

**Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München**

**Tissue Engineering des Meniskus.
In vivo Untersuchungen von zellbesiedelten Kollagenmatrizes am Schafmodell**

Stephan Nitschke

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.**

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

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.- Prof. Dr. A. Imhoff**
- 2. Univ.- Prof. Dr. B. Gänsbacher**

**Die Dissertation wurde am 21.09.2005 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 29.03.2006 angenommen.**

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
2. Methoden und Materialien	11
2.1 Vorversuche	11
2.1.1 Meniskusbiopsie	11
2.1.2 Isolierung und Kultivierung, Zählen der Zellen	11
2.1.3 Besiedelung von Kollagenmatrizes	12
2.2 Tiermodell und Studiendesign	14
2.2.1 Medikation und Haltung der Tiere	16
2.2.2 Meniskusbiopsie	16
2.2.3 Isolierung und Kultur, Proliferation der Zellen	17
2.2.4 Gen-Markierung der Zellen mit β -Galaktosidase	17
2.2.5 Besiedelung der Kollagenmatrizes	18
2.2.6 Implantation der tissue-engineerten Kollagenmenisken	19
2.2.7 Achillessehnendurchtrennung	20
2.2.8 Opferung der Tiere	21
2.3 Untersuchungsmethoden an den tissue-engineerten Menisken	21
2.3.1 Synovialanalyse und Abstrich	21
2.3.2 Makroskopische Beurteilung der Explantate	22
2.3.3 Makroskopische Beurteilung der Gelenkflächen	22
2.3.4 Histologische Beurteilung der tissue-engineerten Menisken	22
2.3.5 Biomechanische Messungen	23
2.4 Verwendete Materialien	25
2.5 Datenauswertung und Statistik	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Vorversuche	26
3.1.1 Proliferationsverhalten der Kaninchen-Fibrochondrocyten	26
3.1.2 Histologische Ergebnisse der in vitro-Besiedelungen	26
3.2 Ergebnisse der Tierstudie	30

3.2.1	Proliferationsverhalten der Fibrochondrocyten, Besiedelung der Kollagenmenisken	30
3.2.2	Stabilität der β -Galaktosidase-Expression in vivo	31
3.2.3	Histologische Kontrolle der besiedelten Kollagenmenisken bei Implantation	32
3.2.4	Heilung der Achillessehne	33
3.3.1	Gelenksabstrich	33
3.3.2	Makroskopische Beurteilung der Explantate	34
3.3.3	Beurteilung der Gelenkflächen	38
3.3.4	Histologische Ergebnisse	41
3.3.5	Biomechanische Messungen	68
4.	Diskussion	72
4.1	Vorversuche	72
4.2.1	Kultur der Fibrochondrocyten	72
4.2.2	Stabilität der β -Galaktosidase-Expression in vitro und in vivo	75
4.2.3	Implantation	77
4.2.4	Heilung der Achillessehne	80
4.3.1	Makroskopische Beurteilung der Explantate	81
4.3.2	Beurteilung der Gelenkflächen	82
4.3.3	Biomechanische Messungen	83
4.3.4	Histologien	85
4.4	Meniskustransplantation und Ausblick	86
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	93
	Anhang	116
	Dankvermerk	116

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BMI	Body Mass Index
BMP-2	Bone-morphogenic protein-2
CMI®	Collagen Meniskus Implantat®
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblastic growth factor
GAG	Glykosaminoglykane
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
HIV	Human-Imunodeficiency-Virus
human PL	Human platelet lysate
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
IP	Infektiöse Partikel
LacZ	β-Galaktosidase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MCL	Medial Collateral Ligament
Min.	Minute(n)
Mon.	Monate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF-AB	Platelet-derived growth-factor-AB
Pen.	Penicillin
PGA	Polyglycolic acid (Glykolsäure)
PGLA	Polyglycolic/polylactic acid (Kombination)
PLLA	Poly-L-lactic acid (Milchsäure)
rpm	Rounds per minute
sec.	Sekunde(n)
Strep.	Streptomycin
TGF-β	Transforming growth factor-β
VKB	Vorderes Kreuzband
Wo.	Wochen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside

1. Einleitung

Die Menisken sind im Knie verantwortlich für Schockabsorption, Verteilung des Gewichts, Stabilität des Gelenks sowie für die Schmierung des Gelenks (Seedhom et al. 1979, S. 225; Voloshin et al. 1983, S. 159; Shoemaker et al. 1986, S. 76; MacConaill 1932, S. 210).

Sie übertragen zwischen 45 % und 60 % der Last, in 90° Beugung sogar bis zu 95 %, hauptsächlich über das Hinterhorn (Seedhom 1979, S. 215; Seedhom et al. 1979, S. 225; Ahmed et al. 1983, S. 223). Über eine vergrößerte tibio-femorale Kontaktfläche wird das Gewicht verteilt, wodurch ein verminderter Belastungsdruck entsteht (Walker et al. 1975, S. 190).

Sie liegen halbmondförmig (griech. menískos = mondsichelförmiger Körper) zwischen den femoralen Kondylen und dem Tibiaplateau. Die Kondylen sind in Kontakt mit der kranialen Fläche der Menisken, die konkav ist. Die kaudale und fast ebene Fläche der Menisken liegt dem Tibiaplateau auf.

Der mediale Meniskus hat eine ovale Form und bedeckt ungefähr 30 % des medialen Tibiaplateaus. Vorne ist er durch das Ligamentum transversum genus mit dem lateralen Meniskus und der Tibia verbunden. Zentral ist er vor allem mit der Kapsel und Teilen des medialen Kollateralbandes (MCL) verwachsen. Während der Kniebeugung verschiebt sich der mediale Meniskus bis zu 5 mm in anterior-posteriorer Richtung, wohingegen der laterale bis zu 11 mm verschoben wird (Fu et al. 1994, S. 142; Bylski-Austrow et al. 1994, S. 429).

Der laterale Meniskus ist vorne ebenfalls durch das Lig. transversum genus fixiert, hinten über Teile des hinteren Kreuzbandes (Humphrey- bzw. Wrisberg-Ligament).

Der mediale Meniskus ist fester fixiert als der laterale, eine Tatsache, die eine Ursache für die häufigeren Verletzungen des medialen Meniskus ist.

Ungefähr die äußeren 10-30 % der Menisken sind stark vaskularisiert, der Rest wird durch Diffusion aus der Synovia versorgt (Arnoczky et al. 1982, S. 93; Arnoczky et al. 1983, S. 138; Danzig et al. 1983, S. 274). Die Zellen der Menisken werden Fibrochondrocyten genannt, weil sie vom Aussehen Chondrocyten ähneln und faserknorpelige Matrix bilden. Sie sind rund bis oval und befinden sich in Lakunen.

Die Kollagenfasern der extrazellulären Matrix sind zum größten Teil parallel zueinander angeordnet und erstrecken sich hauptsächlich halbmondförmig entlang der äußeren Form der Menisken.

Der Meniskus besteht zu 75-80 % aus Wasser. Vom Trockengewicht macht Kollagen mit ca. 75 % den größten Anteil aus, davon vor allem Kollagen Typ I (90-98 %). Zusätzlich kommt Kollagen vom Typ II, III und V vor (Cheung 1987, S. 353; Eyre et al. 1983, S. 268). Die Funktion der Kollagenfibrillen besteht vor allem in ihrer Reißfestigkeit (Arnoczky et al. 1988, S. 1214). Ihre überwiegend zirkuläre Anordnung trägt dieser biomechanischen Funktion Rechnung (Aspden et al. 1985, S. 378; Bullough et al. 1970, S. 568; Yasui 1978, S. 396).

Einen weiteren Bestandteil der extrazellulären Matrix machen die Glykosaminoglykane (GAG) aus, die vor allem für die Druckfestigkeit verantwortlich sind. Ihre Zusammensetzung und Verteilung innerhalb des Meniskus unterscheidet sich zwischen Mensch und Tieren zum Teil erheblich (Adams et al. 1981, S. 388; Adams et al. 1987, S. 277; Nakano et al. 1986, S. 535). Beim humanen Meniskus macht Chondroitin-6-Sulfat (40 %) vor Dermatan-Sulfat (20-30 %) den größten Anteil aus (Herwig et al. 1984, S. 638). Glykoproteine und Elastin bilden weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix (McDevitt et al. 1990, S. 13), auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll.

Die Nervenversorgung der Menisken ist hauptsächlich auf das vaskularisierte Drittel sowie vor allem auf die beiden Meniskushörner beschränkt. Schmerzempfindungen werden mit freien Nervenendigungen innerhalb des Meniskusgewebes assoziiert (Wilson et al. 1969, S. 489; Day et al. 1985, S. 61).

Meniskusverletzungen stellen ein häufiges Problem in der Orthopädie dar. Am häufigsten treten sie bei Männern im Alter zwischen 20-49 Jahren auf (Poehling et al. 1990, S. 546; Nielsen et al. 1991, S. 1647; Hede et al. 1990, S. 436). Im Jahre 2002 wurden in Deutschland 167 641 Kniebinnenläsionen festgestellt, von denen 152 274, zum Teil neben anderen Gelenkläsionen (z.B. VKB), den Meniskus betrafen. Von diesen mussten 126 165 operativ behandelt werden (Statistisches Bundesamt 2004). Risikofaktoren für degenerative Meniskuläsionen sind ein erhöhter Body Mass Index (BMI), häufiges Knien und Hocken im Beruf und abnorme Beweglichkeit der Gelenke (Baker et al. 2002, S. 561). Für akute Meniskusrisse sind nach dieser Studie vor allem sportliche Aktivitäten als Ursache zu nennen, zuallererst Fußball. Meist kommt es durch eine Auswärtsrotation der Tibia bei gebeugtem Knie zum Riss. Gerade bei jungen, agilen Menschen treten sie im Rahmen von Sportverletzungen, z.B. bei einer Trendsportart wie Carving, vermehrt auf.

Meniskusgewebe hat zwar eine gewisse Fähigkeit zur Regeneration, die jedoch überwiegend auf den vaskularisierten Anteil beschränkt ist (King 1936, S.169; King 1936, S. 1072; King 1936, S. 339; Czipott et al. 1977, S. 447; Elmer et al. 1977, S. 307; Espley et al. 1981, S. 389; Evans et al. 1963, S. 748; Morel et al. 1953, S. 139; Smillie 1944, S. 400; Henning et al. 1987, S. 16). Vereinzelt werden von Orthopäden in Arthroskopien Meniskusregenerate auch nach Resektionen gefunden, die auf den avaskulären Anteil des Meniskus beschränkt waren. Auch Arnoczky et al. fanden 1985 in ihrer Studie zum Teil Regenerate, nachdem sie nur einen Teil des nicht vaskularisierten Endes reseziert hatten (Arnoczky et al. 1985, S. 250f). Es handelt sich dabei aber leider nur um Einzelfälle und die gefundenen Regenerate genügen in ihren biomechanischen Eigenschaften bei weitem nicht den hohen Anforderungen.

Bei Verletzungen, die den avaskulären Teil des Meniskus betreffen, muss somit bei symptomatischen Patienten eine geeignete Therapie gefunden werden, die

die Selbstheilung des Meniskus unterstützt. Zu unterscheiden sind reparable Läsionen wie z.B. tangentielle und radiäre Risse (Lappenrisse) oder Korbhenkelrisse, die sich in der vaskularisierten Zone oder am Übergang zur avaskulären Zone befinden und daher nähen lassen (Aagaard et al. 1999, S. 138), von komplexen irreparablen Läsionen, die zunächst eine Resektion erforderlich machen, später unter Umständen sogar eine Transplantation.

Da der Meniskus früher für einen funktionslosen Muskelrest gehalten wurde (Bland SJ 1897), bestand die Therapie einer Läsion zunächst in der offenen totalen Meniskektomie. Die direkten Folgen der totalen Meniskektomie sind eine 50-75 %ige Verkleinerung der artikulierenden Kontaktflächen und eine 2-3fache Zunahme des Belastungsdruckes (Kurosawa et al. 1980, S. 287; Krause et al. 1976, S. 602). Es zeigte sich dann auch in mehreren Studien, dass die totale Meniskektomie mit der Progression von degenerativen Gelenkveränderungen assoziiert ist (Roos et al. 1998, S. 691; Fairbank TJ 1948; S. 668; Jackson 1968, S. 526; Appel 1970, S. 105; Allen et al. 1984, S. 669; Burr et al. 1982, S. 124), an deren Ende häufig die Totalendoprothese steht. Erst in den 70er Jahren wurde man langsam der Folgen, degenerativer Veränderungen am Gelenkknorpel und erhöhter Belastung für den Gelenkknorpel (Elliott et al. 1999, S. 506; Oretorp et al. 1978, S. 412; Krause et al. 1976, S. 604; Medlar et al. 1980, S. 89), von totalen Meniskektomien gewahr und schenkte ihnen Aufmerksamkeit. In Studien wurde schon damals nachgewiesen, dass nach partiellen Meniskektomien zumindest weniger degenerative Knorpelveränderungen entstehen als nach totalen (Cox et al. 1975, S. 181; Moskowitz et al. 1973, S. 402; McGinty et al. 1977, S. 765). Auch die funktionellen Ergebnisse sind nach partiellen Meniskektomien besser als nach totalen (Hede et al. 1992, S. 120).

Sport scheint für die Entstehung von Arthrose nach Meniskektomie ein Risikofaktor zu sein, da die Inzidenz für Arthrose bei Sportlern im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich höher liegt (Jorgensen et al. 1987, S. 82; Hoshikawa et al. 1983, S. 11; Roos et al. 1994, S. 221).

Nach den bekannten Folgen der Meniskektomie wird nun versucht, den Meniskus möglichst zu erhalten, d.h. Risse im Meniskus wieder zu reparieren anstatt das Meniskusgewebe zu entfernen. Viele verschiedene Methoden stehen uns heute zur Verfügung: Nähte, bioresorbierbare Implantate zur Meniskusrefixation, Fibrinkleber, Meniskusklebung mittels Laser, Abrasionstherapie und induzierte Vaskularisierung (Forman et al. 1995, S. 40; Nakhostine et al. 1990, S. 286; Post et al. 1997, S. 734; Rimmer et al. 1995, S. 149; Zhang et al. 1995, S. 39; Roeddecker et al. 1993, S. 31; McAndrews et al. 1996, S. 508; DeHaven 1999, S. 248; Zhang et al. 1988, S. 158). Bis auf die induzierte Vaskularisierung können all diese Methoden den Heilungsprozess lediglich in der vaskularisierten Zone der Menisken unterstützen (Sweigart et al. 2001, S.118).

Für den Ersatz des Meniskus nach großen Defekten gibt es grundsätzlich zwei Methoden: entweder der Einsatz von Kadavermenisken (Allotransplantation) oder die Verwendung von künstlichen Ersatzmenisken (Collagen Meniskus Implant®, CMI®).

Seit der ersten Allotransplantation 1984 in München wird diese Methode vorwiegend in den USA eingesetzt. Sie kann aber lediglich als eine operative Maßnahme mit zeitlich begrenztem Effekt angesehen werden (Messner 1999, S. 165).

Die Transplantation mit Allo- als auch mit Autografts hat zwar einen schützenden Effekt auf den Gelenkknorpel und beugt degenerativen Veränderungen am Knorpel vor (Szomor et al. 2000, S. 87), jedoch erreichen die Transplantate bei weitem nicht die Gewebeeigenschaften normaler Menisken (Jackson et al. 1992, S. 653). Im Verlauf der ersten zwei Jahre nach Implantation kommt es zum Schrumpfen, häufig auch zu Zerreißungen der Transplantate (Milachowski et al. 1994, S. 162; Noyes 1995, Präsentation). Eine langsame Abstoßungsreaktion als Mitursache kann dafür nicht ausgeschlossen werden. Edwards et al. kamen 1996 bei Schafen zu dem Ergebnis, dass die Meniskustransplantation im Vergleich zur Meniskektomie im Hinblick auf Arthrose keinen Vorteil hat (Edwards et al. 1996, S. 225). Hinzu kommt ein kleines, aber nicht unerhebliches Risiko der Infektion z.B. mit HIV, Hepatitis B und C etc. (Kuhn et al. 1996, S. 542). Aus diesen Gründen wird der Kadavermeniskus in Deutschland und anderen europäischen Ländern kaum eingesetzt. Es besteht demnach ein großer Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten für Patienten nach Meniskusverlust.

Die zweite Möglichkeit bei Verlust des Meniskus besteht im Einsatz des Collagen Meniskus Implantats®. Als einziges von vielen experimentell untersuchten biologischen und synthetischen Materialien (Arnoczky et al. 1988, S. 1214; Stone et al. 1992, S. 109; Cook et al. 1999, S. 662; Bruns et al. 2000, S. 367; Angele et al. 2000, Präsentation; Klompmaker et al. 1996, S. 1173; Kohn et al. 1997, S. 236; Kohn et al. 1992, S. 915) ist der Kollagenmeniskus in die klinische Anwendung übergetreten (Stone et al. 1995, S. 398; Rodkey et al. 1999, S. 290). Die klinische Verwendung des Kollagenmeniskus ist heute in einigen Zentren in Deutschland und in den USA vom Hersteller zugelassen. Es handelt sich um ein resorbierbares Gerüst aus bovinen Typ I-Kollagenfasern, das als Ersatz für den verlorenen Meniskus eingesetzt wird. Voraussetzung für die Implantation ist jedoch das Vorhandensein einer stabilen Randleiste. Durch das Einwachsen von Synovial- und anderen Zellen und deren Differenzierung soll das Gerüst langsam resorbiert werden und sich ein neuer Meniskus bilden. Die Ergebnisse mit dem Kollagenmeniskus sind jedoch kritisch zu betrachten, da sämtliche Studien von einer einzigen Arbeitsgruppe aus den USA stammen (Stone, Rodkey et al., Vail, Colorado), und auch die Autoren selbst nach einer Verbesserung der Methode verlangen, z.B. durch Zellbesiedelung. Die Ergebnisse der amerikanischen Kollegen sind mit den Erfahrungen der Abteilung für Sportorthopädie zu vergleichen: eine gewisse Besserung der

Beschwerden ist mit einem eher enttäuschenden histologischen Befund vergesellschaftet.

Die Idee der vorliegenden Studie war, den Kollagenmeniskus vor der Implantation mit autologen Meniskuszellen zu besiedeln und damit die strukturellen und eventuell auch die biomechanischen Resultate der Menisken zu verbessern. Da sich zum Zeitpunkt der Implantation bereits Fibrochondrocyten im Gerüst befinden und schon angefangen haben, extrazelluläre Matrix zu bilden- somit eine Platzhalterfunktion übernehmen- , haben wir angenommen, dass weniger Reparaturzellen einwandern und die Bildung des Meniskugewebes ohne Verzögerung stattfindet. Durch die autologen Zellen soll eine Abstoßungsreaktion vermieden werden.

In der vorliegenden experimentellen Studie wurden aus einer autologen Meniskusbiopsie Fibrochondrocyten isoliert, vermehrt und ex vivo in ein Kollagengerüst in Meniskusform implantiert, das weiter in Kultur gehalten wurde. Diese tissue-engineerten Konstrukte wurden anschließend in die Kniegelenke von Schafen transplantiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Transplantate makroskopisch, histologisch sowie biomechanisch untersucht und mit Kontrollgruppen verglichen.

Das in dieser Studie durchgeführte Tissue Engineering am Meniskus ist heute eine viel versprechende Hoffnung, neue Behandlungsmöglichkeiten für Meniskusschäden zu entwickeln. Der Meniskus ist ein hochkomplexes Gewebe und seine wichtige Funktion innerhalb des Kniegelenkes wird immer besser verstanden. Da die Möglichkeiten des Meniskus zur Selbstheilung nach ausgedehnten Läsionen begrenzt sind und die Spätfolgen eines Defektes für den Patienten schwerwiegend sein können, ist die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden von großer Bedeutung. Durch die inzwischen enormen Möglichkeiten im Bereich der Zellkultur und die rasante Entwicklung in der Genetik und dem Einsatz von Wachstumsfaktoren eröffnen sich ganz neue Methoden, die in Zukunft zur klinischen Routine werden könnten und eine Standardtherapie bei komplexen Meniskusverletzungen darstellen könnten. Es gilt, die neuen Erkenntnisse aus den verschiedenen Gebieten und Studien zu sammeln und zusammenzubringen und eine sichere und erfolgreiche Methode zur Therapie von Meniskusläsionen und zum Meniskusersatz zu finden und zu etablieren.

2. Methoden und Materialien

2.1 Vorversuche

Für die Vorversuche wurden Menisken von New Zealand White Rabbits entnommen, die für laufende Versuche des Instituts für Experimentelle Onkologie der TU München geopfert worden waren.

2.1.1 Meniskusbiopsie

Zur Entnahme der Menisken wurde unter sterilen Bedingungen ein zentraler Hautschnitt von 3 cm Länge von der Patella aus nach kaudal vorgenommen. Nach Präparation der Faszien wurden die beiden Kollateralbänder sowie die Patellarsehne durchtrennt und der Hoffa-Fettkörper reseziert. Nach Sicht auf beide Kreuzbänder wurden diese durchtrennt und das Gelenk somit weit eröffnet. Nach Durchtrennung des Ligamentum transversum genus und der hinteren Insertionsstellen wurden die Menisken entnommen und in Vollmedium (DMEM & 10% Fetal Calf Serum & 100 IU/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin & 2 mmol/l Glutamin) gegeben.

2.1.2 Isolierung und Kultivierung, Zählen der Zellen

Die biopsierten Menisken wurden nun 3 mal mit jeweils 6 ml PBS gewaschen. In einer 60 mm Kulturschale und 3 ml PBS wurden die Menisken mit einem Skalpell und einer Polystyrolpinzette unter der Sterilbank in ca. 1×1 mm² große Stücke geschnitten. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin-EDTA kamen die Stücke bei 37° C 30 Minuten lang auf einen Shaker bei 130 rpm. Es folgte die Zentrifugierung bei 2200 U/Min. und 37° C für 5 Min.. Der Überstand wurde abgesaugt und 20 ml Kollagenase-Lösung (50 mg Kollagenase A in 20 ml Vollmedium) hinzugegeben, diese dann 12-16 h bei 37° C auf einen Shaker (130 rpm) gestellt. Um die größeren Meniskusstücke zu filtern, wurden 40 µl Zellfilter benutzt und die Zellsuspension danach 4 Min. bei 37° C und 1000 U/Min. zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 8 ml Vollmedium gelöst und in 25 cm² Flasks gegeben.

Die Kultivierung der Fibrochondrocyten erfolgte bei 37° C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft. Mediumwechsel erfolgte beim ersten Mal nach einem Tag, danach alle 2 Tage. Die Zellen wurden gesplittet, sobald sie nahezu Konfluenz erreichten. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsin-EDTA aufgegeben. Nach 5 Minuten Inkubation im Brutschrank und mikroskopischer Kontrolle wurden 5 ml Medium dazugegeben und die Zellen auf größere Flasks verteilt. Es standen für die Kultivierung 75 cm² und 150 cm² Flasks zur Verfügung. Beim Splitten der Zellen aus größeren Flasks wurden entsprechende Mengen von Trypsin-EDTA und Medium verwendet.

Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.1.3 Besiedelung von Kollagenmatrizes

Um sowohl die Besiedelungstechnik herauszufinden als auch das beste Gerüst zu bestimmen, wurden verschiedene Kollagene mit Fibrochondrocyten besiedelt:

a) Collagen Meniskus Implantat® = CMI®

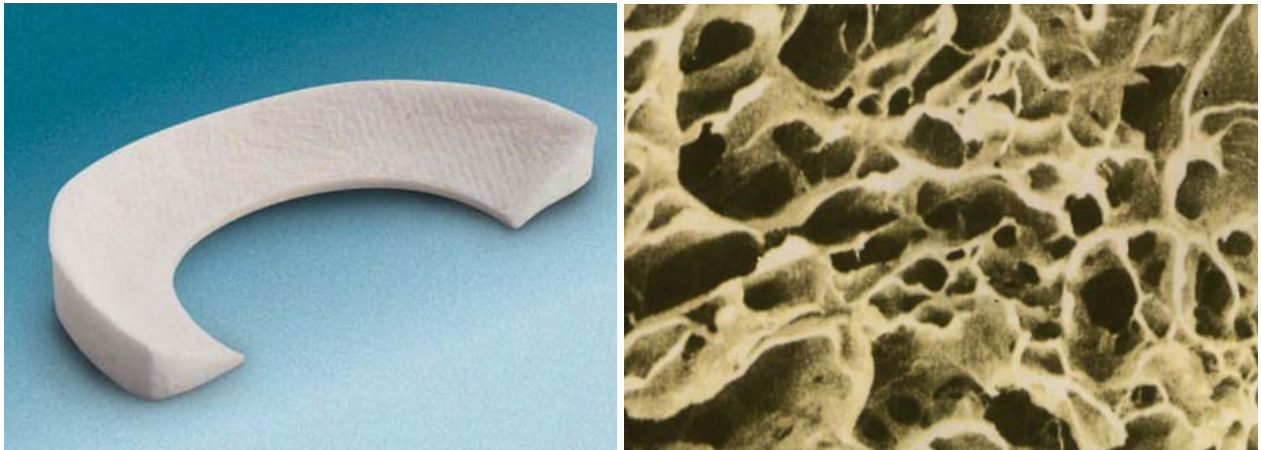


Abbildung 2.1 und 2.1.1: Collagen Meniskus Implantat®, makroskopisch und mikroskopisch.

- b) Resorba®-Schwämme
- c) Verigen®-Membranen
- d) Tachotop®-Kollagene

Die Zellen wurden jeweils mit Trypsin-EDTA abgelöst und nach Mediumzugabe in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Zentrifugieren bei 1000 U/Min. und 37° C für 4 Min. wurde die jeweilige Menge an Medium hinzugegeben und die Zellsuspension in einer 1 ml Spritze aufgezogen. Mediumwechsel bei den besiedelten Schwämmen fand alle 2 Tage statt. Nach einer bestimmten Kulturdauer wurden von den Proben Gefrier- und Paraffinschnitte gemacht und diese HE, Alcian Blau und zum Teil van Giesson gefärbt, um die Besiedelungsqualität zu beurteilen.

Zu a):

Da für die CMIs® bei der Herstellung nach Rodkey et al. (1999, S.283) für die Crosslinks der Kollagenfasern Formaldehyd verwendet wird, das auf Zellen toxisch wirkt, wurden die Kollagenmenisken vor der Besiedelung 2-5 Wochen in Vollmedium eingelegt und im Kühlschrank aufbewahrt. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt, um auf diese Weise das Formaldehyd herauszulösen. In anfänglichen Versuchen ist es uns nicht gelungen, Zellen auf einen Kollagenmeniskus zu bringen, wenn dieser nicht vorher in Medium gespült

worden war. Für die Vorversuche wurden jeweils 0,5 cm breite Stücke der Kollagenmenisken verwendet.

Es wurden Kollagenmenisken mit folgenden Zellzahlen besiedelt:

Kollagenmeniskus-Besiedelungen in vitro (0,5 cm breite Stücke):			
CMI® gespült	Zellzahl	in µl Medium	Kulturdauer
4 Wo.	$0,7 \times 10^6$	300	3 Wo.
4 Wo.	$0,7 \times 10^6$	100	3 Wo.
4 Wo.	4×10^6	100	3 Wo.
4 Wo.	2×10^6	100	3 Wo.
4 Wo.	$1,5 \times 10^6$	100	1,5 Wo.
2 Wo.	$1,5 \times 10^6$	100	2 Wo.
4 Wo.	$1,5 \times 10^6$	100	1 Wo.
5 Wo.	1×10^6	50	14 Wo.

Tabelle 2.1: Übersicht der Vorversuche: Kollagenmeniskus-Besiedelungen.

Nach Zentrifugieren bei 1000 U/Min. und 37° C über 4 Min. wurden die Zellen in 50-100 µl Medium gelöst und mit einer 1 ml Spritze und einer 0,4×19 mm² Kanüle in den Kollagenmeniskus gespritzt. Zuvor war das CMI®-Stück vorsichtig ausgedrückt worden, um wieder Flüssigkeit aufnehmen zu können. Das Stück des Kollagenmeniskus wurde in eine 60 mm Kulturschale gelegt und mit einer Polystyrol-Pinzette festgehalten. Mit der Spritze wurden nun jeweils gleichmäßig verteilt 16 Injektionen gesetzt, wobei die ausgelaufene Zellsuspension immer wieder verwendet wurde.

20 Minuten nach dem Einspritzen wurde Medium hinzugegeben, so dass das Kollagenmeniskus-Stück komplett bedeckt war, und die Kulturschale in den Brutschrank gestellt.

Zu b):

Die Schwämme wurden in 1×1 cm² große Stücke geschnitten und mit verschiedenen Zellzahlen besiedelt:

$0,2 \times 10^6$, $0,7-0,8 \times 10^6$ und $2,1 \times 10^6$ Zellen, gelöst in 100-500 µl Medium. Nach Möglichkeit wurde die Injektion mit der aus dem Schwamm ausgelaufenen Suspension bis zu 3 mal wiederholt. Mediumzugabe erfolgte nach 15 Minuten. Die besiedelten Schwämme wurden in 24-well-Platten im Brutschrank aufbewahrt. Paraffin- und Gefrierschnitte mit HE- und Alcian Blau-Färbungen wurden nach 1, 2, 3 und 6 Wochen gemacht.

Zu c):

Die Membranen wurden in 1×1 cm² große Stücke geschnitten und in 60 mm Kulturschalen gelegt. Auf die raue Seite der Membranen wurde dann die Zellsuspension gegeben und nach 30 Minuten vorsichtig Medium zugegeben.

Die verwendeten Zellzahlen betragen $0,1 \times 10^6$, 1×10^6 und 5×10^6 Zellen jeweils in 200 μ l Medium gelöst. Nach 1, 3 und 6 Wochen wurden schließlich die histologischen Präparate angefertigt.

Zu d):

Die Tachotop®-Schwämme bestehen aus 1,4-2,2 mg/cm² Kollagenfibrillen vom Pferd. Sie wurden in 1×1 cm² große Stücke geschnitten und in 60 mm Kulturschalen gelegt. Jeweils 4×10^6 Zellen gelöst in 100 μ l Medium wurden injiziert. Wenn möglich, wurde die Injektion bis zu 3 mal wiederholt. Mediumzugabe erfolgte nach 40 Minuten. Die Kulturdauer im Brutschrank betrug 3, 6 bzw. 11 Wochen.

2.2 Tiermodell und Studiendesign

Es wurden weibliche Merino-Schafe aus normaler Zucht verwendet, insgesamt 39 Schafe.

