung gebracht. Mit einem Mikrotom (Cut 6062, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) wurden vertikale histologische Schnitte (6 µm) angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Färbung der Meniskusschnitte erfolgte ebenfalls mit Hämatoxilin-Eosin nach den oben bereits beschriebenen Arbeitsschritten.

Die mediale Tibiakondyle der rechten und linken Gliedmaßen aller Gruppen wurde nach der biomechanischen Testung, bzw. MRT Untersuchung für 72 Stunden in Formaldehyd (4 %) fixiert und anschließend für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert. Nach diesem Arbeitsschritt wurde die oben beschriebene India Ink Färbung durchgeführt (2.3.5. *India Ink*). Anschließend wurden mit einer Diamant-Bandsäge (Exakt 300/30-1198, EXAKT Advanced Technologies GmbH, Deutschland) aus jeder medialen Tibiakondyle jeweils drei 2 mm dicke Scheiben gesägt (Abbildung 21). Diese mussten daraufhin über mindestens drei Monate in Ameisensäure (10 %) entkalkt werden.

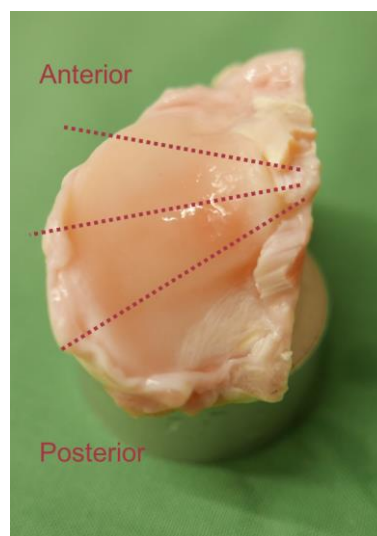


Abbildung 21: Schnittführung bei der Anfertigung der histologischen Präparate der medialen Tibiakondyle. Von jeder Kondyle wurden jeweils drei 2 mm dicke Scheiben angefertigt.

Nach vollständiger Entkalkung der Proben wurden sie für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend ebenfalls in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) entwässert. Nach der Entfettung in Xylol wurden die Proben in 60° C heißes Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur zur Aushärtung gebracht. Schließlich wurden mit einem Mikrotom (Cut 6062, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) 7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Bei den Schnitten der medialen Tibiakondyle wurde eine Safranin-O-Echtgrün-Färbung durchgeführt. Die Safranin-O-Echtgrün-Färbung wird häufig zur Knorpeldarstellung verwendet. Der Farbstoff Safranin-O (basisch) bindet an die sauren Proteoglykane von Knorpelgewebe. Dabei entsteht ein roter Farbkomplex, dessen Intensität in direktem Zusammenhang mit dem Proteoglykangehalt des Gewebes steht. Der saure Farbstoff Echtgrün bindet an die Proteine des Zytoplasmas, was zu einer grünen Färbung führt. Durch das Eisenhämatoxin werden Zellkerne schwarz dargestellt. Auch hier mussten die Proben, wie bereits für die HE-Färbung beschrieben, entparaffiniert und rehydriert werden. Daraufhin wurden die Proben für vier Minuten mit Weigert's Eisenhämatoxin (Eisenhämatoxin Weigert A, Waldeck GmbH & Co. KG Division Chroma®, Münster, Deutschland) gefärbt, anschließend kurz mit angesäuertem Ethanol gespült und fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert (Bläuen). Es folgte die dreiminütige Färbung mit 0,02 %-Echtgrün (Echtgrün FCF rein, Waldeck GmbH & Co. KG, Division chroma®, Münster, Deutschland). Die Schnitte wurden dann für 30 Sekunden mit Essigsäure (1 %) gespült und schließlich über fünf Minuten mit Safranin-O (Safranin-O, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. Vor dem Aufbringen des Deckglases mussten die Proben wie bei der HE-Färbung in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden.

Auswertung der histologischen Schnitte

Die Synovialmembran wurde histologisch vor allem auf das Vorliegen von Strukturveränderungen in Form von Zellhyperplasie und -hypertrophie mit nachfolgender, villöser Proliferation untersucht. Zusätzlich wurden die Schnitte auf das Vorhandensein von Entzündungszellen in Form von mehrkernigen synovialen Riesenzellen untersucht.

Die histologischen Schnitte der medialen Menisken der Sham-Gruppe wurden qualitativ beurteilt und mit den medialen Menisken der rechten Gliedmaße (nicht-operierte Kontrolle) verglichen. In der Leerdefekt-Gruppe wurde vor allem die Resektionskante

des Meniskus untersucht und auf Veränderungen, wie zum Beispiel Änderung des Färbeverhaltens oder Strukturverlust, geachtet. Zusätzlich wurde hier auf das Vorliegen von Regenerationsgewebe geachtet. Bei den histologischen Schnitten des Implantats wurde Augenmerk auf den Übergangsbereich zur nativen Meniskusrandleiste gelegt und beurteilt, inwieweit die Integration des Implantats erfolgte. Das Implantat wurde zusätzlich hinsichtlich seiner Integrität untersucht und das Ausmaß an Zelleninfiltration mit nachfolgender Gewebedeposition bestimmt. Diese rein qualitative Auswertung der Schnitte von Synovialmembran und Menisken bzw. Implantaten erfolgte mit einem Lichtmikroskop (DMI6000B, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland).

Bei der histologischen Untersuchung des tibialen Knorpels wurde an den Safranin-O-gefärbten Schnitten zunächst eine Klassifizierung der Knorpelbeschaffenheit nach Mankin durchgeführt [Mankin, et al. 1971]. Beurteilt wurden dabei Knorpelstruktur, Knorpelzellen, Intensität der Safranin-O-Färbung und die Knorpel-Knochen-Grenze (Tabelle 6). Entsprechend der vorliegenden Veränderungen wurde für jeden Schnitt ein Degenerationsgrad zwischen 0 (keine pathologischen Veränderungen) und 14 (höchster Degenerationsgrad) bestimmt.

Tabelle 6: Mankin-Grading zur histologischen Klassifizierung der Knorpelbeschaffenheit.

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. Intensität der Safranin-O-Färbung	
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
Gesamt	0-14

Zusätzlich wurde der Fibrillationsindex (FI) modifiziert nach Pastreau und Chomel ermittelt [Pastoureau and Chomel 2004]. Hierfür wurde eine spezielle Software zur histomorphometrischen Analyse (OsteoMeasure™, Osteometrics Inc., Decatur, Georgia, USA) verwendet. An allen Schnitten wurden bei 50-facher Vergrößerung die Knorpeloberfläche sowie die Knorpel-Knochen-Grenze markiert und von der Software die exakte Länge in mm berechnet (Abbildung 22).

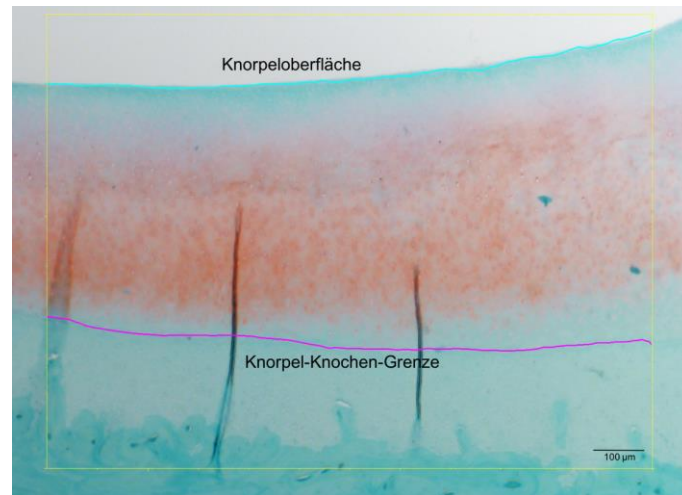


Abbildung 22: Ausschnitt der histomorphometrischen Analyse eines histologischen Präparats des tibialen Knorpels. Türkis = Knorpeloberfläche; Pink = Knorpel-Knochen-Grenze; 50x-Vergrößerung.

Der FI errechnete sich dann folgendermaßen:

$$FI = \frac{\text{Länge der Knorpeloberfläche (mm)}}{\text{Länge der Knorpel – Knochen – Grenze (mm)}}$$

Der FI beträgt bei völlig intakter Knorpeloberfläche 1. Durch eine zunehmende Auffaserung der Knorpeloberfläche kommt es zu einer Verlängerung der Knorpeloberfläche. Damit einhergehend steigt der FI als Maß für die vorliegende Degeneration.

Die Auswertung des tibialen Knorpels erfolgte an ein Fotomikroskop (Axiophot 451887, Zeiss, Deutschland).

2.4. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software (Graph Pad® Prism, Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA). Hierfür wurden zunächst alle Daten auf Normalverteilung getestet (D'Agostino & Pearson Omnibus-Test, Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnoff-Test). Ergebnisse mit kleiner Probenanzahl ($n < 8$) wurden als Median mit Minimum und Maximum, Ergebnisse mit größerer Probenanzahl ($n \geq 8$) wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Für die weitere statistische Untersuchung der Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung (Klassifizierung der Knorpelveränderungen nach Outerbridge), der India Ink-Färbung der Knorpeloberflächen und der biomechanischen Untersuchung des tibialen Knorpels (Knorpeldicke, E_{eq} , k_{eq}) wurde anschließend eine gepaarte zweiseitige ANOVA mit nachfolgendem post hoc-Test (Šidák- oder Tukey-Test) durchgeführt. Damit konnten zum einen Unterschiede zwischen operierter und Kontroll-Gliedmaße innerhalb einer Operationsgruppe aber auch Unterschiede zwischen den drei Operationsgruppen festgestellt werden.

Die Daten der biomechanischen Untersuchung von Meniskus und Implantat wurden nach Testung auf Normalverteilung mit Hilfe einer einseitigen ANOVA und anschließendem post hoc Fisher-LSD-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht. Das Signifikanzniveau lag immer bei $p \leq 0,05$.

Die Auswertung der histologischen Schnitte und der bildgebenden Untersuchung (MRT) erfolgte rein deskriptiv.

3. Ergebnisse

3.1. Operationsverlauf

Die Operationsdauer betrug je nach Eingriff (Sham-Operation, Meniskusresektion, Meniskusersatz) 75 bis 120 Minuten. Es kam bei keinem Tier zu Komplikationen während der Operation und auch die Narkosen verliefen ohne Zwischenfälle.

3.2. Klinischer Verlauf

Die Aufwachphase nach der Narkose verlief bei allen Tieren komplikationslos und nach durchschnittlich einer Stunde hatten alle Tiere ihr volles Stehvermögen wiedererlangt. Auch die weitere Heilung verlief bei allen Tieren ohne Probleme. So war nach zwei bis drei Tagen keine Lahmheit der operierten Gliedmaße mehr sichtbar. Es kam zu keiner Störung der Wundheilung, sodass bei allen Schafen nach 10 Tagen die Fäden gezogen werden konnten.

Im weiteren Verlauf der Studie verletzte sich ein Schaf an der operierten Hintergliedmaße an der Futterkrippe und zeigte eine deutliche Lahmheit mit Weichteil-Schwellung im Bereich des Kniegelenks. Durch eine erneute Gabe von 2 mg/kg KG Carporfen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Pfizer GmbH, Deutschland) über drei Tage, verbesserte sich der Zustand deutlich und es war keine Lahmheit mehr ersichtlich. Ein weiteres Schaf zeigte drei Monate nach der Operation eine hochgradige Lahmheit an der rechten Vordergliedmaße. Das Klauengelenk wies deutliche Zeichen einer Entzündung, mit Schwellung, Wärme und Schmerzhaftigkeit auf. Auch hier konnte durch Gabe von 2 mg/kg KG Carporfen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Pfizer GmbH, Deutschland) und zusätzliche antibiotische Behandlung mit 10 mg/kg KG Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl® LA 20 %, Veyx-Pharma GmbH, Deutschland) eine Verbesserung des Zustandes erreicht werden. Während dieser Behandlung und bis zum vollständigen Abklingen der Symptome wurde das Schaf von der Weide in eine kleinere Box verbracht.

3.3. Makroskopische Untersuchung

3.3.1. Allgemeine Untersuchung der operierten Gliedmaße

In allen Operationsgruppen kam es medial im Bereich des operativen Zugangs gleichermaßen zu gering- bis mittelgradigen bindegewebigen Vernarbungen des Weichteilgewebes (Fibrose). Ebenso kam es medial zur Fibrose und Verdickung des *Stratum fibrosum* der Gelenkkapsel. Diese Veränderungen des Kapselgewebes waren in der Implantat-Gruppe tendenziell stärker ausgeprägt. Hier kam es bei einem Tier teilweise sogar zur Verkalkung der Gelenkkapsel. Der Ursprung des medialen Seitenbandes im Bereich des Krallenplättchens war in allen Versuchsgruppen stark fibrosiert und mit umliegendem Gewebe verwachsen. Bei drei Tieren der Implantat-Gruppe kam es im Zuge dessen zur Umwandlung des Bandgewebes in Knorpelgewebe (chondroide Metaplasie). Bei keinem Tier lagen makroskopisch sichtbare Anzeichen eines Entzündungsgeschehens vor. Die Synovialflüssigkeit war, außer bei einem Tier der Sham-Gruppe und einem Tier der Implantat-Gruppe, von normaler Menge, Farbe und Konsistenz. Bei diesen zwei Tieren erschien die Gelenkflüssigkeit dunkel verfärbt.

3.3.2. Menisken/Implantate

Sham-Gruppe

Bei acht Tieren der Sham-Gruppe lagen keine Läsionen oder degenerative Veränderungen des medialen Meniskus der operierten Gliedmaße vor. Bei einem Tier kam es dagegen zur leichten Auffaserung des inneren Meniskusrandes (Abbildung 23 A). Außerdem erschien das Gewebe des Meniskus dunkler. Die lateralen Menisken der linken (operierten) Gliedmaßen waren größtenteils unverändert. Nur bei zwei Tieren kam es zu geringen degenerativen Veränderungen in Form eines einzelnen oder mehrerer kleiner längsverlaufender und oberflächlicher Risse (Abbildung 23 B). An der rechten Gliedmaße (Kontrolle) kam es ebenfalls bei einem Schaf zur geringen Verfärbung des medialen Meniskus sowie bei einem anderen Tier zu einer leichten Auffaserung des inneren Meniskusrandes des lateralen Meniskus.

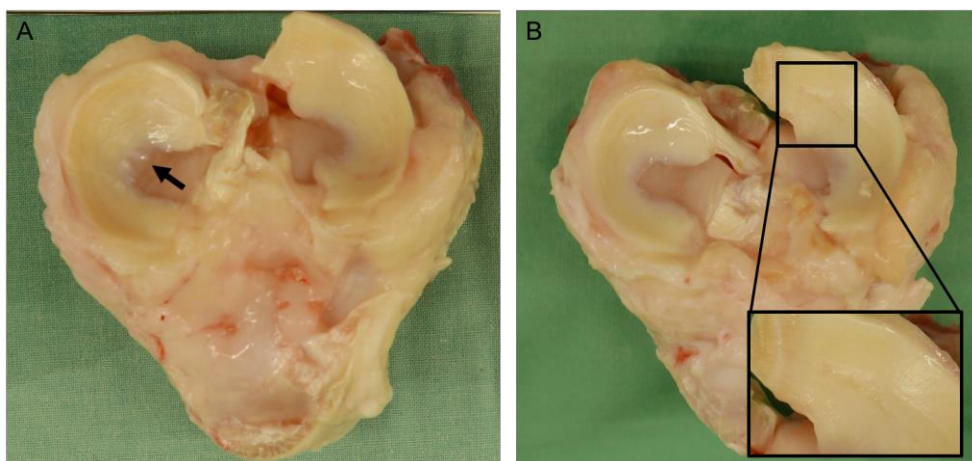


Abbildung 23: Tibiaplateau der linken Gliedmaße zweier Tiere der Sham Gruppe. (A) Medialer Meniskus mit leichter Auffaserung des inneren Randes (Pfeil). (B) Lateraler Meniskus mit kleinem längsverlaufendem Riss.

Leerdeфект-Gruppe

In der Versuchsgruppe mit Leerdeфект waren bei allen Tieren die Resektionskanten des Defekts deutlich erkennbar (Abbildung 24 A, B). Bei einem Tier kam es im Bereich dieser Kanten zur Auffaserung des Meniskusgewebes (Abbildung 24 C). Die Bildung eines Regenerationsgewebes im Bereich des Defekts konnte bei keinem Tier nachgewiesen werden. Die lateralen Menisken der operierten Gliedmaße waren bei zwei Tieren geringgradig degenerativ verändert. Auch hier traten diese Veränderungen in Form von längsverlaufenden kleinen und oberflächlichen Rissen auf.

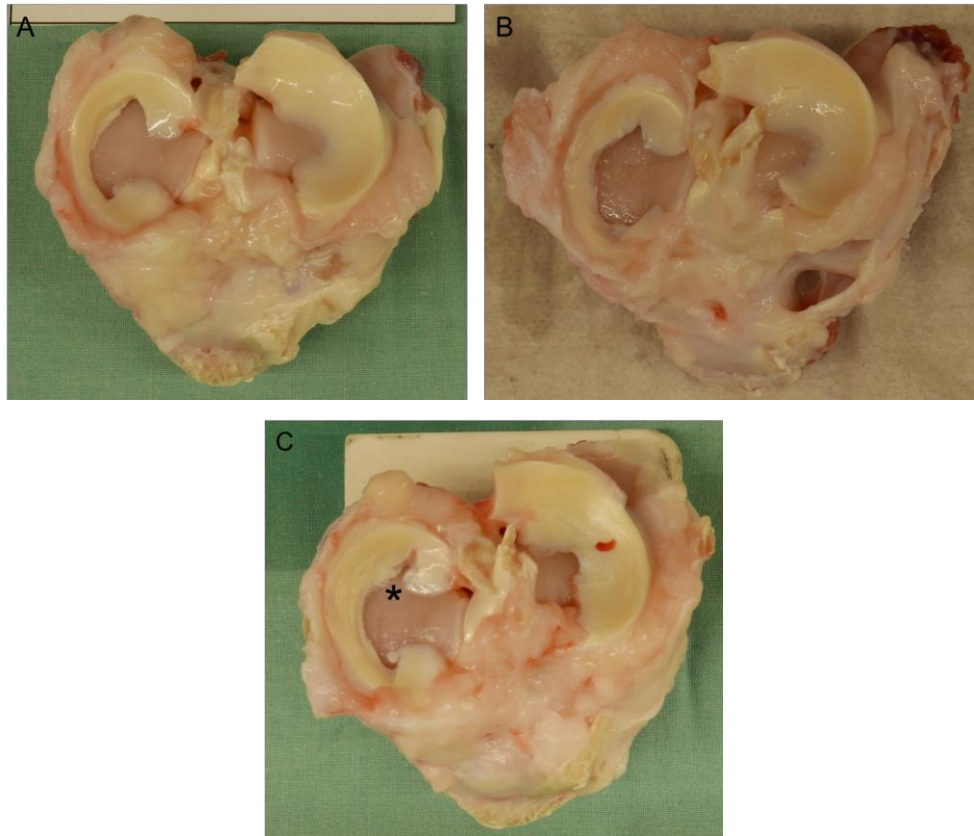


Abbildung 24: Tibiaplateau der operierten Gliedmaße dreier Tiere der Operationsgruppe mit Leerdefekt. (A, B) Die Resektionskanten sind deutlich erkennbar. Es kam zu keiner Regeneration von Meniskusgewebe. (C) Auffaserung des Meniskusgewebes im Bereich der Resektionskante.

Implantat-Gruppe

In der Implantat-Gruppe war bei sechs von neun Tieren das Implantat vollständig im Defekt fixiert. Davon zeigten jedoch drei Implantate am Übergang des mittleren zum hinteren Bereich einen deutlichen Riss (Abbildung 25 A, B). Bei den drei Tieren mit intaktem Implantat kam es zur Spaltbildung zwischen Implantat und nativem Meniskusgewebe. Im posterioren Bereich war dieser teilweise mit einer Art Regenerationsgewebe gefüllt (Abbildung 25 C, D). Bei zwei anderen Tieren war das Implantat zerstört, wobei nur noch eine Hälfte im Defekt fixiert war. Die andere Hälfte war bei einem Tier abgekapselt im Bereich der *Area intercondylaris posterior* aufzufinden (Abbildung 25 E). Bei dem anderen Tier befand sich der dislozierte Teil des Implantats unter der nativen Meniskusrandleiste. Bei einem Tier war das Implantat vollständig disloziert. Es wurde in die Knorpeloberfläche des medialen Tibiaplateaus eingedrückt (Abbildung 25 F). Bei keinem Tier dieser Versuchsgruppe bestand eine feste Verbindung zwischen Implantat und nativem Meniskusgewebe. Am lateralen

Meniskus der operierten Gliedmaße wurde bei einem Tier eine Auffaserung des inneren Meniskusrandes nachgewiesen.

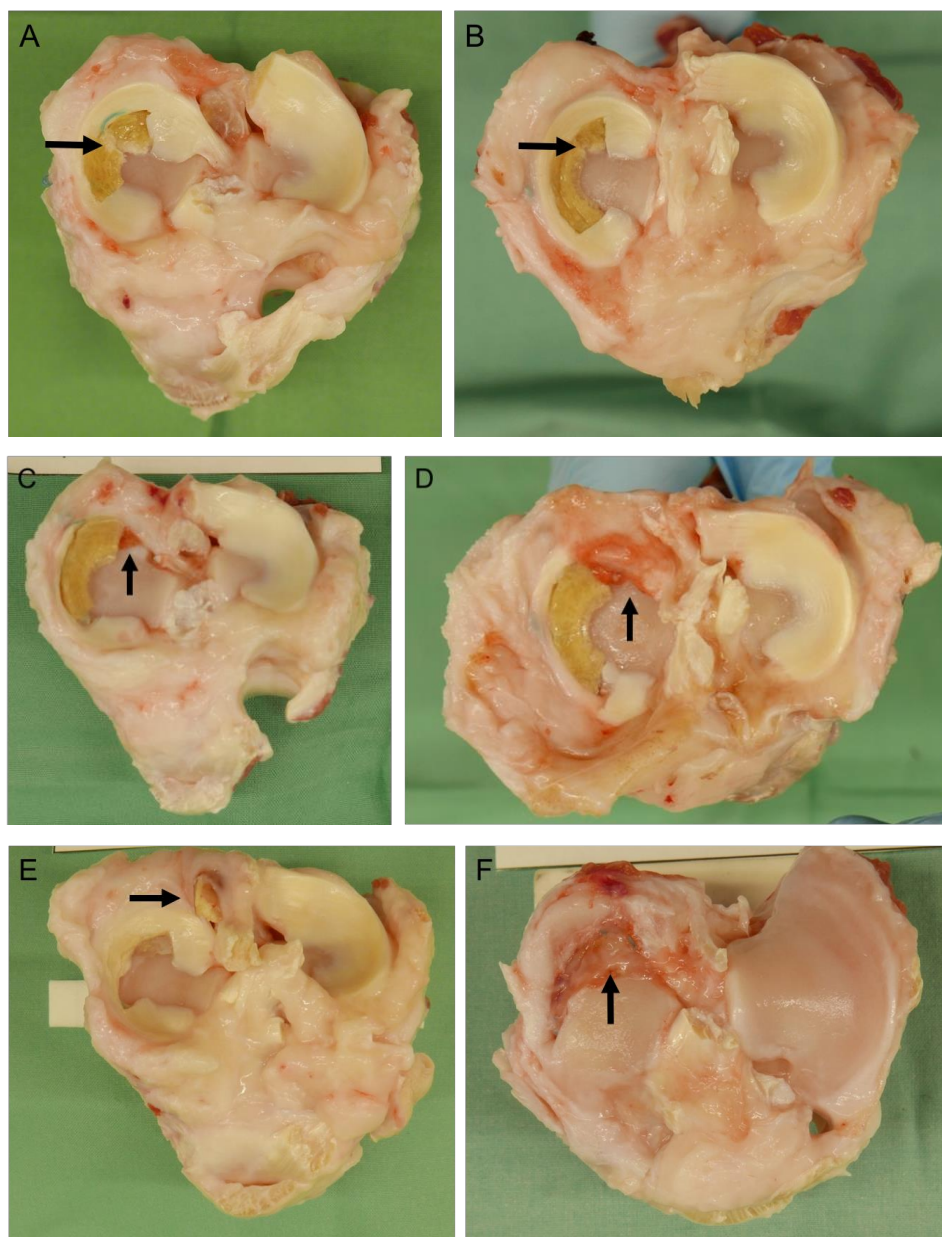


Abbildung 25: Linkes Tibiaplateau verschiedener Tiere der Implantat-Gruppe. (A, B) Riss des Silikonimplantats im Bereich des Übergangs der Pars intermedia zum Hinterhorn. (C, D) Spaltbildung zwischen Implantat und nativer Meniskusrandleiste. (E) Abkapselung von Implantatmaterial im Bereich der Area intercondylaris posterior. (F) Disloziertes und in die Knorpeloberfläche eingedrücktes Implantat (Menisken bereits entfernt).

Bei den lateralen und medialen Menisken der kontralateralen Gliedmaße kam es in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe bei einzelnen Tieren zu geringen pathologischen Veränderungen. Diese traten entweder in Form dunkler Verfärbungen des

Meniskusgewebes, kleiner längs verlaufender Kontinuitätsunterbrechungen des Faserverlaufs oder Auffaserungen am inneren Meniskusrand auf.

3.3.3. Gelenkknorpel

In allen Operationsgruppen waren makroskopisch sichtbare Veränderungen der Knorpeloberfläche an der linken (operierten) und an der rechten (Kontrolle) Gliedmaße vorhanden. Die Gelenkflächen der Tibia waren stärker betroffen als die des Femurs. Dabei wies vor allem das mediale Gelenkkompartiment deutliche Knorpelveränderungen auf.

Sham-Gruppe

In der Sham-Operationsgruppe traten bei fast allen Tieren geringe Veränderungen der Knorpeloberfläche gleichermaßen an den operierten und nicht-operierten Gliedmaßen auf. Die medialen Femurkondylen wiesen nur an ihrem inneren Bereich eine geringe Aufrauung der Knorpeloberfläche auf (Abbildung 26 A). Im zentralen Abschnitt des medialen Tibiaplateaus das *in vivo* nicht vom Meniskus bedeckt ist, kam es zu einer rundlichen Erweichung des Knorpelgewebes (Abbildung 26 B).

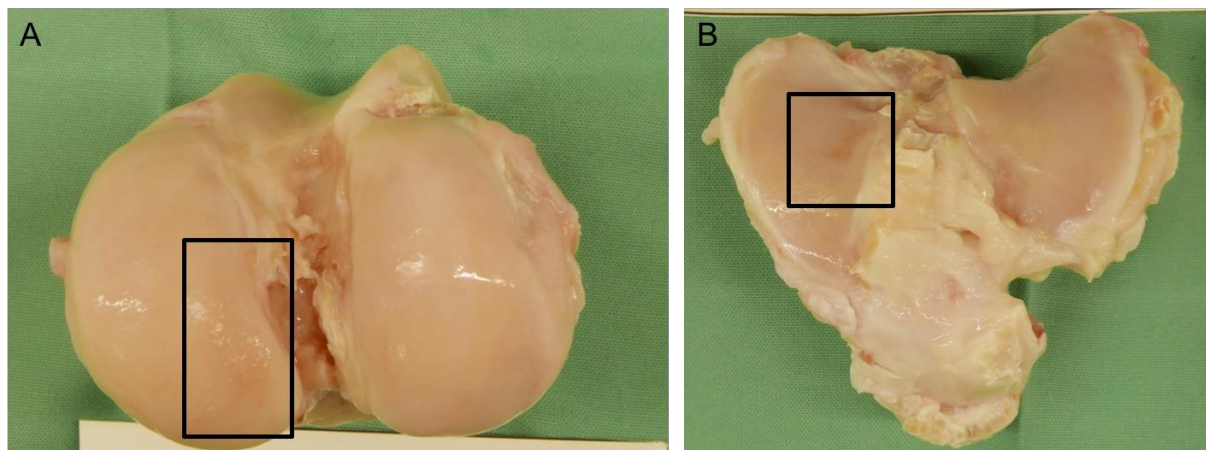


Abbildung 26: (A) Femurkondylen der linken (operierten) Gliedmaße eines Tieres der Sham-Gruppe mit geringer Aufrauung der Knorpeloberfläche am inneren Bereich der medialen Femurkondyle. (B) Linkes Tibiaplateau eines Tieres der Sham-Gruppe mit rundlicher Erweichung des Knorpelgewebes im Bereich der Eminentia intercondylaris.

Leerdefekt-Gruppe

In der Operationsgruppe mit Leerdefekt lag ein breiteres Spektrum an Knorpelveränderungen vor. Im Vergleich zur Sham-Gruppe waren diese insgesamt stärker ausgeprägt und die Unterschiede zwischen operierten und nicht-operierten Gliedmaßen waren in den meisten Fällen deutlicher. Die medialen Femurkondylen der linken (operierten) Gliedmaße waren über die gesamte Fläche deutlich aufgeraut (Abbildung 27 A, B). Zusätzlich kam es zu unterschiedlich stark ausgeprägten Fissuren und Riefen der Knorpeloberfläche. An der rechten (nicht-operierten) Gliedmaße blieb die Aufrauung der Oberfläche auf den inneren Bereich der medialen Femurkondylen beschränkt. Die lateralen Kondylen waren von den Veränderungen nicht betroffen. Auf dem medialen Tibiaplateau der operierten Gliedmaße kam es über die gesamte Fläche zu Erweichung und Aufquellung des Knorpels. Dies führte teilweise zum Aufbrechen der Knorpeloberfläche mit unterschiedlich tiefen Defekten. An der nicht-operierten Gliedmaße kam es vor allem in dem Bereich des medialen Tibiaplateaus, der nicht von Meniskus bedeckt war, zur rundlichen Erweichung des Knorpels. Vereinzelt traten jedoch auch hier stärker ausgeprägte Veränderungen in Form von tieferen Knorpeldefekten auf. Folglich war der Unterschied zwischen operierter und nicht-operierter Kontroll-Gliedmaße hier weniger deutlich. Bei drei Tieren der Leerdefekt-Gruppe kam es außerdem auf Grund von peripheren Zubildungen des artikulären Knorpels zur Verbreiterung der Gelenkfläche. Dies trat bei einem Tier an der medialen Femurkondyle und bei zwei weiteren am medialen Tibiaplateau der linken Gliedmaße auf (Abbildung 27 C, D). Die lateralen Gelenkkompartimente waren auch hier unauffällig.

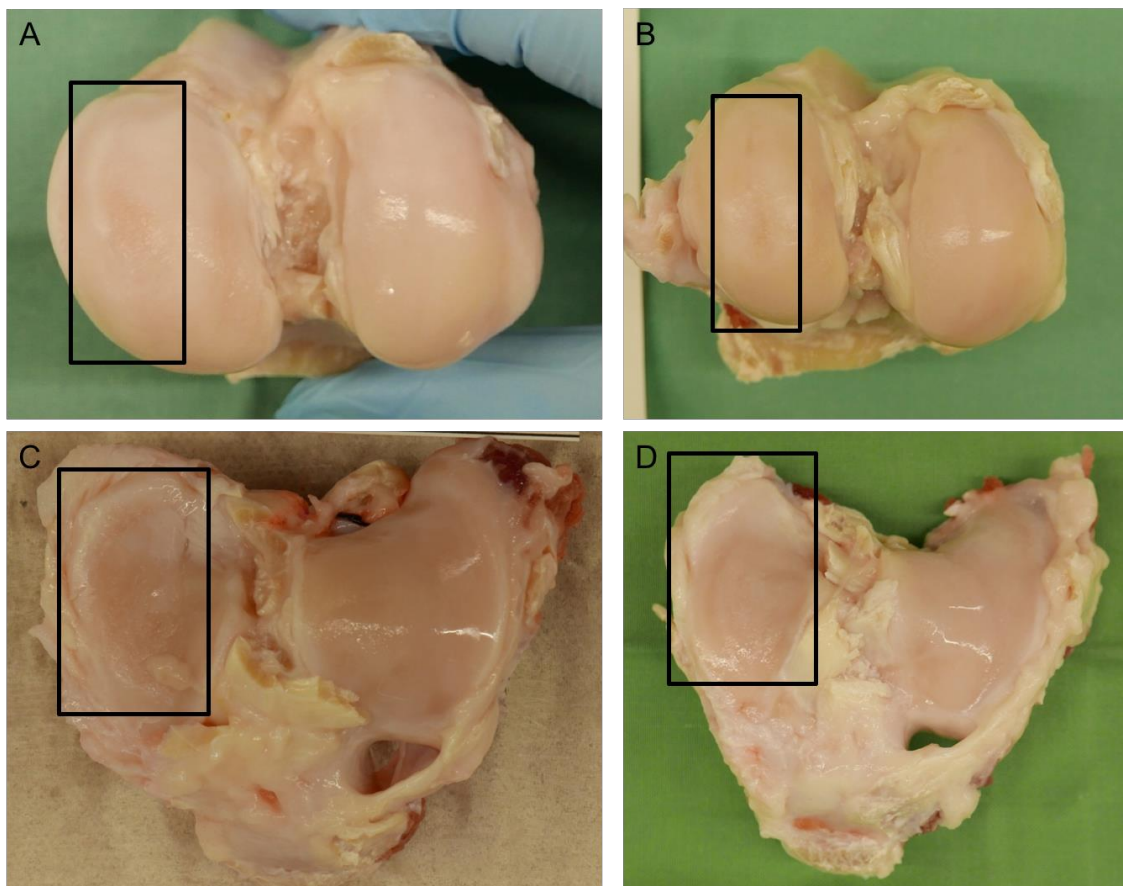


Abbildung 27: (A, B) Gelenkflächen des linken Femurs zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe mit deutlicher Aufrauung im zentralen Bereich der medialen Femurkondyle. Die Aufrauung erstreckt sich über die gesamte Länge der medialen Kondyle. (C, D) Verbreiterung der medialen tibialen Gelenkfläche durch osteophytäre Zubildungen bei zwei Tieren der Leerdefekt-Gruppe.

Implantat-Gruppe

Ähnlich wie in der Gruppe mit Leerdefekt lagen auch in der Implantat-Gruppe deutlich ausgeprägte Veränderungen der Knorpeloberfläche des medialen Gelenkkompartiments vor. Auch hier zeigten sich bei fünf Tieren Abnutzungen des Gelenkknorpels über die gesamte Fläche der medialen Femurkondyle der operierten Gliedmaße. Diese Abnutzungen waren bei den anderen vier Tieren weniger stark ausgeprägt und blieben auf den inneren Bereich der Kondyle beschränkt. Bei vier Schafen kam es zusätzlich zu länglichen Knorpeldefekten im mittleren Bereich der medialen Femurkondyle (Abbildung 28 A). Diese waren tiefer und reichten vereinzelt bis zum subchondralen Knochengewebe. Eine deutliche Verbreiterung der Gelenkfläche der medialen Femurkondyle war bei vier Tieren erkennbar (Abbildung 28 B). An der rechten (nicht-operierten) Gliedmaße kam es nur teilweise zu geringen Veränderungen der Knorpeloberfläche in Form einer Aufrauung des inneren Bereichs der medialen Kondyle. Die Veränderungen am medialen Tibiaplateau waren im Gegensatz zu den

Veränderungen an den Femurkondylen deutlich stärker ausgeprägt. Über die gesamte Fläche des medialen Tibiaplateaus der operierten Gliedmaße kam es zu einer mäßigen Aufrauhung und Erweichung der Knorpeloberfläche. Dabei war bei fast allen Tieren der Bereich, der sich *in vivo* unterhalb des Implantats befand, stärker von Knorpelveränderungen betroffen (Abbildung 28 C). Hier kam es zu deutlichen Riefen und bei drei Tieren auch zu Knorpeldefekten. In diesen Defekten hatte sich teilweise neues Gewebe gebildet (Abbildung 28 D, E). Bei dem Tier, das sich während des Versuchszeitraumes an der operierten Gliedmaße verletzte, war die Gelenkfläche des medialen Tibiaplateaus komplett destruiert. Das Implantat wurde hier vollständig in die Knorpeloberfläche eingedrückt. Im posterioren Bereich des Tibiaplateaus kam es bei sechs Schafen zu Zubildungen des artikulären Knorpels und dadurch zur Vergrößerung der Gelenkfläche (Abbildung 28 F). An den rechten Gliedmaßen waren bis auf rundliche Erweichungen im zentralen Abschnitt des medialen Tibiaplateaus keine weiteren Veränderungen ersichtlich. An beiden Gliedmaßen waren die lateralen Gelenkkompartimente auch hier unauffällig.

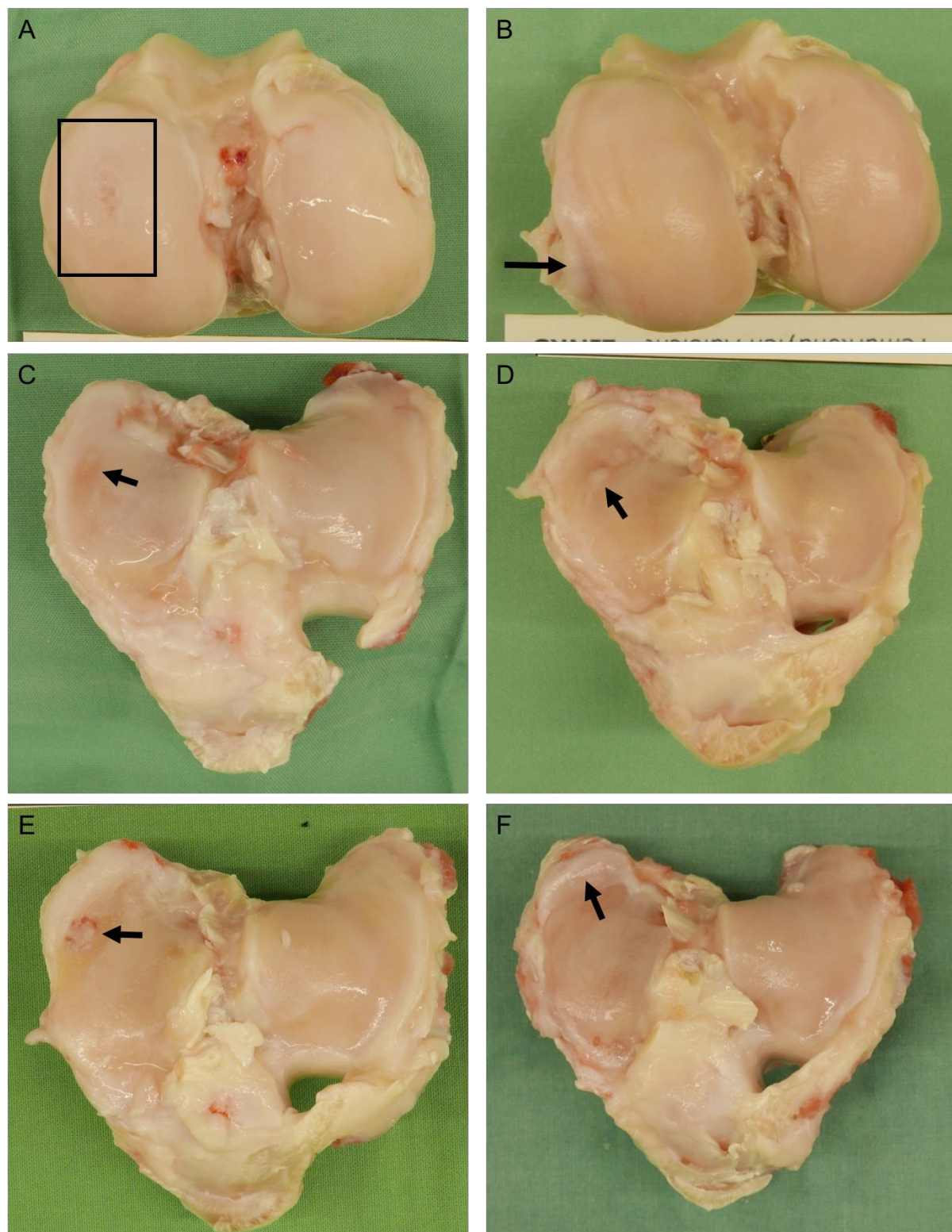


Abbildung 28: (A) Femurkondylen der linken Gliedmaße eines Tieres der Implantat-Gruppe mit zentralem länglichen Defekt in der medialen Kondyle. (B) Verbreiterung der Gelenkfläche der medialen Femurkondyle. (C) Aufrauung und Erweichung der Knorpeloberfläche am linken medialen Tibiaplateau der Implantat-Gruppe. (D, E) Tiefere Knorpeldefekte, teilweise mit regenerativem Gewebe gefüllt. (F) Vergrößerung der medialen Gelenkfläche durch Osteophyten.

Diese Befunde konnten mit Hilfe der Klassifizierung nach Outerbridge bestätigt werden (Abbildung 29 A, B) [Outerbridge 1961]. An der medialen Femurkondyle war der Degenerationsgrad der Knorpeloberflächen sowohl in der Leerdefekt- ($p < 0,05$), als auch in der Implantat-Gruppe ($p < 0,01$) signifikant höher als in der Sham-Gruppe. Zusätzlich bestand in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen der operierten Gliedmaße und der Kontroll-Gliedmaße (jeweils $p < 0,01$). Die degenerativen Veränderungen waren an der medialen Tibiakondyle insgesamt stärker ausgeprägt. Hier wiesen die Knorpeloberflächen des medialen Tibiaplateaus in der Sham-Gruppe an der operierten Gliedmaße einen signifikant geringeren Degenerationsgrad auf, als in der Leerdefekt- ($p < 0,01$) und Implantat-Gruppe ($p < 0,0001$). Zusätzlich bestand in der Implantat-Gruppe ein hoch signifikanter Unterschied zwischen operierter Gliedmaße und Kontrolle ($p < 0,0001$).

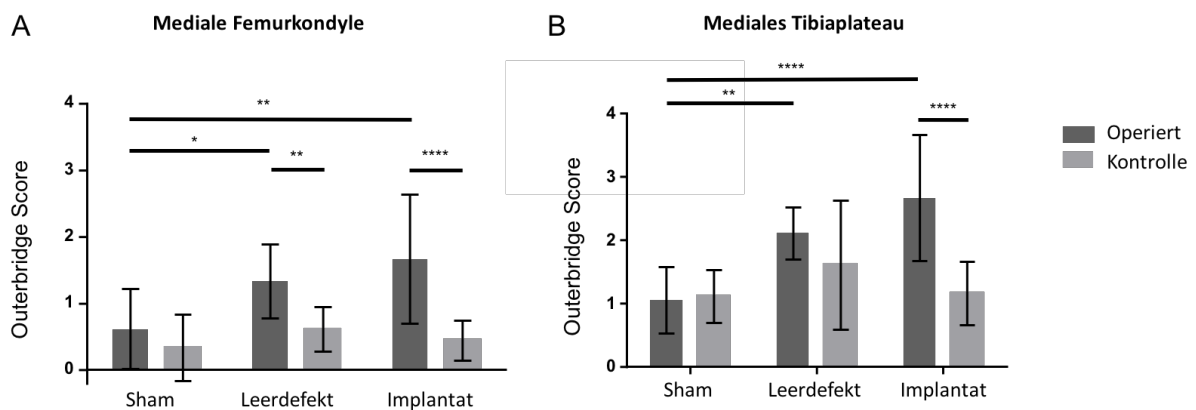


Abbildung 29: (A) Klassifizierung der Knorpelveränderungen an der medialen Femurkondyle nach Outerbridge (Mittelwert \pm Standardabweichung; Grad 0 = Keine sichtbaren Veränderungen). (B) Klassifizierung der Knorpelveränderungen nach Outerbridge an der medialen Gelenkfläche des Tibiaplateaus (Mittelwert \pm Standardabweichung; 0 = Keine sichtbare Veränderung). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$.

3.4. Biomechanische Untersuchung

3.4.1. Seidenfibroin Implantat und Meniskus

Mit Hilfe des Stress-Relaxationstests bei 12 % Dehnung wurden die viskoelastischen Eigenschaften des Seidenfibroin Implantats vor- und nach Implantation im Vergleich zum nativen medialen Meniskus der kontralateralen Gliedmaße und zum medialen Meniskus der Sham-Gruppe bestimmt.

Das Seidenfibroin Implantat zeigte nach Implantation ein höheres Gleichgewichtsmodul E_{eq} als vor der Implantation ($p = 0,0509$). Nach sechs Monaten war das Ersatzmaterial um bis zu 50 % steifer als der mediale Meniskus der kontralateralen ($p = 0,0094$) sowie der operierten Gliedmaße der Sham-Gruppe ($p = 0,0020$). Zwischen den Gleichgewichtsmodulen des medialen Meniskus der kontralateralen Gliedmaße, der Sham-Gruppe und des Ersatzmaterials vor Implantation bestand statistisch kein signifikanter Unterschied (jeweils $p > 0,2$) (Abbildung 30).

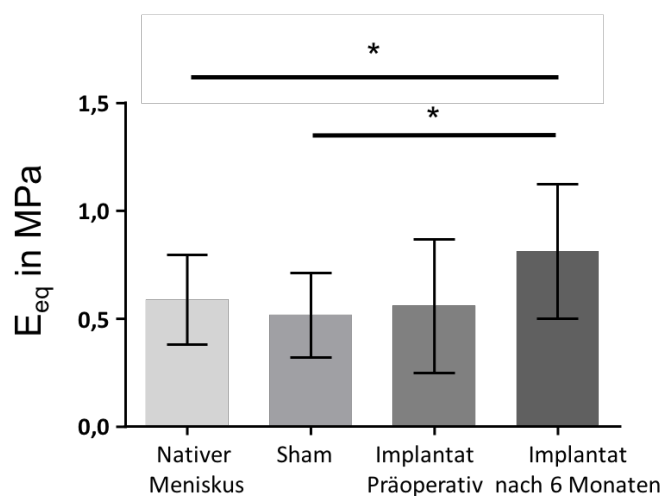


Abbildung 30: Gleichgewichtsmodul E_{eq} in MPa (Mittelwert \pm Standardabweichung) des Seidenfibroin Implantats vor und nach Implantation im Vergleich zum nativen Meniskus der kontralateralen Gliedmaße und zum medialen Meniskus der Sham-Gruppe. * = $p < 0,01$.

3.4.2. Tibialer Knorpel

Knorpeldicke

Die Knorpeldicke wurde jeweils an den drei Messpunkten bestimmt (Abbildung 31 A).

Im Bereich der *Eminentia intercondylaris* konnte sowohl in der Leerdefekt-, als auch in der Implantat-Gruppe bezüglich der Knorpeldicke kein Unterschied zwischen operierter und nicht-operierter Gliedmaße nachgewiesen werden (jeweils $p > 0,1$). Von allen Messpunkten wurde in der Implantat-Gruppe hier die höchste Knorpeldicke gemessen. Ein Unterschied zwischen den beiden Operationsgruppen konnte weder an der operierten ($p > 0,7$), noch an der Kontroll-Gliedmaße ($p > 0,4$) nachgewiesen werden. Jedoch war in der Leerdefekt-Gruppe die Knorpeldicke tendenziell niedriger (Abbildung 31 B).

Der zweite Messpunkt lag im anterioren Bereich des Tibiaplateaus. Dieser befand sich *in vivo* unterhalb des Meniskus oder Implantats. Auch hier konnte in beiden Operationsgruppen kein Unterschied der Knorpeldicke zwischen operierter und nicht-operierter Gliedmaße (jeweils $p > 0,8$) festgestellt werden und auch zwischen den beiden Operationsgruppen bestand kein Unterschied. Dies galt sowohl für die operierte ($p > 0,7$), als auch für die nicht-operierte Gliedmaße ($p > 0,9$) (Abbildung 31 C).

Messpunkt drei lag unterhalb des Meniskus im posterioren Bereich des Tibiaplateaus. Hier wurde in beiden Operationsgruppen die niedrigste Knorpeldicke gemessen. In der Gruppe mit Leerdefekt zeigte sich kein Unterschied in der Knorpeldicke zwischen operierter und Kontroll-Gliedmaße ($p > 0,9$). Zwar konnte auch in der Implantat-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, jedoch war die Knorpeldicke an der operierten Gliedmaße tendenziell niedriger als an der nicht-operierten Gliedmaße ($p > 0,1$). Der Vergleich zwischen den Operationsgruppen zeigte zwar keinen statistischen Unterschied (jeweils $p > 0,6$), jedoch war auch hier die Knorpeldicke an der operierten Gliedmaße der Implantat-Gruppe tendenziell niedriger als in der Leerdefekt-Gruppe (Abbildung 31 D).

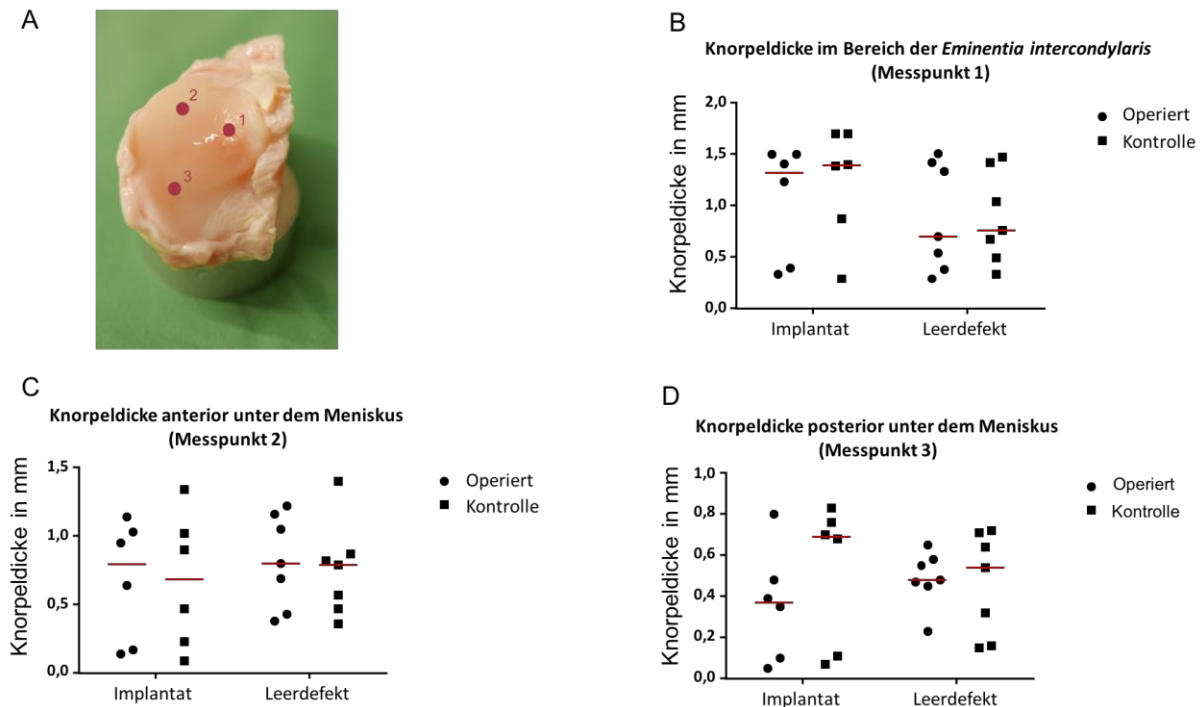


Abbildung 31: (A) Bestimmung der Knorpeldicke des medialen Tibiaplateaus an drei verschiedenen Messpunkten. Knorpeldicke in mm (Median und Einzelwerte) der operierten sowie nicht-operierten Gliedmaßen im Bereich der (B) Eminentia intercondylaris, (C) im anterioren sowie (D) im posterioren Bereich der medialen Tibiakondyle.

Gleichgewichtsmodul E_{eq}

Das Gleichgewichtsmodul E_{eq} (in MPa) des tibialen Knorpels wurde in allen Operationsgruppen an den drei Messpunkten bestimmt.

Im Bereich der *Eminentia intercondylaris* stand die Knorpeloberfläche des medialen Tibiaplateaus *in vivo* in direktem Kontakt mit der medialen Femurkondyle. An diesem Messpunkt konnte innerhalb der Gruppen hinsichtlich des Gleichgewichtsmoduls E_{eq} kein Unterschied zwischen operierter und nicht-operierter Gliedmaße festgestellt werden (jeweils $p > 0,05$). Weiterhin konnte auch zwischen den drei Operationsgruppen kein Unterschied nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für die operierte Gliedmaße (jeweils $p > 0,09$) als auch für die kontralaterale Kontroll-Gliedmaße (jeweils $p > 0,1$) (Abbildung 32 A).

Im Bereich des tibialen Knorpels unterhalb des Meniskus (Messpunkte 2 und 3) war in der Implantat- ($p = 0,0006$) und Leerdefekt-Gruppe ($p = 0,0465$) das Gleichgewichtsmodul E_{eq} an der operierten Gliedmaße signifikant geringer als an der kontralateralen Kontroll-Gliedmaße. Dabei kam es vor allem in der Implantat-Gruppe an der operierten Gliedmaße zu einer deutlichen Erweichung des Knorpels. Hier war das

Gleichgewichtsmodul des tibialen Knorpels fast 50 % geringer als an der nicht-operierten Gliedmaße. Obwohl zwischen den drei Operationsgruppen bezüglich des Gleichgewichtsmoduls, weder an der operierten ($p > 0,05$) noch an der nicht-operierten ($p > 0,3$) Gliedmaße statistisch ein Unterschied nachgewiesen werden konnte, war E_{eq} in der Sham-Gruppe und an den nicht-operierten Gliedmaßen tendenziell höher. Weiterhin wurde in der Sham-Gruppe kein Unterschied zwischen operierter Gliedmaße und Kontrolle nachgewiesen ($p > 0,3$) (Abbildung 32 B).

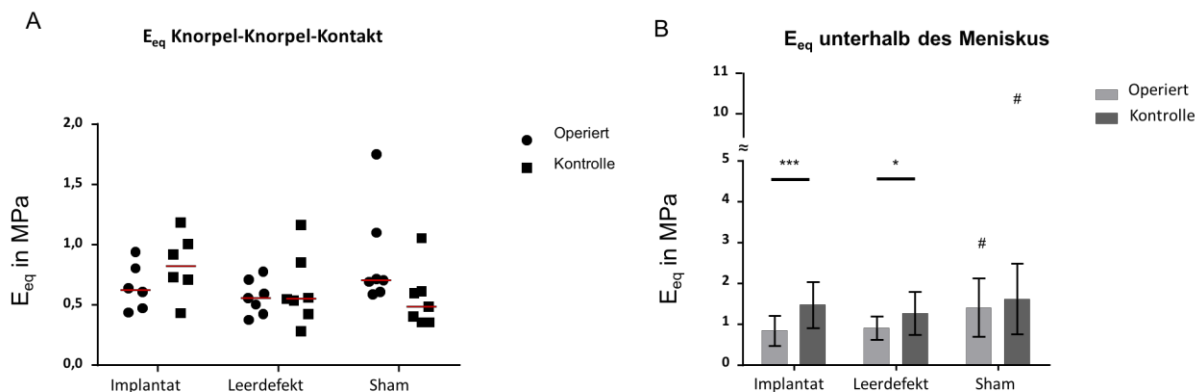


Abbildung 32: (A) Gleichgewichtsmodul E_{eq} (in MPa) des tibialen Knorpels im Bereich der Eminentia intercondylaris (Median und Einzelwerte). (B) Gleichgewichtsmodul E_{eq} (in MPa) unterhalb des Implantats/Leerdecks/Meniskus (Mittelwert \pm Standardabweichung). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0001$; # = Ausreißer.

Steifigkeit k_{eq}

An den drei Messpunkten auf dem medialen Tibiaplateau wurde zusätzlich die Steifigkeit k_{eq} (N/mm) des Knorpels im Gleichgewichtszustand bestimmt.

Im Bereich der *Eminentia intercondylaris* konnte in keiner Gruppe ein Unterschied in der Steifigkeit k_{eq} des tibialen Knorpels zwischen operierter Gliedmaße und Kontrolle nachgewiesen werden (jeweils $p > 0,1$). Jedoch war diese in der Sham-Gruppe an der nicht-operierten Gliedmaße tendenziell niedriger. Auch zwischen den drei Operationsgruppen konnte weder an der operierten (jeweils $p > 0,5$) noch an der nicht-operierten Gliedmaße (jeweils $p > 0,3$) ein Unterschied in der Steifigkeit k_{eq} des tibialen Knorpels festgestellt werden (Abbildung 33 A).

Tendenziell war die Steifigkeit im Gleichgewichtszustand k_{eq} (N/mm) unterhalb des Meniskus (Messpunkte 2 und 3) höher, als im Bereich der *Eminentia intercondylaris*. In der Implantat-Gruppe kam es hier an der operierten Gliedmaße zu einer signifikanten Erweichung des tibialen Knorpels im Vergleich zur nicht-operierten Gliedmaße ($p = 0,0365$). Während in der Sham-Gruppe kein Unterschied zwischen den beiden

Gliedmaßen festgestellt werden konnte ($p > 0,5$), war in der Gruppe mit Leerdefekt eine ähnliche Tendenz wie in der Implantat-Gruppe ersichtlich, blieb jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,0750$). Zwischen den drei Operationsgruppen bestand weder an der linken (jeweils $p > 0,2$) noch an der rechten Gliedmaße (jeweils $p > 0,5$) ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Steifigkeit im Gleichgewichtszustand (Abbildung 33 B).

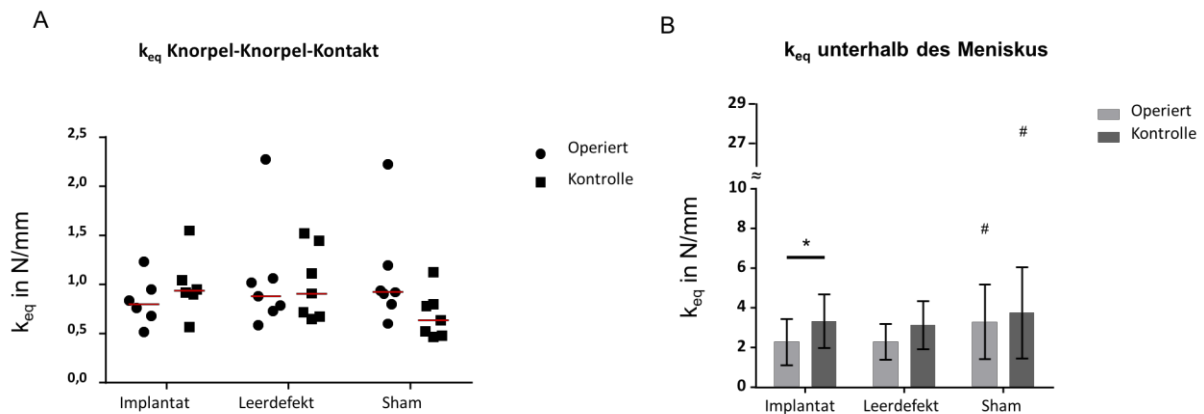


Abbildung 33: (A) Steifigkeit im Gleichgewichtszustand k_{eq} in N/mm im Bereich der Eminencia intercondylaris (Median und Einzelwerte). (B) Steifigkeit k_{eq} in N/mm unterhalb des Implantats/Leerdefekts/Meniskus (Mittelwert \pm Standardabweichung). $* p = 0,0365$; $\# =$ Ausreißer.

3.5. Bildgebende Untersuchung

Die Evaluierung der Knorpelbeschaffenheit der Gelenkflächen von Femur und Tibia wurde an MRT-Schnittbildern jeweils in der sagittalen und in der coronalen Ebene durchgeführt (siehe 2.3.4. Bildgebung (MRT)). Die Gelenkflächen wurden hierfür in vier Kompartimente eingeteilt (*Condylus lateralis femoris* (CLF), *Condylus medialis femoris* (CMF), *Condylus lateralis tibiae* (CLT) und *Condylus medialis tibiae* (CMT)) und mit Hilfe eines etablierten Schemas zur makroskopischen Klassifizierung degenerativer Knorpelveränderungen klassifiziert [Yoshioka, et al. 1996]. Anhand der Knorpelbeschaffenheit wurde jedem der vier Bereiche ein Degenerationsgrad zwischen 1 (Oberfläche intakt) und 6 (Durchmesser des größten Knorpeldefekts > 5 mm) zugeteilt (Tabelle 5). Bestimmend für den zugeteilten Grad war die schwerste vorliegende Veränderung im jeweiligen Kompartiment.

In allen Operationsgruppen erschien die Knorpelschicht des medialen Femurkondylus dicker als die Knorpelschicht des lateralen Femurkondylus. Eine Messung bei einem Tier

der Sham-Gruppe ergab am CMF eine Knorpeldicke von 1,4 mm im Vergleich zum CLF, wo die Knorpeldicke nur 0,6 mm betrug.

Sham-Gruppe

Von allen Operationsgruppen wurden in der Sham-Gruppe die geringsten Veränderungen der Knorpeloberflächen festgestellt. Während ein Tier in allen Kompartimenten des Gelenks eine völlig unveränderte Knorpelstruktur zeigte (Abbildung 34 A), kam es bei dem anderen Tier zu einer minimalen Auffaserung der Gelenkflächen beider Femurkondylen.

Leerdefekt-Gruppe

In der Gruppe mit Leerdefekt zeigten sich insgesamt stärker ausgeprägte Veränderungen der Knorpeloberflächen. Diese waren vor allem im medialen Gelenkkompartiment ersichtlich. So wurde bei einem Tier am CMF ein hypointenser Bereich von über 2 mm Durchmesser festgestellt, wohingegen es am CLF nur zu einer minimalen Fibrillation des Knorpels kam. Für dieses Tier standen aufgrund technischer Probleme während des Scanvorgangs keine Bilder des Tibiaplateaus zur Verfügung. Auch bei dem zweiten Tier in dieser Gruppe kam es am CMT zu einer starken Fibrillation sowie zu ausgedehnten Unregelmäßigkeiten der Oberfläche, die vor allem im Bereich der *Eminentia intercondylaris* am deutlichsten waren. Dagegen kam es am CLT und am CMF nur zu einer minimalen Fibrillation der Knorpeloberfläche.

Implantat-Gruppe

Ähnliche Befunde wie in der Leeredefekt-Gruppe, konnten auch in der Implantat-Gruppe erhoben werden. Auch hier kam es bei einem Tier vor allem im medialen Gelenkkompartiment zu einer Auffaserung der Oberfläche sowie zu einem Knorpeldefekt mit einem Durchmesser von 2 mm (Abbildung 34 C). Die Knorpelstruktur im lateralen Kompartiment war dagegen unverändert. Bei dem zweiten Tier konnte insgesamt nur eine minimale Fibrillation der Knorpeloberflächen nachgewiesen werden (Abbildung 34 B).

Zusammenfassend waren die Unterschiede zwischen den Gruppen aufgrund der geringen Gruppengröße schwierig zu beurteilen. Tendenziell zeigten die Knorpeloberflächen der Leeredefekt- und Implantat-Gruppe stärker ausgeprägte

Veränderungen der Knorpelstruktur. Dabei war in beiden Gruppen vor allem das mediale Kompartiment des Gelenks betroffen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht über die makroskopische Klassifizierung degenerativer Knorpelveränderung an MRT-Schnittbildern von Femurkondylen und Tibiaplateau der linken Gliedmaße in allen Operationsgruppen. 1 = intakte Oberfläche; 2 = minimale Auffaserung; 3 = deutliche Auffaserung, Unregelmäßigkeiten der Oberfläche oder Risse; 4 = 0 mm < Durchmesser des größten Defekts < 2 mm; 5 = 2 mm < Durchmesser des größten Defekts < 5 mm.

	Mediale Femurkondyle	Laterale Femurkondyle	Mediales Tibiaplateau	Laterales Tibiaplateau
Sham-Gruppe				
Tier 1	2	2	1	1
Tier 2	1	1	1	1
Leerdefekt- Gruppe				
Tier 1	5	2	-	-
Tier 2	2	1	3	2
Implantat- Gruppe				
Tier 1	2	1	4	1
Tier 2	2	2	2	2

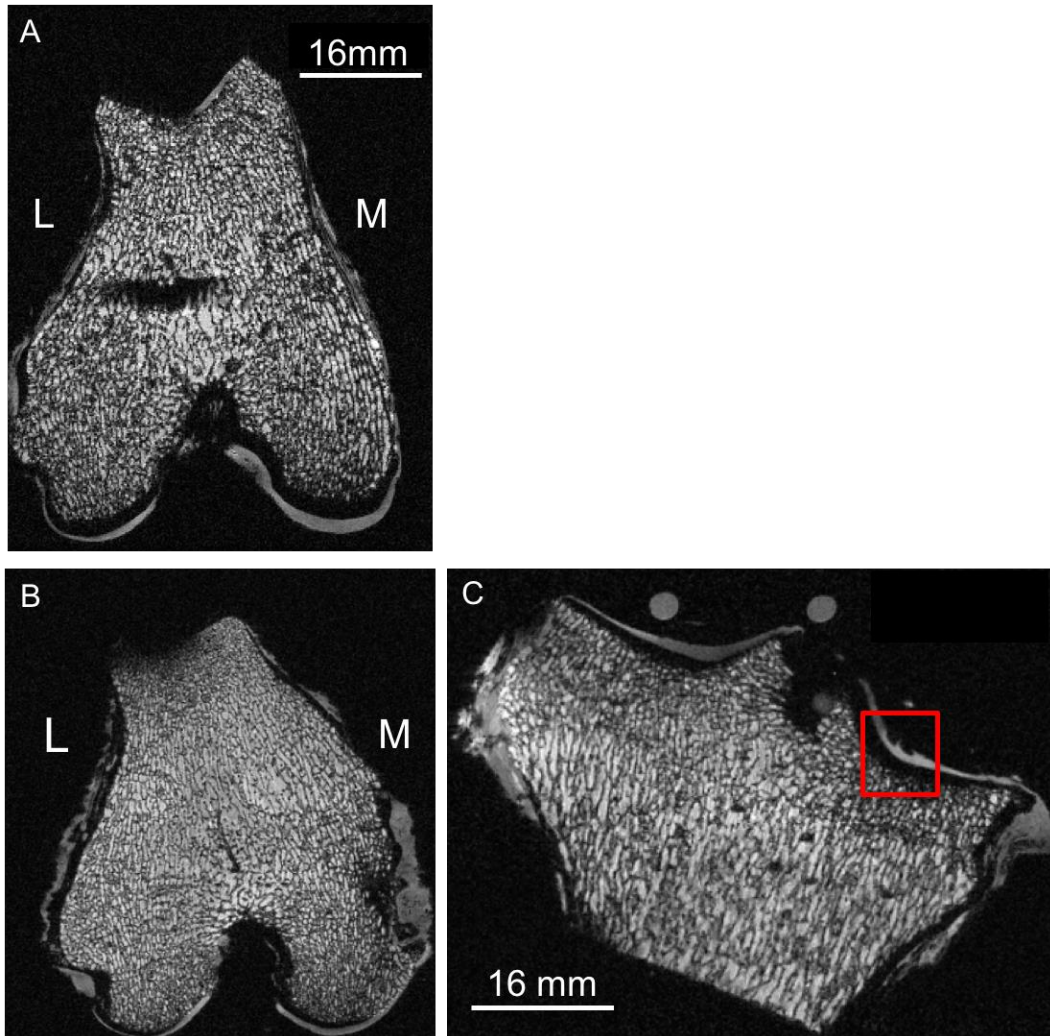


Abbildung 34: (A) Linkes Femur eines Tieres der Sham-Gruppe (coronal). Intakte Oberfläche an medialer und lateraler Femurkondyle. Die Knorpeldicke betrug hier 1,4 mm an der medialen und 0,6 mm an der lateralen Femurkondyle. (B) Linkes Femur eines Tieres der Implantat-Gruppe (coronal) mit Degenerationsgrad 1 am CLF und Degenerationsgrad 2 am CMF. (C) Linkes Tibiaplateau eines Tieres der Implantat-Gruppe (coronal). Roter Kasten = Zwei Defekte in der medialen Knorpeloberfläche mit einem Durchmesser von bis zu 2 mm (Grad 4). L = Lateral; M = Medial

3.6. Färbung mit India Ink

Sham-Gruppe

In der Sham-Gruppe war der Anteil der geschädigten Oberfläche an der medialen Femurkondyle deutlich geringer als am medialen Tibiaplateau und betrug so nur rund ein Viertel des Wertes der medialen Tibiakondyle (Abbildung 35 C, D; Abbildung 38). An beiden Gelenkflächen konnte kein Unterschied zwischen operierter und nicht-operierter Gliedmaße festgestellt werden (jeweils $p > 0,6$) (Abbildung 35 A, B).