Auflistung der Tiere mit jeweiliger Gruppe, Alter und Gewicht bei der Biopsie (OP1):

Schaf Nr.	Gruppe	Geb.Datum	Biopsie	Datum Implant.	Alter Jahre	Gewicht OP1(kg)	Opferung nach
1	CMI+	24.01.1994	28.02.2002	11.04.2002	8,2	80,0	6 Mon.
2	CMI+	03.05.1998	28.02.2002	11.04.2002	3,9	105,0	3 Wo.
3	CMI+	09.09.1992	07.03.2002	18.04.2002	9,6	83,0	6 Mon.
4	CMI+	12.04.1993	07.03.2002	18.04.2002	9,0	101,0	3 Mon.
5	CMI-	10.05.1993	12.03.2003	08.05.2002	9,0	77,0	6 Mon.
6	CMI-	20.06.1993	12.03.2003	08.05.2002	8,9	69,0	3 Wo.
7	CMI-	23.08.1995	19.03.2002	16.05.2002	6,7	71,0	3 Mon.
8	CMI-	01.01.1994	19.03.2002	16.05.2002	8,4	77,0	6 Mon.
9	leer	11.12.1999	26.03.2002	23.05.2002	2,4	75,0	6 Mon.
10	leer	20.12.1993	26.03.2002	23.05.2002	8,4	83,0	6 Mon.
11	leer	15.09.1992	02.04.2002	30.05.2002	9,7	70,0	6 Mon.
12	leer	30.12.1993	02.04.2002	30.05.2002	8,4	85,0	6 Mon.
13	CMI-	21.10.1994	09.04.2002	06.06.2002	7,6	84,0	3 Mon.
14	CMI-	21.12.1993	09.04.2002	06.06.2002	8,5	88,0	6 Mon.
15	CMI-	11.01.1994	16.04.2002	13.06.2002	8,4	79,0	6 Mon.
16	CMI-	07.05.1995	16.04.2002	13.06.2002	7,1	81,0	3 Mon.
17	CMI+	20.03.1993	30.04.2002	20.06.2002	9,3	71,0	6 Mon.
18	CMI+	28.04.1993	07.05.2002	20.06.2002	9,2	73,0	6 Mon.
19	CMI+L	30.12.1993	07.05.2002	27.06.2002	8,5	83,0	3 Wo.
20	CMI+L	02.12.1993	07.05.2002	27.06.2002	8,6	83,0	6 Wo.
21	leer	22.04.1993	14.05.2002	04.07.2002	9,2	71,0	3 Mon.

Schaf Nr.	Gruppe	Geb.Datum	Biopsie	Datum Implant.	Alter Jahre	Gewicht OP1(kg)	Opferung nach
22	leer	08.02.1994	14.05.2002	04.07.2002	8,4	80,0	3 Mon.
23	leer	16.03.1994	21.05.2002	11.07.2002	8,3	68,0	3 Mon.
24	leer	22.06.1996	21.05.2002	11.07.2002	6,1	75,0	3 Mon.
25	CMI+	12.04.1993	28.05.2002	18.07.2002	9,3	75,0	3 Mon.
26	CMI+	17.01.1993	28.05.2002	18.07.2002	9,5	83,0	3 Mon.
27	CMI-	02.07.1998	04.06.2002	25.07.2002	4,1	70,0	3 Mon.
28	CMI-	25.12.1993	04.06.2002	25.07.2002	8,6	79,0	3 Mon.
29	CMI+L	30.09.1994	11.06.2002	14.08.2002	7,9	73,0	3 Mon.
30	CMI+L	14.05.1993	11.06.2002	14.08.2002	9,3	75,0	3 Mon.
31	CMI-	08.12.1993	25.06.2002	01.08.2002	8,7	83,0	3 Mon.
32	CMI-	18.08.1999	25.06.2002	01.08.2002	3,0	86,0	3 Mon.
33	leer	07.01.1994	18.06.2002	08.08.2002	8,6	81,0	3 Mon.
34	CMI-	11.01.1994	18.06.2002	08.08.2002	8,6	89,0	3 Mon.
35	CMI+	21.09.1992	02.07.2002	22.08.2002	9,9	82,0	3 Mon.
36	CMI+L	21.05.1995	02.07.2002	22.08.2002	7,3	97,0	3 Mon.
37	CMI-	12.01.1994	09.07.2002	29.08.2002	8,6	70,0	3 Mon.
38	CMI+L	30.10.1994	09.07.2002	29.08.2002	7,8	65,0	3 Mon.
39	CMI+L	02.12.1993	09.07.2002	29.08.2002	8,7	90,0	3 Mon.
Durchschnitt					8,0	79,7	
<i>Median</i>					8,5	80,0	
<i>Stand.-Abw.</i>					1,8	8,9	

Tabelle 2.2: CMI+ = mit Zellen besiedelt, CMI+L = mit LacZ-markierten Zellen besiedelt, CMI- = unbesiedelt, leer = Menishektomie.

Bei insgesamt 16 Schafen wurde der Kollagenmeniskus vor der Implantation mit Fibrochondrocyten besiedelt. Bei 7 Tieren wurden die Zellen retroviral mit dem Reporter gen β -Galaktosidase (LacZ) markiert, um auf diese Weise später von uns eingebrachte von eingewanderten Zellen unterscheiden zu können. Die retrovirale Infektion wurde freundlicherweise vom Institut für Experimentelle Onkologie, unter Leitung von Prof. Dr. B. Gänsbacher, durchgeführt. Da nicht sicher war, wie lange das LacZ-Protein in vivo stabil ist, gab es in dieser Gruppe keine 6-Monats-Schafe. Um bei möglicher Unverträglichkeit und allergischen Reaktionen schnell reagieren bzw. die Studie abbrechen zu können, gab es in den ersten 3 Gruppen „first-look-Tiere“, die nach 3 und 6 Wochen geopfert wurden.

Gruppe	"first look" (3 u. 6 Wochen)	3 Monate	6 Monate	Gesamtanzahl
CMI® besiedelt	1 (3)	4	4	9
CMI® besiedelt (LacZ markiert)	2 (3, 6)	5	0	7
CMI® unbesiedelt	1 (3)	9	4	14
Leerkontrolle	0	5	4	9
<i>gesamt</i>	4	23	12	39

Tabelle 2.3: Studiendesign.

Insgesamt mussten drei Tiere aus der Studie ausgeschlossen werden: Schaf Nr. 13 aufgrund schwerer Herzinsuffizienz, Nr. 33 wegen eines großen schon zum Zeitpunkt der Biopsie bestandenen Knorpeldefektes am medialen Kondylus, Nr. 36 musste aufgrund einer Liegeschwiele an der Brust vorzeitig eingeschläfert werden, es zeigte sich bei der Eröffnung des Kniegelenkes zudem eine stark infektiöse Gelenkdestruktion. Somit wurden in die Studie 36 Tiere einbezogen.

2.2.1 Medikation und Haltung der Tiere

Die Tiere bekamen am Morgen vor der OP die erste Analgetikagabe, es folgten weitere 5 Analgetikagaben nach der Biopsie bzw. weitere 6 nach der Implantation, jeweils morgens und abends, Carprofen i.m. in der Dosierung von 4mg/kg/d. Während der OP wurde den Tieren einmalig i.v. ein Antibiotikum verabreicht. Nach Bedarf bekamen die Tiere in der Beobachtungszeit Antibiose und Thrombareduct 30000 I.E. bei Schwellungen.

Am Tag nach der OP kamen die Tiere wieder zu ihrer Herde zurück. Sie wurden während der gesamten Zeit artgerecht in Stallhaltung gehalten und während der Analgesiephase täglich nach standardisiertem Schema durch den betreuenden Tierarzt, danach zweimal täglich vom Schafzüchter beobachtet und untersucht. Es wurden die Beweglichkeit und die Stabilität der Gelenke, die Gangart, das Verhalten der Tiere sowie die Wundheilung beurteilt.

2.2.2 Meniskusbiopsie

Sämtliche Operationen, sowohl Biopsie als auch Implantation, wurden von PD Dr. med. Martinek und Dr. med. Ueblacker von der Abteilung für Sportorthopädie der TU München durchgeführt.

In Intubationsnarkose (Enfluran) wurde anteromedial auf Höhe des linken Gelenkspaltes ein 6 cm langer Hautschnitt vorgenommen. Die einzelnen Faszien-schichten wurden der Reihe nach dargestellt und inzisiert. Schließlich wurde die Kapsel eröffnet und ein ca. 5×5 mm² großes Meniskusstück aus dem Vorderhorn biopsiert. Die Meniskusbasis wurde belassen.

Die Kapsel wurde mit 4-0 Vicryl geschlossen und die Faszien schichtweise zugenäht. Zuletzt erfolgte eine Hautnaht mit 3-0 Prolene.

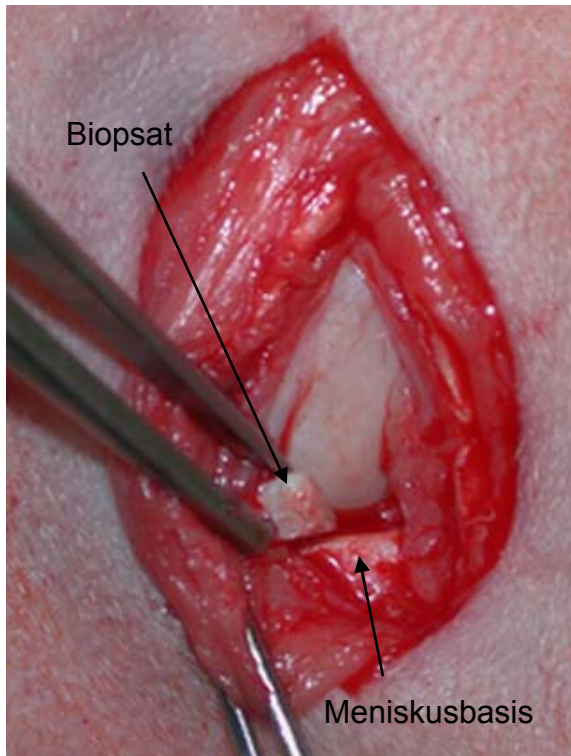


Abbildung 2.2: Biopsie eines kleinen Meniskusstückes aus dem Vorderhorn.

2.2.3 Isolierung und Kultur, Proliferation der Zellen

Das weitere Vorgehen mit den Biopsaten gleicht dem bei der Isolierung der Fibrochondrocyten weiter oben im Text.

Die Zellen wurden vermehrt, bis ca. $8-10 \times 10^6$ zur Verfügung standen, um einen halben Kollagenmeniskus zu besiedeln. Überschüssige Zellen wurden für eventuelle Nachversuche eingefroren.

Das Proliferationsverhalten wurde beobachtet und in drei Gruppen eingeteilt: gutes, mäßiges, schlechtes Wachstum. Die Werte wurden schließlich mit dem Alter der Tiere korreliert und verglichen, um mögliche Zusammenhänge zu erkennen.

2.2.4 Gen-Markierung der Zellen mit β -Galaktosidase

Diejenigen Zellreihen, die mit β -Galaktosidase markiert werden sollten, wurden in der Zahl von $0,25 \times 10^6$ Zellen in 25 cm² Flasks ausgesät und zur Transduktion in das Institut für Experimentelle Onkologie gebracht.

Der Titer (LZ/ VSV.G (1605 bzw. 2507)) lag zwischen 5×10^5 IP/ml und $2,4 \times 10^6$ IP/ml (infektiöse Partikel). Es wurde ein VSV.G pseudotypisierter Virusüberstand, codiert für nlsLacZ, verwendet.

24 h nach der Transduktion wurden die Zellen normal weiterkultiviert. Die markierten Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen ausgesät und mit XGal

gefärbt. Unter dem Mikroskop wurde so der Anteil der transduzierten Zellen im Vergleich zu den nicht transduzierten gezählt.

Zusätzlich wurden die Zellen in der Durchflußzytometrie (FACS) untersucht, um objektive Zahlen zu bekommen.

Um die Stabilität der Genexpression in vivo zu überprüfen, wurden, sofern genügend große Explantate zur Verfügung standen, Gefrierschnitte von den jeweiligen Explantaten hergestellt und mit X-Gal gefärbt.

2.2.5 Besiedelung der Kollagenmatrizes

Die Kollagenmenisken wurden jeweils 5 Wochen vor der Besiedelung in Medium gelegt und dieses alle 3 Tage gewechselt. Jeder Kollagenmeniskus wurde in 2 gleichgroße Hälften geteilt, da die Größe des Kniegelenks eines Schafes ungefähr der halben Größe eines humanen Kniegelenks entspricht und die Kollagenmenisken zur Verwendung am Menschen hergestellt werden.

Es wurde im Durchschnitt eine Zellzahl von $10,9 \times 10^6$ Zellen verwendet.

Die Technik der Besiedelung wurde weitgehend weiter oben beschrieben. Die Zellen lösten wir in jeweils 150-200 µl Medium und injizierten diese Zellsuspension gemäß nachfolgender Abbildung. Als Punkte angedeutet sind an einem Ende des Kollagenmeniskus beispielhaft die Einstichstellen der Kanüle eingezeichnet, wo wir jeweils geringe Mengen der Zellsuspension injizierten.

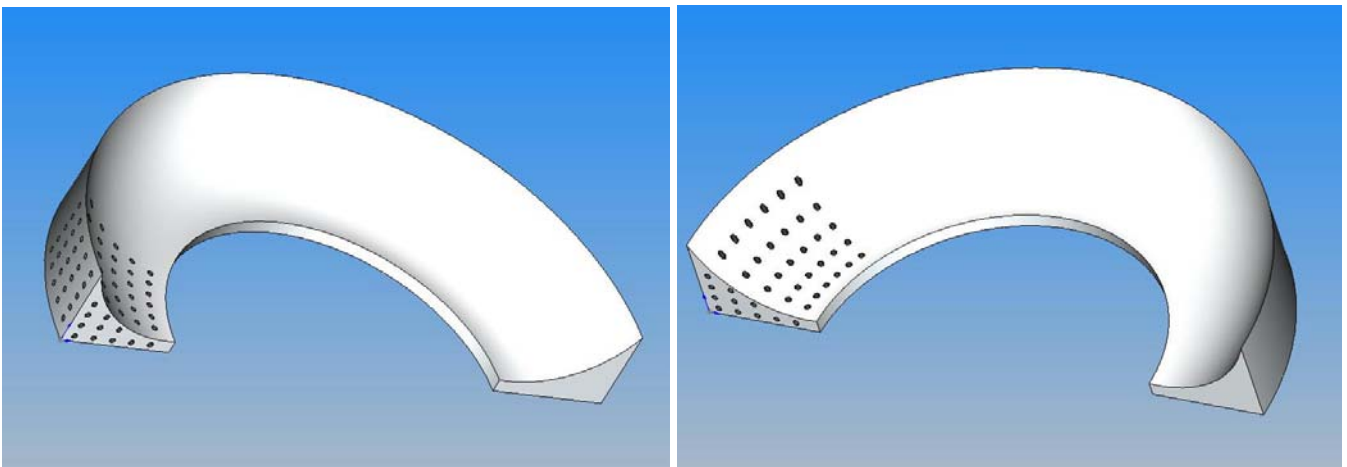


Abbildung 2.3.1 und 2.3.2: Skizze der Injektionsstellen (die Punkte symbolisieren die Injektionsstellen beispielhaft für den kompletten Kollagenmeniskus).

20 Minuten nach der Injektion der Zellen wurde Medium hinzugefügt.

Die Aufbewahrung erfolgte nun nach oben beschriebenem Schema. 8-10 Tage vor der Implantation wurde dem Medium kein FCS mehr zugegeben, da auf diese Art die Fibrochondrocyten unterstützt werden, ihren ursprünglichen Phänotyp wiederzuerlangen und eine mehr polygonale Morphologie zu erreichen (Webber et al. 1988, S. 19).

Stichprobenartig wurde nach einigen Besiedelungen die Zellzahl im Überstand und am Boden der Kulturschale gezählt, um zu erfahren, wie viele Zellen bei der Injektion verloren gehen.

2.2.6 Implantation der tissue-engineerten Kollagenmenisken

Über den gleichen Hautschnitt wie bei der Biopsie wurde eine mediale Arthrotomie durchgeführt und nach Durchtrennung des medialen Kollateralbandes (MCL) wurde das Gelenk aufgeklappt.

Der mediale Meniskus wurde nun bis auf die Meniskusbasis reseziert und entweder ein besiedelter oder ein unbesiedelter Kollagenmeniskus in Inside-out-Technik eingenäht. In den Leerkontrollen wurde lediglich eine Meniskektomie durchgeführt. Anhand des resezierten Meniskusstückes wurde der Kollagenmeniskus angepasst und mit 3 Nähten eingenäht. Verwendet wurde zunächst 2-0 Ethibond Faden.

Die Kapsel wurde verschlossen und das MCL rekonstruiert. Nachdem die einzelnen Faszien-schichten mit 4-0 Vicryl vernäht waren, wurde die Haut mit 3-0 Prolene genäht und zuletzt Silberspray aufgetragen, der für einen mechanischen Schutz der Wunde sorgt.

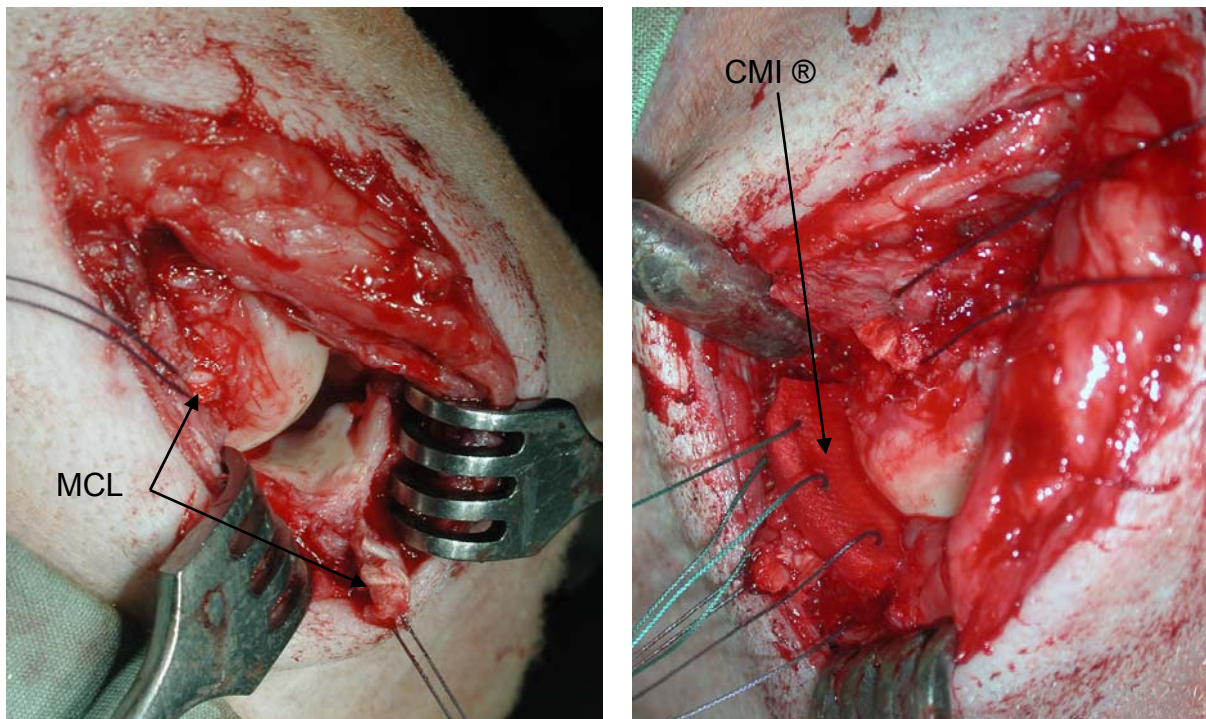


Abbildung 2.4 links: Sicht in das Kniegelenk von anteromedial nach Durchtrennung des MCL; Abb. 2.5 rechts: Einnähen des Kollagenmeniskus.

Bei Schaf Nr. 4 wurde beim Entnehmen des Meniskus das Ligamentum transversum genus durchtrennt und musste readaptiert werden.

Schaf Nr. 6 entwickelte intraoperativ einen Hypertonus, es bekam daraufhin Brevibloc®.

Schaf Nr. 10 wurde aufgrund eines postoperativen Krampfanfalls mit 15 mg Valium® behandelt.

Bei Schaf Nr. 13 zeigte sich nach der Implantation eine Herzinsuffizienz, die mit Furosemid, ACE-Hemmern und Theophyllin behandelt werden musste. Das Tier wurde daher aus der Beobachtungsgruppe ausgeschlossen.

Bei Schaf Nr. 28 musste im Zuge der Implantation ein kleiner Vorderhorndefekt genäht werden.

Bei der Eröffnung des Kniegelenks des Schafes Nr. 33 fiel am medialen Femurkondylus ein 1×1,5 cm² großer Knorpeldefekt bis auf die subchondrale Platte auf. Das Tier wurde deshalb aus der Beobachtungsgruppe herausgenommen.

Die vordere Basis des Meniskus von Schaf Nr. 35 fehlte und wurde durch Naht adaptiert. Auch bei Schaf Nr. 36 fand sich ein Defekt in der Meniskusbasis.

Ansonsten verliefen die Implantationen ohne Komplikationen.

Stichprobenartig wurden von Resten der implantierten Kollagenmenisken HE-Schnitte gemacht, um die Qualität der Besiedelung zum Zeitpunkt der Implantation zu kontrollieren. Es fielen jedoch nicht immer Reste beim Einpassen der Implantate an.

Unterschieden wurde die Qualität der Besiedelung in drei Kategorien: gut- viele Zellen, gleichmäßig; mäßig- vereinzelte Zellen, zum Teil Zellnester; schlecht- keine Zellen.

2.2.7 Achillessehnendurchtrennung

Um eine Entlastung des Kniegelenks und das Einheilen der Transplantate zu gewährleisten, wurde die ipsilaterale Achillessehne 1,5 cm proximal des Calcaneus durchtrennt und ca. 1 cm reseziert. Diese Vorgehensweise hat sich nach Bruns et al. (Knee Surg. 2000, S. 367) bewährt, da die Sehne spontan heilt und die Tiere nach 2 Wochen langsam die Belastung wieder aufnehmen und nach 6 Wochen das betreffende Bein voll belasten.

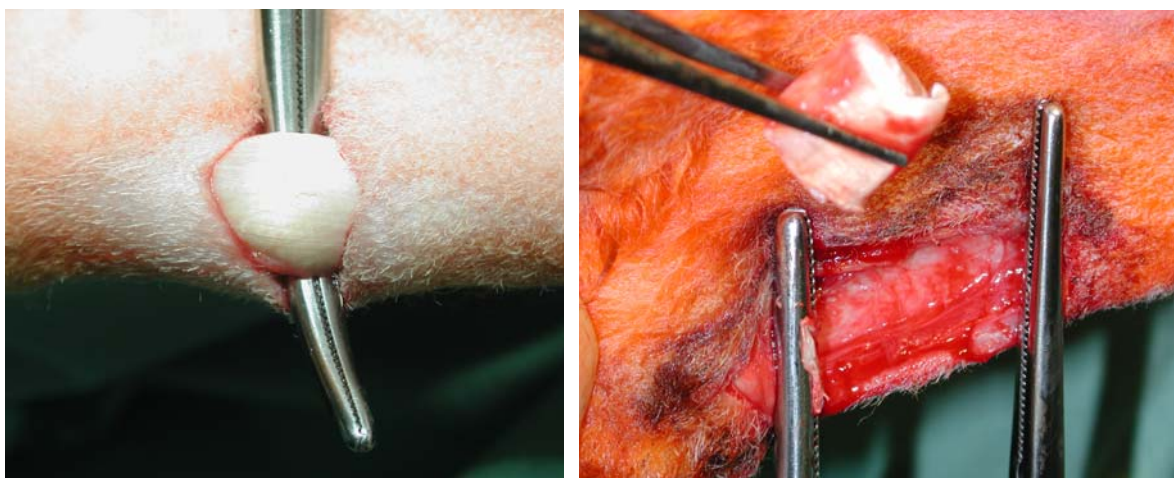


Abbildung 2.6 links: Darstellung der Achillessehne; Abb. 2.7 rechts: Resektion eines 1 cm langen Stückes.

2.2.8 Opfierung der Tiere

Die Schafe wurden zunächst mit 4 ml Diazepam i.m. sediert, nach 20 min. mit 3 ml Ketamin i.v., 10 ml Propofol 2% i.v., 40 ml Pentobarbital i.v. und 40 ml KCl i.v. geopfert.

2.3 Untersuchungsmethoden an den tissue-engineerten Menisken

Auf dem oben beschriebenen Zugangsweg wurde das Gelenk eröffnet und das Regenerat zu weiteren Untersuchungen entnommen.

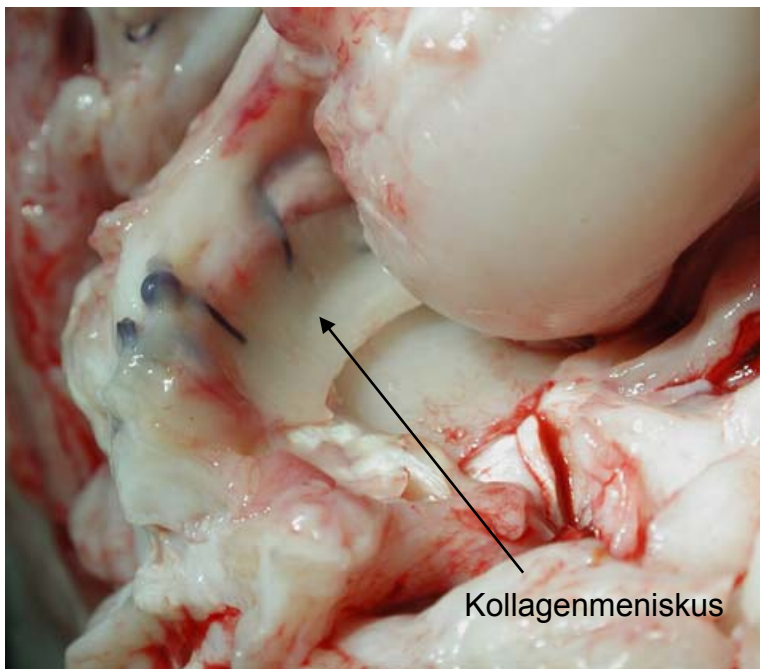


Abbildung 2.8: Explantation eines besiedelten Kollagenmeniskus nach 3 Wochen (Blick von anterior in das eröffnete linke Kniegelenk).

2.3.1 Synovialanalyse und Abstrich

Bei Verdacht auf eine Infektion (trüber bzw. deutlicher bis massiver Gelenkserguß, Gelenksschwellung, Synovialwucherungen bzw. Hypertrophie der Synovialhaut) wurde Synovialflüssigkeit entnommen und mikrobiologisch untersucht.

Zusätzlich wurde in diesen Fällen auch ein Abstrich genommen und mikrobiologisch untersucht.

2.3.2 Makroskopische Beurteilung der Explantate

Die Explantate wurden nach dem folgenden Schema beurteilt:

Kriterien	Scores und zugehörige Beschreibung			
	3	2	1	0
Größe / Form	unverändert	wenig verkleinert	stark verkleinert	nicht vorhanden
Oberfläche		regelmäßig glatt	unregelmäßig	rau
Färbung		schimmernd weiß bzw. meniskustypisch	matt farblos	gelblich-eitrig
Integration		vollständig	teilweise (vorne/hinten)	keine
korrekte anatom. Lage			ja	nein

Tabelle 2.4: Schema zur makroskopische Beurteilung der Explantate.

Der höchstmögliche Gesamtscore beträgt somit 10, womit ein optimales Ergebnis erreicht würde.

2.3.3 Makroskopische Beurteilung der Gelenkflächen

Die Kondylen und das Tibiaplateau wurden nach etabliertem Schema beurteilt (Jackson et al. 1992, S. 649):

Grad	Beschreibung
0	keine sichtbaren Veränderungen
1	intakte Oberfläche mit Farbveränderungen oder Oberflächenunregelmäßigkeiten oder beidem
2	Auffaserung der Oberfläche oder Knorpelverlust ohne sichtbaren Knochen
3	exponierter Knochen in weniger als 10 % des Gebiets
4	mehr als 10 % exponierter Knochen und zersplitterter Knorpel um die Läsion

Tabelle 2.5: Schema zur makroskopischen Beurteilung der Gelenkflächen.

Die Kondylen und das Tibiaplateau wurden jeweils in zwei Gebiete, medial und lateral, eingeteilt. Daraus ergibt sich, dass innerhalb des Gelenks 4 verschiedene Gebiete getrennt voneinander, jeweils nach obigem Knorpelscore, beurteilt wurden.

2.3.4 Histologische Beurteilung der tissue-engineerten Menisken

Aus dem tissue-engineerten Kollagenmeniskus wurde ein zentrales Stück ausgeschnitten und in Paraffin eingebettet, so dass die Keilform des Meniskus zu sehen ist.

Die Schnitte (5 µm) wurden mit Hämatoxylin-Eosin und van Giesson gefärbt, um das Ausmaß der Entzündungsreaktion, die Zellmorphologie und -anordnung sowie die Kollagenbildung zu beurteilen.

Die Beurteilung der Histologien erfolgte verblindet durch Frau Dr. Specht vom Institut für Pathologie der TU München nach einem weiterentwickelten Schema auf der Grundlage des von Stone et al. verwendeten (Stone et al. 1995, S. 397). Es wurde ein Score gebildet nach folgendem Schema:

Kriterium	Scores		
	0	1	2
Entzündung	starke Entzündung	mäßige Entzündung	kaum/keine Entzündung
Zellmorphologie	< 50 % fibroblasten-ähnliche Zellen	50 bis 75 % fibroblasten-ähnliche Zellen	> 75 % fibroblasten-ähnliche Zellen
Anordnung der Zellen	vereinzelte Zellen (ungeordnet)	Zellnester, Zellanhäufungen	gleichmäßig verteilt
Vaskularisierung	kaum	mäßig	gut
Kollagenfasern	kaum, vereinzelt	wenige	viele

Tabelle 2.6: Schema zur Beurteilung der histologischen Präparate.

Aus dem oben gezeigten Schema ergibt sich, dass ein hoher Gesamtscore auf ein gutes histologisches Ergebnis schließen lässt, ein niedrigerer auf ein insgesamt schlechteres histologisches Ergebnis.

2.3.5 Biomechanische Messungen

Sofern es die Größe der gefundenen Explantate zuließ, wurden biomechanische Messungen durchgeführt. Als Vergleich dienten neue Kollagenmenisken, die über einen Zeitraum von 10 Wochen in Medium eingelegt waren. Für die Messungen standen 6 Proben zur Verfügung, drei aus der Gruppe der unbesiedelten, drei aus der Gruppe der besiedelten Kollagenmenisken, von denen zwei mit markierten Zellen besiedelt worden waren.

Es wurde eine Universalprüfmaschine der Firma Zwick GmbH, Ulm, Typ Zwicki 1120.28 und eine Kraftmessdose der AST GmbH Dresden, Typ KAP-S, mit einem Messbereich von 20 N verwendet. Zur Registrierung des Kraftweges, der Zeit und des Traversenweges wurde das Software-Programm TestExpert Version 8.1 von der Firma Zwick GmbH, Ulm, verwendet. Die Proben wurden auf ihre Steifigkeit, das heißt auf den Widerstand des Gewebes gegen eine Kraft, ihre Relaxation, das heißt den Kraftabfall des Gewebes pro Zeit, und ihre Impression untersucht. Ausgewertet wurden die Daten in einem eigens dafür angefertigten Excel-File.

Zur Fixierung der Proben wurde ein Metallzylinder ausgefräst, so dass die Präparate eine Fassung erhielten. Mit einem speziell angefertigten Stempel aus poliertem Stahl mit rundem Kopf in einem Durchmesser von 4 mm wurde nach Erreichen einer Vorkraft von 0,05 N mit einer Anfahrtgeschwindigkeit von 45 mm/Min. bis zu einer Maximalkraft von 2 N auf die Probe gedrückt. Der Stempel verblieb nun in dieser Stellung und es wurde über einen Zeitraum von 45 sec. gemessen, um welchen Betrag sich die dem Stempel entgegenwirkende Kraft verminderte, d.h. wie stark das Gewebe relaxierte. Diese Messung wurde nun jeweils drei mal wiederholt, ein Mittelwert aus den Ergebnissen gebildet und die besiedelten mit den unbesiedelten Stücke miteinander verglichen.

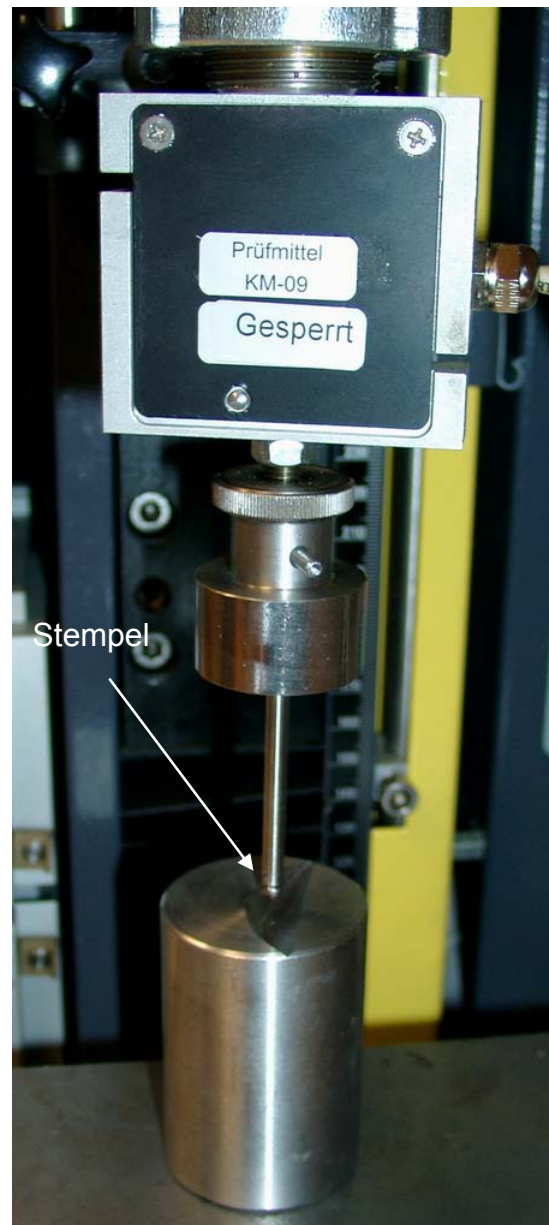


Abbildung 2.9 links: Übersicht der Apparatur; Abb. 2.10 rechts: Kraftmessdose (Prüfmittel KM-09), Stempel und ausgefräster Metallzylinder.

2.4 Verwendete Materialien

Material	Firma
Collagenase A	Roche Diagnostics
Collagen Meniscus Implant®	Sulzer Medica
D-MEM	Biochrom AG
DMSO	Sigma
Einmalspritzen 1 ml	Codan
FACS-Rundbodenröhrchen	Falcon, BD
FCS	Biochrom AG
Formalin 6 %	Hausapotheke
Kanülen 0,4×19 mm	BD Mircolance™ 3
Kanülen 0,9×70 mm	Terumo
Kollagen-Resorb®	Resorba Clinicare
Kollagenvlies	Verigen AG
Kraftmessdose Typ KAP-S	Zwick GmbH, Ulm
PBS	Biochrom AG
Pen/Strep	
Polystyrol-Pinzetten	
Skalpelle No.22	Feather
Tachotop® N	Nycomed
Trypsin/EDTA	Biochrom AG
Universalprüfmaschine	Zwick GmbH, Ulm
Typ Zwicki 1120.28	
X-Gal	Sigma
Zellfilter 40 µm	Falcon, BD
Zellkulturflaschen 25, 75, 150 cm ²	TPP
Zellkulturschalen 60×15 mm	TPP
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	TPP

2.5 Datenauswertung und Statistik

Aus den in den Versuchen erhaltenen Daten wurden die Mittelwerte gebildet und mit dem Student-t-Test für gepaarte Stichproben verglichen. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der Signifikanzfaktor p kleiner als 0,05 war ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Proliferationsverhalten der Kaninchen-Fibrochondrocyten

Nachdem die Zellen isoliert, in Medium gelöst, und in Kulturflaschen gegeben wurden, dauerte es ein bis zwei Tage, bis nahezu alle Zellen am Boden hafteten. Sofort begannen die Zellen mit der Vermehrung, so dass schon nach zwei Tagen ein Splitting in größere Kulturflaschen nötig war.

3.1.2 Histologische Ergebnisse der in vitro-Besiedelungen

Es zeigt sich insgesamt, aber vor allem bei den grobporigen Schwämmen, dass Paraffinschnitte besser zu schneiden sind und sich die Struktur der jeweiligen Schwämme leichter beibehalten lässt als bei Gefrierschnitten. Nach anfänglichen Gefrierschnitten wurden fortan nur noch Paraffinschnitte gemacht und bei den gezeigten Photos handelt es sich ebenfalls nur um Histologien aus Paraffinschnitten.

a) CMI®:

Durch Besiedelung von vielen kleinen (jeweils 0,5 cm breiten) Kollagenmeniskus-Stücken hat sich schließlich gezeigt, dass $1-2 \times 10^6$ Zellen, gelöst in 50-100 μl Medium, die bestmögliche Zellzahl ist:

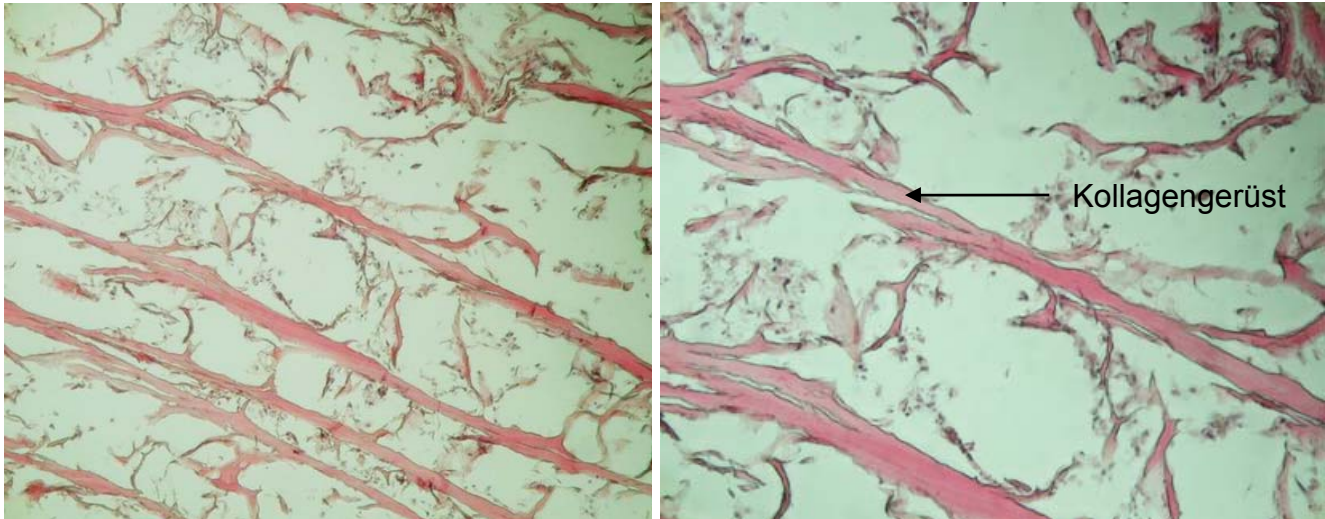
Kollagenmeniskus-Besiedelungen in vitro (0,5 cm breite Stücke):				
CMI® gespült	Zellzahl	in μl Medium	Kulturdauer	Ergebnis: Zellen (viele/wenige/keine)
4 Wo.	$0,7 \times 10^6$	300	3 Wo.	keine
4 Wo.	$0,7 \times 10^6$	100	3 Wo.	wenige
4 Wo.	4×10^6	100	3 Wo.	viele
4 Wo.	2×10^6	100	3 Wo.	viele
4 Wo.	$1,5 \times 10^6$	100	1,5 Wo.	viele
2 Wo.	$1,5 \times 10^6$	100	2 Wo.	wenige
4 Wo.	$1,5 \times 10^6$	100	1 Wo.	viele
5 Wo.	1×10^6	50	14 Wo.	viele

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Vorversuche der Kollagenmeniskus-Besiedelungen.

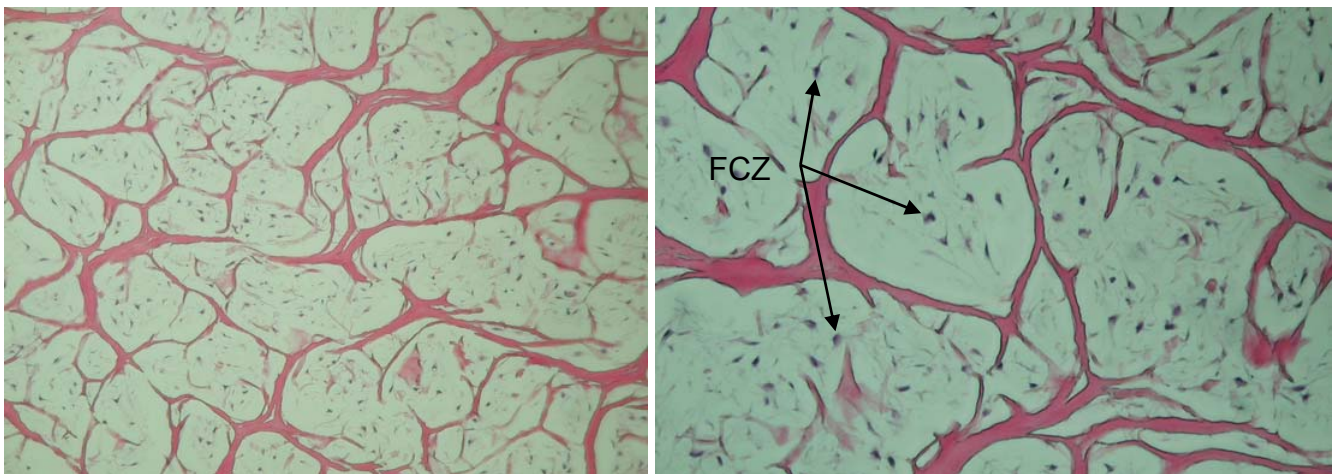
Die Stücke der Kollagenmenisken mussten mindestens 3-4 Wochen in Medium gespült werden, bevor sie besiedelt wurden, um reproduzierbar gute Ergebnisse zu erzielen. Als Anhaltspunkt für eine gute Besiedelung diente die gleichmäßige Verteilung von Zellen im gesamten Stück

Kollagenmeniskus auf mehreren Schnittebenen. Bei längeren Kulturauern (ab 3-4 Wochen) wurde auch die Bildung von extrazellulärer Matrix und die Bildung von Kollagenfasern in Alcian Blau- bzw. van Giesson-Färbungen beurteilt.

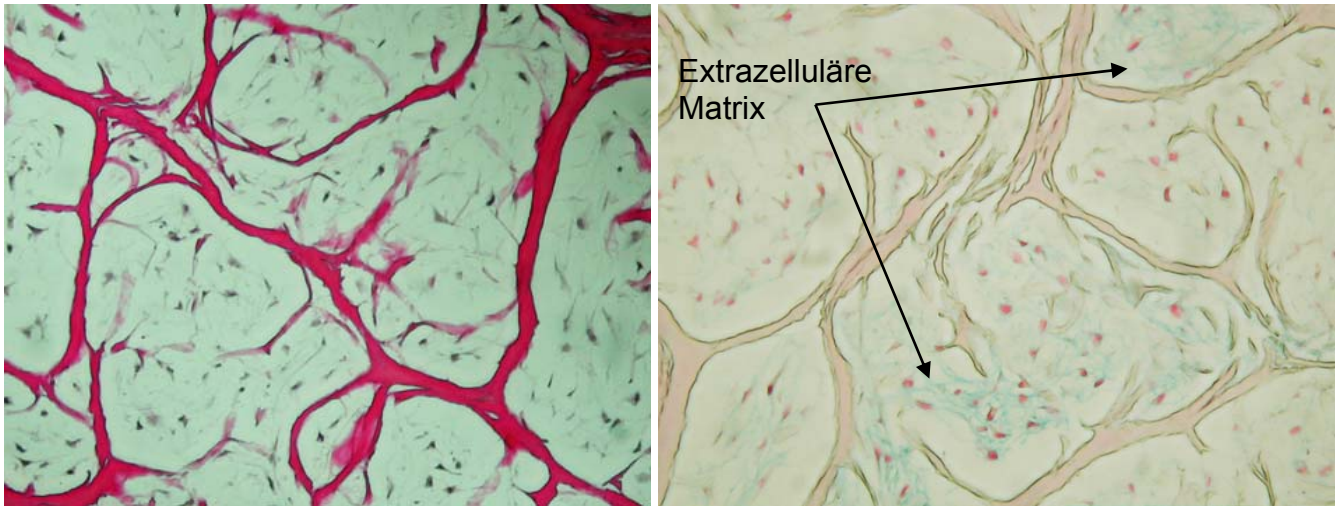
Photos von Kollagenmenisken mit unterschiedlich langer Kulturdauer (in vitro):



Abbildungen 3.1.1 und 3.1.2: Besiedelte Kollagenmenisken nach 2 Wochen in Kultur (Vergrößerung $\times 40$ und $\times 100$), HE-Färbung.



Abbildungen 3.2.1 und 3.2.2: Besiedelte Kollagenmenisken nach 14 Wochen in Kultur (Vergrößerung $\times 40$ und $\times 100$), HE-Färbung.

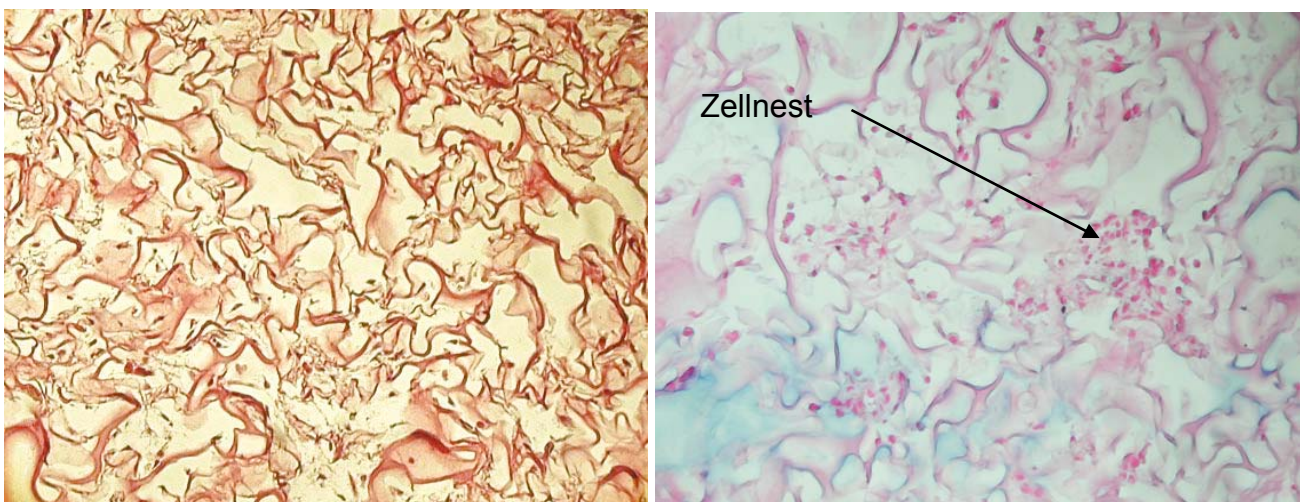


Abbildungen 3.3.1 und 3.3.2: Besiedelte Kollagenmenisken nach 14 Wochen in Kultur (Vergrößerung $\times 100$), van Giesson- und Alcian Blau-Färbung.

Auf den Histologien mit zweiwöchiger Kulturdauer ist um die Zellen nur wenig oder keine Matrix zu erkennen, nach 14 Wochen in Kultur sieht man sehr deutlich die extrazelluläre Matrix und die Kollagenfasern, die sich auch in Alcian Blau- und van Giesson-Färbungen nachweisen lässt.

b) Resorba®:

Die Richtlinien für gute Besiedelungen entsprachen denen bei den Kollagenmenisken: gleichmäßige Zellverteilung und beginnende Matrixbildung. Es zeigte sich schon bei der Injektion der Zellen, dass die Struktur und fehlende Festigkeit der Schwämme nicht dazu geeignet waren, als Meniskusersatz zu dienen. Sie zogen sich nach der Injektion zusammen und hatten die Konsistenz weichen Schaumstoffs.

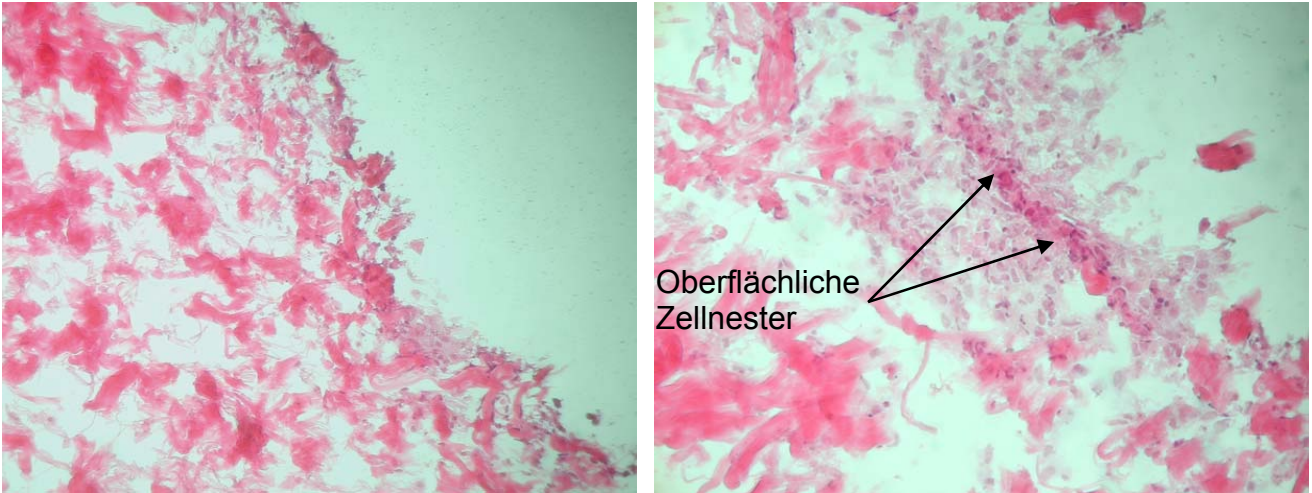


Abbildungen 3.4.1 und 3.4.2: Resorba®-Schwämme in HE-Färbung (Vergrößerung $\times 40$, 2 Wochen in Kultur) und Alcian Blau-Färbung ($\times 100$, 6 Wochen in Kultur).

Es war eine annähernd gleichmäßige Zellbesiedelung möglich und nach ca. 2-3 Wochen eine beginnende Matrixbildung zu beobachten.

c) Verigen®:

Der Aufbau der Verigen®-Membranen ermöglicht lediglich eine oberflächige Zellbesiedelung. Auch hier war schnell klar, dass die Membranen aufgrund ihres Aufbaus, sie sind nur 0,5 mm dick, und ihrer zu geringen Stabilität für die Verwendung als Meniskusersatz ungeeignet sind.

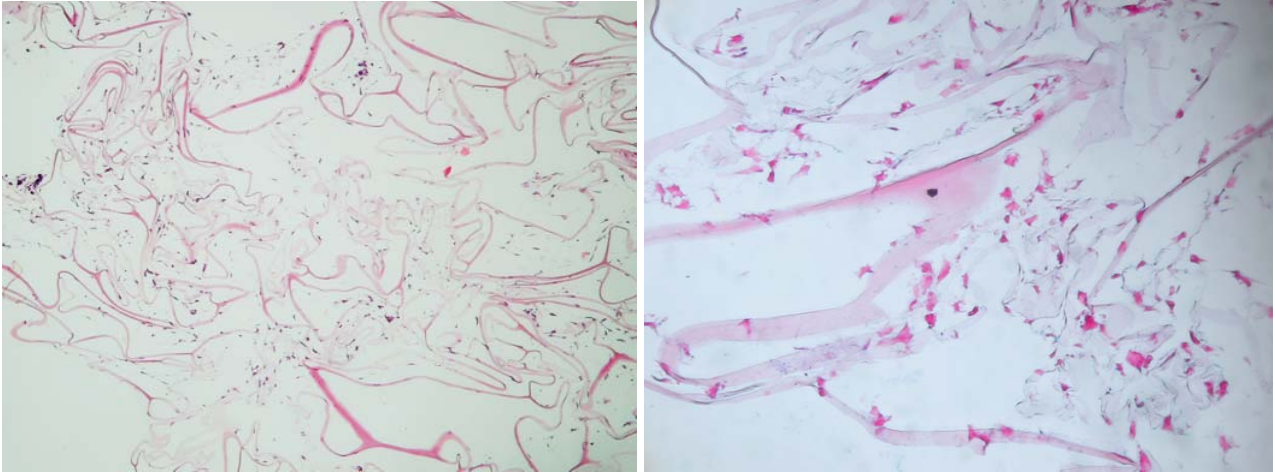


Abbildungen 3.5.1 und 3.5.2: Verigen®-Membranen (Vergrößerung $\times 40$ und $\times 100$) nach 3 Wochen in Kultur (HE- Färbung).

Die Membranen ließen sich nur oberflächlich mit Zellen besiedeln. Meist bildeten sich Zellnester ähnlich, wie in Abbildung 3.5.2 gezeigt.

d) Tachotop®:

Aufgrund der sehr grobporigen Struktur der Schwämme und der damit verbundenen hohen Brüchigkeit und fehlenden Belastungsfähigkeit waren sie nicht geeignet für die Verwendung als Meniskusersatz. Die histologischen Schnitte wurden ebenfalls nach gleichmäßiger Zellbesiedelung und Bildung von extrazellulärer Matrix untersucht.



Abbildungen 3.6.1 und 3.6.2: HE-Färbung in 40-facher Vergrößerung (6 Wochen in Kultur) und rechts Alcian Blau-Färbung in 100-facher Vergrößerung (11 Wochen in Kultur).

Die Tachotop®-Schwämme ließen sich gleichmäßig mit Fibrochondrocyten besiedeln. Nach kurzer Zeit wurde zudem gebildete extrazelluläre Matrix sichtbar.

3.2 Ergebnisse der Tierstudie

3.2.1 Proliferationsverhalten der Fibrochondrocyten, Besiedelung der Kollagenmenisken

Von den 39 Biopsaten wurden 7 verworfen, da sie nicht benötigt wurden. Die Zellen von zwei Tieren waren nach der retroviralen Markierung kontaminiert, so dass sie entsorgt werden mussten. Es blieben somit noch 30 Biopsate, von denen die Zellen kultiviert wurden und bei denen das Proliferationsverhalten der Zellen untereinander verglichen werden konnte. Als Vergleichsparameter diente die Dauer, nach der die Zellen (definierte Zellzahl) in einer neuen Zellkulturflasche nahezu Konfluenz erreichten und gesplittet werden mussten.

Bei 21 Tieren war das Wachstum der Zellen als gut einzustufen (Gruppe 1), als mäßig stufen wir das Zellwachstum 7 mal ein (Gruppe 2), lediglich die Zellen von zwei Tieren wuchsen schlecht (Gruppe 3).

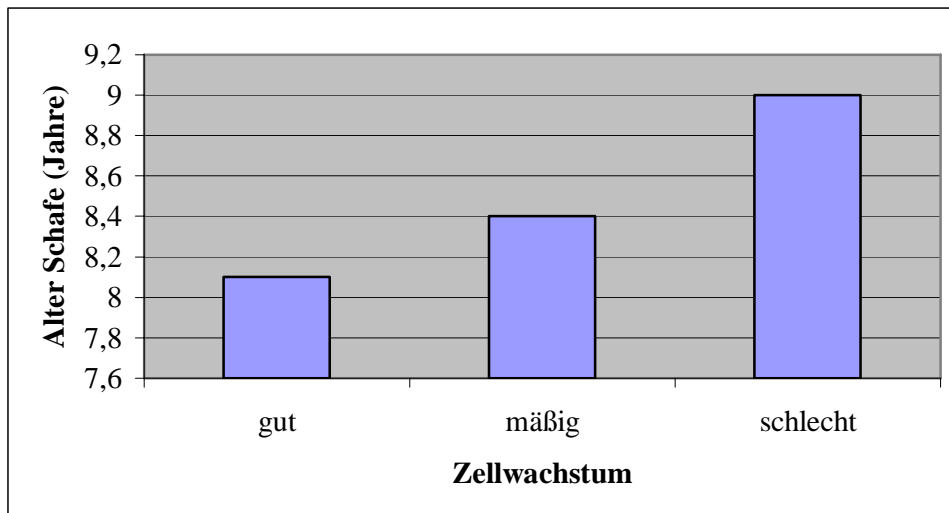


Diagramm 3.1: Proliferationsverhalten der Fibrochondrocyten im Vergleich zum Alter der Tiere.

Beim Vergleich der drei Gruppen besteht zunächst das Problem, dass sie in ihrer Größe sehr unterschiedlich sind. Wir verglichen nun das Durchschnittsalter der einzelnen Gruppen miteinander. Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen. p-Werte:

Gut - mäßig: 0,32.

Mäßig - schlecht: 0,16.

Gut - schlecht: 0,08.

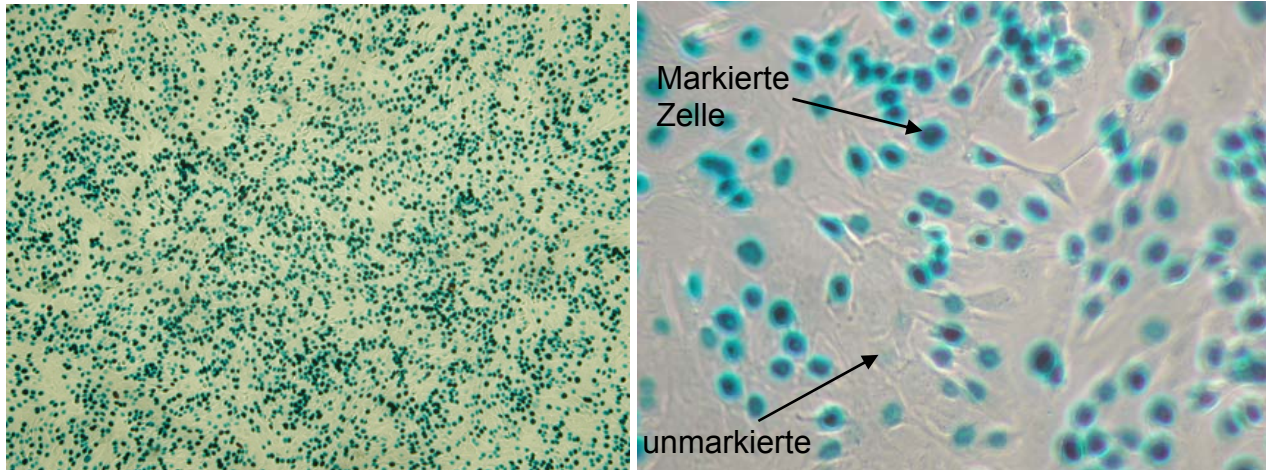
Insgesamt wuchsen die Fibrochondrocyten der Schafe langsamer als die der Kaninchen, die für die Vorversuche verwendet wurden. Es dauerte nach der Isolierung der Zellen länger, bis die Zellen am Boden hafteten und zu proliferieren begannen.

Nach der Besiedelung der Kollagenmenisken wurden im Durchschnitt $5,5 \times 10^5$ Zellen im Überstand und am Boden der Kulturschale gefunden. Das entspricht ungefähr 5 % der eingebrachten Zellzahl.

3.2.2 Stabilität der β -Galactosidase-Expression in vivo

Bei drei der Explantate aus der Gruppe mit LacZ-markierten Zellen wurden zusätzlich zu den Paraffinschnitten Gefrierschnitte gemacht, um die Histologien mit X-Gal anfärben zu können. Da es die Größe der Explantate nicht zuließ, konnten nicht von allen Explantaten dieser Gruppe Gefrierschnitte gemacht werden und eine Färbung von Paraffinschnitten mit X-Gal war uns nicht möglich. Bei den sechs Zellpopulationen, die mit LacZ markiert worden waren und schließlich implantiert wurden, lag der Anteil der transduzierten Zellen vor der Implantation zwischen 63 und 95 % mit einem Mittelwert von 81,6 %.

Nach 12 Wochen ließen sich jedoch keine Zellen in unseren Histologien mit X-Gal anfärben.



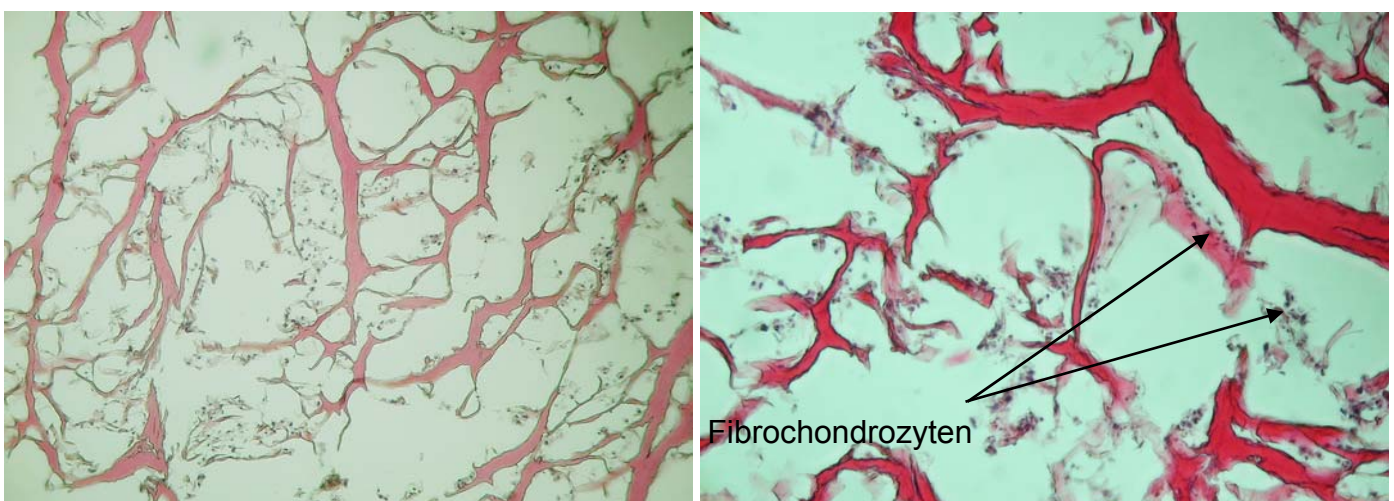
Abbildungen 3.7.1 und 3.7.2: Fibrochondrocyten in Monolayer-Kultur unmittelbar nach Transduktion mit LacZ, X-Gal-Färbung.