Leerdefekt-Gruppe

Im Vergleich zur Sham-Gruppe war in dieser Operationsgruppe der Anteil der schwarz gefärbten und damit geschädigten Gelenkfläche an Femur und Tibia der operierten Gliedmaße stärker ausgeprägt (Abbildung 36 B und D, F und H; Abbildung 38). Dabei war auch hier das mediale Tibiaplateau deutlich stärker betroffen als die mediale Femurkondyle (Abbildung 36 D, H). Am medialen Tibiaplateau beider Gliedmaßen kam es gleichermaßen zu einer ausgedehnten Schädigung des Knorpels, sodass statistisch kein Unterschied nachgewiesen werden konnte ($p > 0,3$). Im Gegensatz dazu, war an der medialen Femurkondyle der gefärbte Anteil des Knorpels an der operierten Gliedmaße fast doppelt so hoch wie an nicht-operierten Gliedmaße ($p = 0,0220$) (Abbildung 36 B, F).

Implantat-Gruppe

In der Implantat-Gruppe zeigte sich an Femur und Tibia ein ähnliches Ausmaß der Knorpelzerstörung wie in der Operationsgruppe mit Leerdefekt (Abbildung 38). Auch hier war die mediale Gelenkfläche der Tibia stärker betroffen als die des Femurs. Trotz einer hohen Variabilität des Knorpelzustandes an der operierten Gliedmaße, konnte sowohl an Femur ($p = 0,0009$) als auch an Tibia ($p = 0,0052$) ein signifikanter Unterschied zwischen operierter Gliedmaße und Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 37 A-F). Weiterhin bestand an der medialen Femurkondyle ein signifikanter Unterschied zur Sham-Gruppe ($p = 0,0138$). Zwischen den drei Operationsgruppen konnte bezüglich des Anteils der beschädigten Knorpeloberfläche an den nicht-operierten Gliedmaßen kein Unterschied nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für das Femur als auch für die Tibia (Abbildung 38).

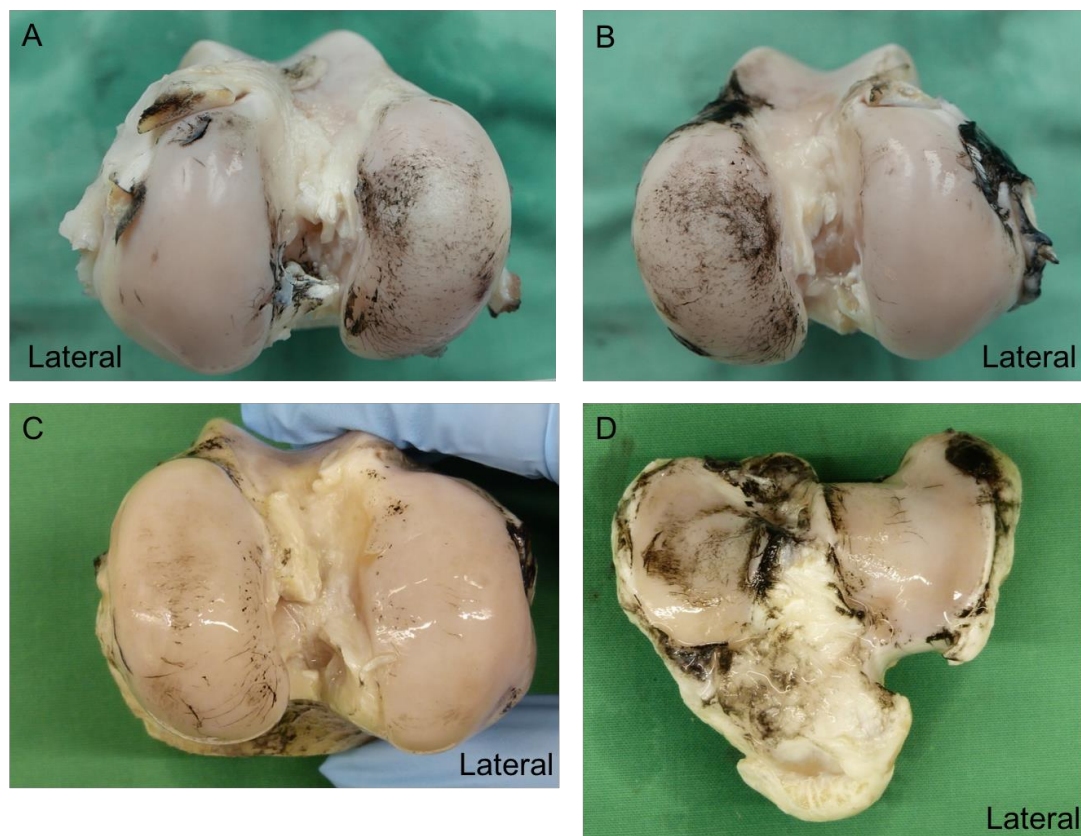


Abbildung 35: (A, B) India Ink Färbung der Gelenkflächen des rechten und linken Femurs eines Tieres der Sham-Gruppe. Es bestand kein Unterschied bezüglich des Anteils der schwarz gefärbten Oberfläche zwischen nicht-operierter (A) und operierter (B) Gliedmaße. Linkes Femur (C) und Tibiaplateau (D) eines Tieres der Sham-Gruppe. Die medialen Gelenkflächen des Tibiaplateaus wiesen im Vergleich zur medialen Femurkondyle den größeren Anteil an beschädigter Oberfläche auf.



Abbildung 36: Gelenkflächen von Femur (A, B und E, F) und medialem Tibiaplateau (C, D und G, H) zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe. An den linken Gliedmaßen (B, F) ist der Anteil der geschädigten Oberfläche der medialen Femurkondyle signifikant höher als rechts (A, E). Der Unterschied zwischen den Gelenkflächen des medialen Tibiaplateaus der rechten (C) und linken (D) Gliedmaßen ist dagegen hier weniger deutlich.

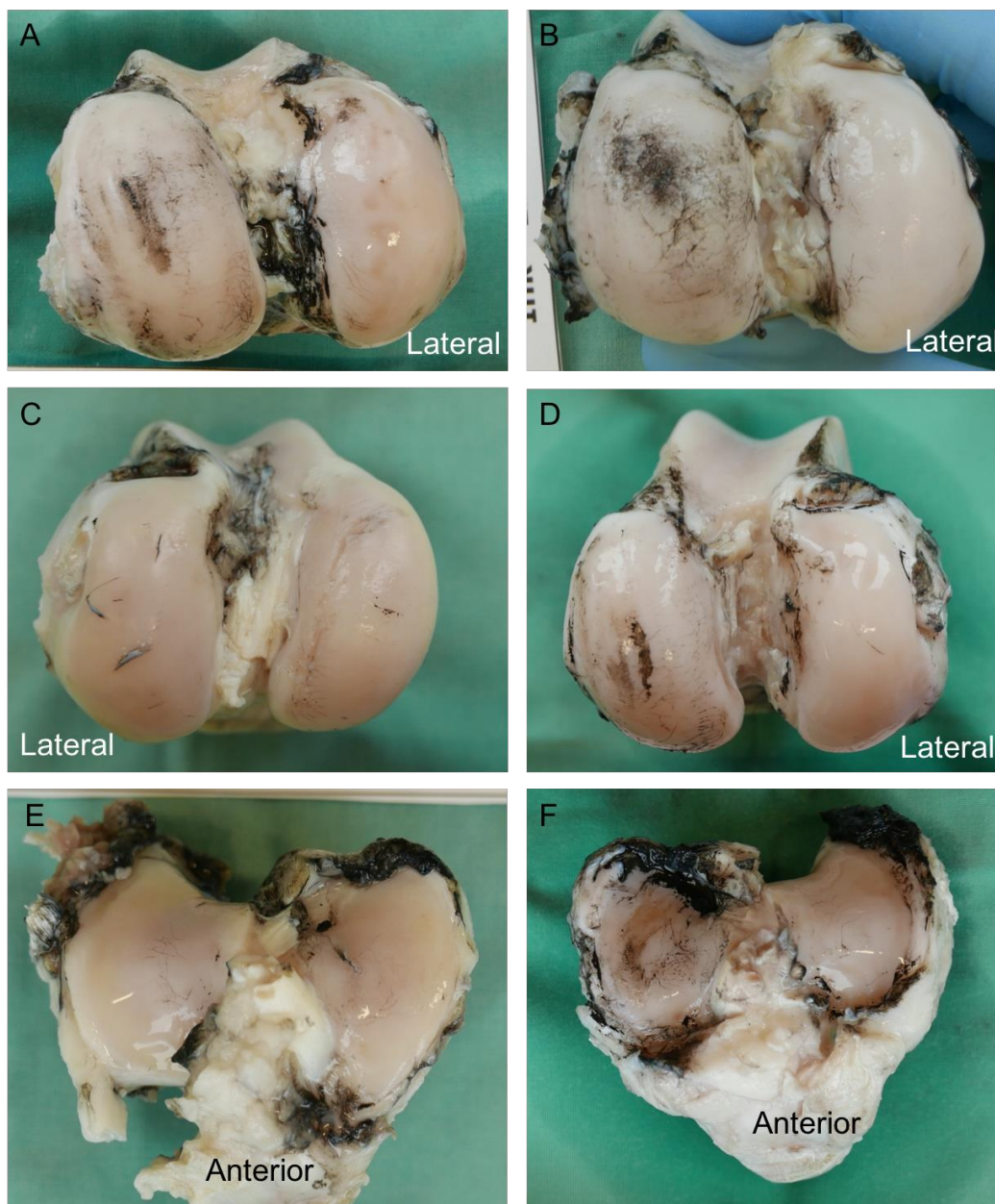


Abbildung 37: (A, B) Gelenkflächen des linken Femurs zweier Tiere der Implantat-Gruppe. Gelenkflächen von Femur (C, D) und Tibia (E, F) beider Gliedmaßen eines weiteren Tieres der Implantat-Gruppe. An der operierten Gliedmaße (D, F) zeigten die medialen Gelenkkompartimente einen deutlich höheren Anteil geschädigter Gelenkfläche.

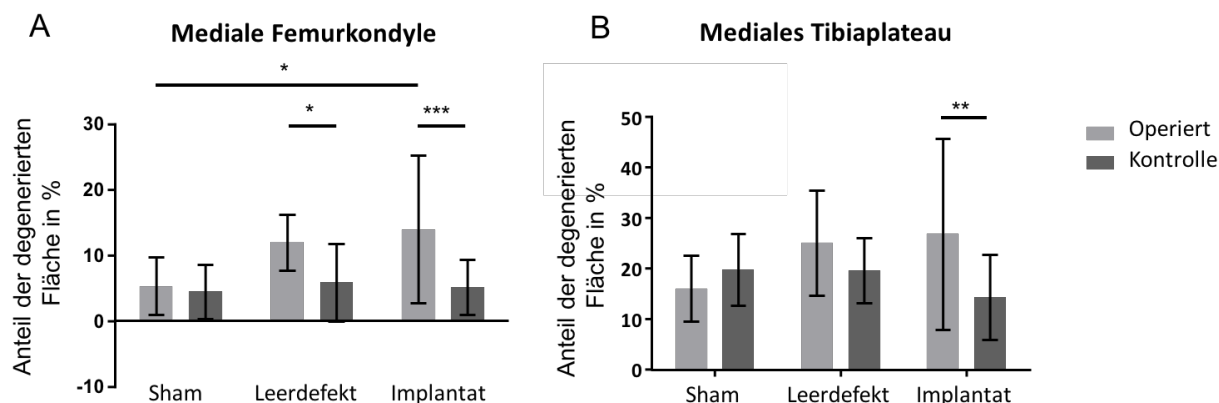


Abbildung 38: (A) Anteil in % der degenerierten Oberfläche der medialen Femurkondyle. (B) Anteil in % der degenerierten Oberfläche des medialen Tibiaplateaus in allen Operationsgruppen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

3.7. Histologische Untersuchung

Bei der Anfertigung der histologischen Präparate von Meniskus/Implantat und des tibialen Knorpels kam es bei einigen Schnitten zu starken Faltungen oder teilweise sogar zur Zerstörung des Präparats. So standen hier nicht von jedem Tier jeweils drei Schnitte für die Auswertung zur Verfügung.

3.7.1. Synovialmembran

Die Gelenkkapsel besteht aus mehreren Schichten. Man unterscheidet das äußere *Stratum fibrosum* aus straffem Bindegewebe und das innere *Stratum synoviale* aus lockerem Bindegewebe [Sinowatz and Hees 2006]. Unter physiologischen Bedingungen besteht die innere *Synovialis* aus 1-4 Zellreihen von synovialen Deckzellen [Stevens and Lowe 1997]. Diese Zellen gehen über in eine Schicht aus locker angeordneten Kollagenfasern mit eingelagerten Fettzellen und Fibroblasten (Abbildung 39). Außerdem finden sich hier zahlreiche Lymph- und Blutgefäße sowie Mastzellen und Makrophagen. Unter pathologischen Bedingungen kann es als Reaktion auf verschiedene Noxen zur Hypertrophie sowie Hyperplasie (> 3-4 Zellreihen) der synovialen Deckzellen kommen. Dies geht häufig mit einer Proliferation der Synovialzotten (villöse Proliferation) einher [Thomas 1996]. Auf einen inflammatorischen Stimulus hin kommt es außerdem zur lokalen Infiltration der Synovialis mit Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten, Zellen des

mononukleären Phagozytensystems und Lymphozyten. Auffällig sind dabei mehrkernige synoviale Riesenzellen, die in der verarbeiteten Deckzellschicht herdförmig auftreten. Diese werden von Makrophagen abgeleitet und besitzen 5-6 kranzförmig angeordnete Zellkerne [Mohr 2000].

Um den Einfluss des operativen Eingriffs und der Implantation des Seidenfibrin Implantats zu evaluieren, wurde bei der histologischen Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte der Synovialmembran vor allem auf das Vorliegen der genannten Strukturveränderungen geachtet. Da keine immunhistologische Untersuchung durchgeführt wurde, die ein sicheres Abgrenzen der verschiedenen Populationen an Entzündungszellen erlaubt, wurden die Schnitte auf das Vorkommen von Entzündungszellen in Form von mehrkernigen Riesenzellen untersucht, da diese auch in einer histologischen Übersichtsfärbung sicher identifiziert werden können. Bei der Anfertigung der histologischen Präparate wurde nicht immer die richtige Schnittebene getroffen. So stand nicht für jedes Tier ein histologischer Schnitt der Synovialmembran der linken und rechten Gliedmaße zur Verfügung.

Hypertrophie und Hyperplasie der synovialen Deckzellen waren die am häufigsten vorliegenden Veränderungen der Synovialmembran. Diese waren bei Tieren jeder Operationsgruppe an der operierten und auch an den nicht-operierten Gliedmaßen zu finden, sodass zwischen den Operationsgruppen nur geringfügige Unterschiede festgestellt werden konnten (Tabelle 8). Strukturveränderungen der Synovialmembran in Form einer villösen Proliferation waren an der linken Gliedmaße bei drei Tieren in der Gruppe mit Leerdefekt und bei jeweils zwei Tieren in der Sham- und Implantat-Gruppe zu finden (Abbildung 40). Diese Form von Veränderung trat nur vereinzelt an den nicht-operierten Gliedmaßen auf. Bei vier Tieren mit Implantat konnten an den operierten Gelenken vereinzelt mehrkernige Riesenzellen gefunden werden (Abbildung 40, Ausschnitt). Dies war tendenziell mehr als in der Sham- und Leerdefekt-Gruppe. Hier wurden nur bei jeweils einem Tier einzelne mehrkernige Riesenzellen gefunden.

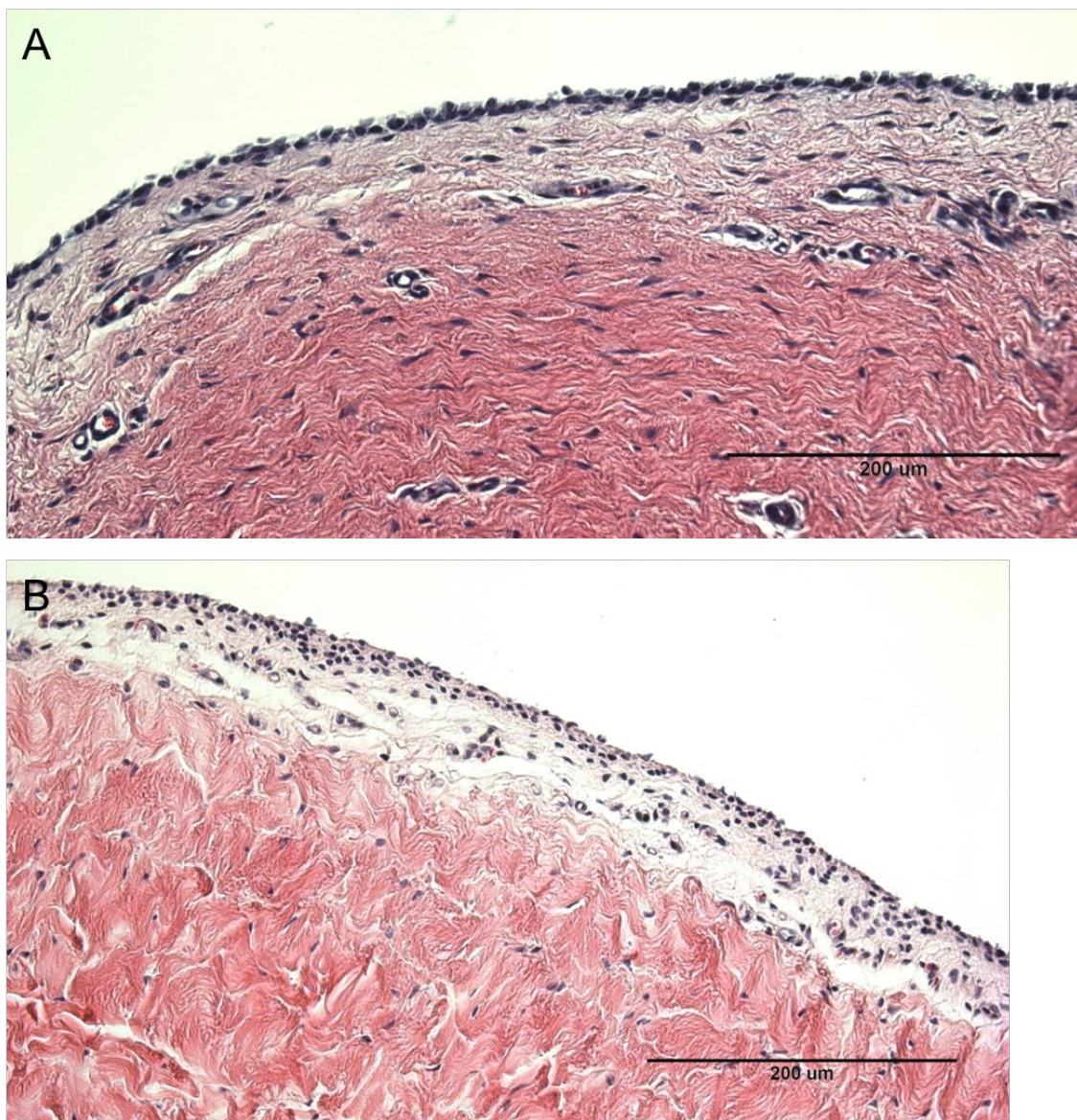


Abbildung 39: Synovialmembran des operierten (A) und nicht-operierten (B) Kniegelenks eines Tieres der Implantat-Gruppe. Die Synovialis besteht aus ca. 2-3 Zellreihen synovialer Deckzellen. Darunter befindet sich eine Schicht aus locker angeordneten Kollagenfasern mit Blutgefäßen; 200-fache Vergrößerung.

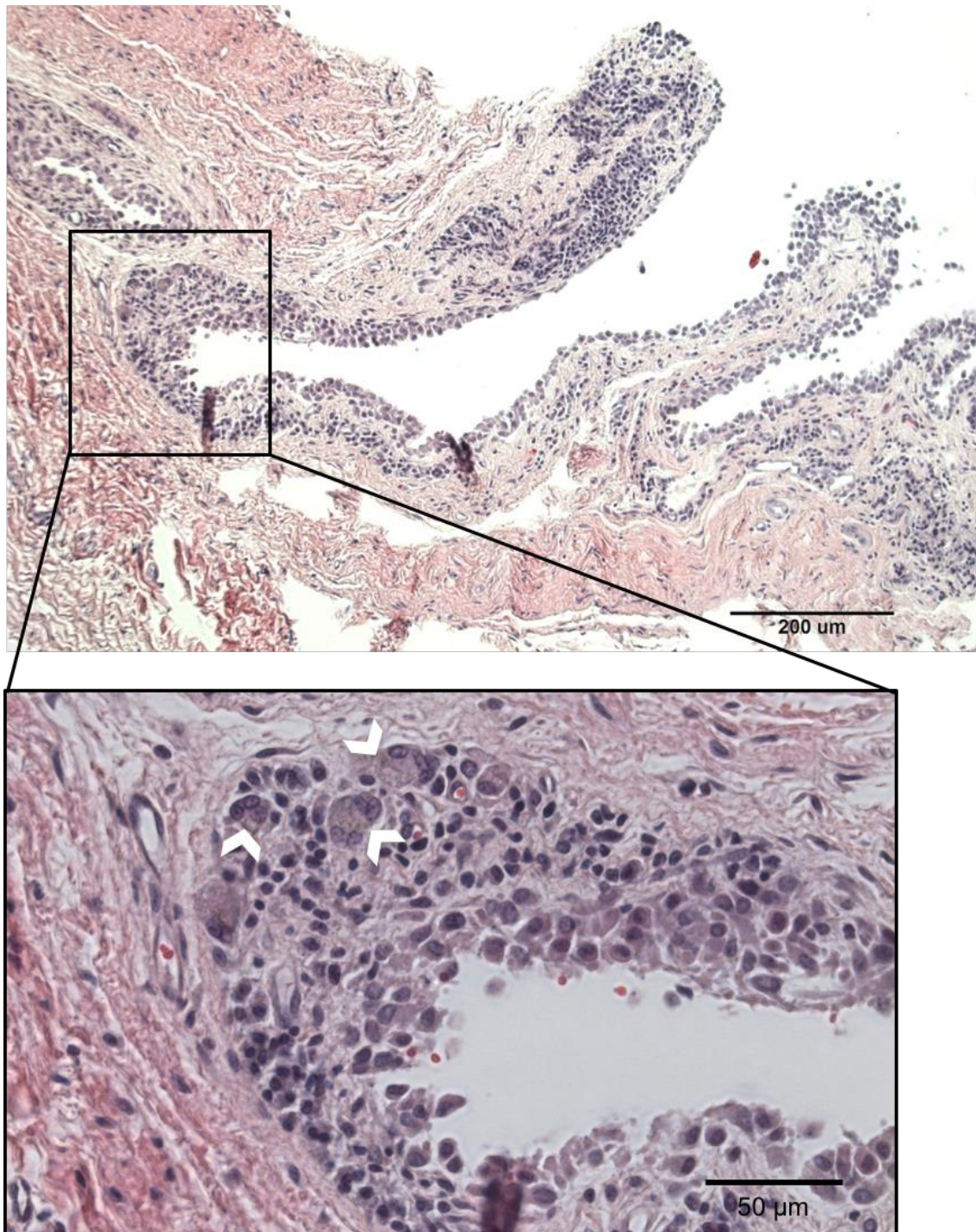


Abbildung 40: Synovialmembran eines operierten Kniegelenks (Implantat-Gruppe). Hyperplasie der synovialen Deckzellen mit villöser Proliferation der Synovialis; 100-fache Vergrößerung. Zusätzlich traten bei diesem Tier herdförmig mehrkernige synoviale Riesenzellen in der verbreiterten Deckzellschicht auf (Ausschnitt). Diese Besitzen 5-6 kranzförmig angeordnete Zellkerne; 400-fache Vergrößerung.

Tabelle 8: Übersicht der in den drei Operationsgruppen vorliegenden Veränderungen der Synovialmembran.

	Operierte Gliedmaße				Kontralaterale Gliedmaße			
	Hyper- plasie	Hyper- trophie	Villöse Pro- liferation	Syn. Riesen- zellen	Hyper- plasie	Hyper- trophie	Villöse Pro- liferation	Syn. Riesen- zellen
Sham								
1	x	x	x					
2	x	x			x	x	x	x
3					x	x		x
4		x		x				
5	x		x		x			
6						x		
7	x	x						
8		x						
9	x							
Gesamt	5	5	2	1	3	3	1	2
Leer- defekt								
1		x	x	x	x	x		
2			x				Kein Schnitt	
3								
4		x				x		
5	x	x			x	x		
6		Kein Schnitt						
7	x	x	x					
8								
9							Kein Schnitt	
Gesamt	2	4	3	1	2	3	0	0
Im- plantat								
1		Kein Schnitt			x		x	
2		x						
3	x	x	x	x			Kein Schnitt	
4	x			x				
5				x				
6	x	x						
7	x	x	x	x			Kein Schnitt	
8	x	x						
9		Kein Schnitt						
Gesamt	5	5	2	4	1	0	1	0

3.7.2. Meniskus/Implantat

Aufgrund seines hohen Gehalts an Kollagen (acidophil) erscheint der Meniskus in Hämatoxilin-Eosin-gefärbten, histologischen Schnitten gleichmäßig rot bis pink gefärbt. Der größte Anteil der Kollagenfasern liegt dabei in parallel ausgerichteten Faserbündeln vor.

Sham-Gruppe

Um mögliche negative Auswirkungen der Arthrotomie des Kniegelenks zu erfassen, wurden die HE-gefärbten Schnitte aus Vorderhorn (n = 7), *Pars intermedia* (n = 9) und Hinterhorn (n = 6) der medialen Menisken der Sham-Gruppe auf Veränderungen der Struktur und des Färbeverhaltens untersucht und mit den medialen Menisken der kontralateralen Gliedmaße verglichen. Dabei konnte kein Unterschied in der histologischen Struktur sowie im Färbeverhalten der Menisken festgestellt werden (Abbildung 41).

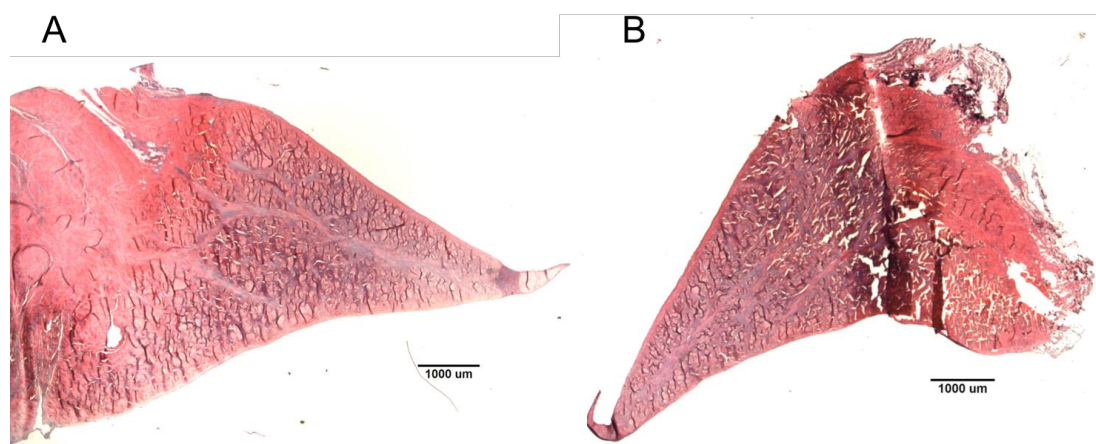


Abbildung 41: Nativer medialer Meniskus der linken (A) und rechten (B) Gliedmaße eines Tieres der Sham-Gruppe; 12,5-fache Vergrößerung.

Leerdekt-Gruppe

In der Gruppe mit Leerdekt wurde ebenfalls auf Veränderungen in Form eines Strukturverlustes oder einer Änderung des Färbeverhaltens geachtet. Hier wurde vor allem die Resektionskante des Meniskus genauer betrachtet. Zusätzlich wurde evaluiert, ob und inwieweit sich ein Regenerationsgewebe im Bereich des Defektes gebildet hatte. In dieser Operationsgruppe standen für jedes Tier jeweils drei Schnitte des medialen Meniskus der linken Gliedmaße (jeweils n = 9) zur Verfügung. Bei acht Tieren kam es im

Bereich der Resektionskante zu einem Strukturverlust der Kollagenfaserbündel (Abbildung 42). Im Gegensatz zu dem restlichen Meniskusgewebe zeigte dieser Bereich teilweise eine weniger intensive Rot-Färbung. Bei fünf Schafen wurden im Resektionsbereich Cluster aus chondrozytären Zellen gefunden (Abbildung 43 A). Bei drei Tieren hatte sich hier zusätzlich ein schmaler Saum neuen Gewebes gebildet (Abbildung 43 B-D). Dieser unterschied sich hinsichtlich der Färbung deutlich vom restlichen Meniskusgewebe und konnte so auch bei zwei weiteren Schafen gefunden werden. In diese Art Regenerationsgewebe waren chondrozytenartige Zellen eingelagert (Abbildung 43 B).

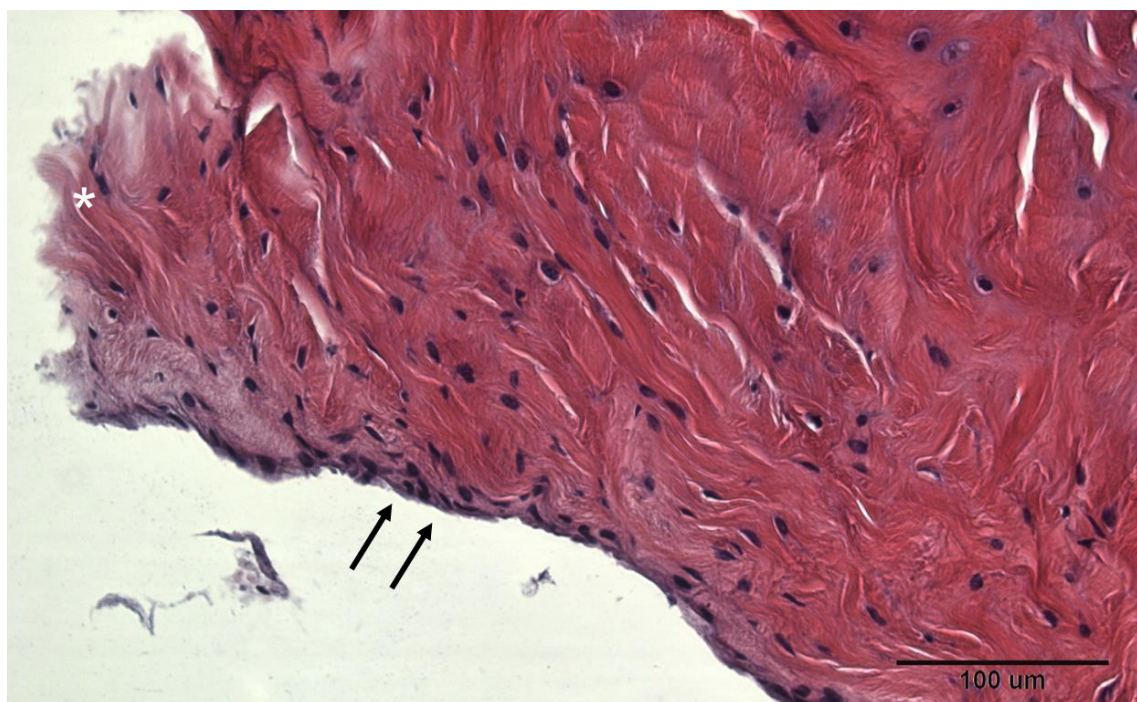


Abbildung 42: Meniskusrandleiste eines Tieres mit Leerdefekt. * = Strukturverlust der Kollagenfaserbündel im Bereich der Resektionskante. Pfeile = Glatte, intakte Oberfläche des Meniskus; 200-fache Vergrößerung.