3.2.3 Histologische Kontrolle der besiedelten Kollagenmenisken bei Implantation

Insgesamt wurden 16 mit autologen Zellen besiedelte Kollagenmenisken implantiert. Von 12 dieser 16 wurden zum Zeitpunkt der Implantation Histologien gemacht, um die Zellbesiedelung zu überprüfen. Somit bestand das Problem, dass nicht bei allen Implantationen Reste anfielen, um Histologien machen zu können und die verwendeten Reste zum Teil sehr klein waren und aus den äußersten Randbereichen kamen.

Von den 12 Proben waren lediglich 3 als gut besiedelt einzustufen, weitere 3 als mäßig und 6 als schlecht. Bei den 3 Proben mit guter Besiedelung fiel auf, dass jeweils der ganze Kollagenmeniskus im Querschnitt zu sehen war, d.h. die Reststücke waren noch relativ groß.

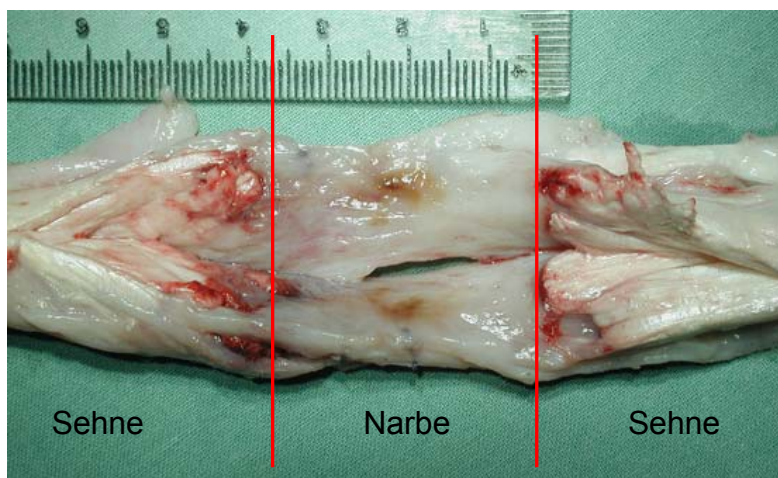
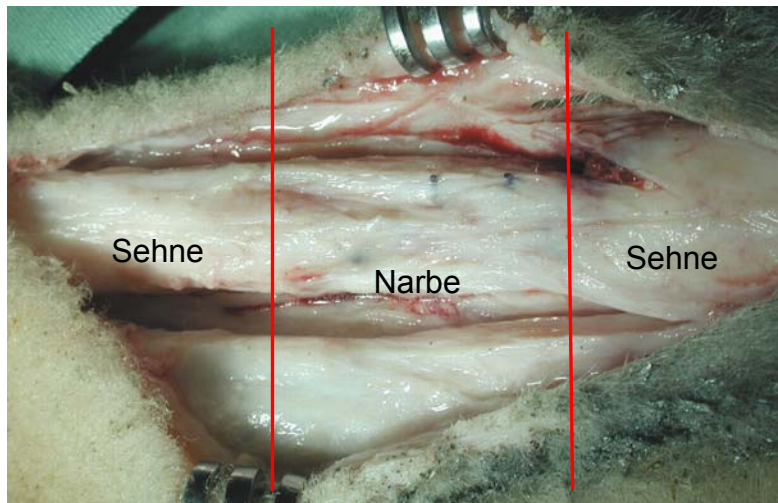
Bei allen übrigen Proben handelte es sich jedoch nur noch um kleine Stücke (z.B. die Ecken des Kollagenmeniskus), insbesondere die als schlecht eingestuften Reststücke waren allesamt sehr klein.



Abbildungen 3.8.1 und 3.8.2: Kollagenmeniskus Nr. 35 (links) und Nr. 19 (rechts) zum Zeitpunkt der Implantation, d.h. nach Kultur in vitro (Vergrößerung $\times 40$ und $\times 100$, HE-Färbung).

3.2.4 Heilung der Achillessehne

Wir überprüften stichprobenartig die Heilung der Achillessehne und kamen zu den gleichen Ergebnissen wie Bruns et al. (Knee Surg. 2000, S. 367): durch eine narbige Heilung wird der resezierte Teil überbrückt und ist nach ungefähr 6 Wochen biomechanisch stabil. Die Tiere begannen nach zwei Wochen langsam mit der Belastung der operierten Extremität und steigerten diese bis zur Vollbelastung nach ungefähr 6 Wochen. Diese Befunde deckten sich mit dem makroskopischen Aussehen der Sehne.



Abbildungen 3.9 (oben) und 3.10: Achillessehne 3 Wochen nach Durchtrennung, oben in situ, unten entnommen und längsgespaltet.

3.3.1 Gelenksabstrich

Bei den Schafen Nr. 4, 5, 19, 25 und 36 wurden Abstriche gemacht und mikrobiologisch untersucht.

Lediglich bei Schaf Nr. 36, bei dem ein blutiger Erguß gefunden wurde, fiel das Ergebnis positiv aus, es wurden vereinzelt Koagulase-negative Staphylokokken gefunden. Das Schaf Nr. 36 hatte schon zum Zeitpunkt der Implantation eine Liegeschwiele an der Brust, die revidiert werden musste. Nach Berichten des

Tierarztes lag es fast nur, nach ca. 2 ½ Monaten riß schließlich die Brustschwiele auf und das Tier musste aufgrund einer arteriellen Blutung frühzeitig geopfert werden. Bei der klinischen Untersuchung des Knies fiel ein kontraktives Kniegelenk auf. Wegen dieser Befunde wurde es aus der Beobachtungsgruppe herausgenommen. Alle anderen Abstriche waren negativ.

3.3.2 Makroskopische Beurteilung der Explantate

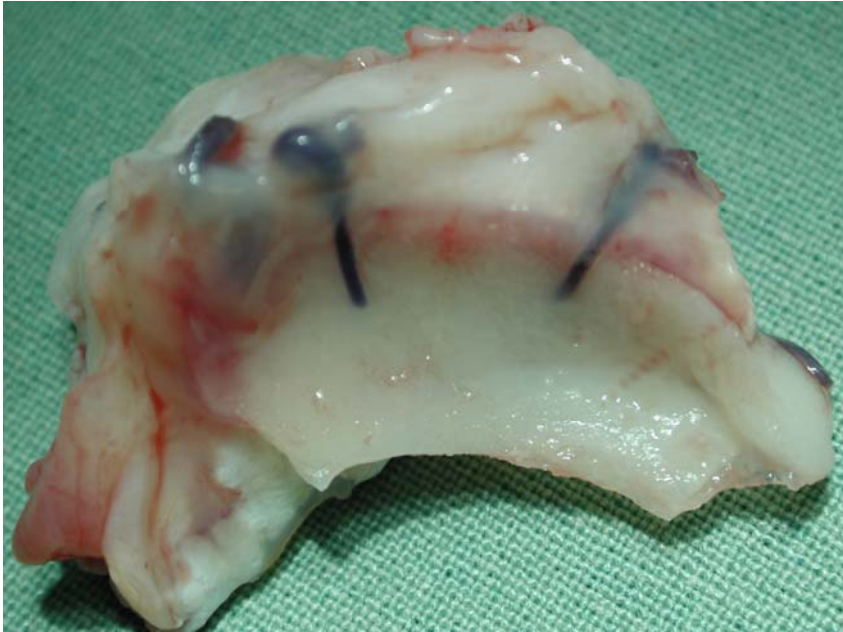


Abbildung 3.11: Besiedelter Kollagenmeniskus (Nr. 2) 3 Wochen nach Implantation.

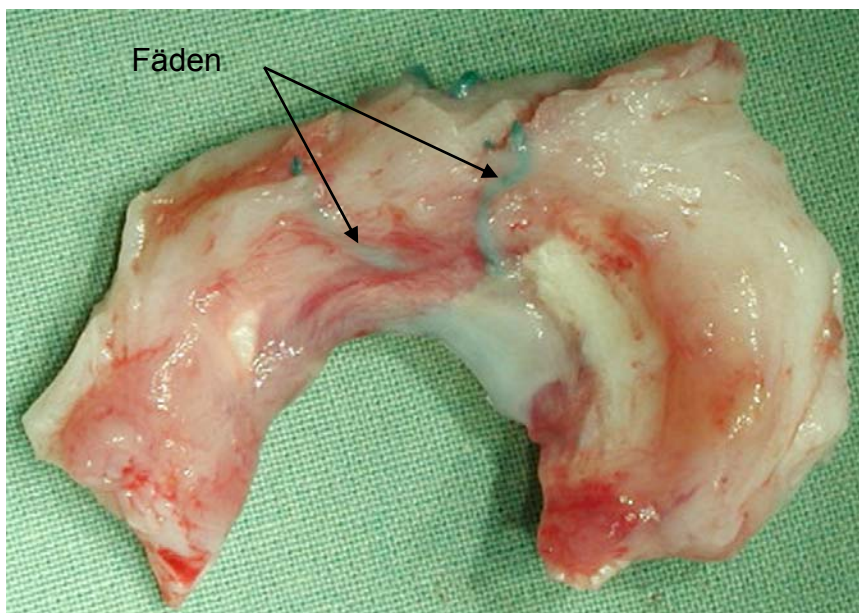


Abbildung 3.12: Nr. 20 (CMI+), 6 Wochen, gute Integration entlang der Meniskusbasis.



Abbildung 3.13: Nr. 30 (CMI+), 3-Monats-Explantation, Integration nur am Vorderhorn.

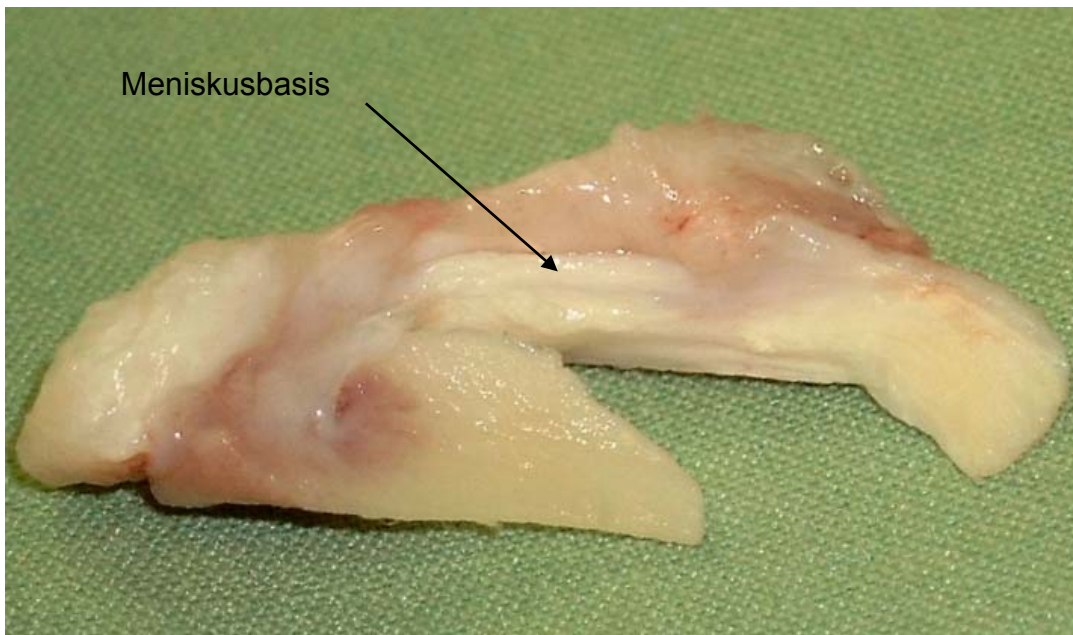


Abbildung 3.14: Nr. 14 (CMI-), 6-Monate, Integration nur am Vorderhorn.

Nr.	Gruppe	Beobachtung über	Größe/Form	Oberfläche	Färbung	Integration	korrekte anatom. Lage	Gesamt-score
2	CMI+	3 Wo.	3	2	2	1-vorne	1	9
19	CMI+L	3 Wo.	2	2	2	2	1	9
20	CMI+L	6 Wo.	1	1	2	2	1	7
4	CMI+	3 Mon.	2	2	0	1	1	6
25	CMI+	3 Mon.	3	2	1	0	0	6
26	CMI+	3 Mon.	1	2	1	0	0	4
35	CMI+	3 Mon.	3	2	1	1-vorne	1	8
29	CMI+L	3 Mon.	0					0
30	CMI+L	3 Mon.	3	1	1	1-vorne	1	7
38	CMI+L	3 Mon.	3	2	1	2	1	9
39	CMI+L	3 Mon.	3	2	1	2	1	9
1	CMI+	6 Mon.	2	1	2	1-hinten	1	7
3	CMI+	6 Mon.	0					0
17	CMI+	6 Mon.	0					0
18	CMI+	6 Mon.	3	1	1	1-vorne	1	7
6	CMI-	3 Wo.	2	2	1	1	1	7
7	CMI-	3 Mon.	3	0	1	1	1	6
16	CMI-	3 Mon.	0					0
27	CMI-	3 Mon.	3	2	1	1	1	8
28	CMI-	3 Mon.	1	2	2	1	1	7
31	CMI-	3 Mon.	3	0	1	1-vorne	1	6
32	CMI-	3 Mon.	2	2	2	1	1	8
34	CMI-	3 Mon.	3	2	1	1-vorne	1	8
37	CMI-	3 Mon.	1	0	1	0	0	2
5	CMI-	6 Mon.	0					0
8	CMI-	6 Mon.	3	1	1	1-vorne	0	6
14	CMI-	6 Mon.	3	2	1	1-vorne	1	8
15	CMI-	6 Mon.	0					0
23	leer	3 Mon.	-	2	1	1	1	5
24	leer	3 Mon.	-	1	1	1	1	4
10	leer	6 Mon.	-	2	2	1	1	6
11	leer	6 Mon.	-	2	2	1	1	6
12	leer	6 Mon.	-	2	1	1	1	5

Tabelle 3.2: Die einzelnen Scores wurden gemäß der Auflistung im Materialien- und Methoden-Teil vergeben und zusammengezählt.

Die Explantate erreichten Gesamtscores zwischen 0 (kein Explantat vorhanden) und 9, der höchste von 10 wurde nicht erreicht.

Es wurden nun jeweils die durchschnittlichen Gesamtscores der 3-Monats-Gruppen und die der 6-Monats-Gruppen miteinander verglichen, jeweils die besiedelten mit den unbesiedelten Kollagenmenisken. Die Regenerate, die sich in der meniskektomierten Gruppe bildeten, wurden der Vollständigkeit halber beurteilt und aufgelistet.

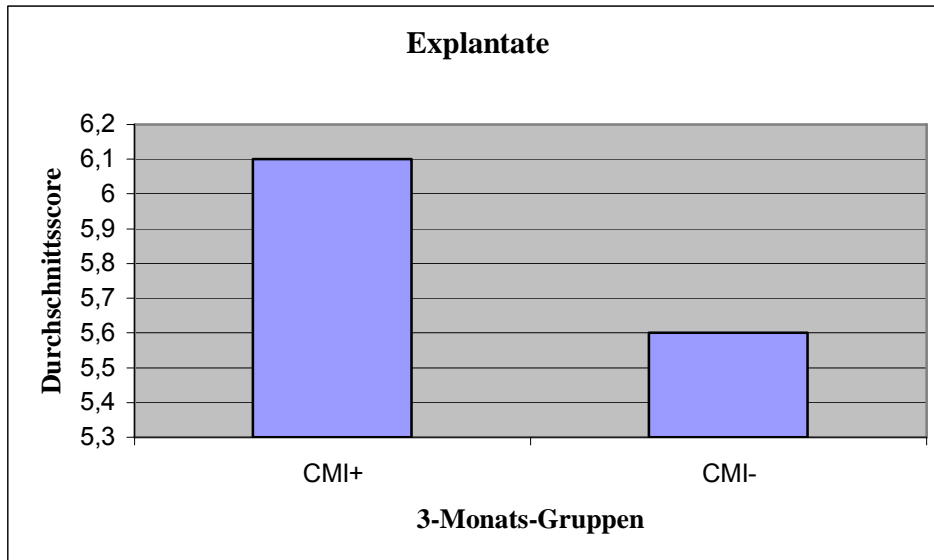


Diagramm 3.2: Makroskopische Beurteilung der Explantate nach obigem Score.

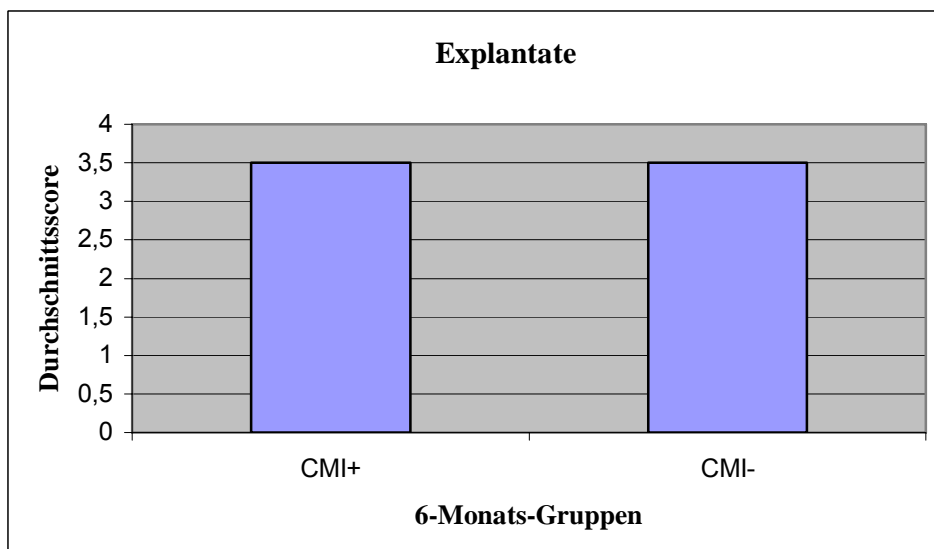


Diagramm 3.3: Makroskopische Beurteilung der Explantate (6-Monats-Gruppen).

Um zu ermitteln, ob es zwischen den beiden Gruppen jeweils signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gibt, wurden die p-Werte berechnet:

3-Monats-Gruppen

CMI+ ↔ CMI- : 0,214.

6-Monats-Gruppen

CMI+ ↔ CMI- : 0,5.

Zwischen den besiedelten und den unbesiedelten Kollagenmenisken waren makroskopisch somit keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

3.3.3 Beurteilung der Gelenkflächen

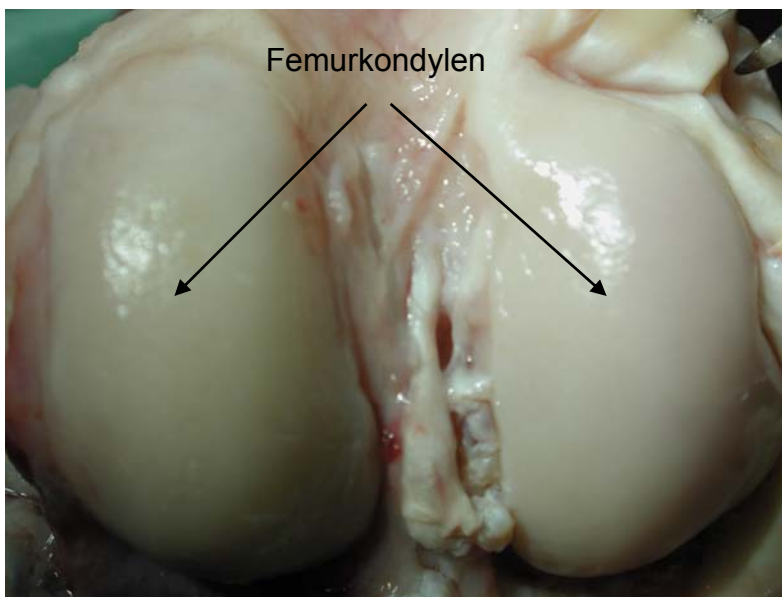


Abbildung 3.15: Makroskopisch intakter Knorpel an den Femurkondylen zum Zeitpunkt der Explantation (3 Monate).

Zunächst sind in der Tabelle die Gruppen der Beobachtungszeit von 3 Monaten aufgeführt, danach folgen diejenigen mit einer Beobachtungszeit von 6 Monaten.

Gruppe:	Anatom. Gebiet	Durchschnittsgrad	Verteilung der Grade				
			0	1	2	3	4
CMI+ (3 Mon.)	<u>femoral:</u>						
	medial	0,3	7	0	1	0	0
	lateral	0	8	0	0	0	0
	<u>tibial:</u>						
	medial	0	8	0	0	0	0
	lateral	0	8	0	0	0	0
CMI- (3 Mon.)	<u>femoral:</u>						
	medial	0,4	6	1	1	0	0
	lateral	0	8	0	0	0	0
	<u>tibial:</u>						
	medial	0,4	7	0	0	1	0
	lateral	0	8	0	0	0	0
leer (3 Mon.)	<u>femoral:</u>						
	medial	1	2	0	2	0	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
	<u>tibial:</u>						
	medial	0	4	0	0	0	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
CMI+ (6 Mon.)	<u>femoral:</u>						
	medial	1	2	1	0	1	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
	<u>tibial:</u>						
	medial	0,8	3	0	0	1	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
CMI- (6 Mon.)	<u>femoral:</u>						
	medial	0,5	2	2	0	0	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
	<u>tibial:</u>						
	medial	0,8	3	0	0	1	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
leer (6 Mon.)	<u>femoral:</u>						
	medial	0	4	0	0	0	0
	lateral	0	4	0	0	0	0
	<u>tibial:</u>						
	medial	0	4	0	0	0	0
	lateral	0	4	0	0	0	0

Tabelle 3.3: Es sind jeweils die Anzahl der einzelnen Knorpeldefektgrade innerhalb der verschiedenen Gruppen aufgelistet und der zugehörige Durchschnittsgrad.

Der Durchschnittsgrad wurde innerhalb einer Gruppe addiert und in einem Diagramm dargestellt, um die Gruppen miteinander vergleichen zu können. Je höher die Gesamtzahl bzw. je höher der Balken, desto eher ist von degenerativen Veränderungen innerhalb dieser Gruppe auszugehen.

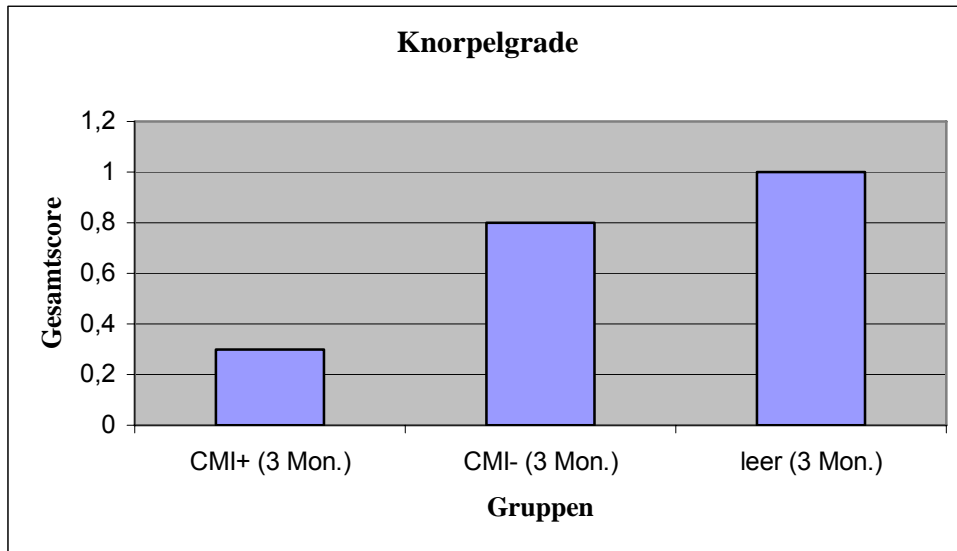


Diagramm 3.4: Vergleich der Gelenkflächen der 3-Monats-Gruppen.

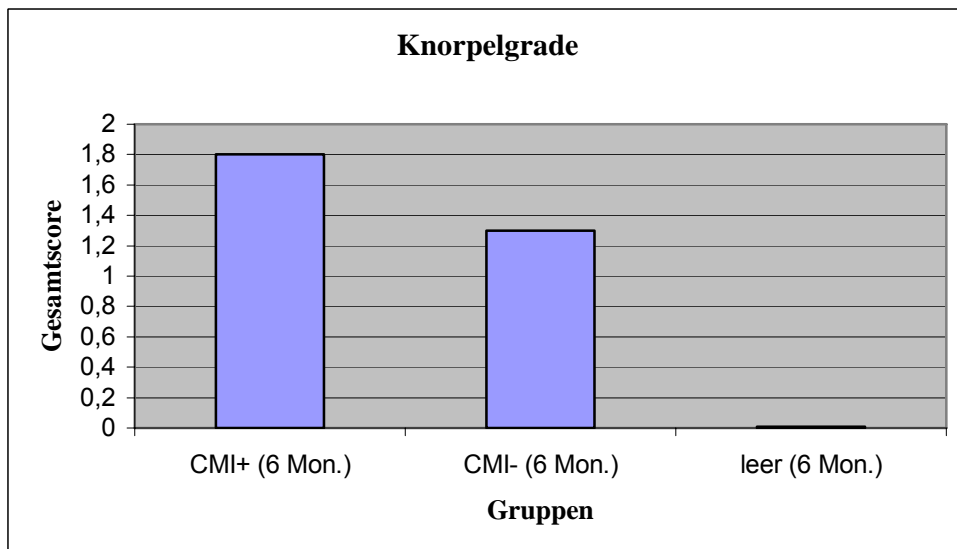


Diagramm 3.5: Vergleich der 6-Monats-Gruppen nach obigem Score.

Die Knorpelscores der einzelnen Gruppen wurden nun statistisch miteinander verglichen, jedoch zeigte sich weder innerhalb der 3-Monats-Gruppen noch innerhalb der 6-Monats-Gruppen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

p-Werte für die 3-Monatsgruppen:

CMI+ ↔ CMI- : 0,202.

CMI+ ↔ leer : 0,272.

CMI- ↔ leer : 0,432.

p-Werte für die 6-Monats-Gruppen:

CMI+ ↔ CMI- : 0,359.

CMI+ ↔ leer : 0,093.

CMI- ↔ leer : 0,099.

Das bedeutet, dass die Gelenkflächen der Schafe, in denen besiedelte Kollagenmenisken implantiert waren, sich nicht signifikant von denen mit unbesiedelten Kollagenmenisken unterschieden. Auch die Knorpel der meniskektomierten Schafe zeigten keine signifikant stärkeren Abnutzungserscheinungen als die der beiden anderen Gruppen.

3.3.4 Histologische Ergebnisse

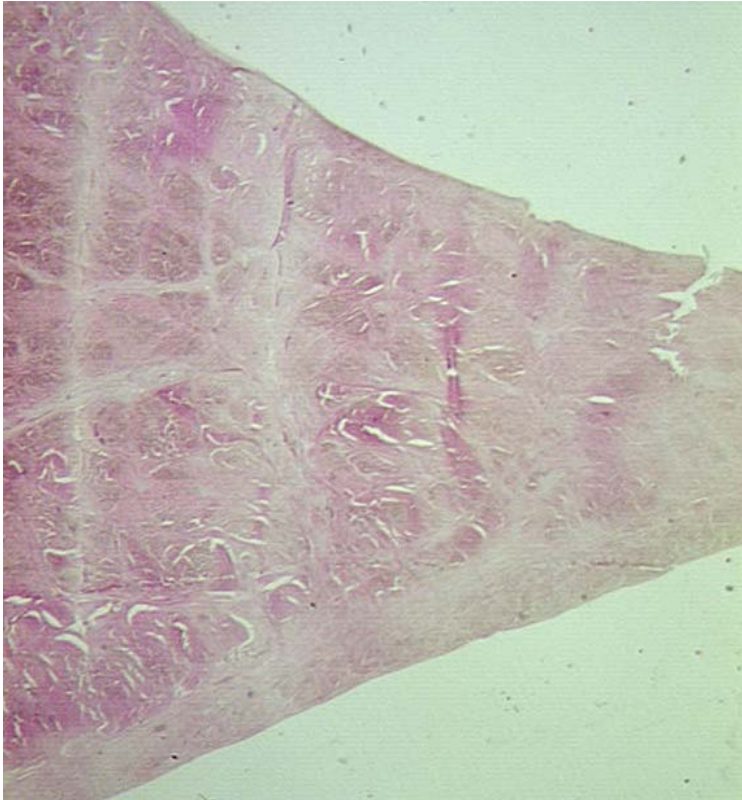
Von den insgesamt 39 Schafen mussten drei Schafe aus der Studie ausgeschlossen werden. In einigen Fällen waren keine Implantate oder Regenerate mehr vorhanden, so daß keine Explantate entnommen werden konnten. In den meniskektomierten Gruppen bildeten sich zum Teil Regenerate, die dann ebenfalls histologisch beurteilt wurden. Sie wurden jedoch nicht mit den beiden anderen Gruppen verglichen. Die Vergrößerungen sind jeweils in Klammern angegeben.

Zur Auswertung standen somit folgende Fallzahlen zur Verfügung:

Gruppe	"first look" (3 u. 6 Wochen)	3 Monate	6 Monate	Gesamtanzahl
CMI®+ (besiedelt)	3 (2×3Wo, 1×6Wo)	8	4	15
CMI®-(unbesiedelt)	1 (3 Wo)	8	4	13
Leerkontrolle		4	4	8
<i>gesamt</i>	4	20	12	36

Tabelle 3.3: Fallzahlen in den einzelnen Gruppen.

Zum Vergleich Histologien von nativen Schafmenisken (Risse = Artefakte, bei der Fixierung entstanden):



Abbildungen 3.16.1 (oben) und 3.16.2: nativer Schafsmeniskus in HE-Färbung (oben: $\times 63$, unten: $\times 250$).



Abbildung 3.17: nativer Schafsmeniskus entlang der Faserrichtung geschnitten (anders als in den Explantaten, HE, $\times 250$).