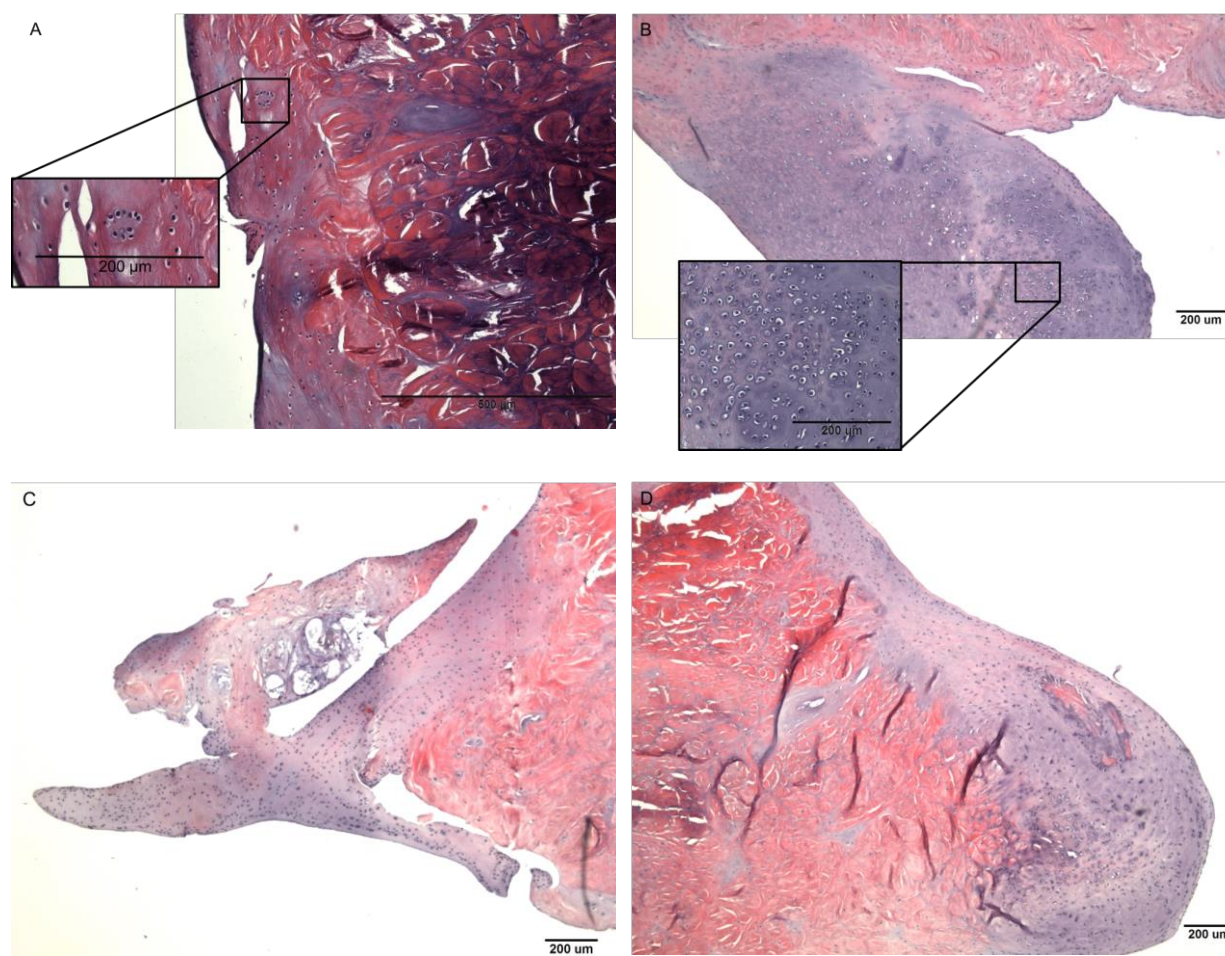


Abbildung 43: (A) Meniskusrandleiste eines Tieres mit Leerdefekt; 200-fache Vergrößerung. Ausschnitt: Cluster aus chondrozytären Zellen; 200-fache Vergrößerung. (B) Basophiles Regenerationsgewebe im Bereich der Resektionskante eines Leerdefekts; 50-fache Vergrößerung. Ausschnitt: Chondrozytäre Zellen innerhalb des neu gebildeten Gewebes; 100-fache Vergrößerung. (C, D) Resektionskante des medialen Meniskus mit violetter (basophilem) Regenerationsgewebe zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe; 50-fache Vergrößerung.

Implantat-Gruppe

Bei den histologischen Schnitten der Implantate sollte unter anderem der Übergangsbereich zur nativen Meniskusrandleiste untersucht werden. Es sollte bestimmt werden inwieweit es zur Integration des Ersatzmaterials kam. Da jedoch keine feste Verbindung zwischen Implantat und Meniskusrandleiste aufgebaut wurde, wurden im Zuge der Anfertigung der histologischen Schnitte die Implantate vom restlichen Meniskusgewebe abgelöst (Abbildung 44). Somit mussten Meniskusrandleiste und Implantat getrennt voneinander beurteilt werden. Bei zwei Tieren kam es bereits *in vivo* zur vollständigen Dislokation des Implantats. Diese wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Somit standen insgesamt von sieben Tieren dieser Gruppe histologische Schnitte des Implantats zur Verfügung. Während der histologischen Aufbereitung kam

es teilweise zur starken Zerstörung der Implantate. Somit konnten nicht von jedem Tier jeweils drei Schnitte beurteilt werden (Vorderhorn und *Pars intermedia*: jeweils $n = 4$, Hinterhorn: $n = 5$). Obwohl auch bei diesen Präparaten das Implantat teilweise zerstört wurde, war die poröse Struktur des Implantats deutlich zu erkennen (Abbildung 45 E). Bei fünf Tieren war in den Poren des äußeren Bereiches des Implantats fibrinartiges Gewebe mit wenigen chondrozytären Zellen auffindbar (Abbildung 45 A). Bei zwei Tieren war hier eine beginnende Organisation des Gewebes ersichtlich, was zu einem eher fibrösen Charakter des Gewebes führte (Abbildung 45 B, C). Bei einem Tier befand sich in den äußeren Poren des Implantats nur azelluläres Gewebe (Abbildung 45 D). Bei einem weiteren Tier befanden sich weder Zellen noch Matrix innerhalb des Implantats (Abbildung 45 E). Die Kollagenstruktur im Bereich der Resektionskante des Meniskus zeigte in dieser Operationsgruppe eine stärkere Auffaserung als in der Leerdefekt-Gruppe (Abbildung 46 A-D). Dieser Bereich zeigte außerdem einen höheren Zellreichtum mit Bildung von Zellclustern chondrozytärer Morphologie (Abbildung 46 B-D). Auch in dieser Operationsgruppe kam es bei zwei Tieren zur beginnenden Regeneration eines Ersatzgewebes von basophilem Charakter. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Seidenfibroin Implantats wurden in Tabelle 9 zusammengefasst (Tabelle 9).

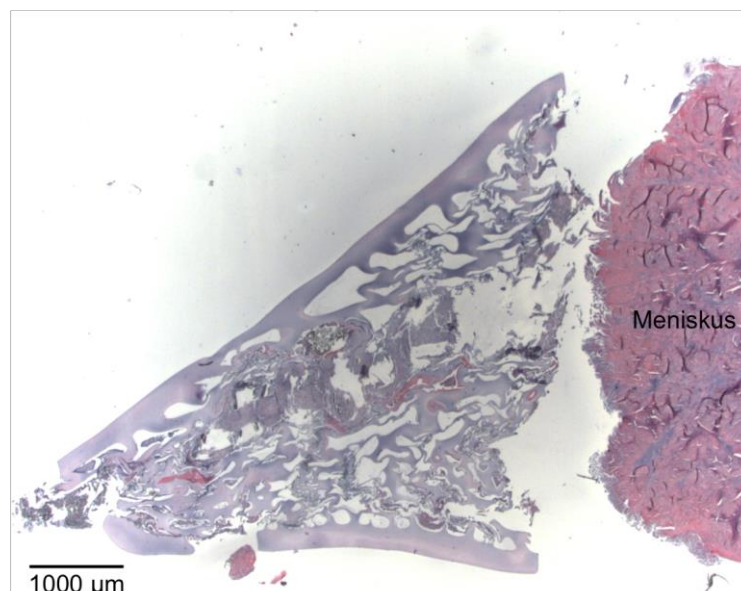


Abbildung 44: Seidenfibroin Implantat ohne feste Verbindung zur nativen Meniskusrandleiste; 12,5-fache Vergrößerung.

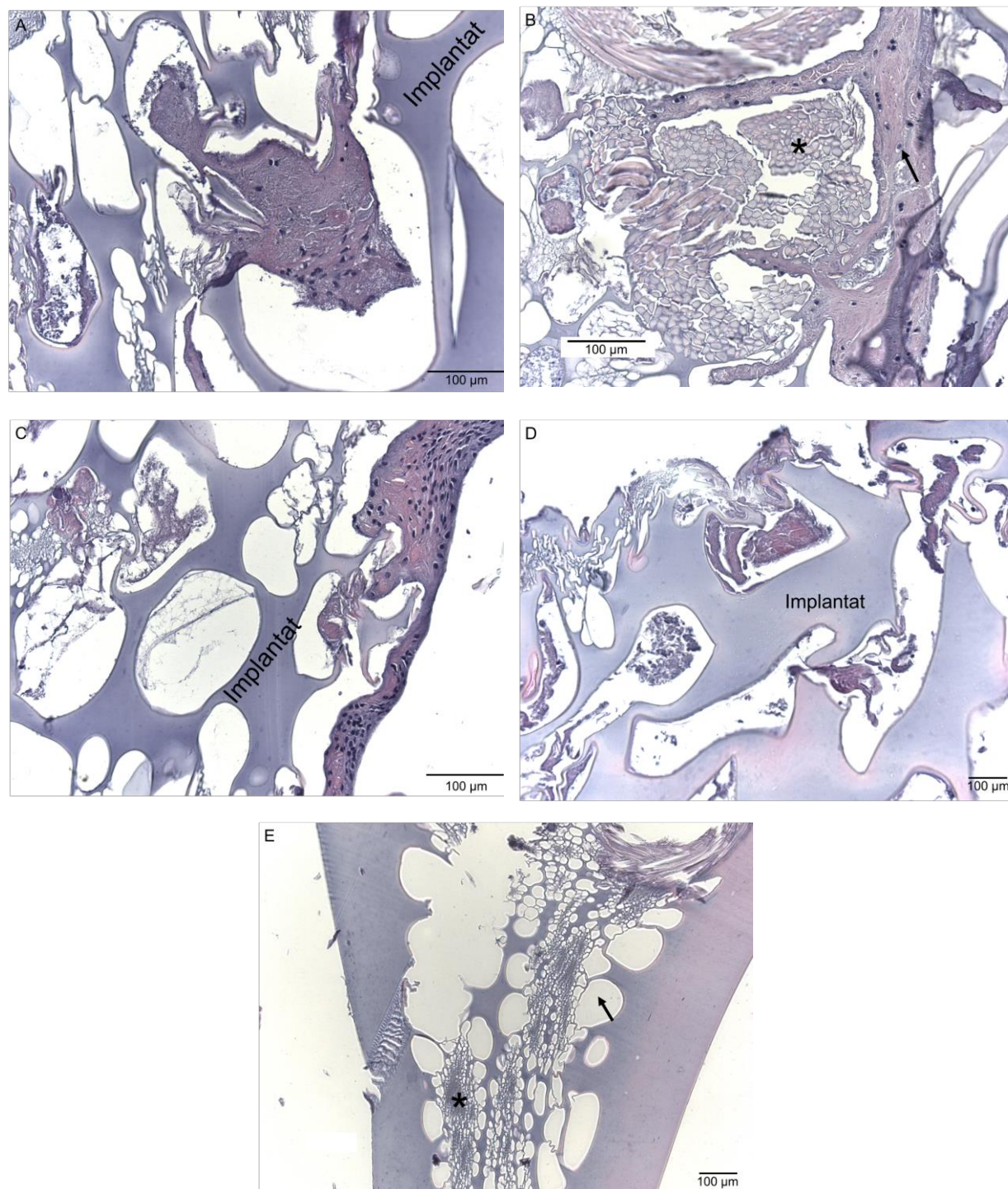


Abbildung 45: (A) Fibrin-ähnliches Gewebe ohne erkennbare Struktur mit wenigen Zellen in den Poren des äußeren Bereichs des Seidenfibroin Implantats; 200-fache Vergrößerung. (B, C) Beginnende Organisation des Gewebes (fibrös) innerhalb der äußeren Poren. Pfeil = wenige chondrozytäre Zellen; * = integriertes Fasernetz des Implantats; 200-fache Vergrößerung. (D) Seidenfibroin Implantat mit azellulärem Gewebe innerhalb der äußeren Poren; 100-fache Vergrößerung. (E) Implantat ohne Zellen oder Matrix. Pfeil = Makropore, * = Mikropore; 100-fache Vergrößerung.

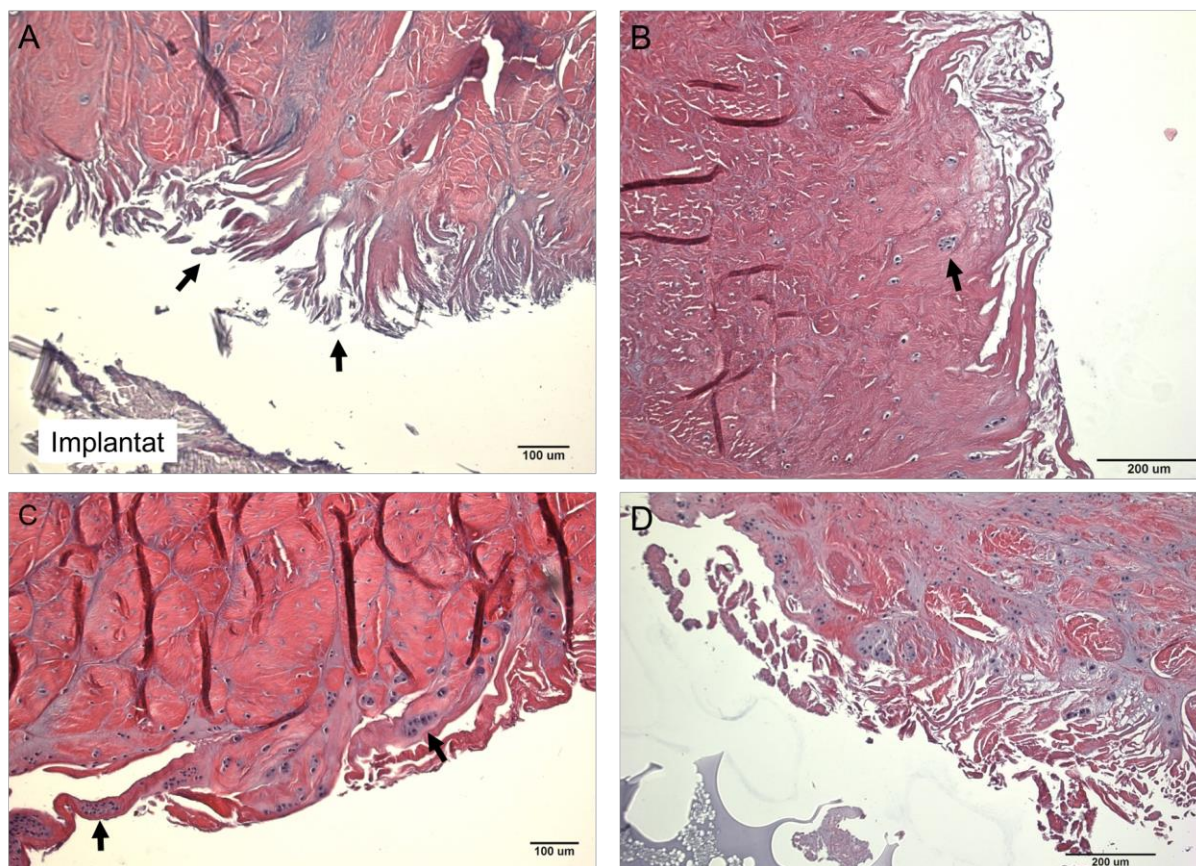


Abbildung 46: (A) Übergangsbereich zwischen Meniskus und Implantat. Pfeil = Resektionskante des nativen Meniskusgewebes mit stärkerem Strukturverlust der Kollagenfasern als in der Leerdefekt-Gruppe; 100-fache Vergrößerung. (B, C) Resektionskante des nativen medialen Meniskus. Pfeil = Cluster chondrozytärer Zellen; 100-fache Vergrößerung. (D) Übergangsbereich zwischen Meniskus und Implantat. Resektionskante des Meniskus mit hohem Zellreichtum und deutlichem Strukturverlust; 100-fache Vergrößerung.

Tabelle 9: Übersicht über die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Seidenfibroin Implantats.

	Implantat im Defekt fixiert und intakt	Chondrozytäre Zellen innerhalb des Implantats	Gewebe ohne Struktur	Beginnende Organisation des Gewebes
1	✓	✓	✓	
2	✓	✓	✓	
3	✓	✓	✓	✓
4	Riss		✓	
5	Riss	✓	✓	✓
6	Riss			
7	Teilweise im Defekt	✓	✓	

3.7.3. Tibialer Gelenkknorpel

Klassifizierung des Knorpels nach Mankin: Für das Mankin-Grading der Knorpeloberflächen wurde von jedem Tier jeweils ein Safranin-O-gefärbter Schnitt aus dem anterioren, mittleren und posterioren Bereich des medialen Tibiaplateaus untersucht [Mankin, et al. 1971].

Sham-Gruppe

In der Sham-Gruppe konnte bezüglich des Degenerationsgrades kein Unterschied zwischen anteriorem (n = 7), mittlerem (n = 9) und posteriorem (n = 8) Tibiaplateau festgestellt werden. Insgesamt beschränkten sich die Knorpelveränderungen in dieser Gruppe auf den zentralen Bereich der Gelenkfläche nahe der *Eminentia intercondylaris* (Abbildung 47 A). Obwohl vor allem im mittleren Bereich des Tibiaplateaus ein großes Spektrum an Veränderungen vorlag, reichten Risse in der Knorpeloberfläche

größtenteils bis zur Übergangszone (Abbildung 47 B). Nur bei zwei Tieren waren die Risse tiefer und reichten bis zur radialen Zone des artikulären Knorpels (Abbildung 47 C, D). Bezüglich der Knorpelstruktur lagen im posterioren Bereich die geringsten Veränderungen vor. Zellularität sowie Zellmorphologie waren größtenteils nur geringfügig verändert. Bei vier Tieren kam es vereinzelt zur Bildung von Zellklonen im Bereich der Knorpeloberfläche und bei vier weiteren Tieren auch zu einer Hypozellularität von Knorpelzellen (Abbildung 47 C). Die Intensität der Safranin-O-Färbung zeigte ein breites Spektrum an Veränderungen. Diese reichten von einer völlig unveränderten Intensität bis hin zur schweren Reduktion der Färbintensität (Abbildung 47 D). Diese trat vor allem in Schnitten des anterioren und mittleren Tibiaplateaus auf. Die Knorpel-Knochen-Grenze war an allen Lokalisationen weitestgehend intakt.

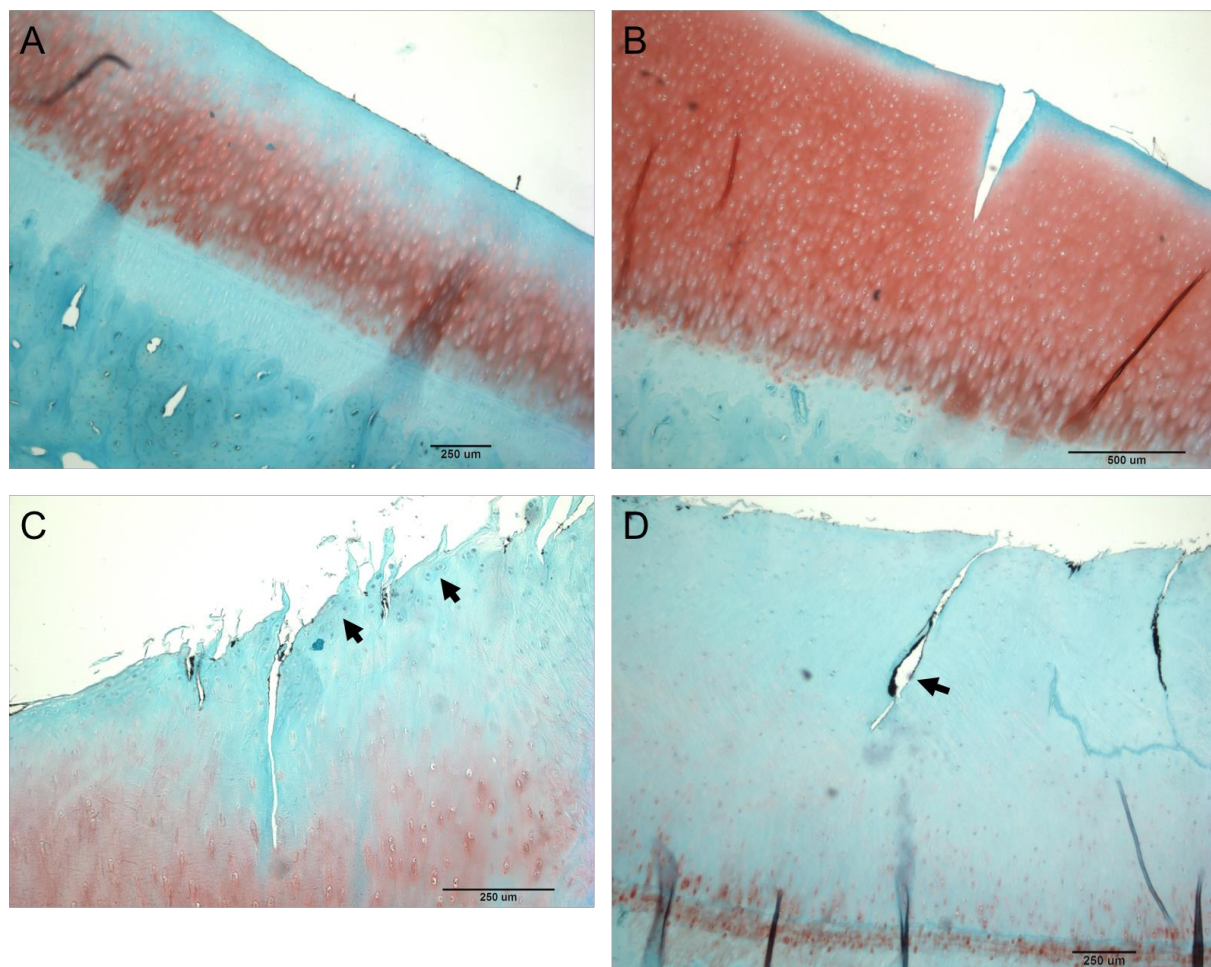


Abbildung 47: Safranin-O-gefärbte, histologische Schnitte des tibialen Knorpels verschiedener Tiere der Sham-Gruppe. (A) Intakte Knorpeloberfläche des linken Tibiaplateaus; 50-fache Vergrößerung. (B) Riss bis zur Übergangszone des Gelenkknorpels; 50-fache Vergrößerung. (C) Riss bis zur radialen Knorpelzone und schwere Reduktion der Safranin-O-Färbung. Pfeile = Bildung von Zellklonen; 100-fache Vergrößerung. (D) Schwere Reduktion der Intensität der Färbung; Pfeil = Riss bis zur radialen Zone des Knorpels mit Tusche Partikeln der India Ink-Färbung; 50-fache Vergrößerung.

Leerdeft-Gruppe

In der Operationsgruppe mit Leerdeft kam es vor allem im mittleren Bereich (n = 7) des Tibiaplateaus zu ausgeprägten Veränderungen des Knorpelzustandes. Anterior (n = 8) und posterior (n = 9) war der Gesamtdegenerationsgrad deutlich geringer, jedoch zeigte sich vor allem im anterioren Bereich der Gelenkfläche eine hohe Variabilität des Gesamtdegenerationsgrades zwischen den einzelnen Tieren. Veränderungen der Knorpelstruktur waren im Vergleich zur Sham-Gruppe in der Operationsgruppe mit Leerdeft tendenziell stärker ausgeprägt und es kam zu Knorpelrissen, die auch bis in die kalzifizierte Zone des Knorpels reichten (Abbildung 48). Zusätzlich blieben die Veränderungen nicht nur auf den zentralen Bereich des medialen Tibiaplateaus beschränkt. So kam es auch in peripheren Bereichen zu Rissen der Knorpeloberfläche. Bezüglich der Zellmorphologie kam es in allen Bereichen zur Bildung von Zellklonen oder zur Zellhypoplasie. Vor allem anterior und im mittleren Abschnitt des Tibiaplateaus war die Intensität der Safranin-O-Färbung mäßig bis schwer reduziert. An der Knorpel-Knochen-Grenze kam es im mittleren und posterioren Bereich bei fast allen Tieren zum Übertritt von Blutgefäßen.

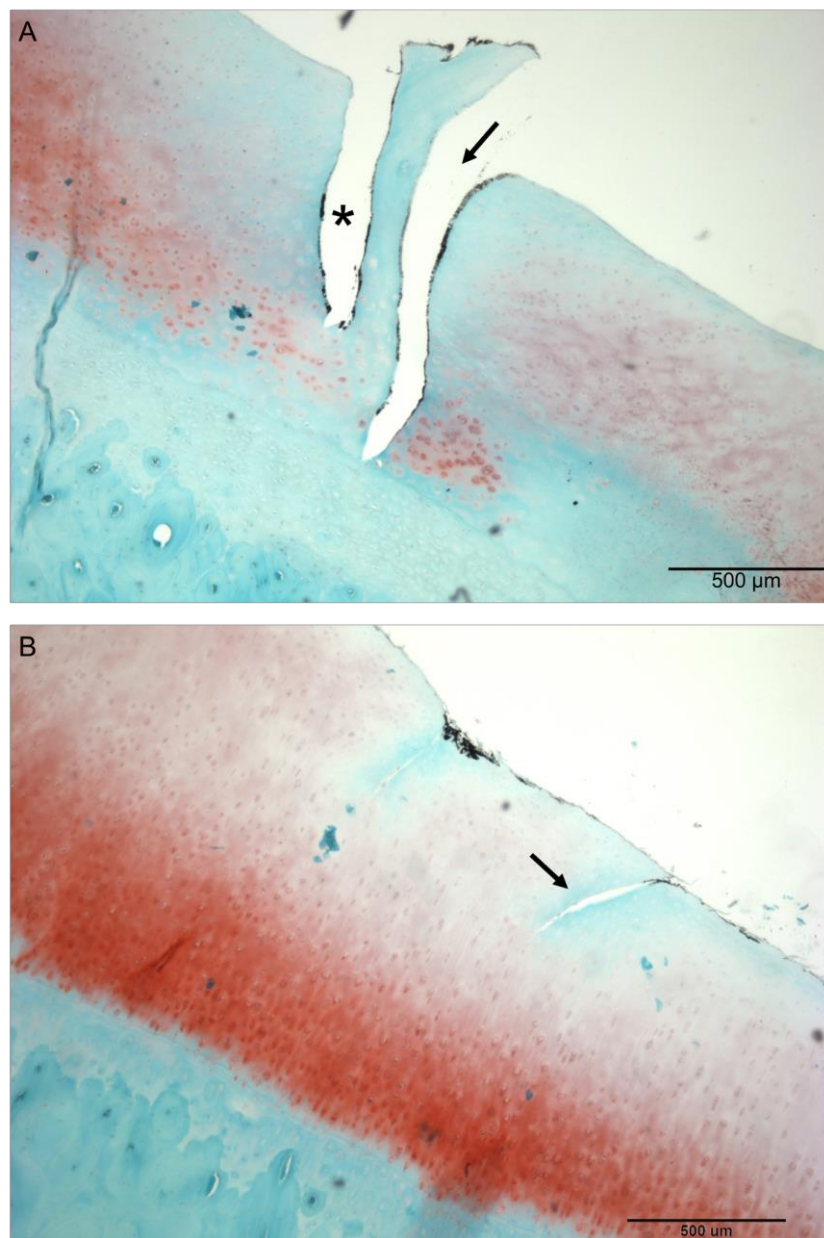


Abbildung 48: Tibialer Gelenkknorpel zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe; 50-fache Vergrößerung. (A) Schwere Reduktion der Intensität der Safranin-O-Färbung und reduzierte Zellzahl. Pfeil = Riss bis in die kalzifizierte Zone des Knorpels; * = Riss bis zur radialen Knorpelzone. (B) Mäßige Reduktion der Färbeintensität. Pfeil = Riss bis zur Übergangszone.

Implantat-Gruppe

In der Implantat-Gruppe kam es zwischen den einzelnen Tieren in jedem Abschnitt des Tibiaplateaus zu einer hohen Variabilität des Gesamtdegenerationsgrades. Ähnlich zur Operationsgruppe mit Leerdefekt, traten auch in dieser Operationsgruppe vor allem im mittleren Bereich (n = 9) der Gelenkfläche ausgeprägte Veränderungen der Knorpeloberfläche auf. Zwar waren im anterioren (n = 6) und posterioren (n = 7) Abschnitt des Tibiaplateaus Veränderungen der Knorpelstruktur deutlich geringer ausgeprägt, jedoch reichten diese in jedem Bereich von Unregelmäßigkeiten der Oberfläche bis hin zur vollständigen Desorganisation der Knorpeloberfläche bei einem Tier. Auch in dieser Operationsgruppe waren Veränderungen im zentralen sowie peripheren Abschnitt ersichtlich. Bezüglich der Zellularität und Zellmorphologie kam es vor allem posterior zur Bildung von Zellklonen und im mittleren Abschnitt auch zur Reduktion der Zellzahl. Die Intensität der Safranin-O-Färbung war vor allem im mittleren und posterioren Bereich des medialen Tibiaplateaus mäßig bis schwer reduziert (Abbildung 49 A). Hier kam es außerdem bei fast allen Tieren im Bereich der Knorpel-Knochen-Grenze zum Übertritt von Blutgefäßen (Abbildung 49 B).

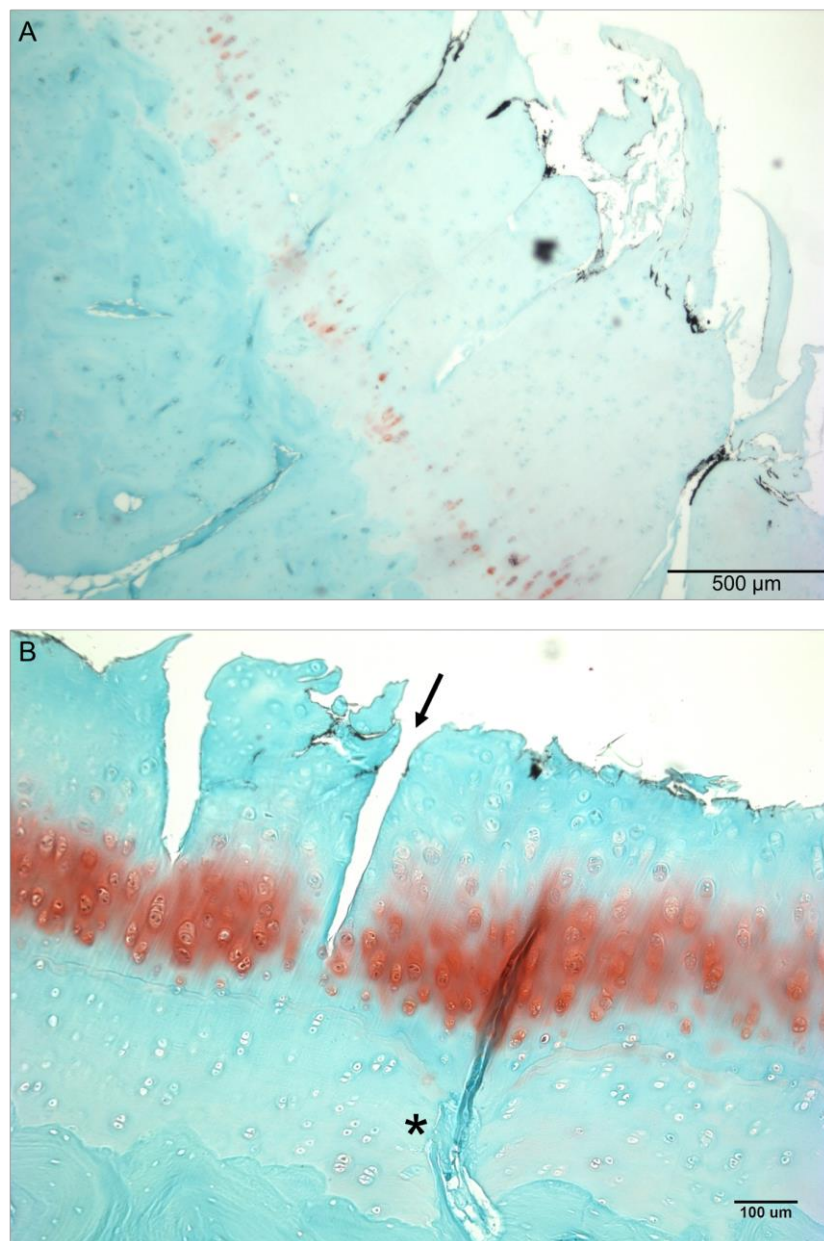


Abbildung 49: Tibialer Gelenknorpel zweier Tiere der Implantat-Gruppe. (A) Schwere Reduktion der Safranin-O-Färbung mit Hypozellularität und ausgedehnten Rissen in der Knorpeloberfläche, die bis in die radiale Knorpelzone reichen; 50-fache Vergrößerung. (B) Riss bis in die radiale Knorpelzone, der fast die kalzifizierte Zone erreicht (Pfeil). * = Übertritt eines Blutgefäßes im Bereich der Knorpel-Knochen-Grenze; 100-fache Vergrößerung.