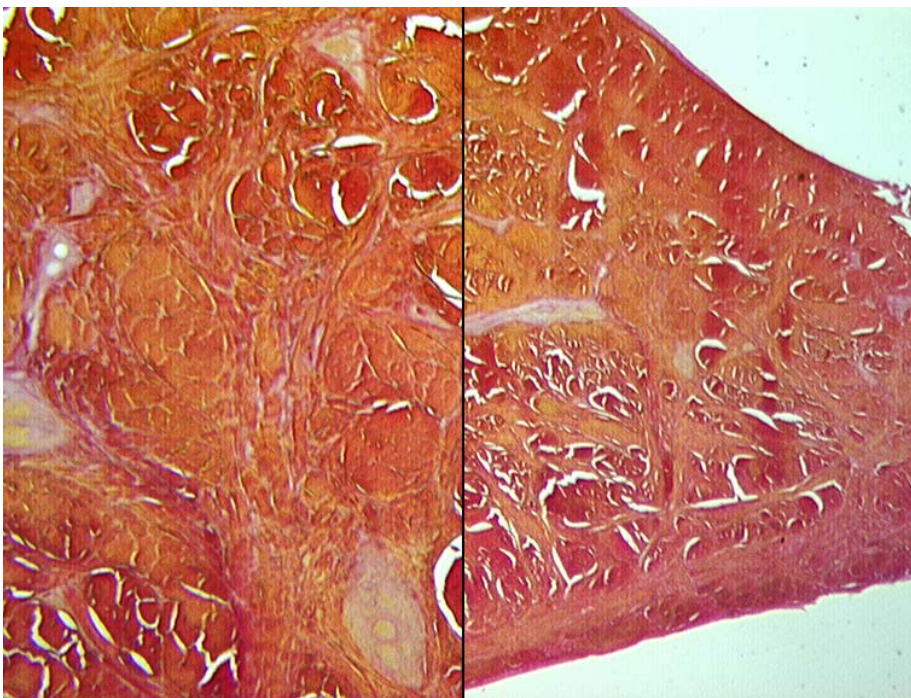


Abbildung 3.18: nativer Schafsmeniskus, van Giesson-Färbung (linke Hälfte: $\times 100$, rechte Hälfte: $\times 63$).

Ergebnisse der besiedelten 3-/6-Wochen-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
2	1,5	0	1	0	0,5	3
19	0	0	0	0	0,5	0,5
20	1	1,5	1	2	1	6,5

Tabelle 3.4: Histologische Ergebnisse der 3-/6-Wochen-Gruppe.

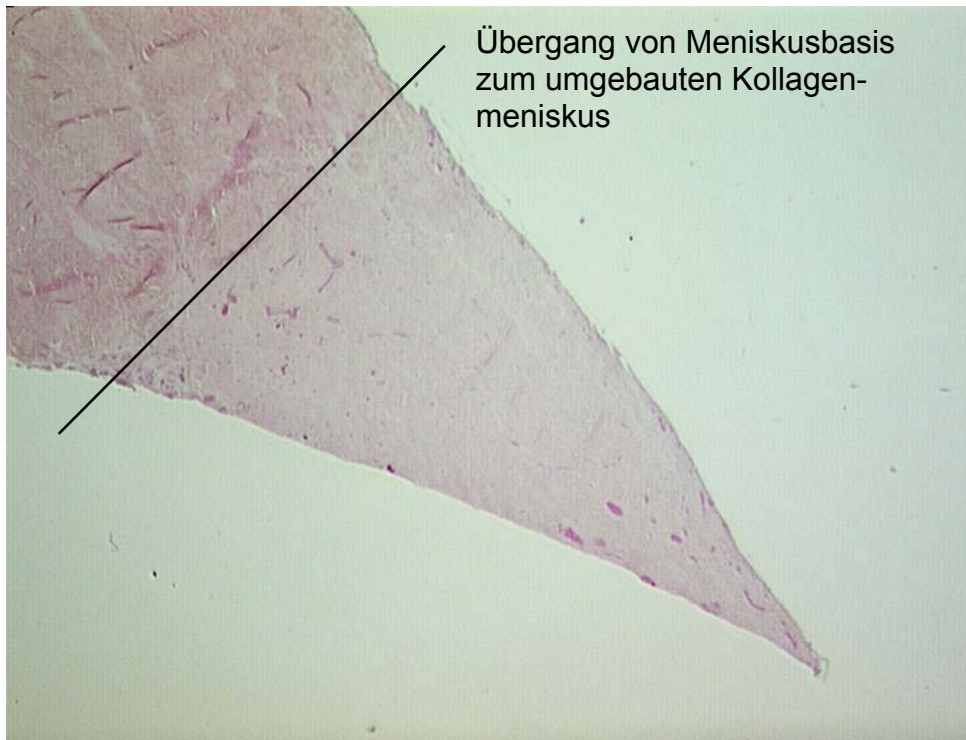


Abbildung 3.19.1: Explantat Nr. 20 in HE-Färbung, linker Rand Meniskusbasis (×63).

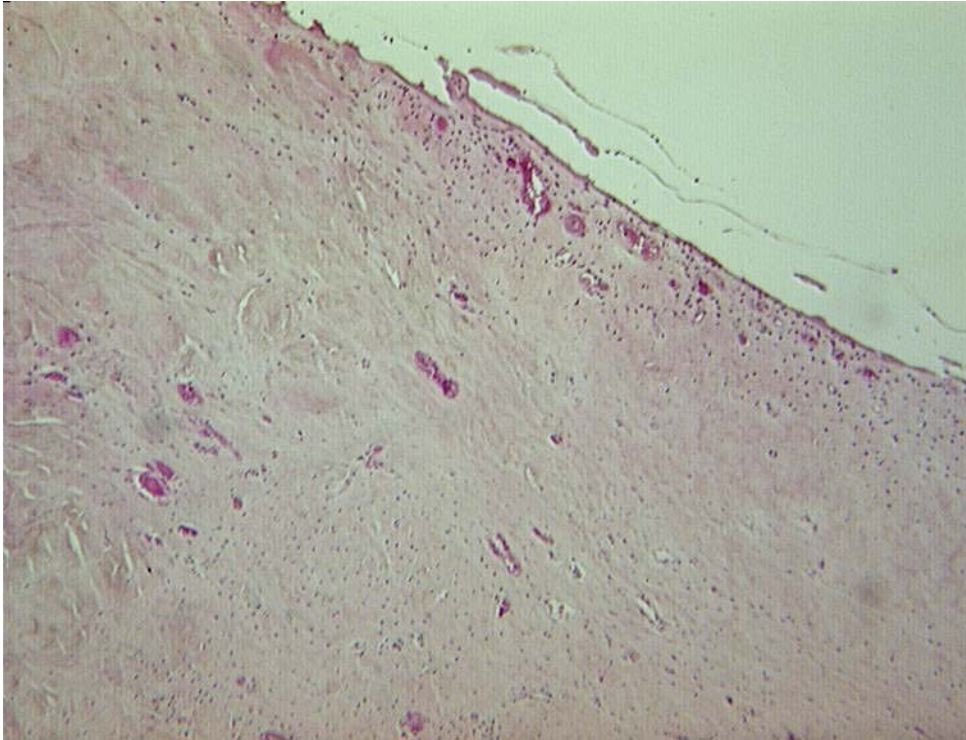


Abbildung 3.19.2: Nr. 20, Übergangsbereich vergrößert, HE-Färbung ($\times 100$).

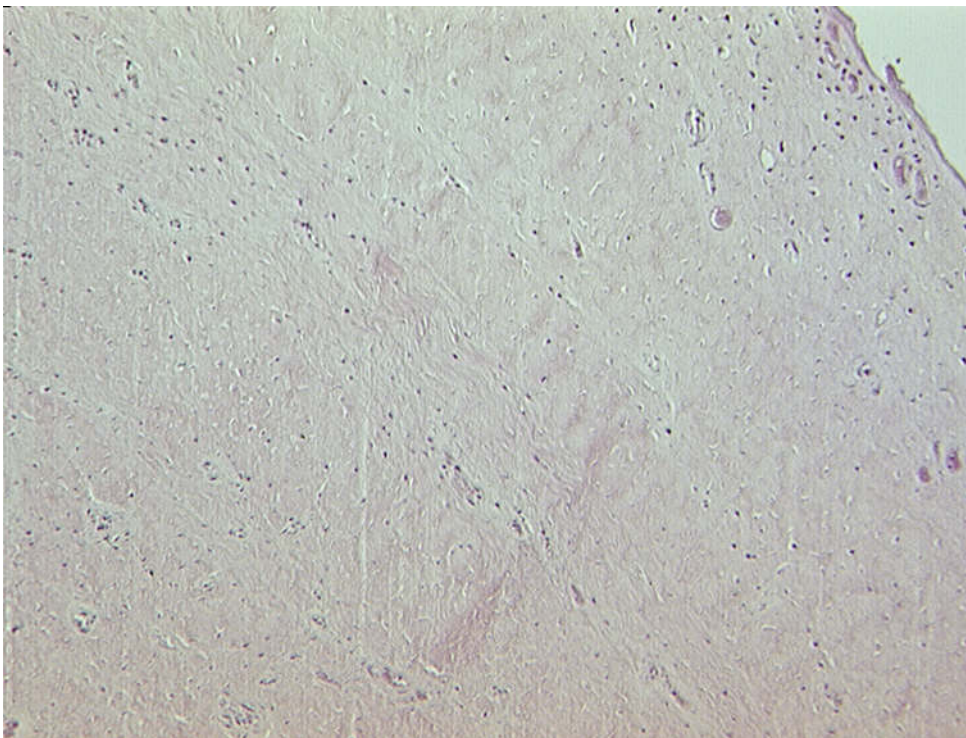


Abbildung 3.19.3: Nr. 20, HE ($\times 100$).



Abbildung 3.19.4: Nr. 20, obliterierte Gefäße stellen sich gelblich dar, Kollagenfasern rot-bräunlich, van Giesson ($\times 100$).

Ergebnisse der unbesiedelten 3 Wochen-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
6	1	0	2	2	2	7

Tabelle 3.5: Unbesiedeltes 3-Wochen-Explantat.

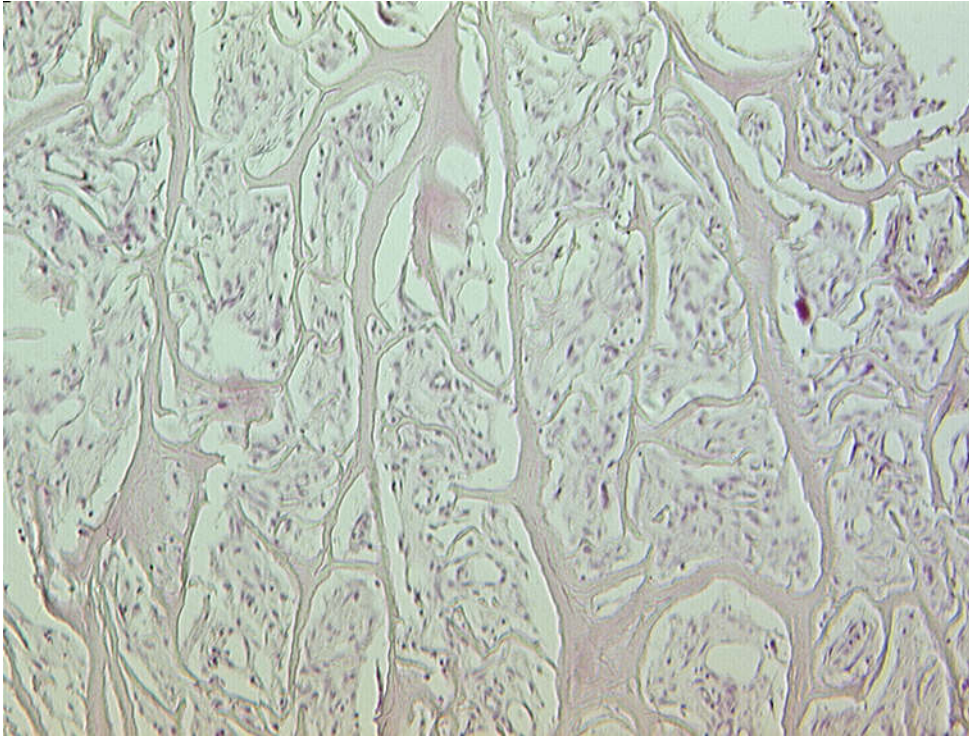


Abbildung 3.20.1: Explantat Nr. 6, HE ($\times 250$).

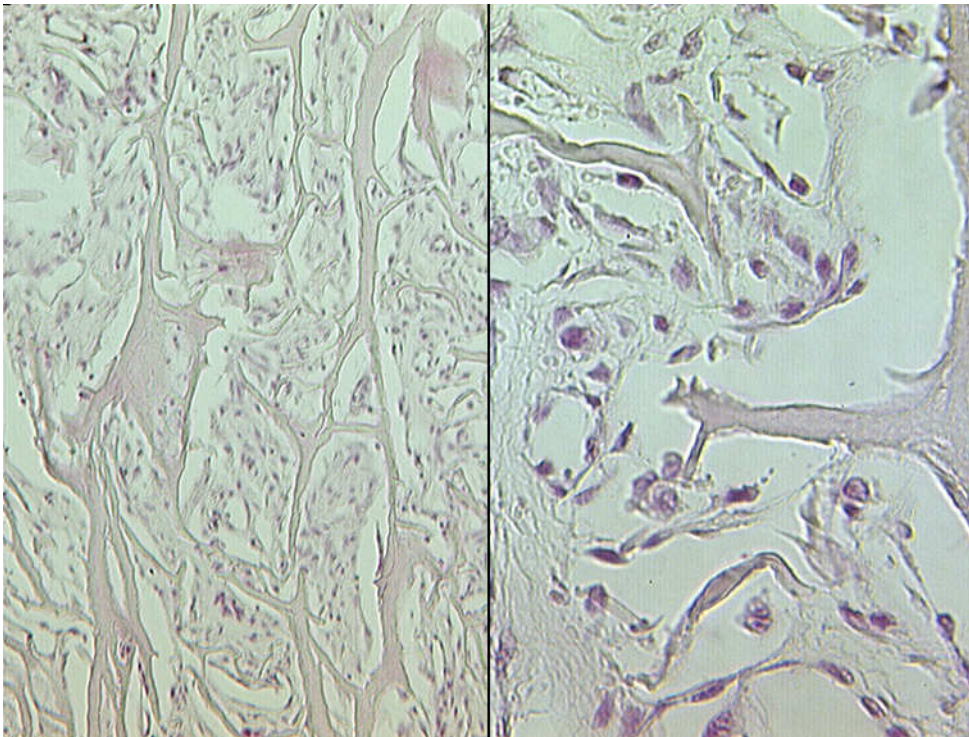


Abbildung 3.20.2: Nr. 6, rechts vergrößerter Ausschnitt ($\times 400$) aus der linken Bildhälfte ($\times 250$), HE.



Abbildung 3.20.3: Nr. 6 van Giesson ($\times 400$).

Vergleich der besiedelten (Gruppe 1) mit der unbesiedelten (Gruppe 2) 3- bzw. 6-Wochen-Gruppe:

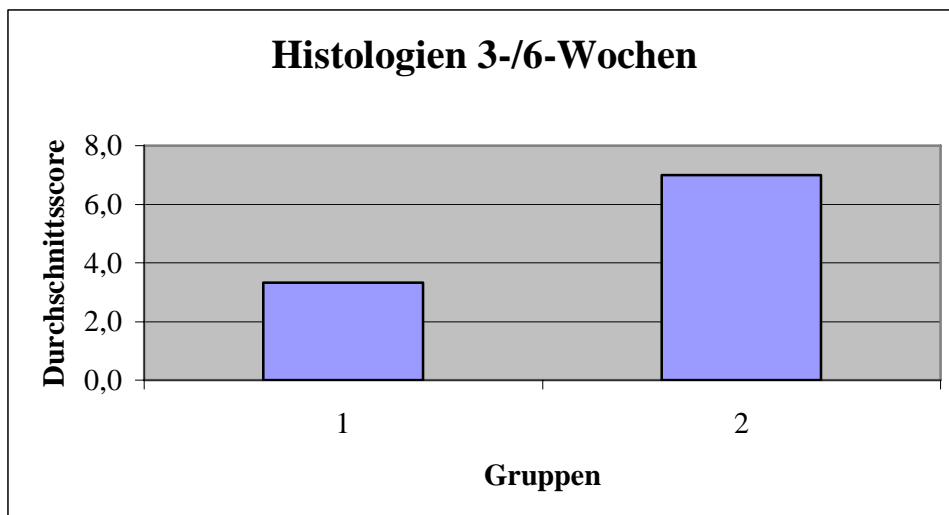


Diagramm 3.6: Übersicht der 3-/6-Wochen-Gruppe.

Ein statistischer Vergleich der beiden Gruppen ist aufgrund der kleinen Fallzahl nicht möglich und war auch nicht beabsichtigt.

Ergebnisse der besiedelten 3 Monats-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
4	2	0	2	2	2	8
25	1	0	2	2	2	7
26	1	0	0	0,5	1,5	3
29	Kein Explantat					0
30	2	0	1	2	1	6
35	2	1	2	2	2	9
38	0	1	1	1	1,5	4,5
39	1	1	2	1,5	1,5	7

Tabelle 3.6: Histologische Ergebnisse der besiedelten 3-Monats-Gruppe.

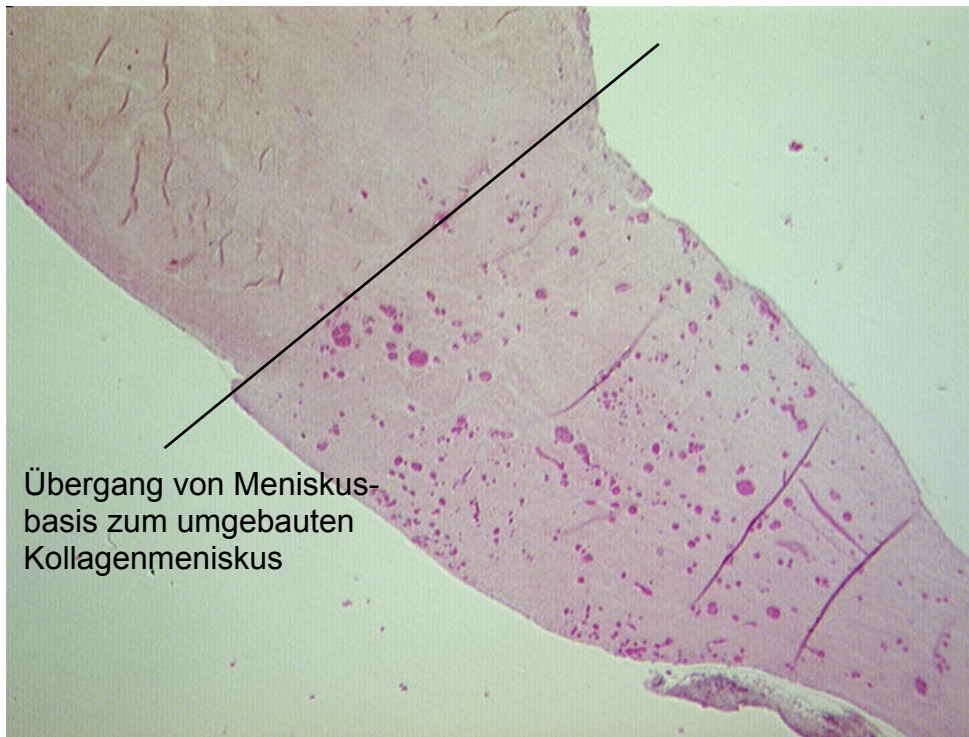


Abbildung 3.21.1: Explantat Nr. 4, Meniskusbasis links oben, HE-Färbung (×63).

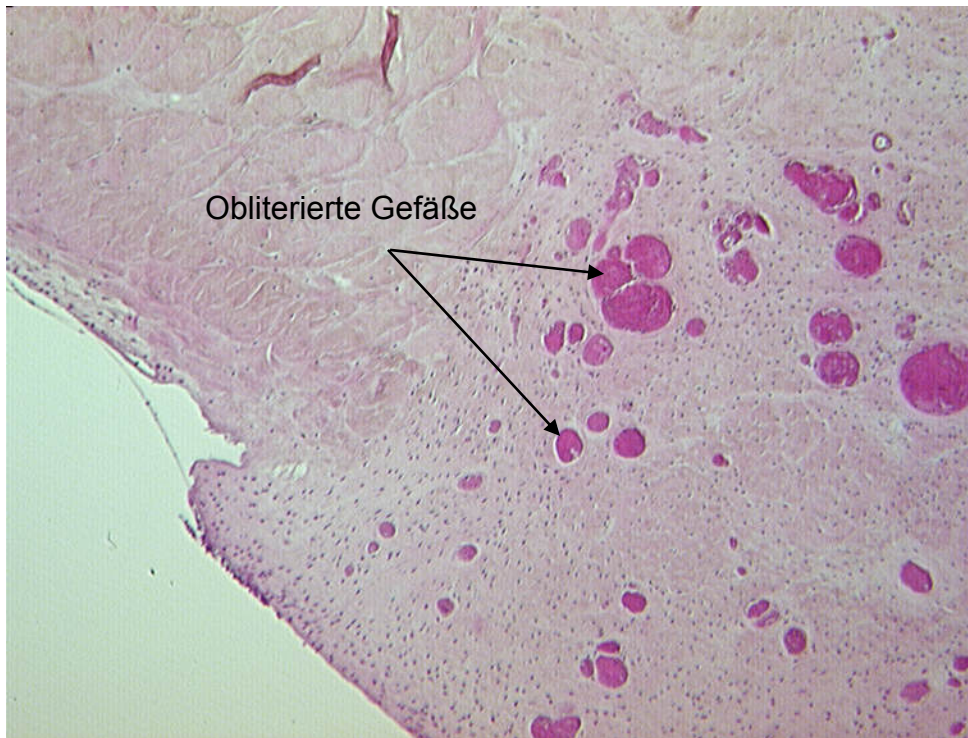


Abbildung 3.21.2: Vergrößerung der Übergangszone, HE ($\times 100$).

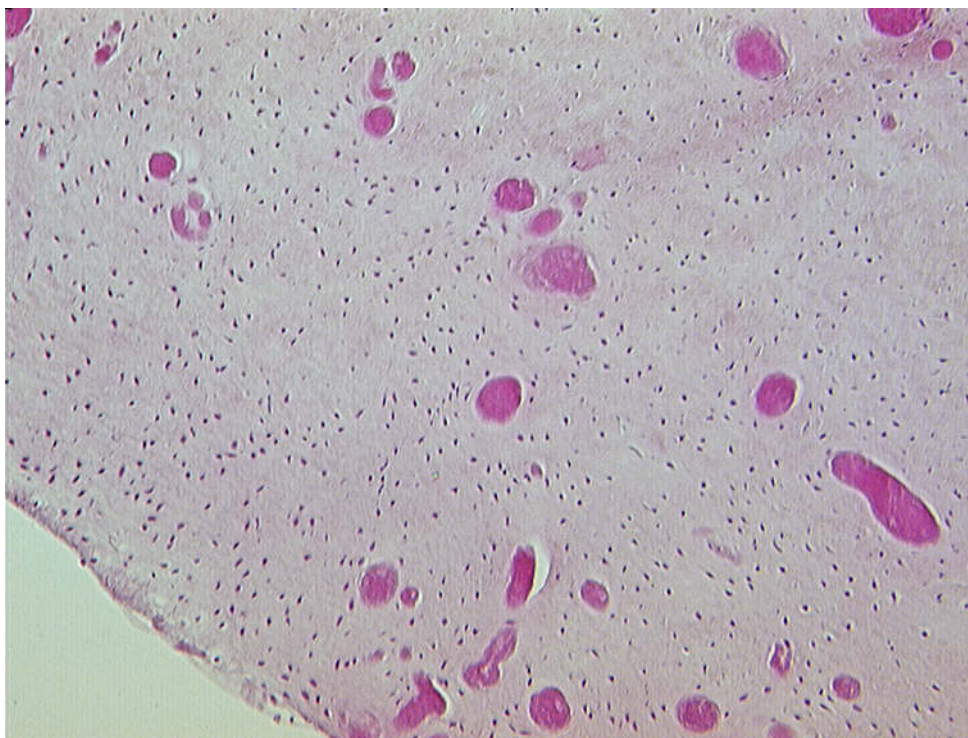


Abbildung 3.21.3: Nr. 4, HE ($\times 250$).

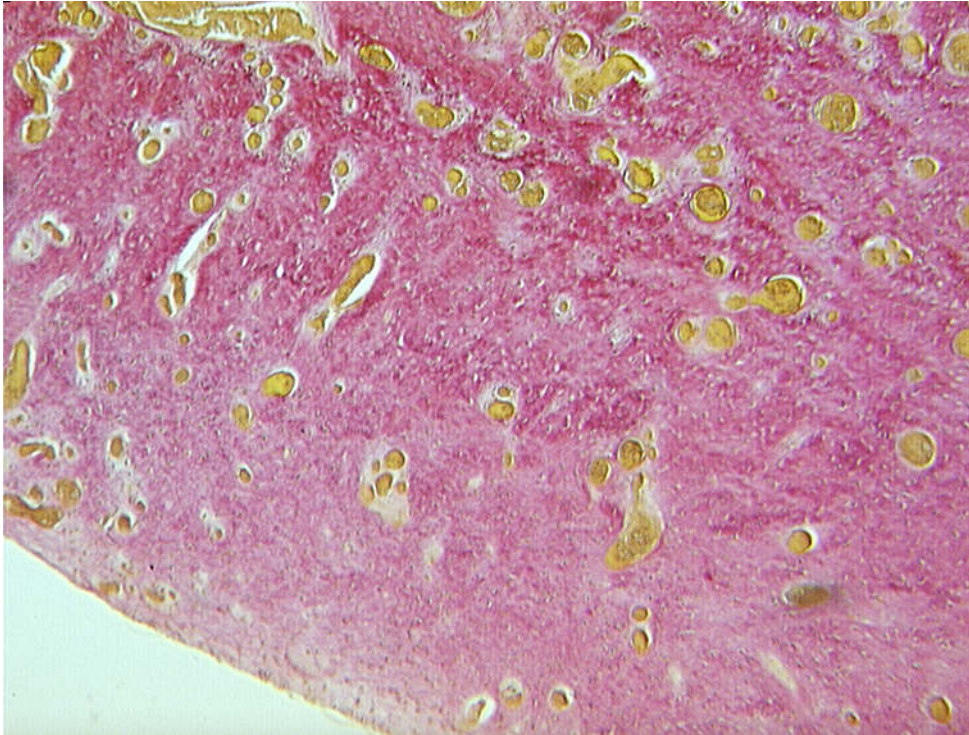


Abbildung 3.21.4: Nr. 4, van Giesson (obliterierte Gefäße gelb, $\times 250$).

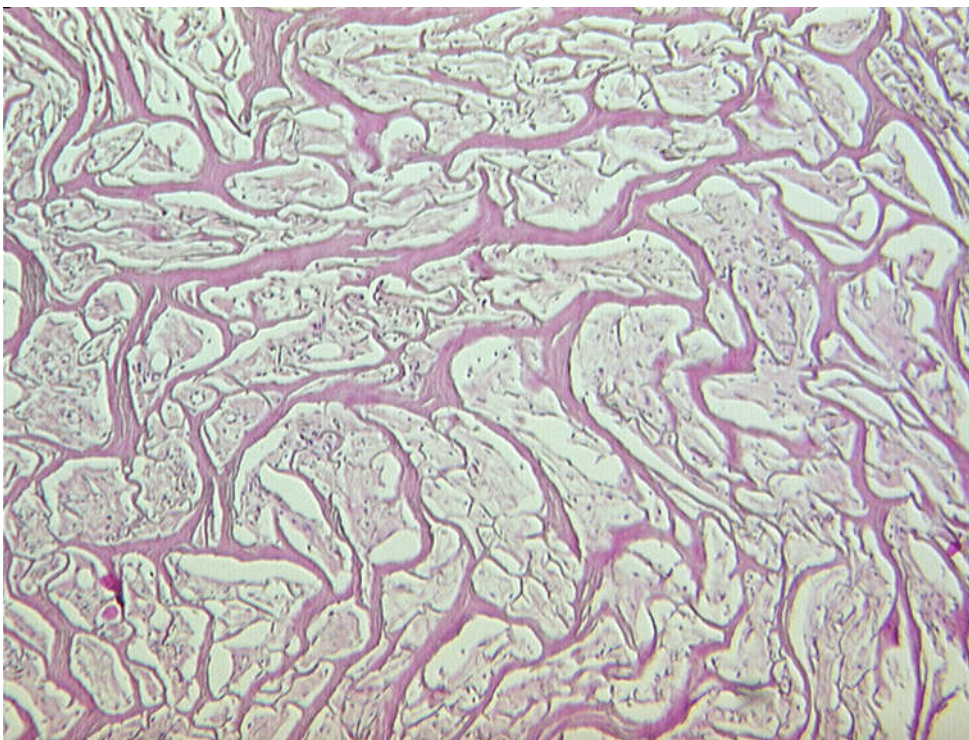


Abbildung 3.22.1: Explantat Nr. 25, HE-Färbung ($\times 100$).



Abbildung 3.22.2: Nr. 25, wenige Zellen, HE (×250).

Ergebnisse der unbesiedelten 3-Monats-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
7	2	0	2	2	1,5	7,5
16	Kein Explantat					0
27	1	0	1	0	0,5	2,5
28	0,5	0	1	1,5	0,5	3,5
31	2	1	2	1,5	2	8,5
32	0,5	0	1	1,5	1,5	4,5
34	2	0	0	0	0,5	2,5
37	1	2	2	2	2	9

Tabelle 3.7: Histologische Ergebnisse (unbesiedelte 3-Monats-Gruppe).

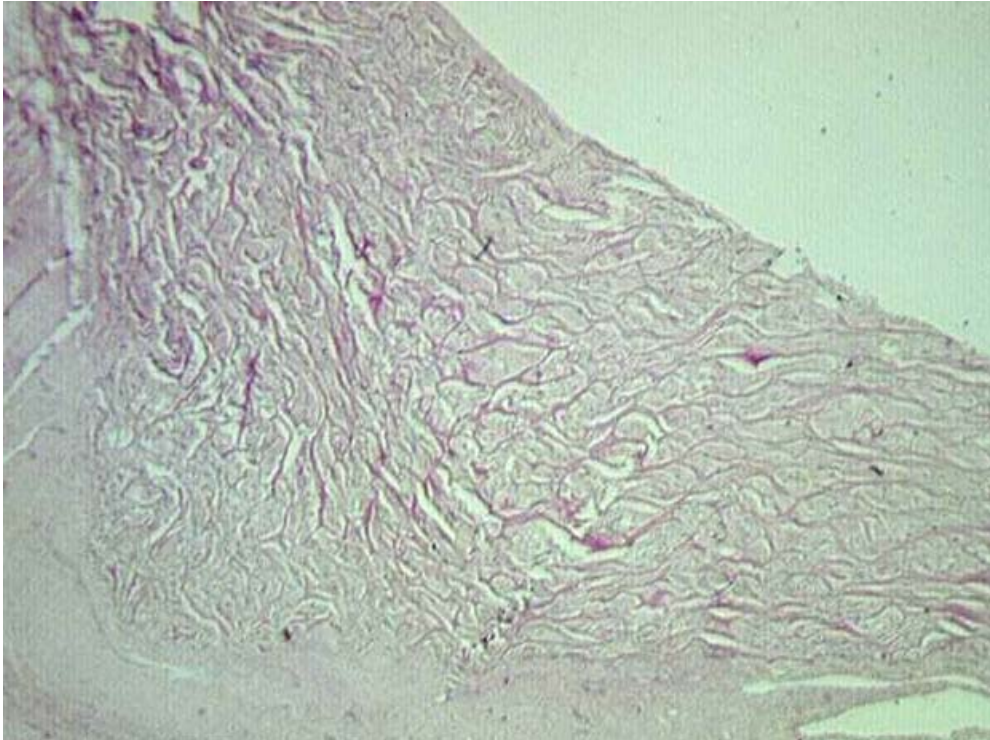


Abbildung 3.23.1: Explantat Nr. 7, Übergang Kollagenmeniskus – Meniskusbasis, HE-Färbung ($\times 63$).