Kontralaterale Gliedmaße

Bei jeweils zwei Tieren aus jeder Versuchsgruppe wurde auch das mediale Tibiaplateau der kontralateralen Seite untersucht. Diese dienten als Kontroll-Gruppe. Jedoch konnten auch hier nicht alle Schnitte ausgewertet werden. Im anterioren und mittleren (jeweils $n = 4$) Bereich des Tibiaplateaus wiesen die Knorpeloberflächen einen ähnlichen Gesamtdegenerationsgrad wie in der Sham-Gruppe auf. Von allen Operationsgruppen waren hier die Knorpelveränderungen im posterioren Abschnitt der Gelenkfläche ($n = 4$) am geringsten ausgeprägt. Bezüglich der Knorpelstruktur kam es nur vereinzelt zu Rissen, die bis zur radialen Zone des artikulären Knorpels reichten. Hauptsächlich lagen rein oberflächliche Unregelmäßigkeiten der Knorpeloberfläche oder Risse bis zur Übergangszone vor. Zellularität sowie Zellmorphologie waren größtenteils unverändert. Auch die Intensität der Safranin-O-Färbung war nur leicht bis mäßig reduziert. Lediglich bei einem Tier kam es zum vollständigen Verlust der Färbung. An der Knorpel-Knochen-Grenze kam es bei den meisten Tieren in allen drei Lokalisationen zum Übertritt von Blutgefäßen.

Abbildung 50 zeigt eine Übersicht über den Degenerationsgrad nach Mankin der Tiere der drei Operationsgruppen.

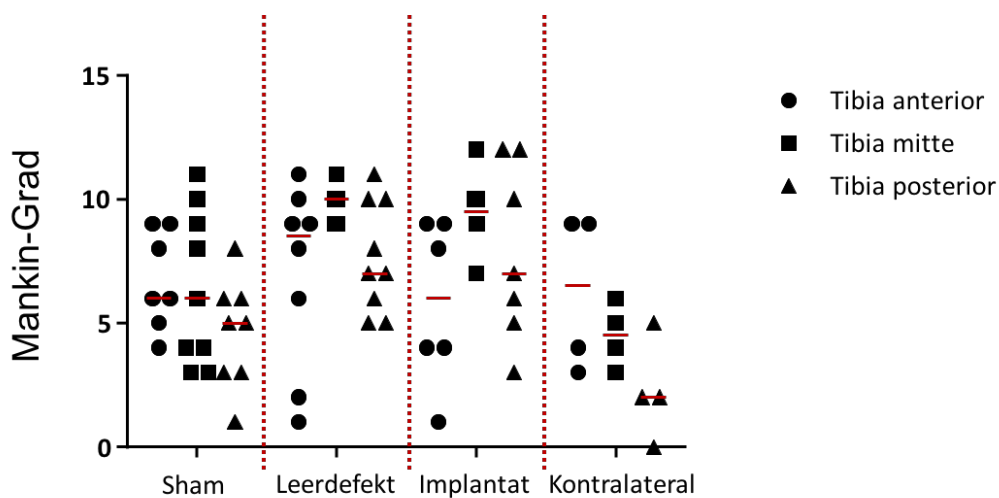


Abbildung 50: Übersicht über den Degenerationsgrad nach Mankin der Tiere der drei Operationsgruppen im Bereich der verschiedenen Lokalisationen des medialen Tibiaplateaus.

Fibrillationsindex (FI): Zusätzlich wurde an den histologischen Schnitten des medialen Tibiaplateaus auch der Fibrillationsindex (FI) bestimmt. Der FI berechnete sich aus der Länge der Knorpeloberfläche und der Länge der Knorpel-Knochen-Grenze (*siehe 2.3.6. Histologische Untersuchung*). Im Rahmen degenerativer Gelenkveränderungen kommt es zu unterschiedlich stark ausgeprägter Fibrillation der Tangentialzone des Gelenkknorpels und folglich zur Verlängerung der Knorpeloberfläche. Bei völlig unverändertem Gelenkknorpel besitzen Knorpeloberfläche und Knorpel-Knochen-Grenze dieselbe Länge und der FI beträgt somit 1.

Sham-Gruppe

In der Sham-Gruppe war der FI im anterioren Bereich des Tibiaplateaus (n = 7) tendenziell höher als im mittleren (n = 8) und posterioren (n = 9) Bereich.

Leerdeфекt-Gruppe

In der Operationsgruppe mit Leerdeфекt war der FI insgesamt etwas höher als in der Sham-Gruppe und unterschied sich deutlicher zwischen den einzelnen Tieren. Im Vergleich mit dem anterioren (n = 8) und posterioren (n = 8) Abschnitt der Gelenkfläche war der FI im mittleren Bereich des medialen tibialen Gelenkknorpels (n = 6) am höchsten.

Implantat-Gruppe

Auch in der Implantat-Gruppe unterschied sich die Ausprägung der Fibrillation der Knorpeloberfläche deutlich zwischen den einzelnen Tieren. Ähnlich zur Operationsgruppe mit Leerdeфекt, war auch hier der FI im mittleren Bereich des tibialen Knorpels (n = 7) tendenziell am höchsten. Im anterioren (n = 5) und vor allem posterioren (n = 5) Abschnitt kam es dagegen zu einer geringer ausgeprägten Fibrillation der Oberfläche.

Kontralaterale Gliedmaße

Bei jeweils zwei Tieren aus jeder Gruppe wurden auch die Knorpeloberflächen des medialen Tibiaplateaus der rechten Gliedmaße untersucht. Diese dienten als Kontroll-Gruppe. Hier waren die Unterschiede im FI zwischen den einzelnen Tieren wieder weniger deutlich. Der FI war anterior (n = 5) geringfügig niedriger als im mittleren

Bereich ($n = 5$). Posterior war die Fibrillation des Knorpels in dieser Gruppe am geringsten ausgeprägt. Die Werte aus dieser Gruppe unterschieden sich nicht von den Werten der Sham-Gruppe.

Abbildung 51 zeigt eine Übersicht des Fibrillationsindex der Tiere der drei Operationsgruppen an den verschiedenen Lokalisationen des medialen Tibiaplateaus.

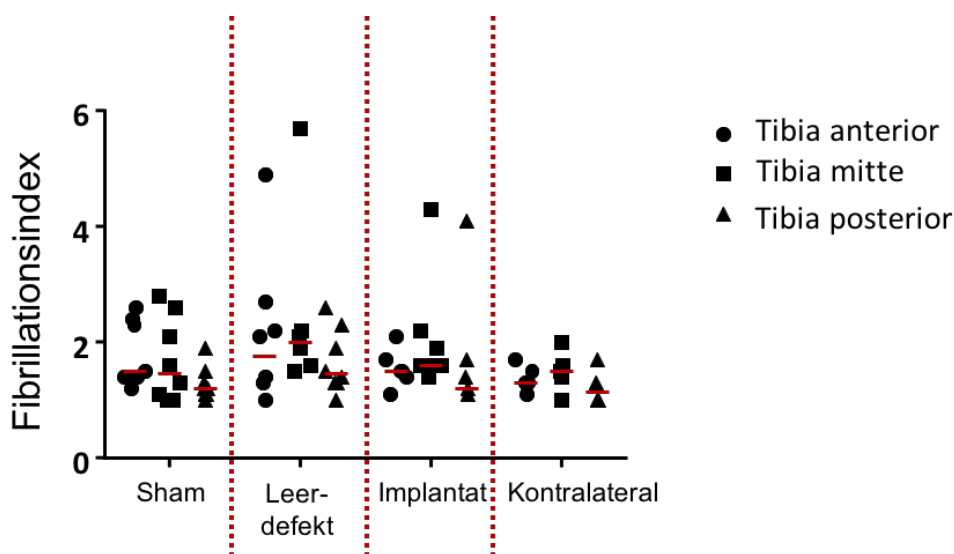


Abbildung 51: Fibrillationsindex des medialen Tibiaplateaus der Tiere der drei Operationsgruppen.

In der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe konnte tendenziell eine Korrelation zwischen dem Fibrillationsindex und dem Mankin-Grading festgestellt werden (Tabelle 10). In beiden Gruppen war sowohl der FI als auch der Gesamtdegenerationsgrad im mittleren Bereich des Tibiaplateaus am höchsten. In der Sham-Gruppe bestand kein Unterschied im Gesamtdegenerationsgrad zwischen dem anterioren und mittleren Tibiaplateau, sodass eine Korrelation hier nur bedingt festgestellt werden konnte.

Tabelle 10: Übersicht über Fibrillationsindex und Degenerationsgrad nach Mankin der verschiedenen Abschnitte des medialen Tibiaplateaus der drei Operationsgruppen.

	Tibia anterior		Tibia mitte		Tibia posterior	
	FI	Mankin	FI	Mankin	FI	Mankin
Sham-Gruppe	1,5 (1,2 - 2,6)	6 (4 - 9)	1,3 (1-2,8)	6 (3 - 11)	1,1 (1 - 1,9)	5 (1 - 8)
Leerdefekt-Gruppe	1,4 (1 - 4,9)	8,5 (1 - 11)	2,2 (1,5 - 5,7)	10 (9 - 11)	1,6 (1 - 2,6)	7 (5 - 11)
Implantat-Gruppe	1,5 (1,1 - 2,1)	6 (1 - 9)	1,8 (1,4 - 4,3)	9,5 (7 - 12)	1,4 (1,1 - 4,1)	7 (3 - 12)

4. Diskussion

4.1. Wichtigste Ergebnisse und Einordnung in die Literatur

Zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie war, ob durch die Implantation des Ersatzmaterials aus Seidenfibroin in einen subtotalen Meniskusdefekt die Knorpeloberflächen des Kniegelenks im Vergleich zur Meniskektomie vor Degeneration geschützt werden können. Sechs Monate nach dem chirurgischen Eingriff erfolgte die makroskopische, biomechanische und histologische Auswertung.

4.1.1. Untersuchung des operierten Kniegelenks

Im Rahmen der makroskopischen Untersuchung der operierten Gliedmaße wurde bei allen Tieren medial im Bereich des operativen Zugangs eine gering bis mittelgradige bindegewebige Vernarbung des Weichteilgewebes festgestellt. Auch in anderen *in vivo* Studien zum Meniskusersatz kam es als Folge der Arthrotomie gleichermaßen zur Fibrose des Weichteilgewebes [Vrancken, et al. 2015, Zur, et al. 2011, Gruchenberg, et al. 2015]. In der vorliegenden Studie war die Fibrose des Weichteilgewebes bei den Schafen der Implantat-Gruppe tendenziell stärker ausgeprägt als in der Sham- und Leerdefekt-Gruppe. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Operationsgruppe das Gelenk stärker manipuliert werden musste als in den beiden anderen Gruppen, um das Implantat sicher im Defekt zu fixieren. Hier erforderte vor allem die Fixierungsnaht im Bereich des Hinterhorns des medialen Meniskus eine starke Subluxation des Gelenks. Dieser Eingriff war zusätzlich mit einer längeren Operationsdauer verbunden.

4.1.2. Synovialmembran

In keiner der drei Operationsgruppen wurden makroskopisch sichtbare Zeichen einer Entzündung des operierten Kniegelenks wie Schwellung, Rötung oder Exsudation festgestellt. Dies konnte in der histologischen Untersuchung der Synovialmembran bestätigt werden. So konnten an den Hämatoxilin-Eosin-gefärbten Schnitten nur vereinzelt Entzündungszellen in Form von mehrkernigen synovialen Riesenzellen gefunden werden. Diese wurden bei vier Tieren der Implantat Gruppe nachgewiesen, was tendenziell häufiger war als in den beiden anderen Gruppen. Jedoch traten auch

hier diese von Makrophagen abgeleiteten Zellen nur vereinzelt auf, weswegen nicht von einer Fremdkörperreaktion im Sinne einer Abstoßung des Implantats ausgegangen werden muss. Das Vorkommen dieser Zellen ist eher als Reaktion auf mögliche Abriebpartikel des Naht- oder Implantatmaterials anzusehen [Vrancken, et al. 2015]. Die am häufigsten vorliegenden Veränderungen der Synovialmembran waren Hyperplasie und Hypertrophie der synovialen Deckzellen. Diese Strukturveränderungen konnten bei Tieren aller drei Operationsgruppen an den operierten Gliedmaßen und auch an den nicht operierten Kontroll-Gliedmaßen nachgewiesen werden. Sie können grundsätzlich auf verschiedene Stimuli und chronische Irritation im Gelenk zurückgeführt werden. An den operierten Gelenken kam es unabhängig von der Operationsgruppe bei einzelnen Tieren zusätzlich zu einer Proliferation der Synovialzotten (villöse Proliferation). Da auch in anderen Studien zur Untersuchung verschiedener Materialien für den Meniskusersatz geringe Veränderungen der Synovialmembran an operierten und nicht-operierten Gliedmaßen in ähnlicher Ausprägung nachgewiesen werden konnten [Vrancken, et al. 2015, Gruchenberg, et al. 2015], sind die genannten Veränderungen eher unspezifisch und können nur teilweise als Folge der Arthrotomie des Kniegelenks angesehen werden.

4.1.3. Medialer Meniskus

Bei der makroskopischen und histologischen Untersuchung der medialen Menisken konnte in der Sham-Gruppe kein struktureller Unterschied zwischen operierter Gliedmaße und Kontrolle festgestellt werden. Dies wurde auch in der biomechanischen Untersuchung bestätigt. Im Stress-Relaxationstest zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Gleichgewichtsmoduls E_{eq} des linken medialen Meniskus der Sham-Gruppe und der kontralateralen Kontroll-Gliedmaße. Ein Vergleich dieser Werte mit der bestehenden Literatur ist aufgrund unterschiedlicher Testbedingungen nur bedingt möglich. Joshi et al. führten eine Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften der Menisken verschiedener Spezies mit Hilfe eines „confined compression“-Kriechtests durch [Joshi, et al. 1995]. Das dabei ermittelte durchschnittliche Gleichgewichtsmodul E_{eq} des ovinen medialen Meniskus lag zwischen 0,2 und 0,3 MPa. Auch Merriam et al. und Patel et al. bestimmten ebenfalls mit Hilfe eines solchen Testaufbaus die mechanischen Eigenschaften eines Meniskusersatzmaterials im Vergleich zum nativen ovinen Meniskus [Merriam, et al. 2015, Patel, et al. 2016]. Das dabei ermittelte durchschnittliche Gleichgewichtsmodul des ovinen Meniskus von 0,8 MPa ähnelt dem in

der vorliegenden Studie ermittelten durchschnittlichen Gleichgewichtsmodul des ovinen medialen Meniskus von 0,6 MPa, wodurch die Plausibilität der Ergebnisse belegt werden konnte. Unterschiede in Rasse und Alter der Tiere, aber auch Differenzen bezüglich der Entnahmestelle der Probe innerhalb des Meniskus und verschiedene Testbedingungen könnten zu den Abweichungen geführt haben. Insgesamt kann ein Einfluss des operativen Eingriffs auf die Eigenschaften des medialen Meniskus aber ausgeschlossen werden.

In der Gruppe mit Leerdefekt waren bei allen Tieren die Resektionskanten des Defekts deutlich erkennbar. Obwohl sich in der Literatur Berichte über die Bildung eines Regenerationsgewebes nach Meniskusresektion im Schafmodell finden [Maher, et al. 2010], konnte in der vorliegenden Studie makroskopisch kein meniskusähnliches Regenerationsgewebe gefunden werden. Beim Schaf werden lediglich die äußeren 11 % der Meniskusbreite von Blutgefäßen durchzogen [Chevrier, et al. 2009]. Bei einer durchschnittlichen Breite des ovinen medialen Meniskus von 9,44 mm kann angenommen werden, dass die Meniskusbasis in einem Bereich von ungefähr 1 mm vaskularisiert ist [Takroni, et al. 2016]. In der vorliegenden Studie wurde im Rahmen der Resektion des Meniskus in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe eine Randleiste von 2 mm belassen. Eine Resektion bis in die vaskularisierte Zone ist zwar als Voraussetzung für eine Infiltration des Implantats mit Zellen und nachfolgende Integration in natives Meniskusgewebe anzusehen, jedoch wäre eine Randleiste mit einer Dicke von 1 mm möglicherweise zu instabil, um eine sichere Fixierung des Implantats im Gelenk zu gewährleisten und eine Extrusion aus dem Gelenkspalt zu verhindern. An den histologischen Schnitten der Menisken mit Leerdefekt konnte allerdings bei fünf Tieren ein schmaler Saum eines regenerativen Gewebes gefunden werden. Dieses unterschied sich hinsichtlich seiner Färbung deutlich vom restlichen Meniskusgewebe. In diesem basophilen Gewebe fanden sich Zellen chondrozytärer Morphologie. Weiterhin kam es bei fast allen Tieren dieser Gruppe zu einem Strukturverlust der Kollagenfaserbündel im Bereich der Schnittkante. Bei fünf Tieren kam es hier zusätzlich zu einer Bildung von Zellclustern. Ähnliche Zellcluster wurden in einer Studie zur histopathologischen Analyse degenerativer humaner Menisken beschrieben [Pauli, et al. 2011]. Demnach kommt es innerhalb des Meniskus im Rahmen einer degenerativen Gelenkerkrankung häufig zur Formation dieser Zellcluster. Morphologisch ähneln die Cluster den in degeneriertem Gelenkknorpel auftretenden Zellaggregaten. Sie befinden sich an der Meniskusoberfläche typischerweise in

Zusammenhang mit Meniskusrissen oder einer Auffaserung von Meniskusgewebe. Neben Zellclustern finden sich in diesen Bereichen auch vergrößerte Einzelzellen, die laut Pauli et al. möglicherweise eine hypertrophe Differenzierung durchlaufen. Zusammen mit einem erhöhten Proteoglykan-Gehalt des Gewebes könnte dies auf einen Versuch der Adaptation oder Regeneration des Meniskusgewebes im Sinne einer Umwandlung in einen chondrogenen Phänotyp hindeuten [Pauli, et al. 2011]. Auch in der vorliegenden Studie wurden neben den Zellclustern chondrozytäre Einzelzellen gefunden. Diese befanden sich innerhalb eines Saumes an neu gebildetem Gewebe. Diese Erkenntnisse könnten darauf schließen lassen, dass es in der Leerdefekt-Gruppe nach Meniskektomie zu arthrotischen Veränderungen des Meniskus im Sinne einer degenerativen Gelenkerkrankung kam. Das neu gebildete Gewebe stellt somit möglicherweise einen Versuch der Regeneration und Adaptation an die veränderten Bedingungen innerhalb des Gelenks dar.

In der Implantat Gruppe konnten ähnliche Befunde an der Meniskusrandleiste erhoben werden. Hier kam es zu einer etwas stärker ausgeprägten Auffaserung des Meniskusgewebes im Resektionsbereich. Zusätzlich konnten auch hier Zellcluster sowie eine ausgeprägte Hyperzellularität nachgewiesen werden. Auch diese wurde von Pauli et al. in Zusammenhang mit einer degenerativen Gelenkerkrankung beschrieben. Dies lässt vermuten, dass durch die Implantation des Ersatzmaterials aus Seidenfibroin die Entstehung degenerativer Prozesse innerhalb des Gelenks nicht verhindert werden konnte.

4.1.4. Seidenfibroin Implantat

Nach Ablauf des Versuchszeitraumes war das Implantat nur bei drei von neun Tieren vollständig intakt im Defekt fixiert. Bei drei weiteren Tieren befand sich das Implantat zwar im Defekt, jedoch war ein deutlicher Riss des Materials am Übergang der *Pars intermedia* zum Hinterhorn zu erkennen. In einer biomechanischen Studie konnte gezeigt werden, dass innerhalb des ovinen Kniegelenks im medialen Kompartiment zwischen Femur und Tibia eine signifikant größere Kontaktfläche besteht als im lateralen Kompartiment [Lee-Shee, et al. 2007]. Demnach werden beim Schaf während der Belastungsphasen des Gangs durchschnittlich 60 – 80 % der Gelenkkraft, was ungefähr dem 1,7-fachen Körpergewicht entspricht, allein über das mediale Tibiaplateau übertragen [Taylor, et al. 2011]. Dabei tritt die höchste Belastung genau in dem Bereich auf, wo es in der vorliegenden Studie zur Zerstörung des Implantats kam

[Lee-Shee, et al. 2007]. In ähnlicher Weise kam es auch in zwei anderen Studien zur *in vivo* Untersuchung eines Materials für den Totalersatz des Meniskus zu einer stärkeren Zerstörung der Implantate im posterioren Abschnitt des Gelenks [Vrancken, et al. 2015, Kelly, et al. 2007]. Obwohl eine dieser Untersuchungen an Ziegen durchgeführt wurde, kann aufgrund der anatomischen Gemeinsamkeiten ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden. In Zusammenhang mit der Zerstörung der Implantate ist auch die Steifigkeit des Materials von Bedeutung. Die biomechanische Untersuchung zeigte, dass das Seidenfibroin Implantat am Ende des Versuchszeitraumes signifikant steifer war als natives Meniskusgewebe. Diese hohe Steifigkeit verbunden mit einer geringen Flexibilität hat möglicherweise zusätzlich zur Beschädigung des Materials beigetragen. Innerhalb des Gelenks ist das Ersatzmaterial Druck-, Scher-, sowie radiären Zugkräften ausgesetzt. Je steifer das Implantat ist, umso weniger kann es sich diesen Kräften anpassen oder nachgeben. Ähnliche mechanische Eigenschaften wie natives Meniskusgewebe sind eine der Voraussetzungen, die ein Material für den Meniskusersatz erfüllen sollte [Rongen, et al. 2014]. So untersuchten Sandmann et al. in ihrer Studie die biomechanischen Eigenschaften der zwei klinisch verfügbaren Ersatzmaterialien CMI® und Actifit® vor Implantation im Vergleich zu humanem Meniskusgewebe [Sandmann, et al. 2013]. Die hier in einem zyklischen Indentations-Relaxationstest ermittelten viskoelastischen Eigenschaften der genannten Ersatzmaterialien unterschieden sich deutlich von den Eigenschaften des humanen Meniskusgewebes. Durch eine sehr niedrige Steifigkeit sind beide Ersatzmaterialien initial wahrscheinlich nicht in der Lage hohe Kräfte aufzunehmen. Inwieweit sich dies mit fortschreitender Gewebeeinfiltration und Degradation des Materials verändert, wurde bisher noch nicht untersucht.

Insgesamt können in der Literatur nur wenige Studien gefunden werden, die die biomechanischen Eigenschaften verschiedener Meniskusersatzmaterialien vor und nach Implantation untersuchen. Gruchenberg et al. untersuchten in einer vorhergehenden *in vivo* Studie die erste Generation der Seidenfibroin Implantate für den partiellen Meniskusersatz und ermittelten in einem Relaxationstest bei 20 % Dehnung („confined compression“) ein durchschnittliches Gleichgewichtsmodul E_{eq} des Ersatzmaterials vor Implantation von 0,04 MPa. Nach einem Implantationszeitraum von sechs Monaten stieg dieses auf 0,08 MPa an, sodass kein Unterschied mehr zum ebenfalls untersuchten nativen Meniskusgewebe nachgewiesen werden konnte. Da sich nur wenig neues Gewebe innerhalb der Implantate gebildet hatte, führten die Autoren diesen Anstieg auf

die durch anhaltende Belastung verursachte Kompression des Materials zurück. In zwei weiteren *in vivo* Studien wurden ebenfalls die mechanischen Eigenschaften eines vielversprechenden Materials für den totalen Meniskusersatz vor und nach Implantation bestimmt [Merriam, et al. 2015, Patel, et al. 2016]. Das aus Kollagen und Hyaluronsäure bestehende Material ist durch zirkumferent verlaufende Polymerfasern verstärkt und soll so in seinem Aufbau dem nativen Meniskus ähneln (Meniscofix™, Novopedics Inc.). In einer ersten Untersuchung über 16- und 32 Wochen kam es im Vergleich zum Ausgangszustand zu einem signifikanten Anstieg der Steifigkeit des Materials. Diese betrug jedoch nur 25-40 % der Steifigkeit des nativen Meniskugewebes [Merriam, et al. 2015]. Nach 52 Wochen kam es zu einer weiteren Verbesserung der mechanischen Eigenschaften. So erreichte das Gleichgewichtsmodul einen Wert von 0,4 MPa, was rund 51 % der Steifigkeit des nativen Gewebes entspricht [Patel, et al. 2016]. Grund für die über den Implantationszeitraum verbesserten mechanischen Eigenschaften könnte die nachgewiesene Zellinfiltration mit nachfolgender Matrixablagerung sein. Zusätzlich vermuten die Autoren einen Umbauprozess des Gewebes als Reaktion auf die mechanische Stimulation. Ein direkter Vergleich der mechanischen Eigenschaften verschiedener Ersatzmaterialien ist aufgrund der unterschiedlichen Testmethoden schwierig. Das in der vorliegenden Studie untersuchte Seidenfibroin Implantat ist unseres Wissens nach das einzige untersuchte Material für den Meniskusersatz, das bereits zum Zeitpunkt der Implantation ähnliche Materialeigenschaften wie natives Meniskugewebe zeigt und somit bezüglich der initialen mechanischen Eigenschaften den Anforderungen an einen Meniskusersatz entspricht. Nach dem Implantationszeitraum stieg das Gleichgewichtsmodul von 0,6 MPa auf 0,8 MPa an. Das Seidenfibroin Implantat war damit signifikant steifer als natives Meniskugewebe. Eine Infiltration des Materials mit Regenerationsgewebe, die zu einer solchen Veränderung der Eigenschaften führen würde, kann als Ursache ausgeschlossen werden. Ähnlich zu der Studie von Gruchenberg et al., konnte auch in der vorliegenden Untersuchung des Seidenfibroin Implantats kein Gewebe in den Poren des Materials nachgewiesen werden. Somit kann auch hier von einer Verdichtung der porösen Matrix aufgrund anhaltender Kompression ausgegangen werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass es innerhalb der synovialen Umgebung des Gelenks zu einer Veränderung des Implantatmaterials an sich kam.

Bei den drei vollständig intakten Implantaten war eine gleichermaßen auftretende Spaltbildung im posterioren Verankerungsbereich zum nativen Meniskus auffällig. In

ähnlicher Weise und Lokalisation trat auch in der vorhergehenden Untersuchung teilweise eine Spaltbildung zwischen Ersatzmaterial und Meniskusgewebe auf [Gruchenberg, et al. 2015]. Dieser Bereich ist *in vivo* sehr schwer einsehbar und eine optimale Platzierung der Fixierungsnaht demnach erschwert. Es ist denkbar, dass die Naht bei diesen drei Tieren nicht optimal platziert war. Zusätzlich treten hier *in vivo* die höchsten Belastungen auf. Dabei verursachen vor allem mögliche Scherkräfte eine Spaltbildung von verletztem Meniskusgewebe und erfordern eine hohe Festigkeit der Fixierung [Dürselen, et al. 2003]. Der Anteil dieser innerhalb des Kniegelenks auftretenden Scherkräfte ist beim Schaf aufgrund des vierbeinigen Ganges höher als beim Menschen, da hier die größte Belastung des Gelenks nicht in Extension, sondern in gebeugter Kniestellung erfolgt [Taylor, et al. 2006]. Die resultierende Spaltbildung zwischen Implantat und nativem Meniskus hat jedoch unter Umständen das Implantat vor einer Zerstörung bewahrt. Demnach war das Implantat bei diesen Tieren beweglicher verankert und das Material war so in der Lage, den Bewegungen von Femur und Tibia während der Belastung zu folgen und Zwangskräften innerhalb des Gelenks auszuweichen.

Über den Versuchszeitraum konnte keine feste Verbindung zwischen Meniskus und Implantat aufgebaut werden. Ursache hierfür könnte die hohe Steifigkeit des untersuchten Ersatzmaterials im Vergleich zu nativem Meniskusgewebe sein, wodurch die Ausbildung einer Gewebebrücke zwischen Meniskus und Implantat effektiv verhindert wurde. Auch histologisch fand sich nur in den Poren des äußeren Bereichs des Implantats fibrinartiges Gewebe mit sehr wenigen Zellen. Dabei könnte es sich um während der Operation eingeschwemmte Gelenkflüssigkeit oder Fibrin handeln. Potenziell eingeschwemmte Zellen waren jedoch im weiteren Verlauf nicht zur Proliferation innerhalb des Implantats fähig. Dementsprechend konnte in einem Implantat nur azelluläres Gewebe ohne jegliche Struktur gefunden werden. In einem weiteren Implantat konnten weder Zellen noch Matrix gefunden werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine unzureichende offene Porosität des Materials zurückzuführen. Zwar wurde in einer früheren Untersuchung der ersten Generation der Seidenfibroin Implantate mittels Mikro-Computertomographie (μ -CT) eine hohe interkonnektierende Porosität (85 %) des Materials nachgewiesen, jedoch ließen zusätzlich durchgeführte Färbeversuche bereits vermuten, dass der tatsächliche Anteil der offenen Porosität des Materials unter diesem zuvor ermittelten Wert liegt. So konnten verschiedene Farbstofflösungen das Material nicht vollständig durchdringen [Gruchenberg 2013].

Auch in der nachfolgenden *in vivo* Studie blieb eine effektive Besiedelung der Scaffolds mit Zellen und Matrix aus. Diese Erkenntnisse bestätigten sich in der vorliegenden Untersuchung der zweiten Generation der Implantate. Ein Material für den Meniskusersatz sollte große Makroporen (200-300 μm), eine hohe Interkonnektivität durch kleinere Mikroporen (10-50 μm) und eine hohe Gesamtporosität ($\geq 70\%$) aufweisen [Rongen, et al. 2014]. Diese Eigenschaften sind wichtig für eine erfolgreiche Zelladhäsion und nachfolgende Matrixproduktion. Das Ersatzmaterial soll so als Gerüst für die Regeneration von Zellen, extrazellulärer Matrix und Gefäßen dienen. Eine fehlende Interkonnektivität würde zu einer mangelhaften Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und somit zum Zelltod führen. Weiterhin ist es denkbar, dass es durch die möglicherweise unzureichende Interkonnektivität zu einer mangelhaften Hydrierung im Inneren des Implantats kam. Eine Austrocknung des Materials könnte so zusätzlich zu dem Anstieg der Steifigkeit über den Implantationszeitraum geführt haben.

4.1.5. Gelenkknorpel

Als wichtigste Funktion eines Meniskusersatzmaterials ist die Prävention degenerativer Gelenkveränderungen nach Meniskusresektion anzusehen.

In der vorliegenden Studie kam es makroskopisch, biomechanisch und histologisch in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe an den operierten Gliedmaßen gleichermaßen zur Zerstörung der medialen Knorpeloberflächen von Femur und Tibia. Makroskopisch sichtbare degenerative Veränderungen des artikulären Knorpels erstreckten sich in beiden Versuchsgruppen über die gesamten Gelenkflächen, was sich auch in der histologischen Untersuchung bestätigte. Dementsprechend konnte auch in der biomechanischen Untersuchung bei beiden Operationsgruppen eine Erweichung des artikulären Knorpels festgestellt werden. Das dabei ermittelte Gleichgewichtsmodul E_{eq} des tibialen Knorpels unterhalb des Defekts bzw. Meniskusersatzes war signifikant niedriger als an den nicht-operierten Kontrollgliedmaßen. Die direkt unterhalb des Implantats auftretende Zerstörung des Knorpels könnte auf die hohe Steifigkeit des Implantats zurückgeführt werden. Nach Rongen et al. führt eine zu hohe Steifigkeit eines Materials für den Meniskusersatz zu einer direkten Zerstörung des artikulären Knorpels [Rongen, et al. 2014]. So kam es in der Implantat-Gruppe neben einer Aufrauhung und Erweichung der Knorpeloberflächen teilweise auch zu Defekten, die bis zum subchondralen Knochengewebe reichten. Histologisch zeigte sich das Bild einer stark zerstörten Knorpelstruktur, einhergehend mit einer deutlichen Reduktion des

Proteoglykangehalts des Knorpels und einer Zerstörung der Knorpel-Knochen-Grenze. Auch in der Gruppe mit Leerdefekt führte eine starke Erweichung des Knorpels teilweise zum Aufbrechen der Knorpeloberfläche und Defektbildung unterschiedlicher Tiefe. Histologisch konnte gezeigt werden, dass diese häufig bis zur radialen Knorpelzone oder sogar bis in die kalzifizierte Zone des Knorpels reichten. Dies ist wahrscheinlich auf die nach Meniskusresektion auftretende Reduktion der Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia zurückzuführen [Brophy, et al. 2010]. Brophy et al. konnten in einer *in vitro* Untersuchung an ovinen Kniegelenken zeigen, dass es im Zuge dessen vor allem im Bereich der *Eminentia intercondylaris* des medialen Tibiaplateaus zu einer deutlichen Erhöhung des Kontaktdrucks kommt [Brophy, et al. 2010]. Dementsprechend kam es biomechanisch auch in der vorliegenden Studie im Bereich der *Eminentia intercondylaris* zur stärksten Erweichung des tibialen Knorpels. Diese trat jedoch nicht nur in der Leerdefekt-Gruppe auf, sondern gleichermaßen auch in der Implantat- und Sham-Gruppe. Des Weiteren konnte an diesem Messpunkt in keiner Gruppe ein Unterschied im Gleichgewichtsmodul des tibialen Knorpels zwischen operierter und nicht-operierter Gliedmaße nachgewiesen werden. In der vorhergehenden Studie von Gruchenberg et al. wurden bei einigen Schafen bereits während der Operation deutliche degenerative Veränderungen des artikulären Knorpels festgestellt, was eine spätere Beurteilung der chondroprotektiven Funktion des Implantats erschwerte [Gruchenberg, et al. 2015]. Obwohl für die vorliegende Studie jüngere Tiere (2 ± 1 Jahre) ausgewählt wurden, waren makroskopisch gering ausgeprägte Knorpelveränderungen auch in der Sham-Gruppe und an den nicht-operierten Gliedmaßen vorhanden. Diese blieben jedoch meist auf den Bereich der *Eminentia intercondylaris* beschränkt. Dieser steht *in vivo* in direktem Kontakt mit dem Knorpel der medialen Femurkondyle. Zusätzlich wird der größte Anteil der Gelenkkraft beim Schaf über das mediale Gelenkkompartiment übertragen, so dass die Knorpeloberfläche hier einer hohen Belastung ausgesetzt ist. Diese Tatsache könnte die gleichermaßen auftretende Erweichung des nicht von Meniskusgewebe bedeckten Teils des Gelenkknorpels erklären. So wird auch in der Literatur sowohl bei Ziegen [Little, et al. 2010], als auch bei Schafen [Vandeweerd, et al. 2013] eine bereits im Alter von 2-3 Jahren spontan auftretende Degeneration des artikulären Knorpels beschrieben. Diese tritt vor allem im Bereich der *Eminentia intercondylaris* auf. Auch Zur et al. berichteten über eine bei Schafen natürlicherweise vorkommende Knorpeldegeneration [Zur, et al. 2011].