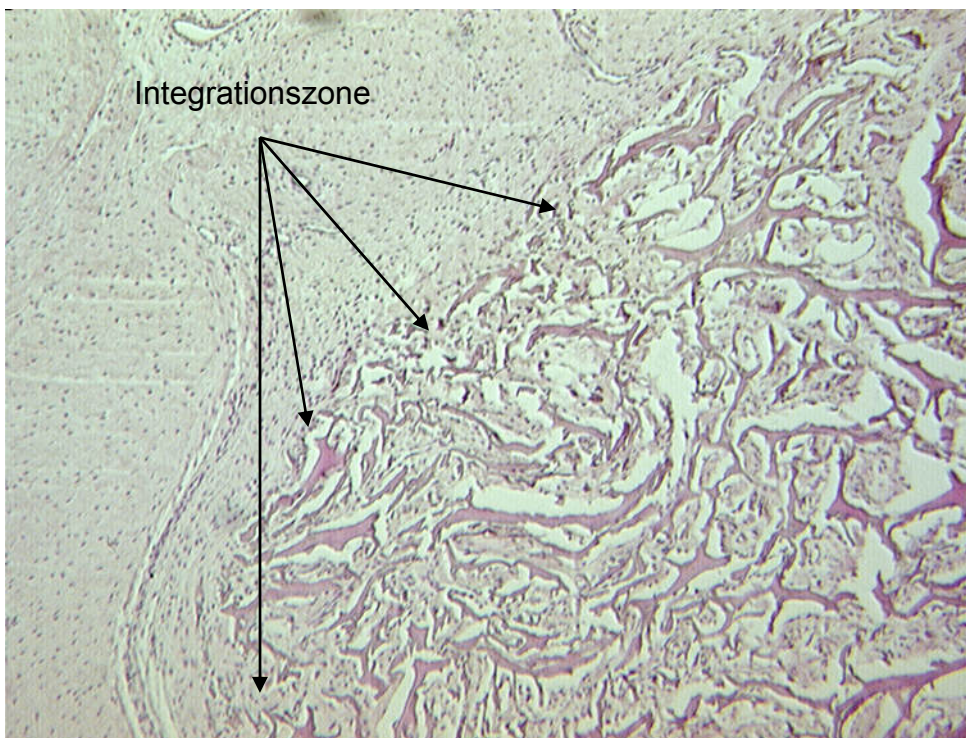


Abbildung 3.23.2: Nr. 7, Integrationszone, HE ($\times 100$).

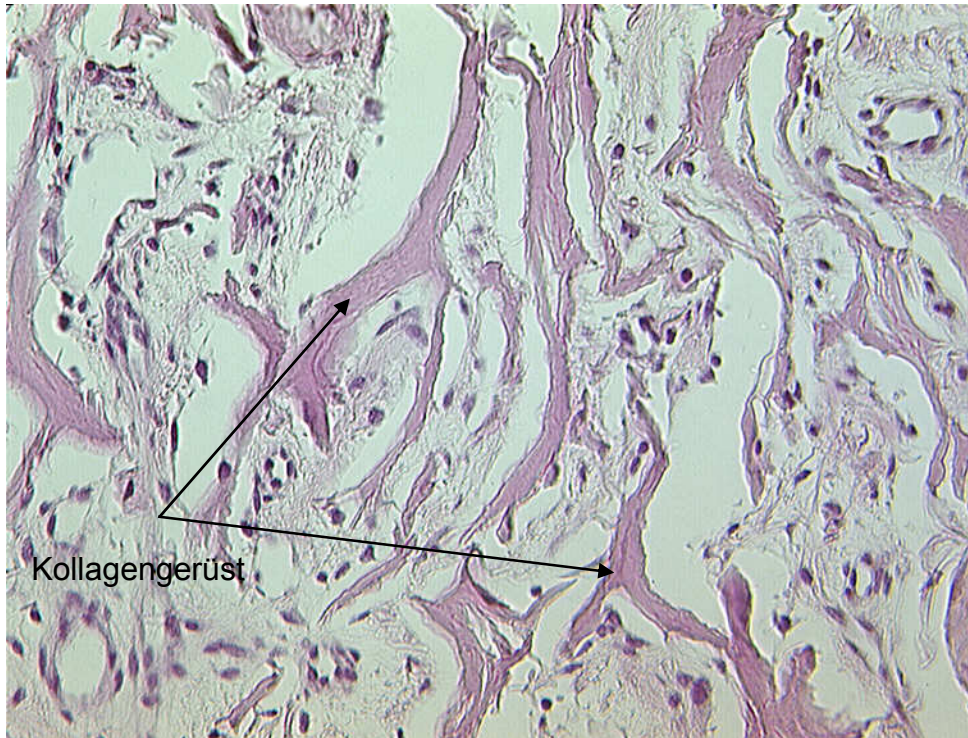


Abbildung 3.23.3: Nr. 7, HE ($\times 400$).

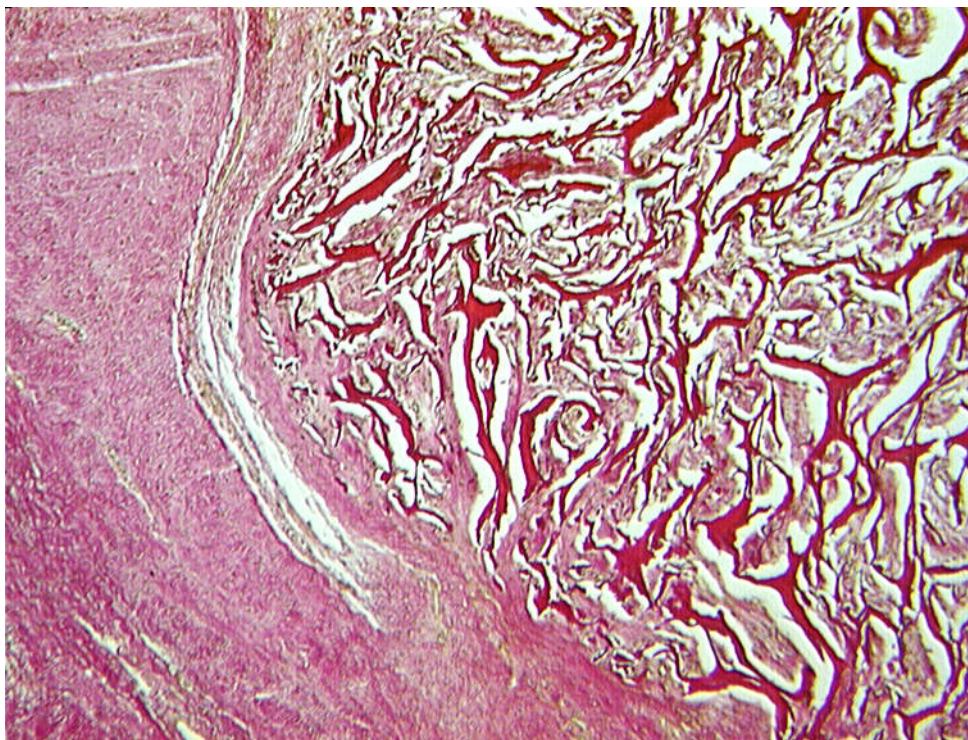


Abbildung 3.23.4: Nr. 7, Integrationszone, van Giesson ($\times 100$).

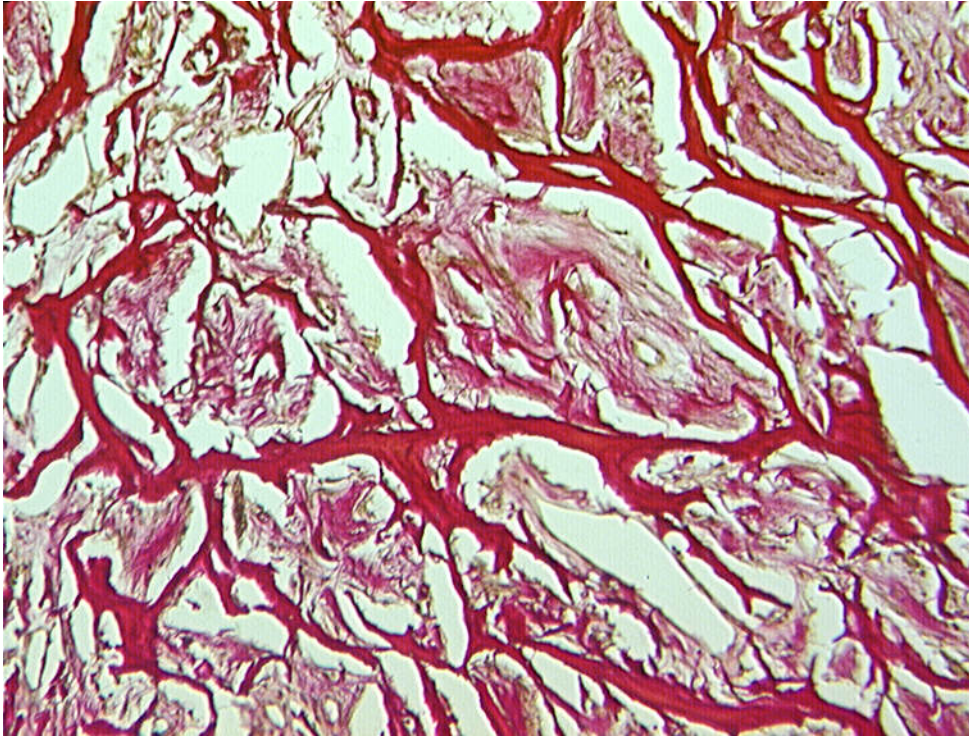


Abbildung 3.23.5: Nr. 7, van Giesson ($\times 250$).



Abbildung 3.24.1: Explantat Nr. 27, Übersicht in HE-Färbung ($\times 63$).



Abbildung 3.24.2: Nr. 27, sehr wenige Zellen, HE ($\times 250$).



Abbildung 3.25.1: Explantat Nr. 34, HE-Färbung ($\times 100$).

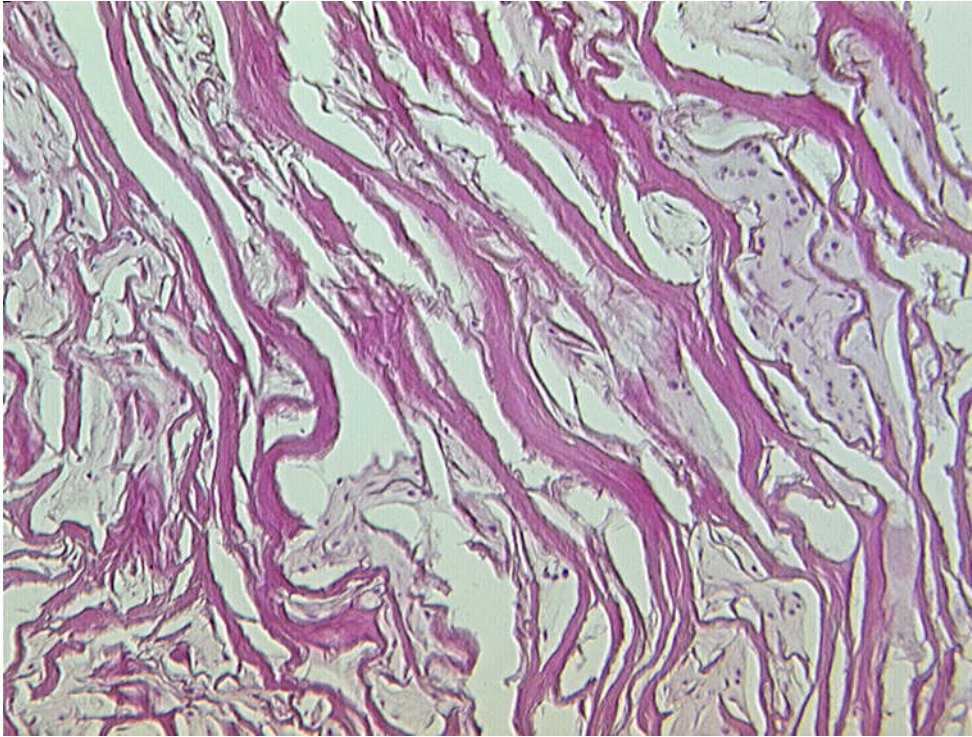


Abbildung 3.25.2: Nr. 34, HE ($\times 250$).

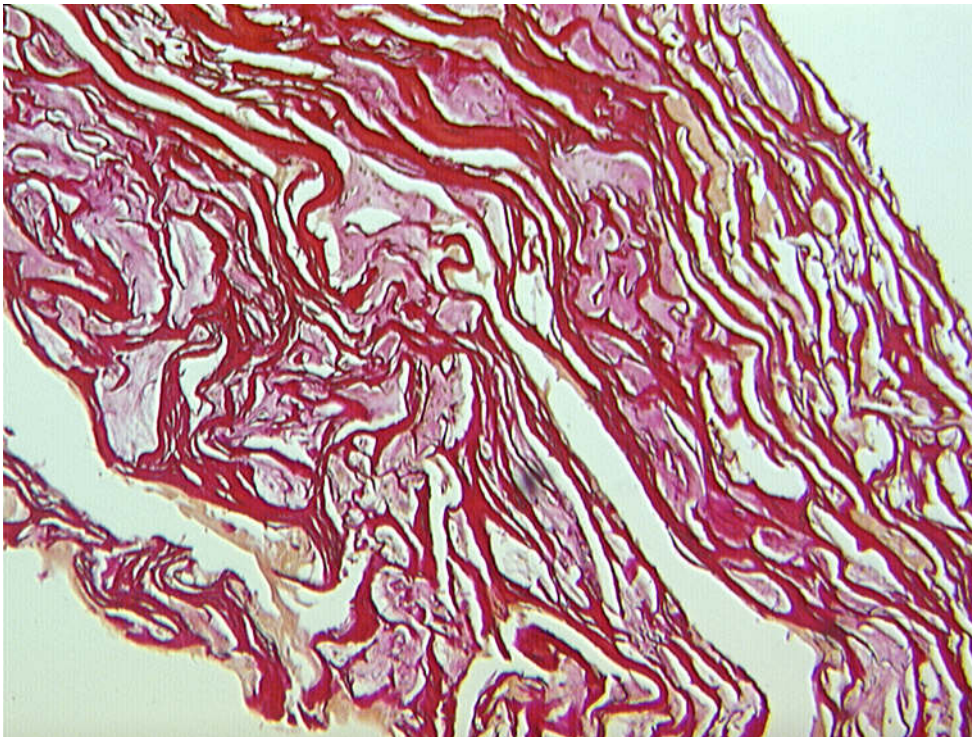


Abbildung 3.25.3: Nr. 34, van Giesson ($\times 100$).

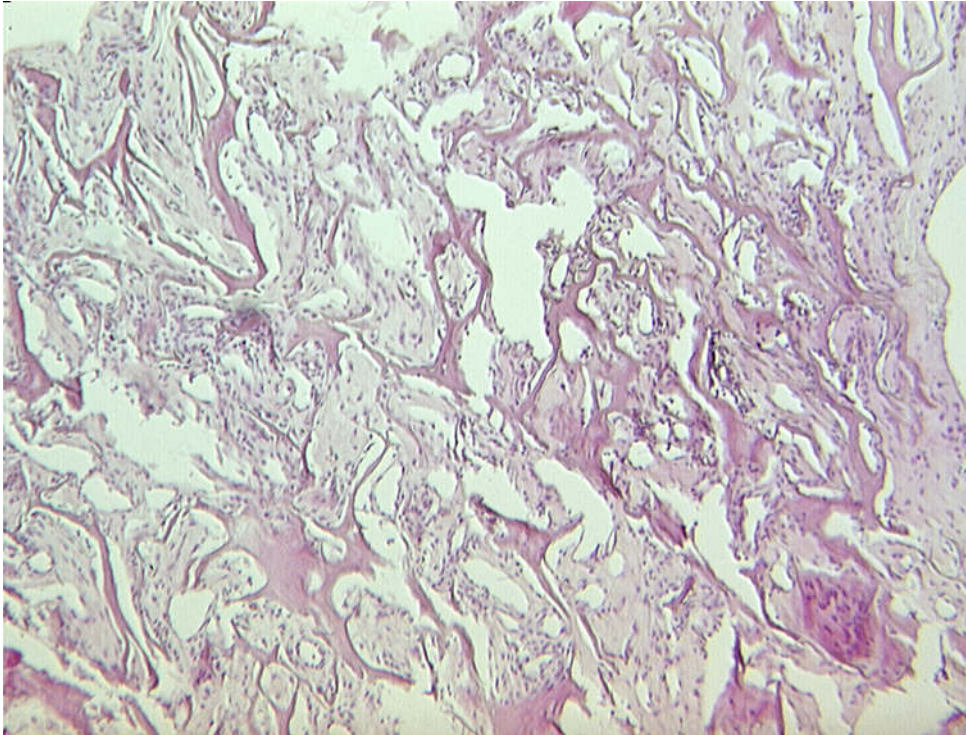


Abbildung 3.26.1: Explantat Nr. 37, HE-Färbung ($\times 100$).

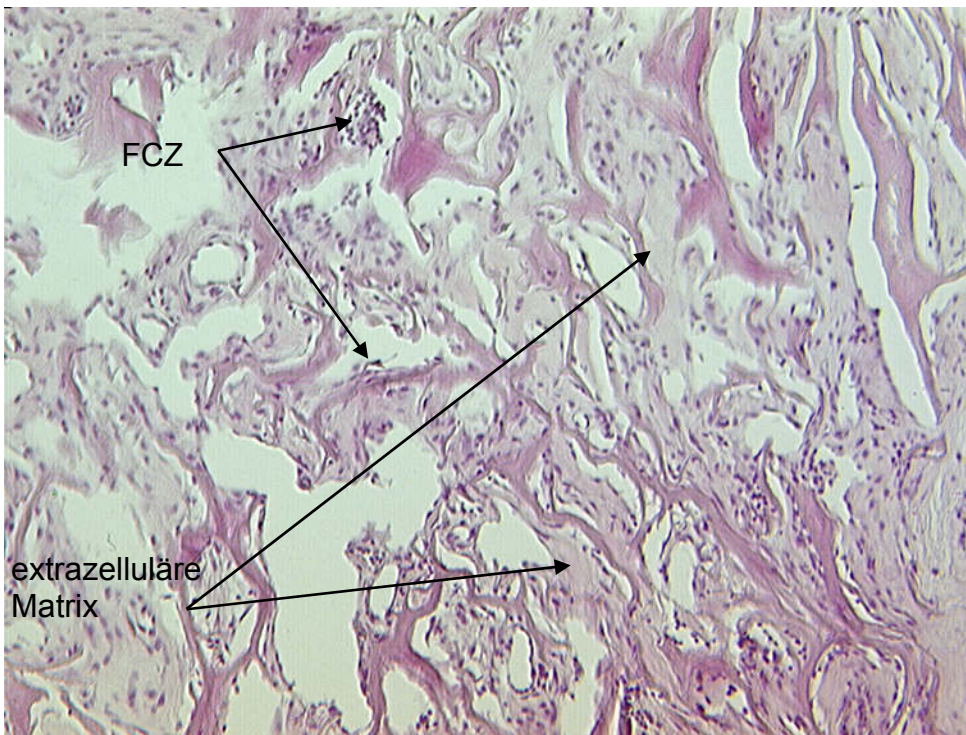


Abbildung 3.26.2: Nr. 37, FCZ= (hier) fibrochondrocyten-ähnliche Zellen, HE ($\times 250$).

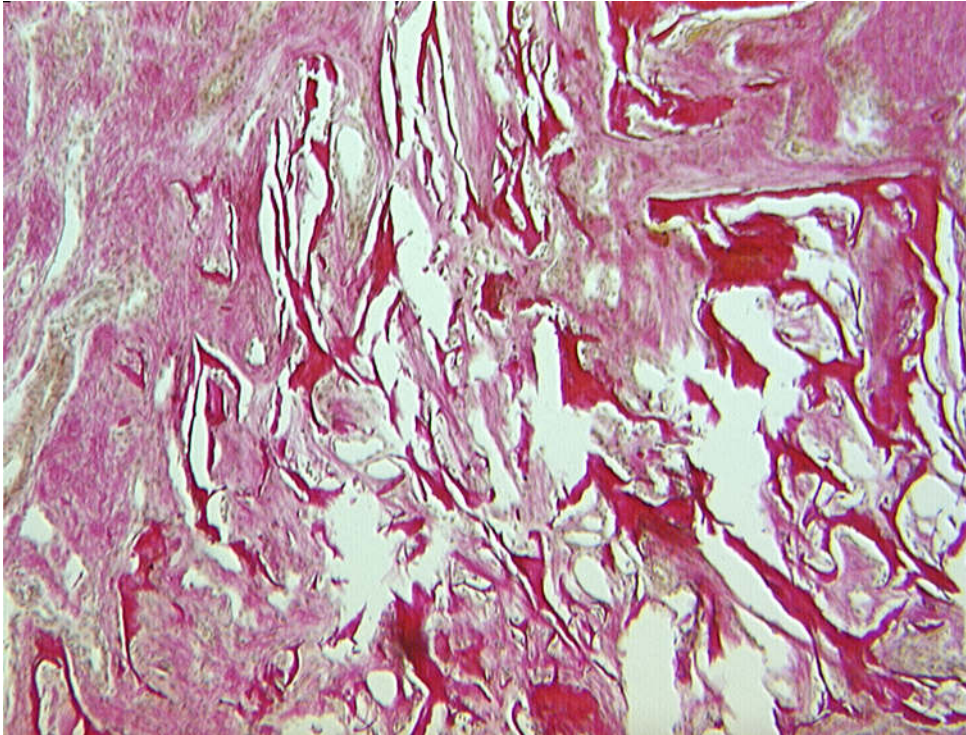


Abbildung 3.26.3: Nr.37, beginnender Umbau sichtbar, van Giesson (×250).

Ergebnisse der menishektomierten 3-Monats-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
21	Kein Regenerat					
22	Kein Regenerat					
23	2	0	0	0	1	3
24	2	0	0	0	0,5	2,5

Tabelle 3.8: Menishektomierte 3-Monats-Gruppe.

Vergleich der besiedelten (Gruppe 1) mit der unbesiedelten (Gruppe 2) 3-Monats-Gruppe:

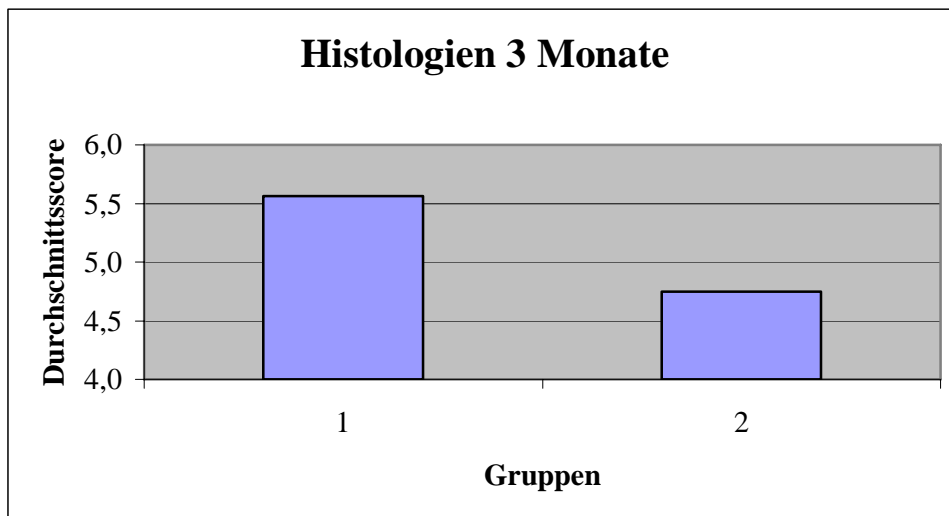


Diagramm 3.7: Als Gruppe 1 ist hier diejenige mit den besiedelten Kollagenmenisken bezeichnet, als Gruppe 2 diejenige mit den unbesiedelten.

Es ergibt sich beim Vergleich beider Gruppen ein p-Wert von 0,54, somit bestehen zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse der besiedelten 6-Monats-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
1	1,5	1	1,5	2	1	7
3	Kein Explantat					0
17	Kein Explantat					0
18	0,5	0	0,5	1	1	3

Tabelle 3.9: Besiedelte 6-Monats-Gruppe.

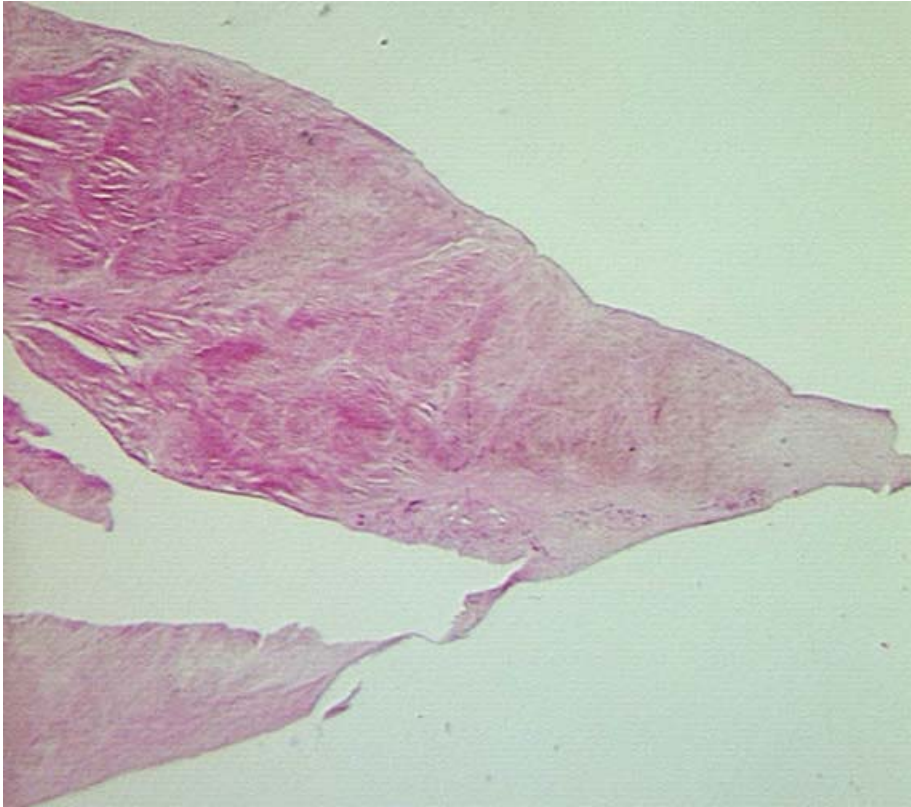


Abbildung 3.26.1: Explantat Nr. 1, Übersicht in HE-Färbung ($\times 63$).



Abbildung 3.26.2: Nr. 1, HE ($\times 100$).

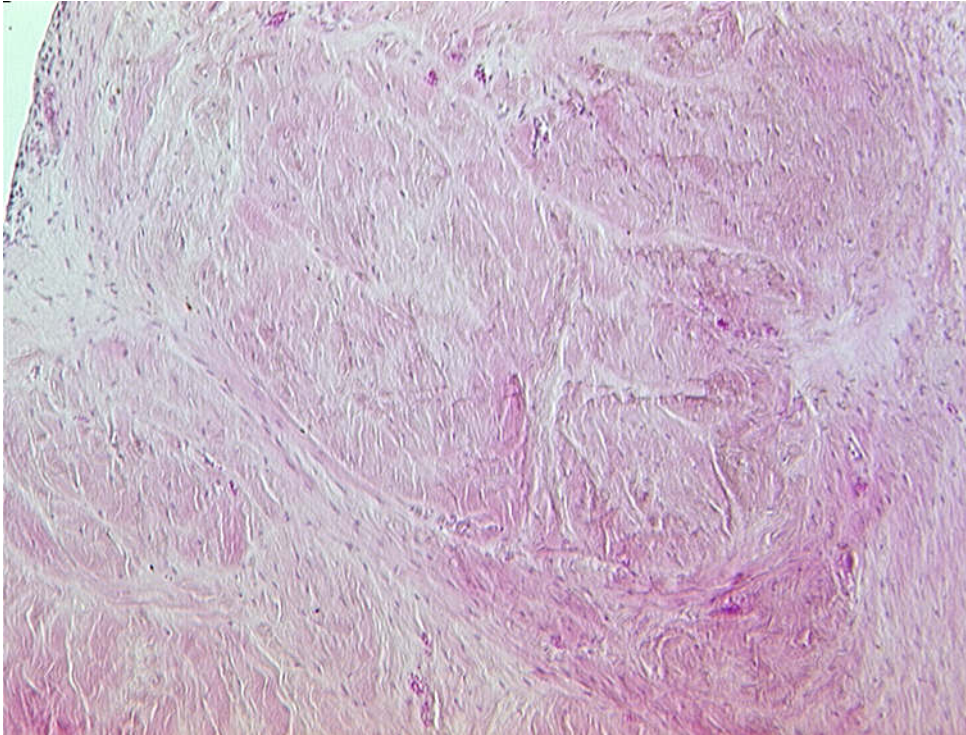


Abbildung 3.26.3: Nr. 1, zu sehen ist mensikusähnliches Gewebe, HE ($\times 250$).



Abbildung 3.26.4: Nr. 1, nur teilweise integriert, van Giesson ($\times 63$).