Das Gleichgewichtsmodul des tibialen Knorpels unterhalb des Meniskus zeigte in der Sham-Gruppe keinen Unterschied zur nicht-operierten Kontrolle und war tendenziell höher als in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe. Auch in der histologischen Untersuchung zeigten sich in der Sham-Gruppe zwar geringe Knorpelveränderungen im Sinne einer Degeneration, jedoch blieben diese auf den zentralen Abschnitt des Gelenks beschränkt. Zellmorphologie und Zellularität waren weitestgehend unverändert. Demzufolge zeigten sowohl der Degenerationsgrad nach Mankin als auch der Fibrillationsindex geringere Werte als in den beiden anderen Operationsgruppen. Zusätzlich konnte kein Unterschied zur kontralateralen Kontrolle nachgewiesen werden. Ein Einfluss der Arthrotomie auf den Zustand des artikulären Knorpels kann somit ausgeschlossen werden.

Man weiß, dass eine Meniskusresektion auf lange Sicht nicht nur zu einer Veränderung der Materialeigenschaften der beteiligten Gewebe, sondern auch zu einer Veränderung der Gelenkgeometrie führt. So kommt es nach Meniskektomie neben einer Erweichung des Knorpelgewebes auch zu einer Verdichtung des subchondralen Knochengewebes sowie zur Bildung von Osteophyten entlang der Gelenkflächen [Fairbank 1948, Odgaard, et al. 1989]. Dieses „Remodelling“ ist auf die veränderte Druckverteilung innerhalb des Gelenks zurückzuführen. Möglicherweise stellt dies einen Versuch dar, den erhöhten Kontaktdruck auf die Knorpeloberflächen zu reduzieren [Bylski-Austrow, et al. 1993]. Die in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe aufgetretene Verbreiterung der medialen Gelenkflächen an Femur und Tibia sind Zeichen eines stattgefundenen Umbaus des Gelenks im Sinne einer degenerativen Gelenkerkrankung. Zusammen mit den vorliegenden Veränderungen des Meniskus- und Knorpelgewebes in diesen Operationsgruppen bestätigt sich der Eindruck, dass durch die Implantation des Ersatzmaterials aus Seidenfibroin die Entstehung degenerativer Prozesse innerhalb des Gelenks nicht verhindert werden konnte.

Die Menisken erfüllen eine Vielzahl von Funktionen innerhalb des Kniegelenks. Durch ihre Beteiligung an der Kraftübertragung zwischen Femur und Tibia und die gleichmäßige Verteilung des Kontaktdrucks über die Gelenkflächen sorgen sie für einen optimalen Schutz des artikulären Knorpels. Während alltäglicher Aktivitäten wie Treppensteigen wirken innerhalb des Kniegelenks Kräfte, die das 6,2-fache des Körpergewichts erreichen können [Taylor, et al. 2004]. Die Entwicklung eines funktionellen Materials für den (sub-)totalen Meniskusersatz, das diesen hohen Anforderungen innerhalb des Gelenks gerecht werden kann, ist sehr anspruchsvoll. So

kam es in mehreren *in vivo* Studien nach Einsatz verschiedener permanenter sowie resorbierbarer Materialien für den totalen Meniskusersatz zu einer stärkeren Knorpelzerstörung im Vergleich zur Sham-Gruppe oder zur nicht-operierten Kontrolle [Vrancken, et al. 2015, Kelly, et al. 2007, Kon, et al. 2012, Welsing, et al. 2008, Hannink, et al. 2011]. Im Falle eines synthetischen Polycaprolacton-Polyurethane Scaffolds (später Actifit®) wurde die bereits früh aufgetretene Zerstörung des Knorpels zunächst auf die Oberflächeneigenschaften des Materials zurückgeführt. Da die vermutete Verbesserung der Chondroprotektion mit voranschreitender Gewebeintegration ausblieb, führten die Autoren die starke Zerstörung des Gelenkknorpels letztendlich auf unzureichende mechanische Eigenschaften des Materials zurück [Welsing, et al. 2008, Hannink, et al. 2011]. Das Material war demnach nicht in der Lage, den hohen Kräften innerhalb des Gelenks standzuhalten, was letztendlich zu einer stärkeren Knorpeldestruktion im Vergleich zur Meniskektomie führte. Kelly et al. untersuchten in ihrer Studie die Eignung eines neuartigen Hydrogels für den totalen Meniskusersatz [Kelly, et al. 2007]. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse zu frühen Untersuchungszeitpunkten kam es nach einem Jahr zu einer signifikanten Zerstörung des Gelenkknorpels und zum Versagen des Materials. Neben einer schlechten Größenanpassung des Implantats führte eine unzureichende periphere Fixierung zu einer erhöhten Beweglichkeit des Implantats innerhalb des Gelenks. Zusammen mit ungenügenden Materialeigenschaften des Hydrogels kam es zu einer direkten Zerstörung des Knorpels unterhalb des Implantats. Im Gegensatz zu den genannten Studien konnte in einer Untersuchung von Zur et al. die Entstehung einer degenerativen Gelenkveränderung durch Implantation eines nicht-resorbierbaren Implantats aus Kevlar®-verstärktem Polycarbonat-Urethane (später NuSurface®) effektiv verhindert werden [Zur, et al. 2011]. Über einen Untersuchungszeitraum von sechs Monaten konnte bezüglich der Chondroprotektion kein Unterschied zur nicht-operierten Kontrolle nachgewiesen werden. Jedoch wurde in dieser Studie kein Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Leerdefekt durchgeführt. Außerdem wurden zu jedem Zeitpunkt nur drei Tiere untersucht, was keine definitive Aussage bezüglich der Funktionalität des Implantats zulässt. Auch nach Meniskustransplantation unter Verwendung frischer oder gefrorener Menisken mit optimaler Größenanpassung kam es in einigen Studien innerhalb von sechs Monaten zu einer ähnlichen Knorpeldegeneration wie nach Meniskusresektion [Elliott, et al. 2002, Kohn, et al. 1997].

Zusammenfassend, können die aufgeführten Studien die Komplexität eines funktionellen (sub-)totalen Meniskusersatzes bestätigen. Dabei führten vor allem unzureichende Materialeigenschaften, im Sinne einer minderwertigen mechanischen Belastbarkeit oder ungeeigneter Oberflächeneigenschaften sowie eine mangelhafte Fixierung zum Versagen der Implantate und folglich zur Zerstörung des artikulären Knorpels. Die vorliegende Studie zeigt, dass ein Meniskusersatz zusätzlich erschwert wird, wenn es sich um einen partiellen Ersatz handelt bei dem das Material in natives Meniskusgewebe integriert werden muss.

4.2. Kritische Betrachtung der Methodik

4.2.1. Tiermodell

Für die Beurteilung eines Biomaterials hinsichtlich der *in vivo* Biokompatibilität, der Integration des Materials, der Beeinflussung des Gelenkknorpels und des Verhaltens unter dynamischer Belastung, ist die Untersuchung in einem geeigneten Tiermodell erforderlich. Idealerweise sollen die gewonnenen Erkenntnisse eine Übertragung der Ergebnisse in die klinische Anwendung für den Menschen zulassen. Im Bereich der präklinischen muskuloskeletalen Forschung ist das Schaf ein weit verbreitetes Großtiermodell [Martini, et al. 2001]. So wurden bereits eine Vielzahl von Studien zum Meniskusersatz am Schaf durchgeführt [Kelly, et al. 2007, Zur, et al. 2011, Gruchenberg, et al. 2015, Merriam, et al. 2015, Patel, et al. 2016]. Die Anatomie des ovinen Kniegelenks mit den primär stabilisierenden Ligamenten (Kollateral- und Kreuzbänder) ähnelt der des Menschen. Auch bezüglich Anatomie und Dimension der Menisken zeigt das Schaf im Vergleich verschiedener Tierarten die größte Ähnlichkeit zum Menschen [Proffen, et al. 2012, Takroni, et al. 2016]. Weiterhin verfügt das Schaf über ein dem Menschen ähnliches Körpergewicht [Martini, et al. 2001]. Jedoch unterscheiden sich die im Kniegelenk auftretenden Kontaktkräfte deutlich. Während im menschlichen Kniegelenk Spitzenbelastungen auftreten, die während des Gehens das 3,8-fache und während des Treppensteigens sogar das 6,2-fache des Körpergewichts erreichen können [Taylor, et al. 2004], betragen die im ovinen Kniegelenk gemessenen Kontaktkräfte das 2,25-fache des Körpergewichts [Taylor, et al. 2006]. Diese deutlich niedrigeren Werte sind wohl vor allem in der vierbeinigen Fortbewegung des Schafes begründet [Heller, et al. 2005]. Eine Übertragung der präklinisch am Schafmodell gewonnenen Erkenntnisse in die Klinik scheint dennoch möglich, da für den Erfolg einer chirurgischen Therapiemaßnahme vor

allein die tatsächlich im Gewebe wirkenden Spannungen und Dehnungen entscheidend sind [Heller, et al. 2005]. Diese ergeben sich zum einen aus der Gesamtbelastung des Gelenks, zum anderen aus der artikulierenden Kontaktfläche. Da diese beim Schaf kleiner ist als beim Mensch, ist die tatsächliche Beanspruchung der Gewebe innerhalb des Kniegelenks durchaus vergleichbar [Heller, et al. 2005].

In Untersuchungen zu den mechanischen Eigenschaften der Menisken verschiedener Spezies konnten gezeigt werden, dass humanes und ovines Meniskusgewebe bezüglich ihrer Permeabilität und Steifigkeit sowie ihrer viskoelastischen Eigenschaften große Ähnlichkeiten aufweisen. Schafe scheinen so für orthopädische Fragestellungen, die den Meniskus betreffen, besonders geeignet zu sein [Joshi, et al. 1995, Sandmann, et al. 2013]. Dabei sind für die Entwicklung und Untersuchung neuer Therapieverfahren auch die strukturellen Eigenschaften des Meniskusgewebes von Bedeutung. Chevrier et al. konnten zeigen, dass sich humane und ovine Menisken bezüglich der für eine Heilung essentiellen Eigenschaften wie Blutgefäßversorgung, Zellularität und Struktur der extrazellulären Matrix (Kollagenverteilung) sehr ähnlich sind [Chevrier, et al. 2009]. Des Weiteren kann auch der Einfluss eines Ersatzmaterials auf die Knorpeloberflächen im Schafmodell angemessen bewertet werden, da es nach Meniskusresektion zu einer schnellen Entwicklung degenerativer Veränderungen kommt [Kelly, et al. 2007, Szomor, et al. 2000, Kon, et al. 2012]. Jedoch wird beim Schaf auch eine spontane Degeneration der Knorpeloberflächen des Kniegelenks beschrieben, [Vandeweerd, et al. 2013]. Demnach sollten bereits zu Versuchsbeginn bestehende Veränderungen im Sinne einer Knorpeldegeneration erfasst werden, um später eine genaue Beurteilung der chondroprotektiven Eigenschaften des untersuchten Therapieverfahrens vornehmen zu können.

Schafe sind ruhig und gelassen, was die Arbeit im Umgang mit diesen Tieren erleichtert. Ihre Haltung ist im Vergleich zu anderen Großtiermodellen sehr unproblematisch und durch die Möglichkeit der Weidehaltung kostengünstig.

Zusammenfassend kann, aufgrund der strukturellen und biomechanischen Ähnlichkeiten zum humanen Kniegelenk und besonders zu den humanen Menisken, die Fragestellung der vorliegenden Studie im Schafmodell angemessen beantwortet werden. Jedoch führten natürlich vorkommende degenerative Veränderungen auch in der Sham-Gruppe und an den nicht-operierten Gliedmaßen zu einer hohen Variabilität des Knorpelzustandes zwischen den einzelnen Tieren. Eine solche Variabilität würde eine sehr hohe Tierzahl erfordern, um auch kleine Unterschiede zwischen den

Operationsgruppen aufzuzeigen. Es ist demnach durchaus vorstellbar, dass bestehende Unterschiede teilweise unterschätzt wurden. Zu erwähnen ist außerdem die Problematik der unmittelbaren Belastung der operierten Gliedmaße nach dem chirurgischen Eingriff. Durch eine fehlende temporäre Immobilisation der betroffenen Gliedmaße, wie sie nach einem vergleichbaren Eingriff beim Menschen erfolgen würde, kam es frühzeitig zu einer hohen mechanischen Beanspruchung des Implantatmaterials.

4.2.2. Versuchsdesign

Eingriffe an den Menisken werden in der Klinik heutzutage vor allem arthroskopisch durchgeführt. Zu den Vorteilen einer minimal-invasiven Technik zählt vor allem die bessere Einsicht in den Bereich des Hinterhorns des Meniskus, was eine sparsame und genaue Resektion des Gewebes ermöglicht. Außerdem kann im Rahmen einer Arthroskopie auf umfangreiche Kapselinzisionen verzichtet und das Infektionsrisiko gesenkt werden. Zusätzlich profitieren die Patienten von einer kürzeren Behandlungsdauer sowie einer beschleunigten Rehabilitation mit einem besseren kosmetischen Ergebnis [Südkamp and Köstler 2004]. Obwohl die Arthroskopie beim Hund und vor allem beim Pferd mittlerweile ein etabliertes Verfahren darstellt, wird diese bei anderen Spezies selten durchgeführt [Allen, et al. 1998]. Das ovine Kniegelenk ist im Vergleich zum Menschen deutlich kleiner, was vor allem die arthroskopische Untersuchung des Femorotibialgelenks erschwert [Allen, et al. 1998]. Ein minimal-invasiv durchgeführter Eingriff würde einen verhältnismäßig hohen apparativen Aufwand erfordern, da arthroskopische Instrumente aus dem Bereich der Humanmedizin aufgrund ihrer Größe nicht geeignet sind. Deswegen war es uns im Rahmen der vorliegenden Studie nicht möglich eine arthroskopische Operationstechnik anzuwenden. Der Zugang zum medialen Meniskus durch eine mediale Arthrotomie unter Ablösung des Innenbandes (*Ligamentum collaterale mediale*) ist eine wesentliche Limitation der vorliegenden Studie. Das mediale Kollateralband zählt zu den wichtigsten passiven Stabilisatoren des Kniegelenks und wirkt dabei primär einem Valgusstress entgegen und begrenzt außerdem sekundär die tibiale Rotation sowie posteriore Translation. Verletzungen des medialen Kollateralbandes können zu einer Gelenkinstabilität führen und prädisponieren somit für eine nachfolgende Entwicklung einer degenerativen Gelenkerkrankung [Chen, et al. 2008]. Durch die Aufnahme einer Sham-Gruppe in die vorliegende Studie sowie durch die Untersuchung der kontralateralen nicht-operierten Gliedmaßen konnte jedoch ein potenziell negativer

Einfluss der Ablösung des Kollateralbandes auf die Gelenkstabilität ausgeschlossen werden. So wurde in der Sham-Gruppe lediglich eine mediale Arthrotomie unter Ablösung des medialen Seitenbandes sowie die anschließende Refixation mit Hilfe eines Krallenplättchens und Kortikalisschraube durchgeführt. Weder makroskopisch, noch biomechanisch oder histologisch konnte nach sechs Monaten eine Beeinflussung des Gelenkknorpels oder Meniskus im Sinne degenerativer Veränderungen nachgewiesen werden. In zwei weiteren *in vivo* Studien zu verschiedenen Meniskusersatzmaterialien wurde ein vergleichbarer Zugang zum medialen Meniskus gewählt [Gruchenberg, et al. 2015, Zur, et al. 2011]. Auch in diesen Studien konnte ein negativer Einfluss ausgeschlossen werden. Eine Beeinträchtigung des Zustandes des Kniegelenks aufgrund des operativen Vorgehens kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Eine weitere Limitation der Studie ist, dass keine postoperative Immobilisation der operierten Gliedmaße durchgeführt werden konnte und die Tiere das betroffene Bein direkt belasteten. In einem Vorversuch mit zwei Tieren erwies sich eine Schienung des operierten Kniegelenks mit Hilfe eines Fiberglasverbandes als kritisch. Die starke Bewegungseinschränkung führte zu einer zusätzlichen Belastung der Tiere, die den Nutzen der Schienung überstieg. Somit wurde diese im Hauptversuch nicht mehr durchgeführt. In früheren Studien des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik am Schafmodell sollte durch eine Tenotomie der Achillessehne eine temporäre Entlastung der operierten Gliedmaße erreicht werden. Jedoch konnte auch hier kein klarer Vorteil des zusätzlichen Eingriffs nachgewiesen werden und wurde daraufhin nicht mehr durchgeführt. Eine vergleichbare Meniskusoperation beim Menschen würde ein Rehabilitationsprogramm mit passivem Bewegungstraining für drei bis vier Wochen, gefolgt von zunächst nur partieller Gewichtsbelastung einschließen. Während dieser Zeit kann eine ungestörte Zellinfiltration sowie Matrixproduktion innerhalb des Materials stattfinden, was letztendlich Voraussetzung für eine erfolgreiche Integration ist. Dies ist vor allem im Falle eines regenerativen Ansatzes essenziell, bei dem es mit fortschreitender Gewebeinfiltration zu einer Degradation des Materials kommen soll. Diese Materialien sind zu Beginn der Implantationszeit meist mechanisch nicht belastbar und erhalten ihre mechanische Festigkeit erst mit fortgeschrittener Gewebeinfiltration. [Maher, et al. 2010]. Somit könnten frühzeitige Knorpelschäden die Folge einer zu früh eingesetzten Gewichtsbelastung sein. Im Falle des Seidenfibroin Implantats handelt es sich jedoch um ein permanentes Ersatzmaterial, das bereits vor der Implantation biomechanisch

funktionell ist. Jedoch hat auch hier eine frühzeitige und hohe Gewichtsbelastung die Ausbildung einer Gewebebrücke möglicherweise erschwert oder sogar verhindert und hat somit zur fehlenden Integration des Materials beigetragen.

In diesem Zusammenhang ist als weitere Limitation zu nennen, dass die Resektion des Meniskusgewebes in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe wahrscheinlich nicht bis in die vaskularisierte Zone des Meniskus erfolgte. Ein fehlender Anschluss an die peripheren Gefäße des Meniskus verhindert eine sichere Integration des Ersatzmaterials in natives Meniskusgewebe. Beim Schaf ist nur circa 1 mm der Meniskusbasis von Blutgefäßen durchzogen [Takroni, et al. 2016]. Das gewählte Resektionsausmaß ist als Kompromiss anzusehen, da eine verbleibende Meniskusrandleiste von nur 1 mm eine Extrusion des Implantats aus dem Gelenkspalt vermutlich nicht verhindern würde.

In Rahmen der vorliegenden Studie wurde keine immunhistologische Untersuchung zur genauen Evaluierung der Biokompatibilität des Seidenfibroin Implantats durchgeführt. Natürliche Seide wird bereits seit Jahrhunderten für biomedizinische Anwendungen genutzt. Sie zeichnet sich dabei vor allem durch eine hohe mechanische Belastbarkeit bei gleichzeitiger Elastizität aus [Altman, et al. 2003]. Natürliche Seide, die aus dem Kokon der Seidenspinner Raupe (*Bombyx mori*) gewonnen wurde, besteht hauptsächlich aus zwei Proteinen: Fibroin und Sericin. Dabei ist Sericin verantwortlich für die in Zusammenhang mit Seide berichtete Immunogenität. Panilaitis et al. konnten zeigen, dass isoliertes Fibroin keine Immunreaktion auslöst [Panilaitis, et al. 2003]. Dementsprechend konnte die Biokompatibilität von Fibroin bereits in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien bewiesen werden [Santin, et al. 1999, Meinel, et al. 2005, Seo, et al. 2009, Cassinelli, et al. 2006]. Auch im Rahmen des Herstellungsprozesses des hier untersuchten Seidenfibroin Implantats wurde der Fibroin-Anteil extrahiert und in eine poröse Matrix überführt. Die Biokompatibilität wurde bereits in der vorhergehenden Untersuchung der ersten Generation der Implantate bestätigt [Gruchenberg, et al. 2015]. Da im Rahmen des Optimierungsprozesses keine Änderung des Materials an sich vorgenommen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Beeinflussung der *in vivo* Biokompatibilität kam.

Schließlich ist als weitere Limitation aufzuführen, dass nur jeweils zwei Tiere pro Gruppe einer bildgebenden *in vitro* Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) unterzogen wurden. Da hier keine definitive Aussage bezüglich Unterschiede des Knorpelzustandes zwischen den drei Operationsgruppen getroffen werden kann, soll

hier eher die generelle Machbarkeit beurteilt werden. Durch longitudinale nicht-invasive (*in vivo*) Untersuchungsverfahren könnte in zukünftigen präklinischen Studien mit mehreren Untersuchungszeitpunkten vor allem die benötigte Anzahl an Tieren reduziert werden. In dieser Studie konnten die Ergebnisse der makroskopischen, biomechanischen sowie histologischen Untersuchung in der MRT-Untersuchung durchaus bestätigt werden. So wiesen die Tiere der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe tendenziell einen höheren Degenerationsgrad auf als die Tiere der Sham-Gruppe. Dabei waren vor allem die medialen Gelenkkompartimente stärker betroffen und wiesen zum Teil größere Defekte mit einem Durchmesser von über 2 mm auf. Für die definitive Beurteilung eines zukünftigen Medizinproduktes sind jedoch weiterführende biomechanische sowie histologische Untersuchungen notwendig, die eine genaue Aussage bezüglich der Wirksamkeit und Sicherheit eines Ersatzmaterials zulassen.

4.3. Ausblick

Nach Implantation der ersten Generation der Seidenfibroin Implantate konnte über einen Zeitraum von sechs Monaten die Entstehung degenerativer Knorpelveränderungen im Vergleich zur partiellen Meniskektomie verhindert werden. Jedoch wurde auch in dieser Studie keine Integration in das native Meniskusgewebe erreicht [Gruchenberg, et al. 2015]. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden *in vivo* Untersuchung der zweiten Generation der Seidenfibroin Implantate für den subtotalen Meniskusersatz keine Chondroprotektion im Vergleich zur Meniskektomie nachgewiesen werden. Hierfür können verschiedene Gründe aufgeführt werden:

In der vorhergehenden Untersuchung wurde eine Meniskusteilresektion von circa 20 % der Meniskuslänge am Übergang des Vorderhorns zur *Pars intermedia* durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde das Resektionsausmaß in der vorliegenden Studie deutlich erweitert. Dieses umfasste hier rund 45 % des gesamten medialen Meniskusgewebes und ist somit klinisch höchst relevant. Ein solches Resektionsausmaß ist im Falle eines Korbhenkelrisses (entsteht aus einem vertikalen Longitudinalriss) erforderlich, der das häufigste Verletzungsmuster des Meniskus darstellt.

Zusätzlich sind die meisten Verletzungen im Bereich des Hinterhorns des medialen Meniskus lokalisiert [Metcalf and Barrett 2004]. Zwar schließt das vorliegende Versuchsmodell auch diese klinische Fragestellung ein, jedoch ist das Material im

posterioren Bereich des Gelenks extrem hohen Belastungen ausgesetzt, die letztendlich zur Zerstörung des Implantats geführt haben könnten.

Schließlich kam es im Rahmen des Optimierungsprozesses zu einer Änderung der Materialeigenschaften. Während die erste Generation der Seidenfibroin Implantate vor Implantation ein durchschnittliches Gleichgewichtsmodul E_{eq} von 0,04 MPa zeigte [Gruchenberg, et al. 2015], betrug das in der vorliegenden Studie ermittelte Gleichgewichtsmodul E_{eq} vor Implantation 0,6 MPa. Möglicherweise hat die Integration des Fasernetzes zu einer erhöhten Steifigkeit des Seidenfibroin Materials geführt, die letztendlich zur Zerstörung der Knorpeloberfläche beigetragen hat.

Durch das integrierte Netz wurde zwar eine operationstechnische Verbesserung bezüglich der Fixierung des Implantats erreicht, jedoch sollte für die zukünftige Anwendung als Meniskusersatz die Steifigkeit reduziert werden. Auf diese Weise könnte eine Integration des Materials gefördert und eine direkte Knorpelzerstörung unterhalb des Meniskusersatzes vermieden werden. Möglicherweise könnte auch eine Erhöhung der offenen Porosität zu einer verbesserten Hydrierung im Inneren des Implantats führen und so nicht nur die Zellproliferation innerhalb des Materials fördern, sondern unter Umständen auch die mechanischen Eigenschaften verbessern.

5. Zusammenfassung

Mehr als ein Drittel aller Sportverletzungen betreffen das Kniegelenk. Dabei ist der mediale Meniskus die am zweit häufigsten betroffene Struktur innerhalb des Gelenks. Rund 80 % dieser Meniskusläsionen bedürfen einer operativen Versorgung, wobei in den meisten Fällen das verletzte Meniskusgewebe reseziert wird. Da dieser Eingriff auf lange Sicht zur Entstehung degenerativer Gelenkerkrankungen beiträgt, werden dringend alternative Therapiemethoden benötigt, durch die die Funktion des Meniskus wiederhergestellt werden kann. Trotz der intensiven Forschung auf diesem Gebiet existieren klinisch momentan nur zwei artifizielle Scaffolds für den partiellen Meniskusersatz. Jedoch ist keines der beiden von der Ärzteschaft allgemein anerkannt und bisher ist unklar, ob der Gelenkknorpel auch auf lange Sicht vor einer Degeneration geschützt werden kann. Ein start-up Unternehmen aus dem Vereinigten Königreich (Orthox Ltd., Abingdon) entwickelte deshalb ein Material aus Seidenfibroin für den partiellen Meniskusersatz (FibroFix™). Dabei handelt es sich um ein permanentes Implantat, bei dem natürliche Seide der Seidenspinnerraupe (*Bombyx mori*) als Ausgangsstoff dient. Während des Herstellungsprozesses wird der Fibroinanteil extrahiert und in eine poröse Matrix überführt. In einer ersten *in vivo* Untersuchung am Schafmodell, bei der ein Meniskusteilersatz am Vorderhorn des medialen Meniskus durchgeführt wurde, zeigte das Implantat vielversprechende Ergebnisse bezüglich Chondroprotektion und Biokompatibilität [Gruchenberg, et al. 2015]. Jedoch wurden auch Defizite hinsichtlich der Fixierung und Integration des Implantats deutlich. Im Rahmen eines darauffolgenden Optimierungsprozesses wurde ein Fasernetz in die poröse Matrix integriert, um eine sichere Fixierung des Materials an der Meniskusrandleiste zu ermöglichen.

In der vorliegenden *in vivo* Studie sollte nun die zweite Generation der Seidenfibroin Implantate am Schafmodell untersucht werden. Durch die Integration des Fasernetzes sollte es nun auch möglich sein, größere Meniskusdefekte zu überbrücken. So wurde im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung das Resektionsausmaß deutlich vergrößert. Eine solch umfangreiche Entfernung von Meniskusgewebe ist im Falle eines Korbhenkelrisses, der einer der häufigsten Rissformen des medialen Meniskus darstellt, indiziert. Zusätzlich schließt eine subtotale Meniskektomie auch den posterioren Bereich des medialen Meniskus mit ein. Da hier beim Menschen die meisten

Verletzungen auftreten, ist das Versuchsdesign der vorliegenden Studie klinisch höchst relevant.

27 Merino Schafe wurden randomisiert in drei Operationsgruppen zu je neun Tieren eingeteilt. Der operative Zugang zum medialen Meniskus erfolgte durch eine mediale parapatellare Arthrotomie unter Ablösung des Kollateralbandes. In Operationsgruppe 1 (Sham-Gruppe) wurde kein Eingriff am Meniskus durchgeführt. Hier sollte lediglich evaluiert werden, in wie weit allein die Operationstechnik die Gesundheit von Knorpel und Meniskus beeinflusst. In den Operationsgruppen 2 (Leerdefekt-Gruppe) und 3 (Implantat-Gruppe) wurde eine subtotal Meniskektomie unter Belassung einer Meniskusrandleiste von 2 mm sowie des Vorder- und Hinterhorns durchgeführt. In der Operationsgruppe 3 (Implantat-Gruppe) erfolgte schließlich ein Ersatz des resezierten Gewebes unter Verwendung des Seidenfibroin Implantats. In allen Gruppen erfolgte anschließend die Refixation des medialen Kollateralbandes mit Hilfe eines Krallenplättchens.

Sechs Monate nach dem chirurgischen Eingriff erfolgte die makroskopische, biomechanische und histologische Auswertung des Gelenkknorpels und der Menisken oder Implantate. Die wichtigsten Kriterien waren dabei, ob durch das implantierte Ersatzmaterial aus Seidenfibroin die Entstehung einer degenerativen Gelenkerkrankung im Vergleich zur Meniskektomie verhindert werden konnte und in wie weit es zu einer Integration des Implantats in natives Meniskusgewebe kam.

Makroskopisch, biomechanisch und histologisch kam es in der Leerdefekt- und Implantat-Gruppe gleichermaßen zu einer Erweichung und Fibrillation des artikulären Knorpels im Sinne einer Degeneration. Obwohl geringe Veränderungen auch in der Sham-Gruppe vorhanden waren, zeigte sich hier kein Unterschied zu den nicht-operierten Gliedmaßen. Während die Veränderungen hier vor allem auf den zentralen Bereich der medialen Tibiakondyle beschränkt blieben, waren diese in der Leerdefekt- um Implantat-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt und erstreckten sich über die gesamten medialen Gelenkflächen von Femur und Tibia.

Aufgrund einer ausgebliebenen Zell- und Gewebeeinfiltration des Seidenfibroin Implantats konnte über die Versuchsdauer keine Integration in natives Meniskusgewebe erreicht werden. So kam es teilweise zu einer Zerstörung und Dislokation der Implantate. Eine mögliche Ursache könnte die festgestellte erhöhte Steifigkeit des Materials nach Implantation sein. So war das Implantat nach sechs Monaten signifikant steifer als natives Meniskusgewebe. Dies hat unter Umständen die Ausbildung einer

Gewebebrücke effektiv verhindert und zu einer direkten Zerstörung der Knorpeloberflächen geführt.

Zwar konnte durch das Fasernetz eine operationstechnische Verbesserung der Fixierung erreicht werden, jedoch sollte für die zukünftige Anwendung als Meniskusersatz die Steifigkeit deutlich reduziert werden. Hierbei könnte möglicherweise eine Erhöhung der offenen Porosität zu einem verbesserten Einwachsverhalten sowie zu verbesserten mechanischen Eigenschaften beitragen.

6. Summary

About one third of all sports injuries are related to the knee joint, thereby affecting particularly the medial meniscus. About 80 % of these lesions require surgical intervention in terms of removing damaged meniscal tissue. However, meniscectomy leads to development of degenerative joint alterations in the long term. Therefore, alternative treatment strategies are needed, by which meniscal function can be restored. Despite intensive research in this field, there are only two scaffolds for partial meniscal replacement clinically available. Nevertheless, they are not generally accepted and the long-term chondroprotection has yet to be proved. Therefore, a start-up company from the United Kingdom (Orthox Ltd., Abingdon) has developed a silk fibroin implant (FibroFix™) for partial meniscal replacement. It is a permanent prosthesis made from *Bombyx mori* silkworm silk. During manufacturing process, fibroin was extracted and processed into a porous matrix. In a preliminary *in vivo* study the performance of the silk fibroin implant for partial replacement at the anterior horn of the medial meniscus was evaluated in a sheep model. After six months of implantation the material showed satisfactory results in terms of chondroprotection and biocompatibility. However, fixation and integration of the implant failed, leading to a subsequent process of optimisation. To increase fixation strength, a fibre mesh was integrated into the porous matrix.

The objective of the present study was the *in vivo* evaluation of the second generation of silk fibroin implants in a sheep model. Integration of the fibre mesh should now allow the replacement of large meniscal defects. Therefore, the proportion of resected tissue was increased compared to the previous study and a subtotal meniscal replacement was carried out. Such an extensive removal of tissue is required in case of bucket-handle tears, representing one of the most common meniscus lesions. Additionally, including the posterior aspect of the medial meniscus is clinically extremely relevant, because most injuries of the medial meniscus are located in this area.

27 merino sheep were randomly assigned to one of three groups with nine animals each. Surgical access implied a medial parapatellar arthrotomy including bony release of the medial collateral ligament. In group 1 sham surgery was performed without creating a meniscal defect and implantation of a silk fibroin scaffold (Sham-group). Thus, evaluation of a potential influence of arthrotomy on cartilage and meniscus conditions was possible. In groups 2 (meniscectomy-group) and 3 (implant-group) a subtotal

meniscectomy was conducted, leaving a narrow peripheral rim (2 mm) and the anterior and posterior horns intact. In group 3, a meniscal replacement using the silk fibroin implant was carried out. Finally, the medial collateral ligament was reattached in all groups using a claw plate.

After six months of implantation macroscopic, biomechanical and histological evaluation of cartilage, menisci and implants was performed. Main criteria were the assessment of prevention of articular cartilage degeneration and integration of the material into native meniscus tissue.

In the meniscectomy- and implant-group considerable softening and fibrillation of articular cartilage was confirmed macroscopically, biomechanically and histologically. Although there were minor changes in articular cartilage structure also in the sham-group, there was no difference to the contralateral non-operated hind limbs. Furthermore, changes were limited to the central area of the medial tibial plateau, whereas they were more pronounced in the meniscectomy- and implant-group and extended over the cartilage surface of femur and tibia.

Absent cell- and tissue-infiltration of the implant led to failed integration. Thus, destruction and dislocation of some implants occurred. A possible reason might be the significantly increased stiffness of the material after implantation, compared to native meniscus tissue. This may have prevented tissue regeneration and promoted direct cartilage destruction underneath the implant. Although there was a surgical improvement by integration of the fibre mesh, stiffness has to be reduced for a future application as replacement material. An increased open porosity may lead to improved integration as well as mechanical properties.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Kniegelenks. (A) Frontalansicht. (B) Ansicht von medial. (C) Aufsicht aus das Tibiaplateau. Eigene Abbildungen in Anlehnung an Schünke, et al. 2014.	2
Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau des Meniskus in drei Schichten. (1) Oberflächliche Schicht aus einem sehr feinen fibrillären Netzwerk ohne spezifische Orientierung der Fasern. (2) Lamelläre Schicht aus sich kreuzenden Kollagenfasern. (3) Zentrale Hauptportion aus zirkumferent verlaufenden Faserbündeln. Eigene Abbildung in Anlehnung an Petersen and Tillmann 1998.	4
Abbildung 3: Gefäßversorgung des Meniskus und Einteilung in 3 Zonen. (A) Querschnitt. (B) Aufsicht. 1 = rot-rote Zone; 2 = rot-weiße Übergangzone; 3 = weiß-weiße Zone.	6
Abbildung 4: Beteiligung des Meniskus an der Lastübertragung im Kniegelenk. Axial einwirkende Kräfte werden innerhalb des Meniskusgewebes in zirkumferente Zugspannungen umgewandelt und über die Verankerungsligamente auf das Tibiaplateau übertragen. Eigene Abbildung in Anlehnung an Dürselen and Freutel 2015.	8
Abbildung 5: Medialer Zugang zum Kniegelenk mit proximo-distaler Schnitfführung, parallel zu medialen Kollateralband.	27
Abbildung 6: (A) Zustand nach knöcherner Ablösung des Ansatzes des medialen Kollateralbandes an der medialen Femurkondyle und Präparation nach distal. LCM = Ligamentum collaterale mediale; CMF = Condylus medialis femoris. (B) Subluxation des Kniegelenks mit Blick auf den medialen Meniskus. MM = Meniscus medialis.	28
Abbildung 7: (A) Resektion des medialen Meniskus unter Verwendung einer Mikro-Skalpellklinge. Es wurde stets auf eine senkrechte Schnitfführung geachtet. MM = Meniscus medialis; LCM = Ligamentum collaterale mediale. (B) Zustand nach subtotaler Meniskusresektion mit Blick auf den Knorpel des medialen Tibiaplateaus. CMT = Condylus medialis tibiae; CMF = Condylus medialis femoris.	29
Abbildung 8: (A) Reseziertes Stück des medialen Meniskus im Vergleich zur Grundform des Implantats aus Seidenfibroin. (B) Meniskusstück und Implantat nach Anpassung von Größe und Form des Ersatzmaterials.	30

Abbildung 9: Stichführung für die Fixierung des Seidenfibroin Implantats. Das horizontalverlaufende Fasernetz wurde stets in die Naht integriert.....	31
Abbildung 10: Innerhalb des Defekts des medialen Meniskus fixiertes Seidenfibroin Implantat. MM = Meniscus medialis; SI = Seidenfibroin Implantat; CMT = Condylus medialis tibiae = CMT; CMF = Condylus medialis femoris.....	31
Abbildung 11: (A) Bohrung durch proximale und distale Kortikalis (2,5 mm). (B) Eindrehen der selbstschneidenden Kortikalisschraube (3,5 mm).....	32
Abbildung 12: Mit Hilfe eines Krallenplättchens und einer Kortikalisschraube refixiertes mediales Kollateralband. LCM = Ligamentum collaterale mediale.....	32
Abbildung 13: (A) Entnahmestellen der Proben aus Vorder- und Hinterhorn der medialen Menisken/Implantate. (B) Anfertigung vertikaler Schnitte aus Vorderhorn, Pars intermedia und Hinterhorn der medialen Menisken/Implantate für die histologische Untersuchung.....	35
Abbildung 14: Prüfaufbau des Stress-Relaxationstest. Über den Druckstempel wurde eine axiale Belastung auf die mittig aufgelegte Probe ausgeübt. Die während der Belastung auftretende Verformung wurde mit Hilfe des Lasersensors erfasst.	38
Abbildung 15: (A) Verlauf der Probendehnung über die Zeit. Nach 10 Setzzyklen zwischen 0,1 % und 12 % Dehnung, wurde eine konstante Dehnung von 12 % über 60 min gehalten. (B) Während dieser Relaxation kam es zum Absinken der Kraft..	39
Abbildung 16: Mediale Tibiakondyle mit den drei Messpunkten für den Eindrückttest. Messpunkt 1 im Bereich der Eminentia intercondylaris war in vivo nicht von Meniskus/Implantat bedeckt und stand in direktem Kontakt mit der Knorpeloberfläche der medialen Femurkondyle. Die Messpunkte 2 und 3 befanden sich in vivo jeweils unter Vorder- und Hinterhorn des medialen Meniskus/Implantats.....	40
Abbildung 17: Testaufbau für die Messung der Knorpeldicke (A) und den Eindrückttest des tibialen Knorpels (B). Für beide Untersuchungen wurde das mediale Tibiaplateau in einer Wanne aus Plexiglas befestigt, sodass die Prüfung immer senkrecht zur Knorpeloberfläche erfolgte.....	41
Abbildung 18: Beispielhaftes Kraft-Weg-Diagramm für die Messung der Knorpeldicke h_0 in mm. Bei Durchdringung der Knorpeloberfläche kam es zu einem Anstieg der Kraft (= Beginn Knorpeldicke), der bei nachfolgender Berührung des subchondralen Knochens exponentiell verlief (=Ende Knorpeldicke).....	42

Abbildung 19: Exemplarischer Verlauf von Kraft (schwarze Kurve) und Dehnung (rote Kurve) während des Eindrücktests des tibialen Knorpels. Die bei einer Kraft von 4,8 N erreichte Dehnung der Probe wurde für 20 min gehalten. Dabei kam es zu einem Absinken der Kraft und zur Relaxation der Probe.	43
Abbildung 20: (A) Segmentiertes Bild einer India Ink-gefärbten medialen Femurkondyle. (B) Mit Hilfe der Analysesoftware erstelltes Graustufenbild.	47
Abbildung 21: Schnittführung bei der Anfertigung der histologischen Präparate der medialen Tibiakondyle. Von jeder Kondyle wurden jeweils drei 2 mm dicke Scheiben angefertigt.	49
Abbildung 22: Ausschnitt der histomorphometrischen Analyse eines histologischen Präparats des tibialen Knorpels. Türkis = Knorpeloberfläche; Pink = Knorpel-Knochen-Grenze; 50x-Vergrößerung.	53
Abbildung 23: Tibiaplateau der linken Gliedmaße zweier Tiere der Sham Gruppe. (A) Medialer Meniskus mit leichter Auffaserung des inneren Randes (Pfeil). (B) Lateraler Meniskus mit kleinem längsverlaufendem Riss.	57
Abbildung 24: Tibiaplateau der operierten Gliedmaße dreier Tiere der Operationsgruppe mit Leerdefekt. (A, B) Die Resektionskanten sind deutlich erkennbar. Es kam zu keiner Regeneration von Meniskusgewebe. (C) Auffaserung des Meniskusgewebes im Bereich der Resektionskante.	58
Abbildung 25: Linkes Tibiaplateau verschiedener Tiere der Implantat-Gruppe. (A, B) Riss des Seidenfibroin Implantats im Bereich des Übergangs der Pars intermedia zum Hinterhorn. (C, D) Spaltbildung zwischen Implantat und nativer Meniskusrandleiste. (E) Abkapselung von Implantatmaterial im Bereich der Area intercondylaris posterior. (F) Disloziertes und in die Knorpeloberfläche eingedrücktes Implantat (Menisken bereits entfernt).	59
Abbildung 26: (A) Femurkondylen der linken (operierten) Gliedmaße eines Tieres der Sham-Gruppe mit geringer Aufrauung der Knorpeloberfläche am inneren Bereich der medialen Femurkondyle. (B) Linkes Tibiaplateau eines Tieres der Sham-Gruppe mit rundlicher Erweichung des Knorpelgewebes im Bereich der Eminentia intercondylaris.	60
Abbildung 27: (A, B) Gelenkflächen des linken Femurs zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe mit deutlicher Aufrauung im zentralen Bereich der medialen Femurkondyle. Die Aufrauung erstreckt sich über die gesamte Länge der medialen	

Kondyle. (C, D) Verbreiterung der medialen tibialen Gelenkfläche durch osteophytäre Zubildungen bei zwei Tieren der Leerdefekt-Gruppe.....	62
Abbildung 28: (A) Femurkondylen der linken Gliedmaße eines Tieres der Implantat-Gruppe mit zentralem länglichen Defekt in der medialen Kondyle. (B) Verbreiterung der Gelenkfläche der medialen Femurkondyle. (C) Aufrauhung und Erweichung der Knorpeloberfläche am linken medialen Tibiaplateau der Implantat-Gruppe. (D, E) Tiefere Knorpeldefekte, teilweise mit regenerativem Gewebe gefüllt. (F) Vergrößerung der medialen Gelenkfläche durch Osteophyten.....	64
Abbildung 29: (A) Klassifizierung der Knorpelveränderungen an der medialen Femurkondyle nach Outerbridge (Mittelwert \pm Standardabweichung; Grad 0 = Keine sichtbaren Veränderungen). (B) Klassifizierung der Knorpelveränderungen nach Outerbridge an der medialen Gelenkfläche des Tibiaplateaus (Mittelwert \pm Standardabweichung; 0 = Keine sichtbare Veränderung). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$	65
Abbildung 30: Gleichgewichtsmodul E_{eq} in MPa (Mittelwert \pm Standardabweichung) des Seidenfibroin Implantats vor und nach Implantation im Vergleich zum nativen Meniskus der kontralateralen Gliedmaße und zum medialen Meniskus der Sham-Gruppe. * = $p < 0,01$	66
Abbildung 31: (A) Bestimmung der Knorpeldicke des medialen Tibiaplateaus an drei verschiedenen Messpunkten. Knorpeldicke in mm (Median und Einzelwerte) der operierten sowie nicht-operierten Gliedmaßen im Bereich der (B) Eminentia intercondylaris, (C) im anterioren sowie (D) im posterioren Bereich der medialen Tibiakondyle.....	68
Abbildung 32: (A) Gleichgewichtsmodul E_{eq} (in MPa) des tibialen Knorpels im Bereich der Eminentia intercondylaris (Median und Einzelwerte). (B) Gleichgewichtsmodul E_{eq} (in MPa) unterhalb des Implantats/ Leerdefekts/ Meniskus (Mittelwert \pm Standardabweichung). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0001$; # = Ausreißer.....	69
Abbildung 33: (A) Steifigkeit im Gleichgewichtszustand k_{eq} in N/mm im Bereich der Eminentia intercondylaris (Median und Einzelwerte). (B) Steifigkeit k_{eq} in N/mm unterhalb des Implantats/ Leerdefekts/ Meniskus (Mittelwert \pm Standardabweichung). * $p = 0,0365$; # = Ausreißer.....	70
Abbildung 34: (A) Linkes Femur eines Tieres der Sham-Gruppe (coronal). Intakte Oberfläche an medialer und lateraler Femurkondyle. Die Knorpeldicke betrug hier 1,4 mm an der medialen und 0,6 mm an der lateralen Femurkondyle. (B) Linkes	

- Femur eines Tieres der Implantat-Gruppe (coronal) mit Degenerationsgrad 1 am CLF und Degenerationsgrad 2 am CMF. (C) Linkes Tibiaplateau eines Tieres der Implantat-Gruppe (coronal). Roter Kasten = Zwei Defekte in der medialen Knorpeloberfläche mit einem Durchmesser von bis zu 2 mm (Grad 4). L = Lateral; M = Medial 73
- Abbildung 35: (A, B) India Ink Färbung der Gelenkflächen des rechten und linken Femurs eines Tieres der Sham-Gruppe. Es bestand kein Unterschied bezüglich des Anteils der schwarz gefärbten Oberfläche zwischen nicht-operierter (A) und operierter (B) Gliedmaße. Linkes Femur (C) und Tibiaplateau (D) eines Tieres der Sham-Gruppe. Die medialen Gelenkflächen des Tibiaplateaus wiesen im Vergleich zur medialen Femurkondyle den größeren Anteil an beschädigter Oberfläche auf. 75
- Abbildung 36: Gelenkflächen von Femur (A, B und E, F) und medialem Tibiaplateau (C, D und G, H) zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe. An den linken Gliedmaßen (B, F) ist der Anteil der geschädigten Oberfläche der medialen Femurkondyle signifikant höher als rechts (A, E). Der Unterschied zwischen den Gelenkflächen des medialen Tibiaplateaus der rechten (C) und linken (D) Gliedmaßen ist dagegen hier weniger deutlich. 76
- Abbildung 37: (A, B) Gelenkflächen des linken Femurs zweier Tiere der Implantat-Gruppe. Gelenkflächen von Femur (C, D) und Tibia (E, F) beider Gliedmaßen eines weiteren Tieres der Implantat-Gruppe. An der operierten Gliedmaße (D, F) zeigten die medialen Gelenkkompartimente einen deutlich höheren Anteil geschädigter Gelenkfläche..... 77
- Abbildung 38: (A) Anteil in % der degenerierten Oberfläche der medialen Femurkondyle. (B) Anteil in % der degenerierten Oberfläche des medialen Tibiaplateaus in allen Operationsgruppen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ 78
- Abbildung 39: Synovialmembran des operierten (A) und nicht-operierten (B) Kniegelenks eines Tieres der Implantat-Gruppe. Die Synovialis besteht aus ca. 2-3 Zellreihen synovialer Deckzellen. Darunter befindet sich eine Schicht aus locker angeordneten Kollagenfasern mit Blutgefäßen; 200-fache Vergrößerung..... 80
- Abbildung 40: Synovialmembran eines operierten Kniegelenks (Implantat-Gruppe). Hyperplasie der synovialen Deckzellen mit villöser Proliferation der Synovialis; 100-fache Vergrößerung. Zusätzlich traten bei diesem Tier herdförmig mehrkernige synoviale Riesenzellen in der verbreiterten Deckzellschicht auf

(Ausschnitt). Diese Besitzen 5-6 kranzförmig angeordnete Zellkerne; 400-fache Vergrößerung.....	81
Abbildung 41: Nativer medialer Meniskus der linken (A) und rechten (B) Gliedmaße eines Tieres der Sham-Gruppe; 12,5-fache Vergrößerung.....	83
Abbildung 42: Meniskusrandleiste eines Tieres mit Leerdefekt. * = Strukturverlust der Kollagenfaserbündel im Bereich der Resektionskante. Pfeile = Glatte, intakte Oberfläche des Meniskus; 200-fache Vergrößerung.....	84
Abbildung 43: (A) Meniskusrandleiste eines Tieres mit Leerdefekt; 200-fache Vergrößerung. Ausschnitt: Cluster aus chondrozytären Zellen; 200-fache Vergrößerung. (B) Basophiles Regenerationsgewebe im Bereich der Resektionskante eines Leerdefekts; 50-fache Vergrößerung. Ausschnitt: Chondrozytäre Zellen innerhalb des neu gebildeten Gewebes; 100-fache Vergrößerung. (C, D) Resektionskante des medialen Meniskus mit violetter (basophilem) Regenerationsgewebe zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe; 50-fache Vergrößerung.....	85
Abbildung 44: Seidenfibroin Implantat ohne feste Verbindung zur nativen Meniskusrandleiste; 12,5-fache Vergrößerung.	86
Abbildung 45: (A) Fibrin-ähnliches Gewebe ohne erkennbare Struktur mit wenigen Zellen in den Poren des äußeren Bereichs des Seidenfibroin Implantats; 200-fache Vergrößerung. (B, C) Beginnende Organisation des Gewebes (fibrös) innerhalb der äußeren Poren. Pfeil = wenige chondrozytäre Zellen; * = integriertes Fasernetz des Implantats; 200-fache Vergrößerung. (D) Seidenfibroin Implantat mit azellulärem Gewebe innerhalb der äußeren Poren; 100-fache Vergrößerung. (E) Implantat ohne Zellen oder Matrix. Pfeil = Makropore, * = Mikropore; 100-fache Vergrößerung.....	87
Abbildung 46: (A) Übergangsbereich zwischen Meniskus und Implantat. Pfeil = Resektionskante des nativen Meniskusgewebes mit stärkerem Strukturverlust der Kollagenfasern als in der Leerdefekt-Gruppe; 100-fache Vergrößerung. (B, C) Resektionskante des nativen medialen Meniskus. Pfeil = Cluster chondrozytärer Zellen; 100-fache Vergrößerung. (D) Übergangsbereich zwischen Meniskus und Implantat. Resektionskante des Meniskus mit hohem Zellreichtum und deutlichem Strukturverlust; 100-fache Vergrößerung.....	88
Abbildung 47: Safranin-O-gefärbte, histologische Schnitte des tibialen Knorpels verschiedener Tiere der Sham-Gruppe. (A) Intakte Knorpeloberfläche des linken	

Tibiaplateaus; 50-fache Vergrößerung. (B) Riss bis zur Übergangszone des Gelenkknorpels; 50-fache Vergrößerung. (C) Riss bis zur radialen Knorpelzone und schwere Reduktion der Safranin-O-Färbung. Pfeile = Bildung von Zellklonen; 100-fache Vergrößerung. (D) Schwere Reduktion der Intensität der Färbung; Pfeil = Riss bis zur radialen Zone des Knorpels mit Tusche Partikeln der India Ink-Färbung; 50-fache Vergrößerung.	90
Abbildung 48: Tibialer Gelenkknorpel zweier Tiere der Leerdefekt-Gruppe; 50-fache Vergrößerung. (A) Schwere Reduktion der Intensität der Safranin-O-Färbung und reduzierte Zellzahl. Pfeil = Riss bis in die kalzifizierte Zone des Knorpels; * = Riss bis zur radialen Knorpelzone. (B) Mäßige Reduktion der Farbeintensität. Pfeil = Riss bis zur Übergangszone.....	92
Abbildung 49: Tibialer Gelenkknorpel zweier Tiere der Implantat-Gruppe. (A) Schwere Reduktion der Safranin-O-Färbung mit Hypozellularität und ausgedehnten Rissen in der Knorpeloberfläche, die bis in die radiale Knorpelzone reichen; 50-fache Vergrößerung. (B) Riss bis in die radiale Knorpelzone, der fast die kalzifizierte Zone erreicht (Pfeil). * = Übertritt eines Blutgefäßes im Bereich der Knorpel-Knochen-Grenze; 100-fache Vergrößerung.....	94
Abbildung 50: Übersicht über den Degenerationsgrad nach Mankin der Tiere der drei Operationsgruppen im Bereich der verschiedenen Lokalisationen des medialen Tibiaplateaus.	95
Abbildung 51: Fibrillationsindex des medialen Tibiaplateaus der Tiere der drei Operationsgruppen.....	97

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene Verletzungsmuster des Meniskus [Pellacci, et al. 1997, Pereira, et al. 2016].	12
Tabelle 2: Übersicht über die drei Versuchsgruppen.	25
Tabelle 3: Beurteilungsschema nach Outerbridge für die semiquantitative Beurteilung des artikulären Knorpels von Femur und Tibia [Outerbridge 1961].	37
Tabelle 4: Parameter der T1-gewichteten FFE-Sequenz zur bildgebenden Untersuchung des Gelenkknorpels von Femur und Tibia.	45
Tabelle 5: Schema nach Yoshioka et al. zur makroskopischen Klassifizierung degenerativer Knorpelveränderungen [Yoshioka, et al. 1996].	46
Tabelle 6: Mankin-Grading zur histologischen Klassifizierung der Knorpelbeschaffenheit.	52
Tabelle 7: Übersicht über die makroskopische Klassifizierung degenerativer Knorpelveränderung an MRT-Schnittbildern von Femurkondylen und Tibiaplateau der linken Gliedmaße in allen Operationsgruppen. 1 = intakte Oberfläche; 2 = minimale Auffaserung; 3 = deutliche Auffaserung, Unregelmäßigkeiten der Oberfläche oder Risse; 4 = 0 mm < Durchmesser des größten Defekts < 2 mm; 5 = 2 mm < Durchmesser des größten Defekts < 5 mm.	72
Tabelle 8: Übersicht der in den drei Operationsgruppen vorliegenden Veränderungen der Synovialmembran.	82
Tabelle 9: Übersicht über die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Seidenfibroin Implantats.	89
Tabelle 10: Übersicht über Fibrillationsindex und Degenerationsgrad nach Mankin der verschiedenen Abschnitte des medialen Tibiaplateaus der drei Operationsgruppen.	98

9. Literaturverzeichnis

- Abraham, A. C., C. R. Edwards, G. M. Odegard, and T. L. Donahue. 2011. "Regional and Fiber Orientation Dependent Shear Properties and Anisotropy of Bovine Meniscus." *J Mech Behav Biomed Mater* 4: 2024-30.
- Abrams, G. D., R. M. Frank, A. K. Gupta, J. D. Harris, F. M. McCormick, and B. J. Cole. 2013. "Trends in Meniscus Repair and Meniscectomy in the United States, 2005-2011." *Am J Sports Med* 41: 2333-9.
- Ahn, J. H., Y. S. Lee, J. C. Yoo, M. J. Chang, K. H. Koh, and M. H. Kim. 2010. "Clinical and Second-Look Arthroscopic Evaluation of Repaired Medial Meniscus in Anterior Cruciate Ligament-Reconstructed Knees." *American Journal of Sports Medicine* 38: 472-77.
- Allaire, R., M. Muriuki, L. Gilbertson, and C. D. Harner. 2008. "Biomechanical Consequences of a Tear of the Posterior Root of the Medial Meniscus. Similar to Total Meniscectomy." *J Bone Joint Surg Am* 90: 1922-31.
- Allen, C. R., E. K. Wong, G. A. Livesay, M. Sakane, F. H. Fu, and S. L. Y. Woo. 2000. "Importance of the Medial Meniscus in the Anterior Cruciate Ligament-Deficient Knee." *Journal of Orthopaedic Research* 18: 109-15.
- Allen, M. J., J. E. Houlton, S. B. Adams, and N. Rushton. 1998. "The Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep." *Vet Surg* 27: 596-605.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan. 2003. "Silk-Based Biomaterials." *Biomaterials* 24: 401-16.
- Andrews, S., N. Shrive, and J. Ronsky. 2011. "The Shocking Truth About Meniscus." *J Biomech* 44: 2737-40.
- Andriacchi, T. P., A. Mundermann, R. L. Smith, E. J. Alexander, C. O. Dyrby, and S. Koo. 2004. "A Framework for the in Vivo Pathomechanics of Osteoarthritis at the Knee." *Annals of Biomedical Engineering* 32: 447-57.
- Arnoczky, S. P., and R. F. Warren. 1982. "Microvasculature of the Human Meniscus." *Am J Sports Med* 10: 90-5.
- Aumüller, Gerhard, Gabriela Aust, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, and Giovanni Maio. 2014. "Hüfte, Oberschenkel Und Knie." In *Duale Reihe: Anatomie*: Georg Thieme Verlag. 318-33.
- Baker, B. E., A. C. Peckham, F. Puppato, and J. C. Sanborn. 1985. "Review of Meniscal Injury and Associated Sports." *Am J Sports Med* 13: 1-4.
- Balint, E., C. J. Gatt, Jr., and M. G. Dunn. 2012. "Design and Mechanical Evaluation of a Novel Fiber-Reinforced Scaffold for Meniscus Replacement." *J Biomed Mater Res A* 100: 195-202.
- Baratz, M. E., F. H. Fu, and R. Mengato. 1986. "Meniscal Tears: The Effect of Meniscectomy and of Repair on Intraarticular Contact Areas and Stress in the Human Knee. A Preliminary Report." *Am J Sports Med* 14: 270-5.
- Barber, F. A., and M. A. Herbert. 2000. "Meniscal Repair Devices." *Arthroscopy* 16: 613-8.
- Batiste, D. L., A. Kirkley, S. Laverty, L. M. Thain, A. R. Spouge, and D. W. Holdsworth. 2004. "Ex Vivo Characterization of Articular Cartilage and Bone Lesions in a Rabbit Acl Transection Model of Osteoarthritis Using Mri and Micro-Ct." *Osteoarthritis Cartilage* 12: 986-96.
- Beaupre, A., R. Choukroun, R. Guidouin, R. Garneau, H. Gerardin, and A. Cardou. 1986. "Knee Menisci. Correlation between Microstructure and Biomechanics." *Clin Orthop Relat Res*: 72-5.
- Bernstein, J. 2010. "In Brief: Meniscal Tears." *Clin Orthop Relat Res* 468: 1190-2.

- Borjesson, M., E. Robertson, L. Weidenhielm, E. Mattsson, and E. Olsson. 1996. "Physiotherapy in Knee Osteoarthritis: Effect on Pain and Walking." *Physiother Res Int* 1: 89-97.
- Brophy, R. H., J. Cottrell, S. A. Rodeo, T. M. Wright, R. F. Warren, and S. A. Maher. 2010. "Implantation of a Synthetic Meniscal Scaffold Improves Joint Contact Mechanics in a Partial Meniscectomy Cadaver Model." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 92a: 1154-61.
- Bullough, P. G., L. Munuera, J. Murphy, and A. M. Weinstein. 1970. "The Strength of the Menisci of the Knee as It Relates to Their Fine Structure." *J Bone Joint Surg Br* 52: 564-7.
- Bylski-Austrow, D. I., J. Malumed, T. Meade, and E. S. Grood. 1993. "Knee Joint Contact Pressure Decreases after Chronic Meniscectomy Relative to the Acutely Meniscectomized Joint: A Mechanical Study in the Goat." *J Orthop Res* 11: 796-804.
- Casscells, S. W. 1980. "The Place of Arthroscopy in the Diagnosis and Treatment of Internal Derangement of the Knee: An Analysis of 1000 Cases." *Clin Orthop Relat Res*: 135-42.
- Cassinelli, C., G. Cascardo, M. Morra, L. Draghi, A. Motta, and G. Catapano. 2006. "Physical-Chemical and Biological Characterization of Silk Fibroin-Coated Porous Membranes for Medical Applications." *International Journal of Artificial Organs* 29: 881-92.
- Chen, L., P. D. Kim, C. S. Ahmad, and W. N. Levine. 2008. "Medial Collateral Ligament Injuries of the Knee: Current Treatment Concepts." *Curr Rev Musculoskelet Med* 1: 108-13.
- Cheung, H. S. 1987. "Distribution of Type-I, Type-Ii, Type-Iii, and Type-V in the Pepsin Solubilized Collagens in Bovine Menisci." *Connective Tissue Research* 16: 343-56.
- Chevrier, A., M. Nelea, M. B. Hurtig, C. D. Hoemann, and M. D. Buschmann. 2009. "Meniscus Structure in Human, Sheep, and Rabbit for Animal Models of Meniscus Repair." *J Orthop Res* 27: 1197-203.
- Chia, H. N., and M. L. Hull. 2008. "Compressive Moduli of the Human Medial Meniscus in the Axial and Radial Directions at Equilibrium and at a Physiological Strain Rate." *J Orthop Res* 26: 951-6.
- Choi, S. H., S. Bae, S. K. Ji, and M. J. Chang. 2012. "The Mri Findings of Meniscal Root Tear of the Medial Meniscus: Emphasis on Coronal, Sagittal and Axial Images." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20: 2098-103.
- Cole, B. J., T. R. Carter, and S. A. Rodeo. 2003. "Allograft Meniscal Transplantation: Background, Techniques, and Results." *Instr Course Lect* 52: 383-96.
- Costa, C. R., W. B. Morrison, and J. A. Carrino. 2004. "Medial Meniscus Extrusion on Knee Mri: Is Extent Associated with Severity of Degeneration or Type of Tear?". *AJR Am J Roentgenol* 183: 17-23.
- Crook, T. B., A. Ardolino, L. A. Williams, and I. W. Barlow. 2009. "Meniscal Allograft Transplantation: A Review of the Current Literature." *Ann R Coll Surg Engl* 91: 361-5.
- Day, B., W. G. Mackenzie, S. S. Shim, and G. Leung. 1985. "The Vascular and Nerve Supply of the Human Meniscus." *Arthroscopy* 1: 58-62.
- Dewair, M., X. Baur, and K. Ziegler. 1985. "Use of Immunoblot Technique for Detection of Human Ige and Igg Antibodies to Individual Silk Proteins." *J Allergy Clin Immunol* 76: 537-42.
- Dürselen, L, and M Freutel. 2015. "Biomechanik Des Meniskus." *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 10: 215-27.

- Dürselen, L., A. Hebisch, L. E. Claes, and G. Bauer. 2003. "Gapping Phenomenon of Longitudinal Meniscal Tears." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 18: 505-10.
- Elliott, D. M., R. Jones, 3rd, L. A. Setton, S. P. Scully, T. P. Vail, and F. Guilak. 2002. "Joint Degeneration Following Meniscal Allograft Transplantation in a Canine Model: Mechanical Properties and Semiquantitative Histology of Articular Cartilage." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10: 109-18.
- Elsner, J. J., S. Portnoy, G. Zur, F. Guilak, A. Shterling, and E. Linder-Ganz. 2010. "Design of a Free-Floating Polycarbonate-Urethane Meniscal Implant Using Finite Element Modeling and Experimental Validation." *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* 132.
- Englund, M., A. Guermazi, D. Gale, D. J. Hunter, P. Aliabadi, M. Clancy, and D. T. Felson. 2008. "Incidental Meniscal Findings on Knee Mri in Middle-Aged and Elderly Persons." *N Engl J Med* 359: 1108-15.
- Englund, M., and L. S. Lohmander. 2004. "Risk Factors for Symptomatic Knee Osteoarthritis Fifteen to Twenty-Two Years after Meniscectomy." *Arthritis Rheum* 50: 2811-9.
- Eyre, D. R., and J. J. Wu. 1983. "Collagen of Fibrocartilage - a Distinctive Molecular Phenotype in Bovine Meniscus." *Febs Letters* 158: 265-70.
- Fairbank, T. J. 1948. "Knee Joint Changes after Meniscectomy." *J Bone Joint Surg Br* 30B: 664-70.
- Fayard, J. M., H. Pereira, E. Servien, S. Lustig, and P. Neyret. 2010. "Meniscectomy: Global Results-Complications." In *The Meniscus*. 177-90.
- Ferrer-Roca, O., and C Vilalta. 1980. "Lesions of the Meniscus. Part I: Macroscopic and Histologic Findings." *Clin Orthop Relat Res* 146: 289-300.
- Fithian, D. C., M. A. Kelly, and V. C. Mow. 1990. "Material Properties and Structure-Function Relationships in the Menisci." *Clin Orthop Relat Res*: 19-31.
- Fukubayashi, T., and H. Kurosawa. 1980. "The Contact Area and Pressure Distribution Pattern of the Knee - a Study of Normal and Osteoarthrotic Knee Joints." *Acta Orthopaedica Scandinavica* 51: 871-79.
- Galley, N. K., J. P. Gleghorn, S. Rodeo, R. F. Warren, S. A. Maher, and L. J. Bonassar. 2011. "Frictional Properties of the Meniscus Improve after Scaffold-Augmented Repair of Partial Meniscectomy: A Pilot Study." *Clin Orthop Relat Res* 469: 2817-23.
- Garrett, W. E., Jr., M. F. Swiontkowski, J. N. Weinstein, J. Callaghan, R. N. Rosier, D. J. Berry, J. Harrast, and G. P. Derosa. 2006. "American Board of Orthopaedic Surgery Practice of the Orthopaedic Surgeon: Part-Ii, Certification Examination Case Mix." *J Bone Joint Surg Am* 88: 660-7.
- Gesundheitsberichterstattung, des Bundes. "Die 50 Häufigsten Operationen Der Vollstationären Patientinnen Und Patienten in Krankenhäusern (Rang, Anzahl, Anteil in Prozent). 2015." gbe-bund.de.
- Ghadially, F. N., J. M. A. Lalonde, and J. H. Wedge. 1983. "Ultrastructure of Normal and Torn Menisci of the Human Knee-Joint." *J Anat* 136: 773-91.
- Gruchenberg, K., A. Ignatius, B. Friemert, F. von Lübken, N. Skaer, K. Gellynck, O. Kessler, and L. Dürselen. 2015. "In Vivo Performance of a Novel Silk Fibroin Scaffold for Partial Meniscal Replacement in a Sheep Model." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 23: 2218-29.
- Gruchenberg, Katharina. "In Vivo Untersuchungen Neuartiger Seidenfibroin-Scaffolds Als Teilersatz Des Meniskus Am Schafmodell." Imu, 2013.
- Guo, H., S. A. Maher, and R. L. Spilker. 2013. "Biphasic Finite Element Contact Analysis of the Knee Joint Using an Augmented Lagrangian Method." *Med Eng Phys* 35: 1313-20.