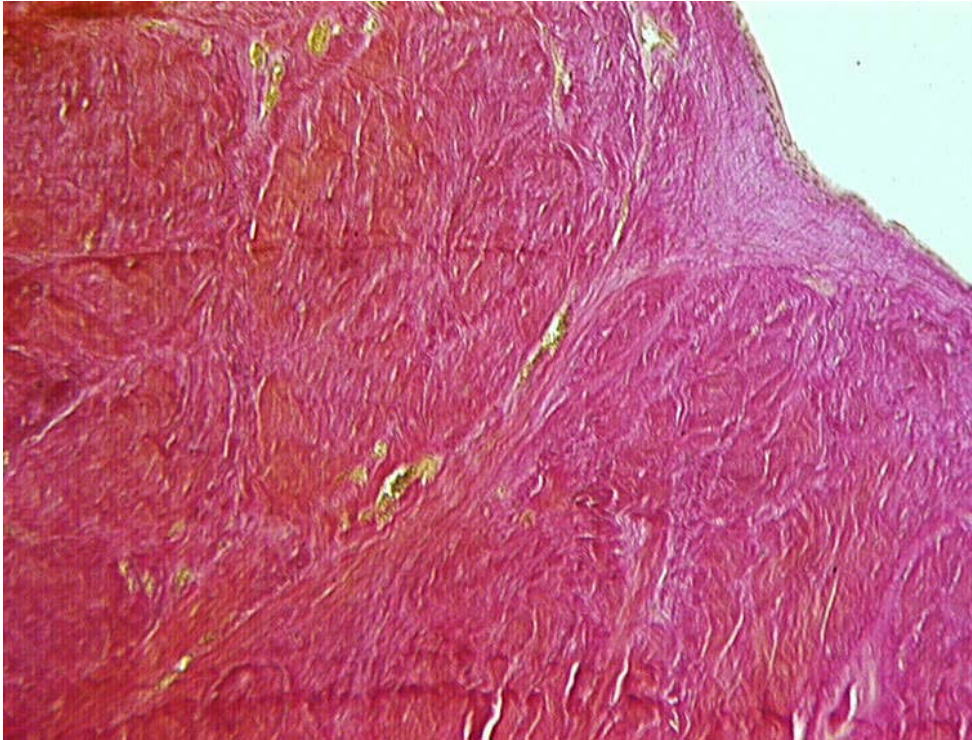


Abbildung 3.26.5: Nr. 1, van Giesson ($\times 250$).

Ergebnisse der unbesiedelten 6-Monats-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
5	0	0	0	0	0	0
8	1,5	0	0	0	1	2,5
14	2	0,5	1	1	1	5,5
15	Kein Explantat					0

Tabelle 3.10: Unbesiedelte 6-Monats-Gruppe.



Abbildung 3.27.1: Explantat Nr. 8, sehr wenige Zellen, HE ($\times 250$).

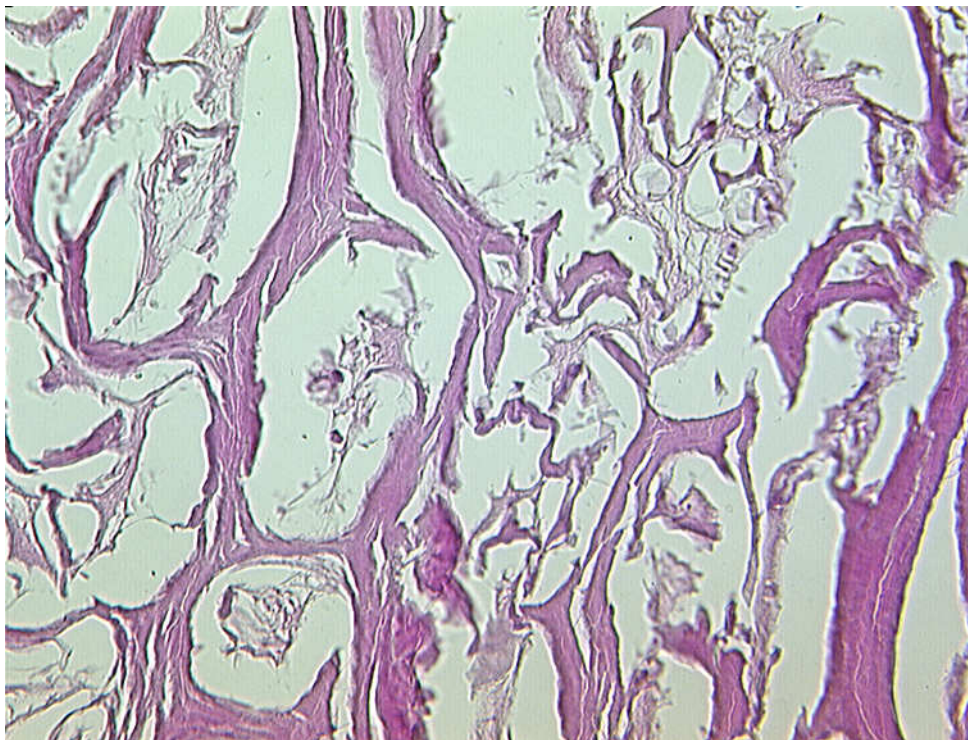


Abbildung 3.27.2: Nr. 8, HE ($\times 400$).

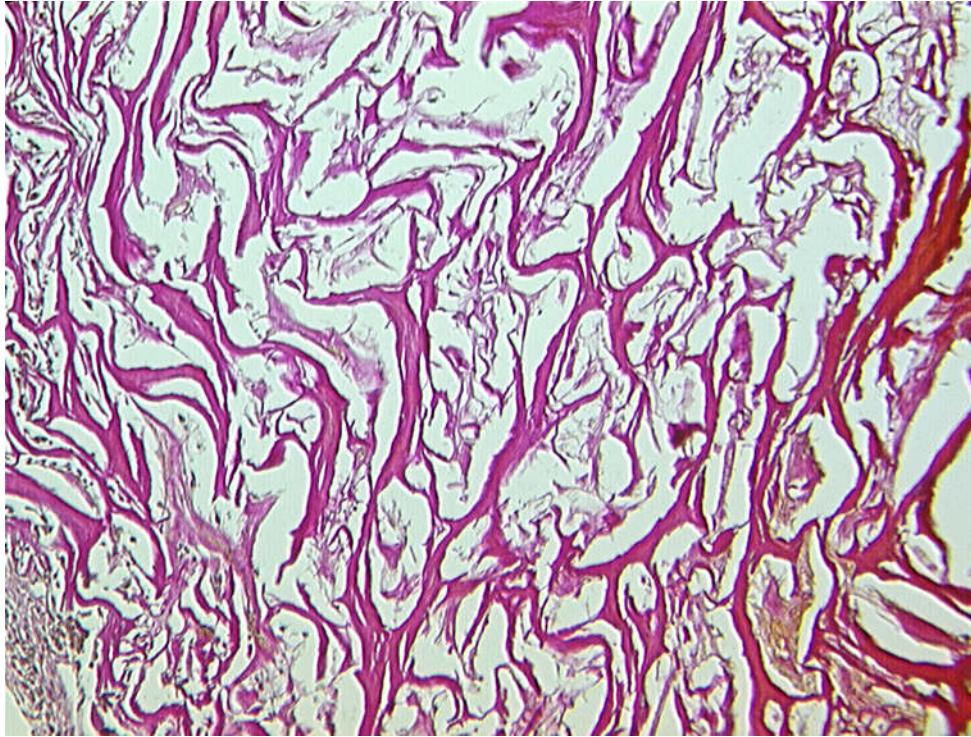


Abbildung 3.27.3: Nr. 8, van Giesson ($\times 250$).

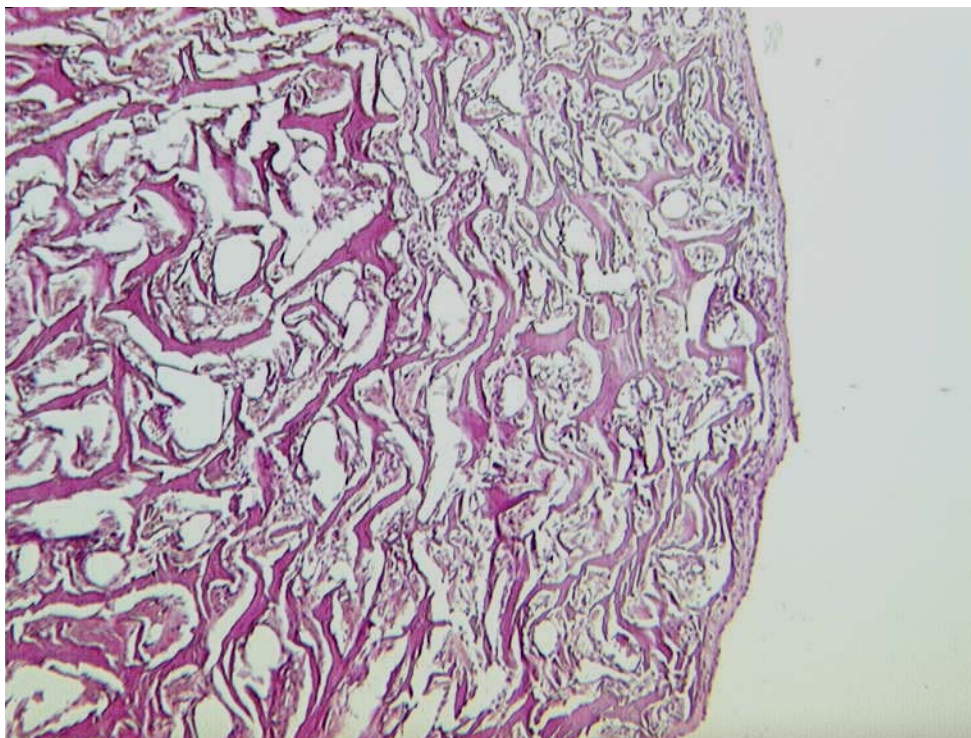


Abbildung 3.28.1: Explantat Nr. 14, HE-Färbung ($\times 100$).

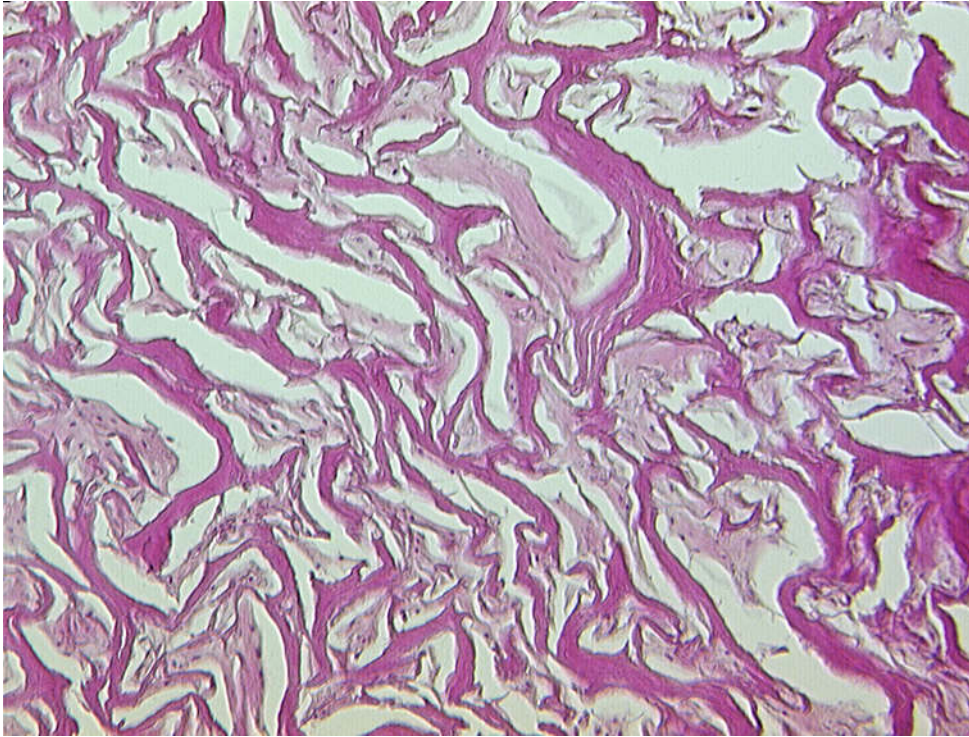


Abbildung 3.28.2: Nr. 14, fast keine Zellen, HE ($\times 250$).

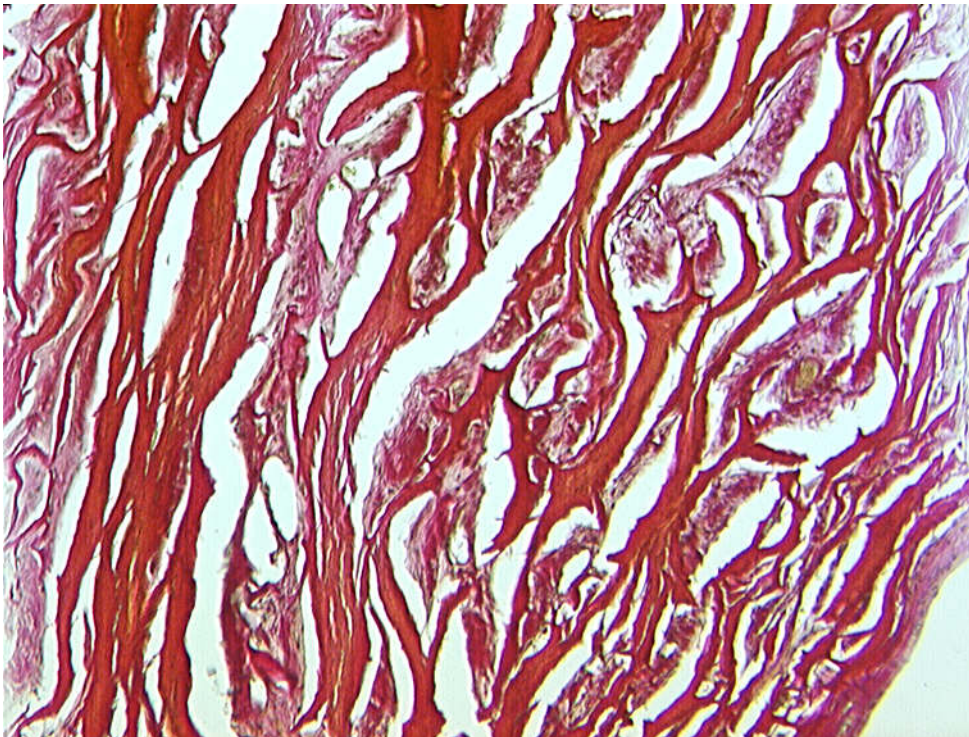


Abbildung 3.28.3: Nr. 14, van Giesson ($\times 250$).

Ergebnisse der menishektomierten 6-Monats-Gruppe:

Schaf Nr.	Entzündung	Zellmorphologie	Anordnung der Zellen	Vaskularisierung	Kollagenfasern	gesamt
9	Kein Regenerat					
10	Kleines Regenerat: nicht beurteilbar					
11	Kein Regenerat					
12	2	0,5	2	2	1	7,5

Tabelle 3.11: 6-Monats-Gruppe Menishektomien.

Vergleich der besiedelten (Gruppe 1) mit der unbesiedelten (Gruppe 2) 6-Monats-Gruppe:

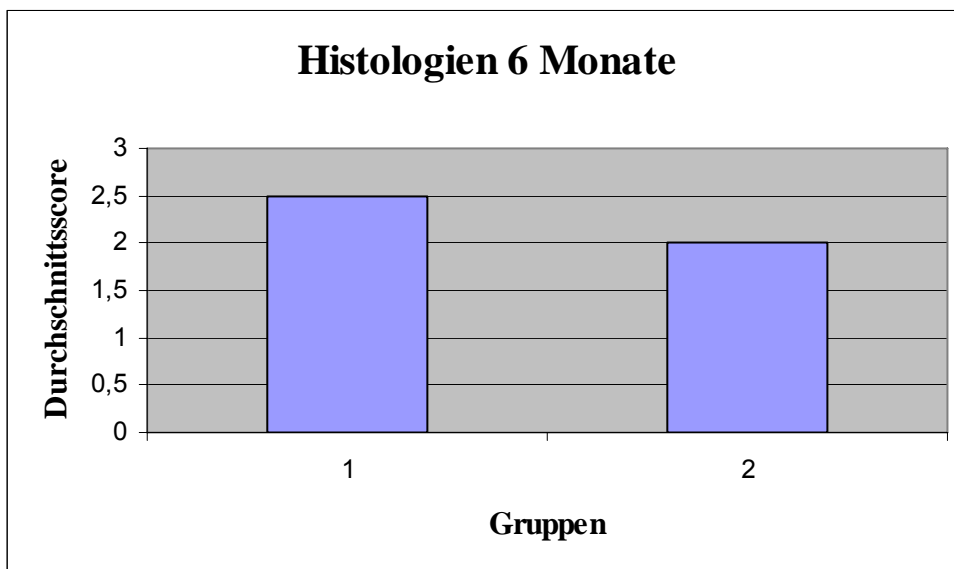


Diagramm 3.8: Vergleich der 6-Monats-Gruppen.

Beim Vergleich der beiden Gruppen ergibt sich ein p-Wert von 0,82, es zeigten sich somit zwischen den 6-Monats-Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des histologischen Ergebnisses.

3.3.5 Biomechanische Messungen

Steifigkeit (N/mm)				
Schaf Nr.	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert
18+	5,71	8,8	6,93	7,15
38+	3,8	6,9	7,47	6,06
39+	3,5	5,73	6,56	5,26
27-	5,05	6,69	9,7	7,15
31-	3,92	5,35	6,42	5,23
34-	4,12	5,67	6,55	5,45
CMI®	1,77	2,04	1,8	1,87

Tabelle 3.12: Messung des Widerstands der Explantate und eines Kollagenmeniskusses.

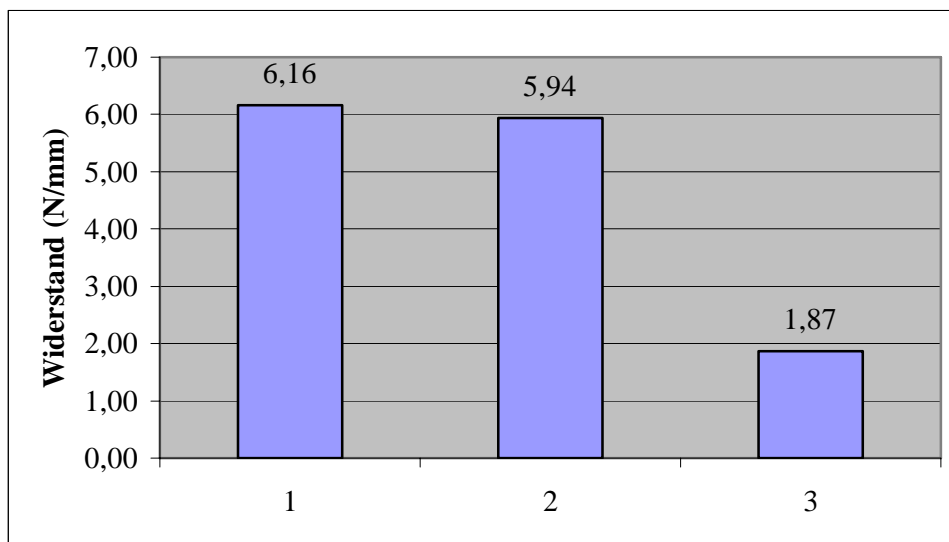


Diagramm 3.9: Gruppe 1 – besiedelte Explantate, Gruppe 2 – unbesiedelte Explantate, Gruppe 3 – Kollagenmeniskus.

Beim Vergleich der Mittelwerte der besiedelten mit den unbesiedelten Explantaten zeigt sich ein p-Wert von 0,81. Es gibt somit keinen signifikanten Unterschied im Widerstand der beiden Gruppen.

Kraftabfall (%)				
Schaf Nr.	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert
18+	73,9	70,4	63,9	69,40
38+	85,2	84,3	81,2	83,57
39+	85,9	85,1	85	85,33
27-	85,3	86,2	83,9	85,13
31-	85,2	85,9	84,3	85,13
34-	82,6	78,4	74,1	78,37
CMI®	18,9	17,4	19,7	18,67

Tabelle 3.13: Messungen der Relaxation der Explantate und eines Kollagenmeniskusses.

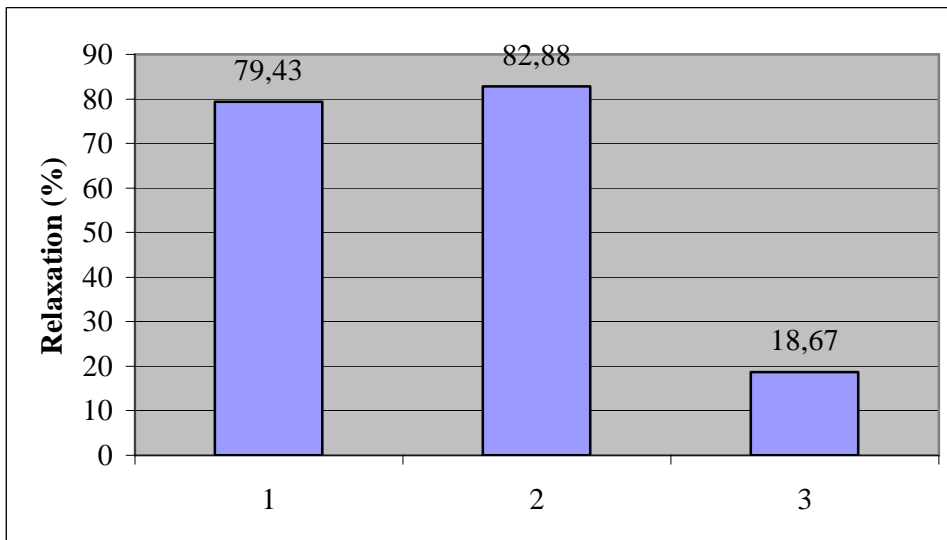


Diagramm 3.10: Gruppe 1 – besiedelt, Gruppe 2 - unbesiedelt, Gruppe 3 – Kollagenmeniskus.

Beim Vergleich der Mittelwerte zwischen besiedelten und unbesiedelten Explantaten findet sich ein p-Wert von 0,58, d.h. es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Relaxation der einzelnen Gruppen.

Impression (%)				
Schaf Nr.	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert
18+	4,7	3,9	4,2	4,27
38+	5,5	3,1	2,7	3,77
39+	11,6	8,8	8,5	9,63
27-	6,7	6,3	4	5,67
31-	12,4	11	10,5	11,30
34-	15,2	11,6	11,7	12,83
CMI®	25,9	25,6	25,7	25,73

Tabelle 3.14: Messdaten der Impression der Explantate und eines Kollagenmeniskusses.

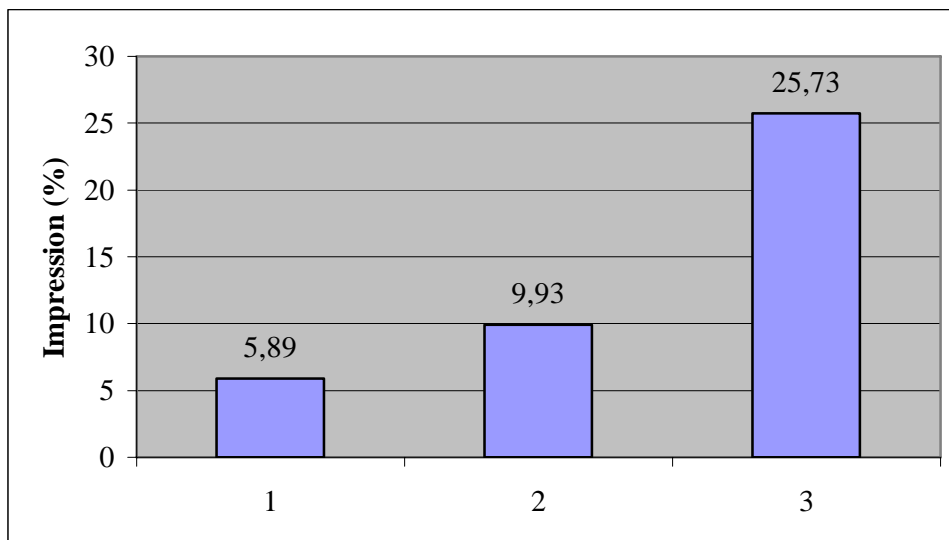


Diagramm 3.11: Gruppe 1 – besiedelt, Gruppe 2 – unbesiedelt, Gruppe 3 – Kollagenmeniskus.

Beim Vergleich der Mittelwerte zwischen besiedelten und unbesiedelten Explantaten zeigt sich ein p-Wert von 0,23. Es gibt somit keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.



Abbildung 3.29: Druckmessung an einem Stück Kollagenmeniskus.

4. Diskussion

4.1 Vorversuche

Es bestand zunächst das Problem, ein Gerüst für die in vivo Versuche zu finden, das sich sowohl in der Form als auch in der Festigkeit als Meniskusersatz eignen würde. Schließlich entschieden wir uns für die in vitro Versuche für vier verschiedene Kollagen-Gerüste (CMI®, Resorba®, Verigen®, Tachotop®), bei denen die Besiedelung mit Kaninchen-Fibrochondrocyten getestet wurde. Bei allen gelang es, das Gerüst gleichmäßig mit Zellen zu besiedeln, wobei in der Beschaffenheit der Kollagene große Unterschiede bestehen.

Sowohl der Resorba®- als auch der Tachotop®-Schwamm sind allein von der Steifigkeit her ungeeignet, als Meniskusersatz zu dienen. Es wäre unmöglich, diese Kollagene suffizient an der Meniskusbasis anzunähen. Sie könnten keine der Aufgaben des Meniskus wie Schockabsorption oder Verteilung des Gewichts auch nur annähernd übernehmen.

Bei der Verigen®-Membran kommt noch hinzu, dass die Zellen zum einen nur auf die raue Oberfläche aufgebracht werden können und die Membran nur durch Aufeinanderlegen mehrerer Lagen eine ausreichende Dicke bilden würde.

Bei den Kollagenmenisken fiel auf, dass erst dann eine Besiedelung gelang, nachdem sie mehrere Wochen in Medium eingelegt worden waren, das regelmäßig gewechselt wurde. Unsere Erklärung besteht darin, dass, wie weiter oben beschrieben, bei der Herstellung der Kollagen-Gerüste für die Crosslinks der Kollagenfasern Formaldehyd verwendet wird (Rodkey et al. 1999, S.283), das eine zelltoxische Wirkung besitzt. Durch das ständig neue Medium wird das noch vorhandene Formaldehyd gelöst und die Toxizität des Gerüsts nimmt ab. Eine weitere Schwierigkeit bei der Besiedelung bestand darin, dass der Kollagenmeniskus durch seine relativ hohe Dichte von $0,2 \text{ g/cm}^3$ und einer Porengröße zwischen 75 und $400 \mu\text{m}$ (Stone et al. 1997, S. 1771) eine geringe Kapazität besitzt, Flüssigkeit aufzunehmen. Die Zellen müssen aber in Medium gelöst werden, um sie in das Kollagengerüst zu injizieren. Es waren sehr kleine Mengen an Medium nötig, um den Zellverlust durch sofortiges Herausspülen so gering wie möglich zu halten.

Der Kollagenmeniskus wurde für den Meniskusersatz entwickelt und besitzt somit schon die Form eines humanen Meniskus. Auch in den biomechanischen Eigenschaften ist er den anderen Gerüsten überlegen, denen des nativen Meniskus aber bei weitem unterlegen.

Aufgrund dieser Vorergebnisse entschieden wir uns in unserer Studie für den Kollagenmeniskus.

4.2.1 Kultur der Fibrochondrocyten

Wir vermehrten die Fibrochondrocyten in Monolayer-Kultur in DMEM + 10 % FCS + 100 IU/ml Pen. + 100 $\mu\text{l/ml}$ Strep. + 2 mmol/l Glutamin. Meist wird dem

Medium FCS zugegeben, um das Wachstum von Zellen knorpeligen Ursprungs zu begünstigen (Webber 1990, S. 116).

Webber et al. untersuchten 1985 den Effekt von DMEM und Ham's F-12, jeweils mit FCS, auf Fibrochondrocyten von Kaninchen und kamen zu dem Ergebnis, dass die Zellen in Ham's F-12 schneller zu wachsen schienen und eher längliche oder schmale Form hatten (S. 40). Zellen in DMEM waren eher polygonal. Diese zwei Zellformen könnten den natürlicherweise im Meniskus vorkommenden Zelltypen entsprechen, den oberflächlichen und den tiefer gelegenen, die schon von Ghadially et al. (1978, S. 514) und Webber et al. (1989, S. 397) beschrieben wurden.

Im Gegensatz zu Webber 1985 kamen Nakata et al. 2001 (S.211) zu dem Ergebnis, dass humane Fibrochondrocyten in DMEM schneller proliferieren als in Ham's F-12, aber in Ham's F-12 ihren Phänotyp über längere Zeit beibehalten. Sie schlugen ein Gemisch der beiden Medien vor. Sie identifizierten zudem drei morphologisch unterschiedliche Zelltypen: kleine, runde chondrocytenähnliche, längliche fibroblastenähnliche und polygonale Zellen (S. 215).

Webber et al. entwickelten und verwendeten 1988 (Webber et al. 1988, S. 18) ein serumfreies Medium, in dem die Zellen sich ebenso vermehrten wie in serumhaltigem Medium, das sie aber eher darin unterstützte, eine chondrocytenähnliche Zellmorphologie zu erhalten und zu erlangen. Einen weiteren Vorteil sahen sie in der Tatsache, dass im Gegensatz zu FCS, das gewissen Schwankungen hinsichtlich seiner Komponenten unterworfen ist (Choi et al. 1980, S. 202; Choi et al. 1980, S. 220; Webber et al. 1984, S. 880), die Qualität ihres Mediums stets die gleiche sei (Webber et al. 1988, S. 21). In einem handelsüblichen serumfreien Medium (Ventrex PC-1) proliferierten die Fibrochondrocyten nicht genauso gut, aber in Anbetracht der hohen Kosten ihres eigenen Mediums sahen sie dieses durchaus als Alternative an (Webber et al. 1988, S. 21).

Collier et al. (1995, S.130, 132) kultivierten Fibrochondrocyten sowohl in Monolayer-Kultur als auch in Alginate und überprüften jeweils die Wirkung von TGF- β und FCS auf die DNA-Synthese und auf die Proteoglykan-Produktion der Zellen.

FCS beschleunigt sowohl die DNA-Synthese als auch die Proteoglykan-Produktion in der ersten Zellpassage. TGF- β stimuliert die Proteoglykan-Produktion in Monolayer-Kultur (Collier et al. 1995, S. 132; Tanaka et al. 1999, S. 78; Webber 1990, S. 217) und in Alginate (Collier et al. 1995, S.132). Webber fand zudem heraus, dass fibroblast growth factor (FGF) und TGF- β das Wachstum der Fibrochondrocyten fördern, einen ähnlichen Effekt hat human platelet lysate (human PL) auf die Proliferation (Webber et al.1985, S. 40).

Es gelang auch einer Forschergruppe, Fibrochondrocyten mit Hilfe eines Retrovirus mit dem TGF- β 1 Gen zu transduzieren, und auf diese Weise die Synthese von Kollagen und Proteoglykanen zu stimulieren (Goto et al. 2000, S.

267-268). Die endogene Produktion von Wachstumsfaktoren kann somit zur gesteigerten Matrixsynthese führen.

Nach Collier et al. entspricht die Verteilung der verschiedenen PG in Alginat am ehesten der im nativen Meniskus, in Monolayer-Kultur dagegen handelt es sich fast nur um kleine Proteoglykane (Collier et al. 1995, S. 135).

Zusätzlich zu FCS haben auch platelet-derived growth factor-AB (PDGF-AB), hepatocyte growth factor (HGF) und bone morphogenic protein-2 (BMP-2) wachstumsfördernden Einfluß auf Fibrochondrocyten (Bhargava et al. 1999, S. 638-640). Nach ihren Ergebnissen bewirken PDGF und HGF, bei Zellen aus bestimmten Anteilen des Meniskus auch Interleukin-1 (IL-1), BMP-2, epidermal growth factor (EGF) und insulin-like growth factor-1 (IGF-1), eine verstärkte Migration der Zellen.