- Gupte, C. M., A. M. Bull, R. Murray, and A. A. Amis. 2007. "Comparative Anatomy of the Meniscolfemoral Ligament in Humans and Some Domestic Mammals." *Anat Histol Embryol* 36: 47-52.
- Gupte, C. M., A. Smith, I. D. McDermott, A. M. J. Bull, R. D. Thomas, and A. A. Amis. 2002. "Meniscolfemoral Ligaments Revisited - Anatomical Study, Age Correlation and Clinical Implications." *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 84b: 846-51.
- Han, S. B., G. M. Shetty, D. H. Lee, D. J. Chae, S. S. Seo, K. H. Wang, S. H. Yoo, and K. W. Nha. 2010. "Unfavorable Results of Partial Meniscectomy for Complete Posterior Medial Meniscus Root Tear with Early Osteoarthritis: A 5- to 8-Year Follow-up Study." *Arthroscopy* 26: 1326-32.
- Hannink, G., T. G. van Tienen, A. J. Schouten, and P. Buma. 2011. "Changes in Articular Cartilage after Meniscectomy and Meniscus Replacement Using a Biodegradable Porous Polymer Implant." *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 19: 441-51.
- Hede, A., E. Larsen, and H. Sandberg. 1992. "Partial Versus Total Meniscectomy. A Prospective, Randomised Study with Long-Term Follow-Up." *J Bone Joint Surg Br* 74: 118-21.
- Heijkants, R. G., R. V. van Calck, J. H. De Groot, A. J. Pennings, A. J. Schouten, T. G. van Tienen, N. Ramrattan, P. Buma, and R. P. Veth. 2004. "Design, Synthesis and Properties of a Degradable Polyurethane Scaffold for Meniscus Regeneration." *J Mater Sci Mater Med* 15: 423-7.
- Heller, M. O., G. N. Duda, R. M. Ehrig, H. Schell, P. Seebeck, and W. R. Taylor. 2005. "Musculoskeletal Loading in the Sheep Hind Limb: Mechanical Boundary Conditions for Healing." *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik* 36: 775-80.
- Herrlin, S., M. Hallander, P. Wange, L. Weidenhielm, and S. Werner. 2007. "Arthroscopic or Conservative Treatment of Degenerative Medial Meniscal Tears: A Prospective Randomised Trial." *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 15: 393-401.
- Herwig, J., E. Egner, and E. Buddecke. 1984. "Chemical-Changes of Human Knee-Joint Menisci in Various Stages of Degeneration." *Annals of the Rheumatic Diseases* 43: 635-40.
- Hodler, J., P. Haghghi, M. N. Pathria, D. Trudell, and D. Resnick. 1992. "Meniscal Changes in the Elderly: Correlation of Mr Imaging and Histologic Findings." *Radiology* 184: 221-5.
- Huber, J., P. Lisinski, P. Kloskowska, A. Gronek, E. Lisiewicz, and T. Trzeciak. 2013. "Meniscus Suture Provides Better Clinical and Biomechanical Results at 1-Year Follow-up Than Meniscectomy." *Arch Orthop Trauma Surg* 133: 541-49.
- Hunter, D. J., Y. Q. Zhang, J. B. Niu, X. Tu, S. Amin, M. Clancy, A. Guermazi, M. Grigorian, D. Gale, and D. T. Felson. 2006. "The Association of Meniscal Pathologic Changes with Cartilage Loss in Symptomatic Knee Osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 54: 795-801.
- Ingman, A. M., P. Ghosh, and T. K. F. Taylor. 1974. "Variation of Collagenous and Non-Collagenous Proteins of Human Knee-Joint Menisci with Age and Degeneration." *Gerontologia* 20: 212-23.
- Jackson, D. W., G. E. Windler, and T. M. Simon. 1990. "Intraarticular Reaction Associated with the Use of Freeze-Dried, Ethylene Oxide-Sterilized Bone-Patella Tendon-Bone Allografts in the Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament." *American Journal of Sports Medicine* 18: 1-11.
- Jakobson, BW. 2007. "Meniscal Injuries. Isakos/Esska Standard Terminology, Definitions, Classification and Scoring Systems for Arthroscopy: Knee, Shoulder and Ankle Joint. Isakos/Esska."

- Jerosch, J., M. Prymka, and W. H. Castro. 1996. "Proprioception of Knee Joints with a Lesion of the Medial Meniscus." *Acta Orthop Belg* 62: 41-5.
- Joshi, M. D., J. K. Suh, T. Marui, and S. L. Woo. 1995. "Interspecies Variation of Compressive Biomechanical Properties of the Meniscus." *J Biomed Mater Res* 29: 823-8.
- Kelly, B. T., W. Robertson, H. G. Potter, X. H. Deng, A. S. Turner, S. Lyman, R. F. Warren, and S. A. Rodeo. 2007. "Hydrogel Meniscal Replacement in the Sheep Knee: Preliminary Evaluation of Chondroprotective Effects." *Am J Sports Med* 35: 43-52.
- Kohn, D., M. Rudert, C. J. Wirth, W. Plitz, G. Reiss, and H. Maschek. 1997. "Medial Meniscus Replacement by a Fat Pad Autograft - an Experimental Study in Sheep." *Int Orthop* 21: 232-38.
- Kon, E., G. Filardo, M. Tschon, M. Fini, G. Giavaresi, L. M. Reggiani, C. Chiari, S. Nehrer, I. Martin, D. M. Salter, L. Ambrosio, and M. Marcacci. 2012. "Tissue Engineering for Total Meniscal Substitution: Animal Study in Sheep Model-Results at 12 Months." *Tissue Engineering Part A* 18: 1573-82.
- Krause, W. R., M. H. Pope, R. J. Johnson, and D. G. Wilder. 1976. "Mechanical Changes in the Knee after Meniscectomy." *J Bone Joint Surg Am* 58: 599-604.
- Kumm, J., F. W. Roemer, A. Guermazi, A. Turkiewicz, and M. Englund. 2016. "Natural History of Intrameniscal Signal Intensity on Knee Mr Images: Six Years of Data from the Osteoarthritis Initiative." *Radiology* 278: 164-71.
- Kurosawa, H., T. Fukubayashi, and H. Nakajima. 1980. "Load-Bearing Mode of the Knee Joint: Physical Behavior of the Knee Joint with or without Menisci." *Clin Orthop Relat Res*: 283-90.
- Le Graverand, M. P. H., Y. Ou, T. Schield-Yee, L. Barclay, D. Hart, T. Natsume, and J. B. Rattner. 2001. "The Cells of the Rabbit Meniscus: Their Arrangement, Interrelationship, Morphological Variations and Cytoarchitecture." *J Anat* 198: 525-35.
- Lechner, K., M. L. Hull, and S. M. Howell. 2000. "Is the Circumferential Tensile Modulus within a Human Medial Meniscus Affected by the Test Sample Location and Cross-Sectional Area?". *J Orthop Res* 18: 945-51.
- Lee, S. J., K. J. Aadalen, P. Malaviya, E. P. Lorenz, J. K. Hayden, J. Farr, R. W. Kang, and B. J. Cole. 2006. "Tibiofemoral Contact Mechanics after Serial Medial Meniscectomies in the Human Cadaveric Knee." *Am J Sports Med* 34: 1334-44.
- Lee-Shee, N. K., J. P. Dickey, and M. B. Hurtig. 2007. "Contact Mechanics of the Ovine Stifle During Simulated Early Stance in Gait. An in Vitro Study Using Robotics." *Vet Comp Orthop Traumatol* 20: 70-2.
- Lerer, DB, Hilary R Umans, MX Hu, and MH Jones. 2004. "The Role of Meniscal Root Pathology and Radial Meniscal Tear in Medial Meniscal Extrusion." *Skeletal radiology* 33: 569-74.
- Little, C. B., M. M. Smith, M. A. Cake, R. A. Read, M. J. Murphy, and F. P. Barry. 2010. "The Oarsi Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in Sheep and Goats." *Osteoarthritis and Cartilage* 18: S80-S92.
- Lubowitz, J. H., P. C. Verdonk, J. B. Reid, 3rd, and R. Verdonk. 2007. "Meniscus Allograft Transplantation: A Current Concepts Review." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15: 476-92.
- Maher, S. A., S. A. Rodeo, S. B. Doty, R. Brophy, H. Potter, L. F. Foo, L. Rosenblatt, X. H. Deng, A. S. Turner, T. M. Wright, and R. F. Warren. 2010. "Evaluation of a Porous Polyurethane Scaffold in a Partial Meniscal Defect Ovine Model." *Arthroscopy* 26: 1510-9.
- Majewski, M., H. Susanne, and S. Klaus. 2006. "Epidemiology of Athletic Knee Injuries: A 10-Year Study." *Knee* 13: 184-8.

- Makris, E. A., P. Hadidi, and K. A. Athanasiou. 2011. "The Knee Meniscus: Structure-Function, Pathophysiology, Current Repair Techniques, and Prospects for Regeneration." *Biomaterials* 32: 7411-31.
- Mankin, H. J., H. Dorfman, L. Lippiello, and A. Zarins. 1971. "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* 53: 523-37.
- Martini, L., M. Fini, G. Giavaresi, and R. Giardino. 2001. "Sheep Model in Orthopedic Research: A Literature Review." *Comp Med* 51: 292-9.
- Masouros, S. D., I. D. McDermott, A. A. Amis, and A. M. J. Bull. 2008. "Biomechanics of the Meniscus-Meniscal Ligament Construct of the Knee." *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 16: 1121-32.
- Masouros, S. D., I. D. McDermott, A. M. Bull, and A. A. Amis. 2010. "Biomechanics." In *The Meniscus*, eds. P. Beaufils and Verdonk P.: Springer Verlag. 29-37.
- Matsubara, H., K. Okazaki, T. Izawa, Y. Tashiro, S. Matsuda, T. Nishimura, Y. Nakanishi, H. Kawamura, and Y. Iwamoto. 2012. "New Suture Method for Radial Tears of the Meniscus Biomechanical Analysis of Cross-Suture and Double Horizontal Suture Techniques Using Cyclic Load Testing." *American Journal of Sports Medicine* 40: 414-18.
- Matthews, P., and D. M. M. StPierre. 1996. "Recovery of Muscle Strength Following Arthroscopic Meniscectomy." *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* 23: 18-26.
- McDermott, I. D., and A. A. Amis. 2006. "The Consequences of Meniscectomy." *J Bone Joint Surg Br* 88: 1549-56.
- Mcdevitt, C. A., and R. J. Webber. 1990. "The Ultrastructure and Biochemistry of Meniscal Cartilage." *Clin Orthop Relat Res*: 8-18.
- Meinel, L., S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan. 2005. "The Inflammatory Responses to Silk Films in Vitro and in Vivo." *Biomaterials* 26: 147-55.
- Merriam, A. R., J. M. Patel, B. M. Culp, C. J. Gatt, Jr., and M. G. Dunn. 2015. "Successful Total Meniscus Reconstruction Using a Novel Fiber-Reinforced Scaffold: A 16- and 32-Week Study in an Ovine Model." *Am J Sports Med* 43: 2528-37.
- Messner, K., and J. Gao. 1998. "The Menisci of the Knee Joint. Anatomical and Functional Characteristics, and a Rationale for Clinical Treatment." *J Anat* 193 (Pt 2): 161-78.
- Metcalf, M. H., and G. R. Barrett. 2004. "Prospective Evaluation of 1485 Meniscal Tear Patterns in Patients with Stable Knees." *Am J Sports Med* 32: 675-80.
- Milachowski, K. A., K. Weismeier, and C. J. Wirth. 1989. "Homologous Meniscus Transplantation - Experimental and Clinical-Results." *Int Orthop* 13: 1-11.
- Mohr, Winfried. 2000. "Reaktionsformen Des Organisierten Bindegewebes." In *Gelenkpathologie: Historische Grundlagen, Ursachen Und Entwicklungen Von Gelenkleiden Und Ihre Pathomorphologie*: Springer-Verlag. 62-83.
- Mow, Van C, and Rik Huiskes. 2005. "Structure and Function of Articular Cartilage and Meniscus." In *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*, eds. Van C Mow and Rik Huiskes: Lippincott Williams & Wilkins. 181-258.
- Mutschler, W., and L. Claes. 1985. *Knorpeltransplantation. Tierexperimentelle Untersuchungen Über Biomechanik Und Morphologie Von Autologen Und Homologen Knorpelstücktransplantaten Sowie Homologen Chondrozytensuspensionen.* : Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Nakata, K., K. Shino, M. Hamada, T. Mae, T. Miyama, H. Shinjo, S. Horibe, K. Tada, T. Ochi, and H. Yoshikawa. 2001. "Human Meniscus Cell: Characterization of the Primary Culture and Use for Tissue Engineering." *Clin Orthop Relat Res*: S208-18.
- Nielsen, A. B., and J. Yde. 1991. "Epidemiology of Acute Knee Injuries: A Prospective Hospital Investigation." *J Trauma* 31: 1644-8.
- Nishimuta, J. F., and M. E. Levenston. 2012. "Response of Cartilage and Meniscus Tissue Explants to in Vitro Compressive Overload." *Osteoarthritis Cartilage* 20: 422-9.
- Noble, J. 1977. "Lesions of the Menisci. Autopsy Incidence in Adults Less Than Fifty-Five Years Old." *J Bone Joint Surg Am* 59: 480-3.
- Noble, J., and D. L. Hamblen. 1975. "The Pathology of the Degenerate Meniscus Lesion." *J Bone Joint Surg Br* 57: 180-6.
- O'Donoghue, D. H. 1964. "The Unhappy Triad: Etiology, Diagnosis and Treatment." *Am J Orthop* 6: 242-7 PASSIM.
- Odgaard, A., C. M. Pedersen, S. M. Bentzen, J. Jorgensen, and I. Hvid. 1989. "Density Changes at the Proximal Tibia after Medial Meniscectomy." *Journal of Orthopaedic Research* 7: 744-53.
- Odian, George. 2004. *Principles of Polymerization*: John Wiley & Sons.
- Outerbridge, R. E. 1961. "The Etiology of Chondromalacia Patellae." *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 43: 752-57.
- Pagnani, M. J., D. E. Cooper, and R. F. Warren. 1991. "Extrusion of the Medial Meniscus." *Arthroscopy* 7: 297-300.
- Panilaitis, B., G. H. Altman, J. Chen, H. J. Jin, V. Karageorgiou, and D. L. Kaplan. 2003. "Macrophage Responses to Silk." *Biomaterials* 24: 3079-85.
- Parsons, F. G. 1900. "The Joints of Mammals Compared with Those of Man: A Course of Lectures Delivered at the Royal College of Surgeons of England: Part II." *J Anat Physiol* 34: 301-23.
- Pastoureau, P., and A. Chomel. 2004. "Methods for Cartilage and Subchondral Bone Histomorphometry." *Methods Mol Med* 101: 79-91.
- Patel, J. M., A. R. Merriam, B. M. Culp, C. J. Gatt, Jr., and M. G. Dunn. 2016. "One-Year Outcomes of Total Meniscus Reconstruction Using a Novel Fiber-Reinforced Scaffold in an Ovine Model." *Am J Sports Med* 44: 898-907.
- Pauli, C., S. P. Grogan, S. Patil, S. Otsuki, A. Hasegawa, J. Koziol, M. K. Lotz, and D. D. D'Lima. 2011. "Macroscopic and Histopathologic Analysis of Human Knee Menisci in Aging and Osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* 19: 1132-41.
- Paxton, E. S., M. V. Stock, and R. H. Brophy. 2011. "Meniscal Repair Versus Partial Meniscectomy: A Systematic Review Comparing Reoperation Rates and Clinical Outcomes." *Arthroscopy* 27: 1275-88.
- Pellacci, F, H Zmerly, and G Sacco. 1997. "Anatomia Patologica Dei Menischi." *JOURNAL OF SPORTS TRAUMATOLOGY AND RELATED RESEARCH* 19: 2-5.
- Pereira, H , R Varatojo, N Sevivas, L Serratos, PL Ripoll, JM Oliveira, RL Reis, and J Espregueira-Mendes. 2016. "Physiopathology of the Meniscal Lesions." In *Surgery of the Meniscus*, eds. Hulet C., Pereira H., Peretti G. and Denti M.: Springer Verlag. 47-61.
- Peters, T. J., and I. S. Smillie. 1972. "Studies on Chemical Composition of Menisci of Knee-Joint with Special Reference to Horizontal Cleavage Lesion." *Clin Orthop Relat Res*: 245-&.
- Petersen, W., and B. Tillmann. 1995. "Age-Related Blood and Lymph Supply of the Knee Menisci - a Cadaver Study." *Acta Orthopaedica Scandinavica* 66: 308-12.
- . 1998. "Collagenous Fibril Texture of the Human Knee Joint Menisci." *Anatomy and Embryology* 197: 317-24.

- Poehling, G. G., D. S. Ruch, and S. J. Chabon. 1990. "The Landscape of Meniscal Injuries." *Clin Sports Med* 9: 539-49.
- Policard, Albert. 1936. *Physiologie Générale Des Articulations À L'état Normal Et Pathologique*: Masson.
- Proffen, B. L., M. McElfresh, B. C. Fleming, and M. M. Murray. 2012. "A Comparative Anatomical Study of the Human Knee and Six Animal Species." *Knee* 19: 493-9.
- Radoievitch, S. 1931. "Les Ligaments Des Ménisques Interarticulaires Du Genou." *Ann Anat Pathol* 8: 400-13.
- Renstrom, P., and R. J. Johnson. 1990. "Anatomy and Biomechanics of the Menisci." *Clinics in Sports Medicine* 9: 523-38.
- Rodkey, W. G., K. E. DeHaven, W. H. Montgomery, 3rd, C. L. Baker, Jr., C. L. Beck, Jr., S. E. Hormel, J. R. Steadman, B. J. Cole, and K. K. Briggs. 2008. "Comparison of the Collagen Meniscus Implant with Partial Meniscectomy. A Prospective Randomized Trial." *J Bone Joint Surg Am* 90: 1413-26.
- Rongen, J. J., T. G. van Tienen, B. van Bochove, D. W. Grijpma, and P. Buma. 2014. "Biomaterials in Search of a Meniscus Substitute." *Biomaterials* 35: 3527-40.
- Roos, E. M. 2005. "Joint Injury Causes Knee Osteoarthritis in Young Adults." *Curr Opin Rheumatol* 17: 195-200.
- Roos, H., M. Lauren, T. Adalberth, E. M. Roos, K. Jonsson, and L. S. Lohmander. 1998. "Knee Osteoarthritis after Meniscectomy: Prevalence of Radiographic Changes after Twenty-One Years, Compared with Matched Controls." *Arthritis Rheum* 41: 687-93.
- Rossitch, E., Jr., D. E. Bullard, and W. J. Oakes. 1987. "Delayed Foreign-Body Reaction to Silk Sutures in Pediatric Neurosurgical Patients." *Childs Nerv Syst* 3: 375-8.
- Roth, V., and V. C. Mow. 1980. "The Intrinsic Tensile Behavior of the Matrix of Bovine Articular-Cartilage and Its Variation with Age." *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 62: 1102-17.
- Rubman, M. H., F. R. Noyes, and S. D. Barber-Westin. 1998. "Arthroscopic Repair of Meniscal Tears That Extend into the Avascular Zone - a Review of 198 Single and Complex Tears." *American Journal of Sports Medicine* 26: 87-95.
- Salata, M. J., A. E. Gibbs, and J. K. Sekiya. 2010. "A Systematic Review of Clinical Outcomes in Patients Undergoing Meniscectomy." *Am J Sports Med* 38: 1907-16.
- Salthouse, T. N., B. F. Matlaga, and M. H. Wykoff. 1977. "Comparative Tissue Response to Six Suture Materials in Rabbit Cornea, Sclera, and Ocular Muscle." *Am J Ophthalmol* 84: 224-33.
- Sanchez-Adams, J., V. P. Willard, and K. A. Athanasiou. 2011. "Regional Variation in the Mechanical Role of Knee Meniscus Glycosaminoglycans." *Journal of Applied Physiology* 111: 1590-96.
- Sanchez-Soler, J., R. Torres-Claramunt, D. Pape, and J.C. Monllau. 2016. "Biomechanics of Meniscal Repair." In *Surgery of the Meniscus*, eds. C. Hulet, H. Pereira, G. M. Peretti and M. Denti: Springer Verlag. 201-09.
- Sandmann, G. H., C. Adamczyk, E. Grande Garcia, S. Doebele, A. Buettner, S. Milz, A. B. Imhoff, S. Vogt, R. Burgkart, and T. Tischer. 2013. "Biomechanical Comparison of Menisci from Different Species and Artificial Constructs." *BMC Musculoskeletal Disord* 14: 324.
- Santin, M., A. Motta, G. Freddi, and M. Cannas. 1999. "In Vitro Evaluation of the Inflammatory Potential of the Silk Fibroin." *J Biomed Mater Res* 46: 382-89.
- Schimmer, R. C., K. B. Brulhart, C. Duff, and W. Glinz. 1998. "Arthroscopic Partial Meniscectomy: A 12-Year Follow-up and Two-Step Evaluation of the Long-Term Course." *Arthroscopy* 14: 136-42.

- Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher. 2014. "Untere Extremität: 1. Knochen, Bänder Und Gelenke." In *Prometheus Lernatlas Der Anatomie. Allgemeine Anatomie Und Bewegungssystem*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 410-79.
- Seedhom, B. B. 1976. "Loadbearing Function of the Menisci." *Physiotherapy* 62: 223.
- Seedhom, BB., and DJ. Hargreaves. 1979. "Transmission of the Load in the Knee Joint with Special Reference to the Role of the Menisci. Part Ii: Experimental Results, Discussion and Conclusions." *Engineering in Medicine* 8: 220-28.
- Seil, R., and D. Pape. 2010. "Meniscal Repair: Biomechanics." In *The Meniscus*, eds. P. Beaufils and Verdonk P.: Springer Verlag. 107.
- Seitz, A. M., A. Lubomierski, B. Friemert, A. Ignatius, and L. Dürselen. 2012. "Effect of Partial Menisectomy at the Medial Posterior Horn on Tibiofemoral Contact Mechanics and Meniscal Hoop Strains in Human Knees." *J Orthop Res* 30: 934-42.
- Seo, Y. K., H. H. Yoon, K. Y. Song, S. Y. Kwon, H. S. Lee, Y. S. Park, and J. K. Park. 2009. "Increase in Cell Migration and Angiogenesis in a Composite Silk Scaffold for Tissue-Engineered Ligaments." *Journal of Orthopaedic Research* 27: 495-503.
- Sinowatz, F., and H. Hees. 2006. "19. Bewegungsapparat." In *Kurzlehrbuch Der Zytologie, Histologie Und Mikroskopischen Anatomie*, ed. Eigenverlag. 471-79.
- Soong, H. K., and K. R. Kenyon. 1984. "Adverse Reactions to Virgin Silk Sutures in Cataract Surgery." *Ophthalmology* 91: 479-83.
- Stevens, A., and J. Lowe. 1997. "13. Bewegungsapparat." In *Histologie Des Menschen*: Chapman & Hall GmbH, Weinheim. 227-50.
- Stone, K. R., W. G. Rodkey, R. J. Webber, L. McKinney, and J. R. Steadman. 1990. "Future Directions. Collagen-Based Prostheses for Meniscal Regeneration." *Clin Orthop Relat Res*: 129-35.
- Stone, K. R., W. G. Rodkey, R. Webber, L. Mckinney, and J. R. Steadman. 1992. "Meniscal Regeneration with Copolymeric Collagen Scaffolds - Invitro and Invivo Studies Evaluated Clinically, Histologically, and Biochemically." *American Journal of Sports Medicine* 20: 104-11.
- Stone, K. R., J. R. Steadman, W. G. Rodkey, and S. T. Li. 1997. "Regeneration of Meniscal Cartilage with Use of a Collagen Scaffold - Analysis of Preliminary Data." *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 79a: 1770-77.
- Südkamp, NP, and W Köstler. 2004. "Minimalinvasive Unfallchirurgie." *Trauma und Berufskrankheit* 6: S455-S63.
- Sweigart, M. A., C. F. Zhu, D. M. Burt, P. D. DeHoll, C. M. Agrawal, T. O. Clanton, and K. A. Athanasiou. 2004. "Intraspecies and Interspecies Comparison of the Compressive Properties of the Medial Meniscus." *Ann Biomed Eng* 32: 1569-79.
- Szomor, Z. L., T. E. Martin, F. Bonar, and G. A. Murrell. 2000. "The Protective Effects of Meniscal Transplantation on Cartilage. An Experimental Study in Sheep." *J Bone Joint Surg Am* 82: 80-8.
- Takroni, T., L. Laouar, A. Adesida, J. A. Elliott, and N. M. Jomha. 2016. "Anatomical Study: Comparing the Human, Sheep and Pig Knee Meniscus." *J Exp Orthop* 3: 35.
- Taylor, W. R., R. M. Ehrig, M. O. Heller, H. Schell, P. Seebeck, and G. N. Duda. 2006. "Tibio-Femoral Joint Contact Forces in Sheep." *J Biomech* 39: 791-8.
- Taylor, W. R., M. O. Heller, G. Bergmann, and G. N. Duda. 2004. "Tibio-Femoral Loading During Human Gait and Stair Climbing." *J Orthop Res* 22: 625-32.
- Taylor, W. R., B. M. Poeplau, C. Konig, R. M. Ehrig, S. Zachow, G. N. Duda, and M. O. Heller. 2011. "The Medial-Lateral Force Distribution in the Ovine Stifle Joint During Walking." *Journal of Orthopaedic Research* 29: 567-71.
- Thomas, C. 1996. "22. Gelenke." In *Spezielle Pathologie*: Schattauer Verlag, Stuttgart. 577-90.

- Thompson, W. O., F. L. Thaete, F. H. Fu, and S. F. Dye. 1991. "Tibial Meniscal Dynamics Using 3-Dimensional Reconstruction of Magnetic-Resonance Images." *American Journal of Sports Medicine* 19: 210-16.
- Tienen, T. G., R. G. Heijkants, J. H. de Groot, A. J. Schouten, A. J. Pennings, R. P. Veth, and P. Buma. 2006. "Meniscal Replacement in Dogs. Tissue Regeneration in Two Different Materials with Similar Properties." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76: 389-96.
- Tissakht, M., and A. M. Ahmed. 1995. "Tensile Stress-Strain Characteristics of the Human Meniscal Material." *J Biomech* 28: 411-22.
- Vandeweerd, J. M., F. Hontoir, N. Kirschvink, P. Clegg, J. F. Nisolle, N. Antoine, and P. Gustin. 2013. "Prevalence of Naturally Occurring Cartilage Defects in the Ovine Knee." *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1125-31.
- Vangsness, C. T., Jr., I. A. Garcia, C. R. Mills, M. A. Kainer, M. R. Roberts, and T. M. Moore. 2003. "Allograft Transplantation in the Knee: Tissue Regulation, Procurement, Processing, and Sterilization." *Am J Sports Med* 31: 474-81.
- Vedi, V., A. Williams, S. J. Tennant, E. Spouse, D. M. Hunt, and W. M. Gedroyc. 1999. "Meniscal Movement. An in-Vivo Study Using Dynamic Mri." *J Bone Joint Surg Br* 81: 37-41.
- Verbruggen, G., R. Verdonk, E. M. Veys, P. Van Daele, P. De Smet, K. Van den Abbeele, B. Claus, and D. Baeten. 1996. "Human Meniscal Proteoglycan Metabolism in Long-Term Tissue Culture." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 4: 57-63.
- Verdonk, P., and P. Vererfve. 2010. "Traumatic Lesions: Stable Knee, Acl Knee." In *The Meniscus*, eds. P. Beaufils and P. Verdonk: Springer Verlag. 45-49.
- Verdonk, R., and FA. Almqvist. 2005. "Lésions Traumatiques Des Ménisques Du Genou." In *Emc: Appareil Locomoteur*: Elsevier, Paris. 1-16.
- Verdonk, R., K. F. Almqvist, W. Huysse, and P. C. Verdonk. 2007. "Meniscal Allografts: Indications and Outcomes." *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 15: 121-25.
- Verdonk, R., P. Verdonk, W. Huysse, R. Forsyth, and E. L. Heinrichs. 2011. "Tissue Ingrowth after Implantation of a Novel, Biodegradable Polyurethane Scaffold for Treatment of Partial Meniscal Lesions." *Am J Sports Med* 39: 774-82.
- Voloshin, A. S., and J. Wosk. 1983. "Shock Absorption of Meniscectomized and Painful Knees: A Comparative in Vivo Study." *J Biomed Eng* 5: 157-61.
- Vrancken, A. C., P. Buma, and T. G. van Tienen. 2013. "Synthetic Meniscus Replacement: A Review." *Int Orthop* 37: 291-9.
- Vrancken, A. C., W. Madej, G. Hannink, N. Verdonschot, T. G. van Tienen, and P. Buma. 2015. "Short Term Evaluation of an Anatomically Shaped Polycarbonate Urethane Total Meniscus Replacement in a Goat Model." *PLoS One* 10: e0133138.
- Walker, P. S., and M. J. Erkman. 1975. "The Role of the Menisci in Force Transmission across the Knee." *Clin Orthop Relat Res*: 184-92.
- Wang, C. J., and P. S. Walker. 1974. "Rotatory Laxity of the Human Knee Joint." *J Bone Joint Surg Am* 56: 161-70.
- Webber, R. J., M. G. Harris, and A. J. Hough, Jr. 1985. "Cell Culture of Rabbit Meniscal Fibrochondrocytes: Proliferative and Synthetic Response to Growth Factors and Ascorbate." *J Orthop Res* 3: 36-42.
- Weiss, C. B., M. Lundberg, P. Hamberg, K. E. DeHaven, and J. Gillquist. 1989. "Non-Operative Treatment of Meniscal Tears." *J Bone Joint Surg Am* 71: 811-22.
- Welsing, R. T. C., T. G. van Tienen, N. Ramrattan, R. Heijkants, A. J. Schouten, R. F. H. Veth, and P. Buma. 2008. "Effect on Tissue Differentiation and Articular Cartilage Degradation of a Polymer Meniscus Implant - a 2-Year Follow-up Study in Dogs." *American Journal of Sports Medicine* 36: 1978-89.

-
- Wen, C. M., S. T. Ye, L. X. Zhou, and Y. Yu. 1990. "Silk-Induced Asthma in Children: A Report of 64 Cases." *Ann Allergy* 65: 375-8.
- Wirth, C. J., G. Peters, K. A. Milachowski, K. G. Weismeier, and D. Kohn. 2002. "Long-Term Results of Meniscal Allograft Transplantation." *Am J Sports Med* 30: 174-81.
- Yoshioka, M., R. D. Coutts, D. Amiel, and S. A. Hacker. 1996. "Characterization of a Model of Osteoarthritis in the Rabbit Knee." *Osteoarthritis Cartilage* 4: 87-98.
- Zaoming, W., R. Codina, E. Fernandez-Caldas, and R. F. Lockey. 1996. "Partial Characterization of the Silk Allergens in Mulberry Silk Extract." *J Investig Allergol Clin Immunol* 6: 237-41.
- Zimny, M. L., D. J. Albright, and E. Dabezies. 1988. "Mechanoreceptors in the Human Medial Meniscus." *Acta Anat (Basel)* 133: 35-40.
- Zur, G., E. Linder-Ganz, J. J. Elsner, J. Shani, O. Brenner, G. Agar, E. B. Hershman, S. P. Arnoczky, F. Guilak, and A. Shterling. 2011. "Chondroprotective Effects of a Polycarbonate-Urethane Meniscal Implant: Histopathological Results in a Sheep Model." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19: 255-63.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anita Ignatius und Herrn Prof. Dr. Lutz Dürselen, für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm. Vielen Dank für Ihre Unterstützung, Ihre Wertschätzung und Ihr Vertrauen.

Herzlichen Dank an Eckhard Wolf für die Übernahme meiner Dissertation als Doktorvater.

Vielen Dank an die Bundeswehr für die Förderung der Studie im Rahmen des zivil-militärischen Verbundprojektes zwischen der Universität Ulm und dem Bundeswehrkrankenhaus Ulm (E/U2AD/ED001/EF551).

Mein großer Dank gilt Dr. Falk von Lübken, der nicht nur seine Feierabende opferte um mir bei der Erlernung der Operationstechnik zu helfen, sondern mich auch an allen Operationstagen unterstützte. Ich bin stolz, dass ich so viel von dir lernen durfte.

Vielen Dank an Uschi Maile für die große Hilfe bei der OP-Vorbereitung und an Julian Schülke für die Assistenz an den Operationstagen sowie die große Hilfe im Stall.

Danke an die Tierpfleger des Tierforschungszentrums der Universität Ulm, die mir immer tatkräftig zur Seite standen. Besonders zu erwähnen sind hier Wilhelm Gebel, Ricco Richter, Hermann Klassen und Kurt Steinhauer. Danke für die liebevolle und zuverlässige Versorgung meiner Schafe.

Mein unendlicher Dank gilt meiner Kollegin und Freundin Daniela Warnecke für die unzähligen Stunden, die sie mit mir während der Auswertung im Labor verbrachte. Danke für deine unermüdliche Unterstützung in allen Belangen. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Luisa de Roy und Janine Schneider bedanken, die uns an den langen Labortagen mental und physisch zur Seite standen.

Vielen Dank an die gesamte „Kniegruppe“ für die große Unterstützung und Weiterbildung in Sachen Mechanik. Besonderer Dank gilt hier Steffen Hacker für die Hilfe mit Matlab.

Uschi Maile, Marion Tomo und Chérise Grieser gilt mein Dank für die Anfertigung der unzähligen histologischen Präparate.

Mein besonderer Dank gilt Patrizia Horny für die tollen Bilder und Grafiken, die sie in mühevoller Arbeit für meine Dissertation angefertigt hat.

Danke an Prof. Dr. Volker Rasche und Anne Subgang für die Möglichkeit zur Durchführung der MRT-Untersuchung an der Core-Facility *Kleintier-MRT*.

Mein unendlicher Dank geht an meinen Verlobten Julian. Dafür, dass er mich immer wieder aufgebaut hat und in allen Höhen und Tiefen der letzten Zeit für mich da war.

Und schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die es mir überhaupt ermöglichte meinen Traumberuf zu erlernen. Danke für deine bedingungslose Unterstützung während Studium und Promotion.