In Monolayer-Kultur scheinen die Zellen relativ schnell zu dedifferenzieren, was unter anderem an ihrem veränderten Aussehen, einer fibroblastenähnlichen Form, erkennbar wird. Lediglich in kurzzeitiger Monolayer-Kultur behalten sie ihren Phänotyp bei und bilden verschiedene Proteoglykane (Webber et al. 1988, S. 203).

Bei Kultur in dreidimensionalen Strukturen, z.B. Alginat-, Agarose-Gel oder auf natürlichen Trägermaterialien wie Kollagenen, Dünndarm-Submukosa oder perichondralem Gewebe bzw. synthetischen Gerüsten wie z.B. Polyurethan, poly-L-lactic acid (PLLA), Teflon, polyglycolic acid (PGA) oder PGLA scheinen die Zellen nicht zu dedifferenzieren und sogar zu redifferenzieren.

Für Chondrocyten wurde beispielsweise schon mehrfach beschrieben, dass sie in einer dreidimensionalen Struktur ihren Phänotyp beibehalten und sogar wiedererlangen können (Horwitz et al. 1970, S. 437; Sokoloff et al. 1973, S. 1499; Benya et al. 1982, S. 221; Bujia et al. 1995, S. 562).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass mechanische Veränderungen im Umfeld von verschiedenen Zellen zu unterschiedlich starker Synthese von extrazellulärer Matrix führen können (Säamanen et al. 1993, S. 49; Kiraly et al. 1998, S. 33; Smith et al. 2000, S. 104).

Die Unterschiede in der Heilung von Knorpel und in der Wirkung auf Chondrocyten bei verändertem Druck wurde schon mehrfach untersucht. Druck auf den Knorpel bzw. die Zellen führt zu einer gesteigerten Bildung von extrazellulärer Matrix durch die Chondrocyten und einer vermehrten Knorpelbildung (Drachman et al. 1966, S. 417; Hall 1967, S. 665; Hall 1968; S. 302; Mooney et al. 1966, S. 1153; Salter et al. 1982, S. 267; Salter et al. 1980, S. 1245).

Chondrocyten bilden in vitro deutlich mehr extrazelluläre Matrix unter intermittierendem Druck (Palmoski et al. 1984, S. 679; van Kampen et al. 1985, S. 422; Veldhuijzen et al. 1987, S. 193), der wahrscheinlich dafür verantwortlich ist, dass Knorpel zu einem Gewebe differenziert, das sehr starken Belastungen standhalten kann (Heath et al. 1996, S. 430). Carver et al. entwickelten für die Kultur ein Perfusionssystem, in dem abwechselnd hydrostatischer Druck aufgebaut und Medium zugeführt wird (Carver et al. 1999, S. 3) und fanden

deutlich mehr Glykosaminoglykane als in den Kontrollgruppen ohne Druck (S. 7).

Auch nach Transplantation von autologem Periost in das Gelenk bildet sich Knorpel, wahrscheinlich unter dem Einfluß von Druck und der Umgebung (O'Driscoll et al. 1984, S. 1252; Rubak et al. 1982, S. 185).

Im Meniskus der Ratte findet sich nach verstärktem Training ein deutlich höherer Kollagen- und Proteoglykangehalt (Vailas et al. 1986, S. 1033), wohingegen nach Immobilisation eine verminderte Expression für das Aggrecan-Gen festgestellt werden konnte (Djurasovic et al., S.464). Fink et al. wiesen 2001 nach, dass Fibrochondrocyten unter intermittierendem Druck signifikant mehr NO bilden als ohne Druck (S. 483). NO scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Arthrose zu spielen (Evans et al. 1995, S. 287; Amin et al. 1995, S. 2100; Stefanovic-Racic et al. 1993, S. 1041; Murrell et al. 1996, S. 271), bei der es schließlich zu einer Hemmung der Matrixproduktion der Chondrocyten kommt (Evans et al. 1995, S. 289).

Wir haben in unserer Studie den Zusammenhang zwischen Alter der Tiere und Wachstumsverhalten der Fibrochondrocyten untersucht und konnten keine signifikante Korrelation erkennen. Damit decken sich unsere Ergebnisse mit denen von Webber et al., die auch keine Unterschiede im Wachstum von Kaninchen-Fibrochondrocyten von Tieren unterschiedlichen Alters entdeckten (Webber et al. 1986, S. 1014).

Insgesamt ist jedoch noch zu wenig über die optimalen Kulturbedingungen, die einsetzbaren Wachstumsfaktoren oder auch die Anwendung von speziellen Bioreaktoren für Fibrochondrocyten bekannt und es besteht nach wie vor ein großer Bedarf an Untersuchungen. Das Ziel in der *in vitro* Kultur besteht ganz klar darin, den Fibrochondrocyten Lebensbedingungen bereitzustellen, die den natürlichen innerhalb des Meniskus so ähnlich wie nur möglich sind. Dazu gehören sowohl die biochemischen - Wachstumsfaktoren, Interleukine u.a. - als auch die biomechanischen - intermittierender Druck - Einflüsse, die auf die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung einwirken.

4.2.2 Stabilität der β -Galaktosidase-Expression *in vitro* und *in vivo*

Der Mittelwert der retroviral transduzierten Zellen lag bei uns *in vitro* bei 81,6 %. Diese Ergebnisse decken sich mit denen verschiedener Studien, in denen zudem gezeigt wurde, dass die Genexpression durch Transduktion mit Hilfe von Retroviren stabiler ist als diejenige durch Adenoviren, in einer Studie beispielsweise bis zum Ende der Versuche nach 28 Wochen (Martinek et al. 2002, S. 112, Goto et al. 1999, S. 921). Adenoviren transduzieren sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen und können daher *in vivo* und *ex vivo* eingesetzt werden, Retroviren transduzieren dagegen nur sich nicht teilende Zellen und werden somit hauptsächlich *ex vivo* eingesetzt, bringen aber ihre genetische Information in die DNS der Zellen ein, d.h. die Information geht durch die Teilung der Zellen nicht verloren (Goto et al. 1999, S. 919, S. 924). Die Machbarkeit des Gentransfers in verschiedenen muskuloskeletalen

Gewebe wurde in mehreren Studien gezeigt (Goto et al. 1999, S. 922; Lou et al. 1996, S. 516; Menetrey et al. 1999, S. 440; Musgrave et al. 1999, S. 545). Martinek et al. konnten an Kaninchen β -Galaktosidase positive Zellen in vivo über 8 Wochen nachweisen, ihr Anteil nahm jedoch langsam und stetig ab (Martinek et al. 2002, S. 114). Goto et al. wiesen 1999 das Markergen LacZ nach 6 Wochen in vivo nach (Goto et al. 1999, S. 923). In unseren Explantaten waren nach 12 Wochen keine markierten Zellen mehr nachweisbar, was darauf hindeutet, dass LacZ entweder in vivo nicht über einen Zeitraum von 12 Wochen stabil ist oder aber keine von uns eingebrachten Zellen mehr vorhanden waren. Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede in der Persistenz der Markergene könnten auch auf den unterschiedlichen verwendeten Tieren beruhen, aber die Ursachen sind im Grunde nicht bekannt. Um genauere Aussagen über die in vivo-Stabilität von β -Galaktosidase machen zu können, müssten mit größeren Fallzahlen und engeren Zeitfenstern weitere Versuche, im Optimalfall mit verschiedenen Tieren, gemacht werden.

Ein Vorteil der indirekten Methode ist sicherlich, den Gentransfer unter kontrollierten Bedingungen ex vivo durchzuführen, somit können ganze Organe erreicht werden und es besteht nicht die Gefahr einer direkten Immunreaktion des Empfängers (Martinek et al. 2003, S. 784). Auch kann die Gefahr einer Ausbreitung der viralen Partikel im Körper des Empfängers auf ein Minimum reduziert werden. Es kann also eine hohe Konzentration einer bestimmten Substanz, z.B. eines Wachstumsfaktors, im betreffenden Gewebe erreicht werden, ohne systemische Komplikationen auszulösen (Evans et al. 1999, S. 412).

Es können somit zwei Wege gewählt werden, die Gentherapie anzuwenden: zum einen durch systemische Gabe, zum anderen lokal. Eine systemische Gabe bietet sich in Geweben an, die nicht direkt erreicht werden können und hat den Vorteil einer gleichmäßigen Verteilung. Limitiert wird die systemische Anwendung durch die hohen Konzentrationen, die nötig sind, um therapeutische Effekte am Zielgewebe zu erzielen. Zudem werden manche Gewebe wie Teile des Meniskus nicht arteriell erreicht und die Verteilung der Vektoren im gesamten Körper birgt ein unbekanntes Risiko in sich. Der andere Weg, der Gentransfer ex vivo, ist zweifelsohne von größerer Sicherheit, da er unter kontrollierten Bedingungen stattfindet, und das Zielgewebe kann mit höherer Spezifität erreicht werden (Huard et al. 2002, S. 95).

Generell muß nun die Frage gestellt werden, ob eine transiente Genexpression nicht von vornherein sicherer ist und als Heilungsanreiz genügen kann, so zum Beispiel mit Hilfe von Adenoviren oder Plasmiden. Nicht virale Vektoren sind normalerweise einfacher herzustellen und sind auch weniger toxisch und weniger immunogen als virale Vektoren, erreichen jedoch eine niedrigere Transfektionsrate (Huard J et al. 2002, S. 94). Eine stabile Expression könnte zu unkontrolliertem Wachstum und im schlimmsten Fall zur Entwicklung von Malignomen führen. Unter Umständen ließe sich diese Gefahr durch den Einbau von Apoptosegenen in die Viren verhindern oder eindämmen, indem so

die transduzierten Zellen selektiv eliminiert würden (Evans et al. 2004, S. 327). Bei elektiven orthopädischen Eingriffen ist die Gefahr einer Entartung absolut inakzeptabel, wohingegen bei fatalen Erbkrankheiten wie z.B. der Zystischen Fibrose oder der Muskeldystrophie Typ Duchenne sicherlich ein höheres Risiko eingegangen werden könnte. Mit Plasmiden konnten je nach Studie zwischen 13 und 38 % der Zellen erreicht werden, die Transfektion war aber auch nur über einen kurzen Zeitraum stabil (Vorergebnisse der Knorpelforschungsgruppe der Sportorthopädie der TU München; Nakata et al. 2001, S. 213). Eine nahezu optimale Lösung bestünde in der Steuerbarkeit der Genexpression durch je nach Bedarf zugeführte Substanzen. Ueblacker et al. zeigten 2004, dass durch Gabe von Tetrazyklin die Genexpression an mittels Plasmiden transfizierten Chondrocyten in vivo gesteuert werden kann (Ueblacker et al. 2004, S. 714). Bevor der Gentransfer jedoch klinisch zum Einsatz kommen kann, muß zunächst in weiteren Studien die Sicherheit und Kontrollierbarkeit überprüft werden.

4.2.3 Implantation

Der Kollagenmeniskus wird vorwiegend in den USA, aber auch in Deutschland an ausgewählten Zentren, so z.B. in der Abteilung für Sportorthopädie der TU München, im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt. Er wurde von der amerikanischen Gruppe um Rodkey und Steadman entwickelt (Stone et al. 1997, S. 1771) und ist als einziges Trägergerüst für den Meniskusersatz in den Bereich der klinischen Anwendung übergetreten. Der Kollagenmeniskus ist für den Einsatz im medialen Kompartiment entwickelt worden, da Läsionen am medialen Meniskus häufiger auftreten als am lateralen, insbesondere in Verbindung mit chronischer Instabilität des vorderen Kreuzbandes (Bellabarba et al. 1997, S. 21).

Die Implantation des Kollagenmeniskus wird üblicherweise arthroskopisch vorgenommen. Wir entschieden uns aber aufgrund der Komplexität der Operation zu einem offenen Vorgehen. Dadurch bestand nun das Problem, dass das Hinterhorn des Meniskus sehr schwer zugänglich war und dadurch die Fixierung des Kollagenmeniskus immer wieder Schwierigkeiten bereitete.

Bei mehreren Untersuchungen zu Allografts stellte sich zuvor schon heraus, dass die anatomisch korrekte und suffiziente Fixierung der Transplantate entscheidend für ein erfolgreiches Ergebnis ist, sowohl das Transplantat betreffend als auch den Gelenkknorpel (Noyes et al. 1995, Präsentation; Veltri et al. 1994, S. 52; Szomor et al. 2000, S. 87; Kohn et al. 1994, S. 100). Absorbierbare Nähte z.B. reichten selbst bei Autografts nicht aus, für die nötige Fixierung zu sorgen (Stone et al. 1995, S. 399). Nach Kummer 1987 kommt es nur durch eine zirkuläre Spannung innerhalb des Meniskusersatzes zu einem funktionsgerechten Umbau in vornehmlich zirkulär angeordnete Kollagenfaserbündel (Kummer 1987, S. 244). Diese Spannung ist aber abhängig von einer festen und anatomisch korrekten Befestigung. Einer insuffizienten Fixierung an den Insertionsstellen ähnlich zu beurteilen scheint

ein radiärer Riss durch den Meniskus zu sein, denn Kohn et al. fanden 1993 in Kompressionsversuchen an Kniegelenken heraus, dass die Eindringtiefe der Femora in die tibialen Gelenkpfannen signifikant zunimmt nach radiärer Durchtrennung der Menisken und eine Meniskektomie zu keiner weiteren Änderung des Kompressionsverhaltens führt (Kohn et al. 1993, S. 401).

Zusätzlich zur Fixierung hat die optimal an die Empfängerseite angepasste Kongruenz des Transplantats eine wichtige Bedeutung für den dauerhaften Erhalt und die Erfüllung aller Meniskusfunktionen (Lazovic et al. 1997, S. 546; Lazovic et al. 1997, S. 136).

In einem Kompressionsmodell am Meniskus zeigte sich, dass die Geometrie (Kongruenz) eine größere Auswirkung auf die wirkenden Belastungen im Gelenk hat als die Materialeigenschaften des Meniskus selbst (Meakin et al. 2003, S. 39). Es stellte sich heraus, dass drei Faktoren die Funktion des Meniskustransplantates beeinträchtigen: schlechte Fixation am anterioren und posterioren Horn, eingeschränkter Kontakt des Transplantates mit den artikulierenden Gelenkflächen und unphysiologische Positionierung der Meniskushörner (Verdonk 2002, S. 126).

Somit ist es von entscheidender Bedeutung, das Meniskustransplantat in Form und Größe so genau wie nur möglich den in vivo Verhältnissen anzupassen, am besten nicht erst intraoperativ, sondern präoperativ. Auch zum postoperativen Follow-up wäre eine nichtinvasive Methode zur Messung von Größe und Form des tissue-engineerten Transplantates interessant und wichtig. Stone et al. untersuchten 1994 eine Methode, bei der sie mit Hilfe eines Magnetresonanztomographen das Volumen der Menisken maßen. Sie verglichen ihre Ergebnisse mit denen, die sie nach der Explantation der Menisken durch Wasserverdrängung erlangten. Die Ergebnisse korrelierten zwar, doch waren sie stets etwas niedriger (S. 642). Mit den heutigen Magnetresonanztomographen und Programmen sind ähnliche Methoden auf höherem Niveau und mit größerer Genauigkeit möglich (siehe unten).

In zwei Studien an humanen Kadavern zeigte sich, dass die sichere, isometrische Fixierung des Transplantats an Vorder- und Hinterhorn wesentlich dafür ist, den Druck zu reduzieren und die Kontaktfläche im Kniegelenk zu vergrößern (Chen et al. 1996, S. 177; Paletta et al. 1997, S. 696).

Bei unseren Explantaten fiel häufig auf, dass sie nicht komplett integriert waren, d.h. sie waren nicht entlang der ganzen Meniskusbasis inklusive Vorder- und Hinterhorn eingeheilt, sondern oft nur vorne. Dies ist wahrscheinlich auf die schwierige Zugänglichkeit des Hinterhorns bei einer offenen Operation zurückzuführen und ließe sich in einer arthroskopischen OP, evt. mit einem zusätzlichen posterioren Zugang, verbessern.

Ein weiterer Vorteil einer arthroskopischen OP bestünde in dem geringeren Trauma gegenüber einer Arthrotomie. Das Kollateralband kann intakt belassen werden, frühere Rehabilitation wäre möglich, insgesamt ist die Morbidität

geringer, auch durch die fehlende Unterbrechung der Extensoren, die z.T. in Arthrotomien notwendig ist (Maitra et al. 1999, S. 217).

Da der Kollagenmeniskus an der Meniskusbasis eingenäht wird und relativ schnell hohen Druckkräften und starken Zugkräften ausgesetzt ist, muß die Naht diesen Kräften standhalten können und darf nicht ausreißen. Die Nahtausreißkraft des Kollagenmeniskus wird mit $2,5 \pm 0,5$ Kilogramm angegeben (Stone et al. 1997, S. 1771). Die auf den Meniskus wirkenden Zugkräfte sind jedoch um ein vielfaches höher.

Bei Allografttransplantationen ist man inzwischen dazu übergegangen, die Menisken zusammen mit Knochenblöcken zu transplantieren, um die Fixierung der Allografts zu verbessern (Setton et al. 1999, S. 266). Diesen Vorschlag hatten 1990 Arnoczky et al. nach ihren Untersuchungen zu Allografts am Hund schon unterbreitet, als bei einigen Allografts die Naht am Hinterhorn nicht standhielt (Arnoczky et al. 1990, S. 126).

Durch die Struktur des Kollagenmeniskus sind die Möglichkeiten der Fixierung begrenzt und es bleibt fraglich, ob die Reißfestigkeit des Materials ausreicht, den hohen biomechanischen Anforderungen gerecht zu werden. Es fehlen zudem bis heute jegliche biomechanische Tests am Konstrukt sowohl vor der Implantation als auch nach der Explantation.

Stichprobenartig wurden zum Zeitpunkt der Implantation von den Reststücken der Kollagenmenisken Histologien gemacht, um die Zellbesiedelung zu überprüfen. Dies war für uns die einzige Möglichkeit der Kontrolle, da die Kollagene zu dicht sind, um unter dem Mikroskop vor der Implantation die Besiedelung zu überprüfen. Inzwischen sind verschiedene Methoden auf Basis der Magnetresonanztomographie und der Magnetresonanzspektroskopie entwickelt und untersucht worden, mit deren Hilfe die Funktionstüchtigkeit der Zellkultur-Systeme *in vitro* überprüft werden kann. Sie messen verschiedene Faktoren, so z.B. Zellwachstum und -verteilung, Zellvolumen, Sauerstoffverteilung, Zellmetabolismus oder Diffusion und Fluß der Nährstoffe (Callies et al. 1994, S. 75; Pfeuffer et al. 1998, S. 11; Williams et al. 1997, S. 56; Brindle et al. 1998, S. 499; Thelwall et al. 2001, S. 682). Erste Studien beschäftigen sich nun damit, mit Hilfe bestimmter Einstellungen in der Magnetresonanztomographie die biochemische Zusammensetzung des Gelenkknorpels *in vivo* zu untersuchen (Gray et al. 2001, S. 336). Es zeigte sich, dass die Dicke eines Scaffolds vor allem für die Zellen in der Mitte ein erhebliches Problem darstellt, da sie nicht ausreichend Nährstoffe erhalten können (Neves et al. 2003, S.61). Eine gleichmäßige Zellmorphologie und -dichte scheint unter diesen Bedingungen nicht möglich zu sein. In der Zukunft könnte es mit Hilfe der Magnetresonanztomographie durchaus möglich sein, nichtinvasiv sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die tissue-engineerten Gewebe bezüglich Größe und Form und ihren zellulären und extrazellulären Bestandteilen (Bashir et al. 1999, S. 863) zu messen und zu beurteilen. Darüber hinaus hat die Magnetresonanztomographie inzwischen ihren festen Platz in der

Diagnostik von Meniskus- bzw. allgemein Knieverletzungen. Die verschiedenen Methoden sind jedoch noch relativ aufwendig und teuer und es konnte bisher nicht geklärt werden, welche Parameter sich am besten zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Zellkultur und in vivo eignen.

Bei der Injektion der Zellsuspension in den Kollagenmeniskus wurde vor allem Wert darauf gelegt, Zellen in die Mitte zu bringen, die Reststücke stammen jedoch ausnahmslos aus den äußersten Randgebieten der Kollagenmenisken. Anhand dieser Histologien lässt sich somit nur bedingt ein Rückschluss auf die Qualität der Zellbesiedelung des ganzen Kollagenmeniskus ziehen.

Aufgrund der relativ geringen Aufnahmefähigkeit der Kollagenmenisken (Porengröße zwischen 75 und 400 μm (Stone et al. 1997, S. 1771)) für Flüssigkeit, zusätzlich bedingt durch die Tatsache, dass die Kollagene zunächst in Medium eingelegt waren (obwohl sie vor der Besiedelung vorsichtig ausgedrückt wurden), war es nicht möglich, die Zellsuspension von 150 μl vollständig in das Gerüst einzubringen. Es standen 0,4 \times 19 mm² Kanülen und 1 ml Spritzen zur Verfügung. Mit noch feineren Kanülen wäre das Einbringen geringerer Mengen von Zellsuspension wahrscheinlich möglich und unter Umständen auch eine regelmäßige Verteilung der Zellen innerhalb des Gerüsts. Durch vorherige Trocknung des Kollagenmeniskus bei 37° C könnte zudem eine höhere Aufnahmefähigkeit für Flüssigkeit erreicht werden.

4.2.4 Heilung der Achillessehne

Wie schon von Bruns et al. (2000, S. 366) beschrieben, kommt es nach Durchtrennung der Achillessehne bei Schafen spontan zu einer Heilung, die von einer Entlastung der betroffenen Extremität schrittweise bis zu einer Vollbelastung nach ungefähr 6 Wochen führt. Dies entspräche dem ungefähren Therapieschema beim Menschen nach der Transplantation eines Kollagenmeniskus, nach dem eine Entlastung für 6 Wochen bei maximaler Flexion von 60° durchgeführt wird. Da es sich jedoch um Tiere handelt, sind unbeobachtete Fehl- und Mehrbelastungen oder auch Stürze niemals gänzlich auszuschließen, wodurch es zu einer Überbelastung kommen kann und dadurch das Ergebnis verschlechtert werden kann. Möglichkeiten, diesen Fehl- und Überbelastungen vorzubeugen, sind begrenzt. Man könnte die Tiere für einige Zeit nach der Operation in eine Art Hängegerüst mit Rollen einspannen, das für eine verminderte Belastung der betroffenen Extremität sorgen könnte. Eine solche Apparatur wäre jedoch in höchstem Maße unphysiologisch, würde die Tiere in der Herde ausgrenzen und stark in ihrer Bewegungsfreiheit einschränken und wäre zudem auch sehr aufwendig in der Konstruktion. Eine andere Möglichkeit bestünde in der Verwendung von Knieorthesen, wie sie auch beim Menschen verwendet werden, die die Stabilität des Kniegelenks verbessern sollen. In einer Metaanalyse von Martinek et al. zeigte sich jedoch lediglich bei instabilen Kniegelenken und niedrigen Kräfteinwirkungen ein geringer stabilisierender Effekt, die Verwendung von Knieorthesen nach Verletzungen oder Operationen ergab widersprüchliche Ergebnisse und bleibt

kontrovers, kann somit nicht generell empfohlen werden (Martinek et al. 1999, S. 565-6).

In Anbetracht der Erfahrungen und heutigen Möglichkeiten scheint aber der gewählte Weg – eine Studie an Großtieren (Schafen) - der einzig mögliche und sinnvolle zu sein, um eine Studie solcher Komplexität durchzuführen. Es ist zudem eine gewisse Größe der Kniegelenke nötig, um die Kollagenmenisken verwenden zu können, die zur Implantation am Menschen hergestellt werden.

4.3.1 Makroskopische Beurteilung der Explantate

Da in der Literatur kein Schema für die makroskopische Beurteilung von Menisken gefunden werden konnte, wurde eines auf der Grundlage einerseits von physiologischen Menisken als auch von vorhandenen Schemata für Knorpel entwickelt.

Um die Aufgaben des nativen Meniskus – Schockabsorption, Verteilung des Gewichts, Stabilisierung des Gelenks – erfüllen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die implantierten Menisken ihre ursprüngliche Form und Größe beibehalten und vollständig entlang der Meniskusbasis integriert sind. Dies beinhaltet natürlich auch ihre korrekte anatomische Lage, das heißt der Meniskus muss sich zum Zeitpunkt der Explantation nach wie vor an seinem physiologischen Ort befinden und nicht z.B. außerhalb des Gelenkes. Während der Degeneration des Meniskus verändert sich die Oberfläche von einer glatten zu einer zunehmend rauen rissigen. Um entzündliche Veränderungen und eine weitere Aufgabe des Meniskus – Schmierung des Gelenks – registrieren zu können, wurde schließlich die Färbung des Kollagenmeniskus beurteilt, es wurde zwischen der physiologischen schimmernd weißen Farbe bis hin zu gelblich-eitrigem Aussehen unterschieden.

Es zeigte sich nun bei vielen Explantaten innerhalb beider Gruppen, dass der Kollagenmeniskus nicht vollständig entlang der ganzen Basis integriert war, ein Ergebnis, das vermutlich auf die schwierige Zugänglichkeit des Hinterhorns während einer Arthrotomie zurückzuführen ist und das durch eine arthroskopische Implantation, eventuell mit einem zusätzlichen posterioren Zugang, wahrscheinlich verbessert werden könnte. Die vollständige Integration und die suffiziente Fixierung sind von zentraler Bedeutung, da einerseits die sofortige Blutzufuhr zum Implantat gewährleistet wird und andererseits der Kollagenmeniskus seine biomechanischen Aufgaben nur dann ausreichend erfüllen kann (Chen et al. 1996, S. 178; Paletta et al. 1997, S. 696; Gao et Messner 1996, S. 280; Gao et al. 1998, S. 254). Bei den vier Tieren, bei denen zum Zeitpunkt der Explantation eine komplette Integration gefunden wurde, ist das makroskopische Gesamtergebnis mit einer Ausnahme (Gesamtscore von 7) mit einem Score von 9 sehr gut. Eine mögliche Erklärung für das schlechtere Ergebnis derjenigen Kollagenmenisken, die nicht vollständig integriert waren, besteht in der mechanischen Abnutzung des Implantats mit der Zeit, die durch

die geringere Stabilität des Kollagenmeniskus höher ist. Dadurch verliert das Implantat an Größe und kann nicht mehr für die notwendige Schockabsorption und Kraftübertragung sorgen, die Folgen sind degenerative Veränderungen am Gelenkknorpel (Messner 1994, S. 227).

Die makroskopische Beurteilung der tissue-engineerten Menisken ist ein wichtiger Teil der gesamten Untersuchung, es wurde jedoch in bisherigen Studien wenig Augenmerk darauf gelegt und es existieren keine etablierten Schemata. Durch die Beurteilung der Integration und Lage können Rückschlüsse auf die Fixierung der Transplantate gezogen werden, die Färbung und Oberfläche kann Hinweise auf Entzündungen und degenerative Prozesse geben. Je nach Trägergerüst und Design der Studie muß sicherlich im Einzelfall ein Auswertungsschema erarbeitet werden und an die Besonderheiten der Studie angepasst werden.

4.3.2 Beurteilung der Gelenkflächen

Zur Beurteilung der Gelenkflächen wurde ein etabliertes Schema verwendet (Jackson et al. 1992, S. 653), um degenerative Veränderungen am Gelenkknorpel makroskopisch zu klassifizieren. Die Gelenkflächen wurden femoral und tibial in jeweils zwei Bereiche unterteilt, um präzisere Aussagen über die Unterschiede zwischen medialem (Transplantation) und lateralem Gelenkanteil treffen zu können. Zum Vergleich zwischen den einzelnen Studiengruppen wurden die Werte addiert und die Gesamtscores miteinander verglichen.

Arthrose aufgrund von degenerativen Gelenkveränderungen ist eine Hauptursache für eingeschränkte Mobilität im mittleren und höheren Lebensalter (O'Driscoll 1998, S. 1803).

Wie weiter oben erwähnt, ist schon seit langem bekannt, dass die totale Meniskektomie, wie sie von uns in der dritten Studiengruppe durchgeführt wurde, mit degenerativen Gelenkveränderungen assoziiert ist (Roos et al. 1998, S. 691; Fairbank TJ 1948; S. 668; Jackson 1968, S. 526; Appel 1970, S. 105; Allen et al. 1984, S. 669). Diese zeigten sich jedoch bei den meisten Patienten erst nach einer Latenzzeit von 5 bis 10 Jahren, nach 10 Jahren erfüllten in einer Studie 8 % der teilnehmenden Sportler die Kriterien der Arthrose (Jorgensen et al 1987, S.82). Eine andere Studie fand nach einer Latenzzeit von 5 Jahren radiographisch degenerative Gelenkveränderungen nach partieller Meniskektomie bei 50 % der Patienten vor (Bolano et al. 1993, S. 435). 10 Jahre nach partieller Meniskektomie waren an 42 % der radiologisch untersuchten Gelenke degenerative Veränderungen vom Grad 3 bzw. 4 zu finden (Hoser et al. 2001, S. 514). Rangger et al. fanden in den partiell meniskektomierten Gelenken nach 4 ½ Jahren größere degenerative Veränderungen vor als in den kontralateralen Kontrollgelenken (Rangger et al. 1995, S. 242). Nach 8 ½ Jahren Beobachtungszeit zeigten sich bei Fauno et al. 1992 in den operierten Gelenken bei 53 % der Patienten degenerative Veränderungen im Vergleich zu 27 % in den nicht-operierten Gelenken (Fauno

et al. 1992, S. 348). Jaureguito et al. beobachteten nach partiellen Menishektomien eine kurzfristige Besserung der Beschwerden, die mit der Zeit jedoch wieder zunahm, aber nicht mit den relativ milden radiologischen Veränderungen nach durchschnittlich 8 Jahren korrelierten (Jaureguito et al. 1995, S. 33).

Der relativ kurze Beobachtungszeitraum von 3 und 6 Monaten schränkt nun die Aussagekraft bezüglich degenerativer Knorpelveränderungen erheblich ein, was sich nicht zuletzt am Ergebnis in der menishektomierten 6-Monats-Gruppe zeigte, in der makroskopisch keine degenerativen Veränderungen erkennbar waren.

Dennoch war die makroskopische Beurteilung des Gelenkknorpels ein wichtiger Untersuchungsaspekt, da degenerative Veränderungen am Gelenkknorpel, d.h. Arthrose - auch nach Menishektomie - wesentlich zur Morbidität der alternden Bevölkerung beitragen und eine der Hauptursachen für die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für Meniskusläsionen darstellen. Es waren zudem keine Studien bekannt, die degenerative Gelenkveränderungen am Schafsknie untersucht hatten und Aussagen über die Latenzzeit bis zu deren makroskopischem Auftreten gemacht hatten.

4.3.3 Biomechanische Messungen

Durch die Menisken im Kniegelenk vergrößert sich die tibio-femorale Kontaktfläche und die Belastung auf den tibialen Gelenkknorpel reduziert sich deutlich (Walker et al. 1975, S. 188; Kettelkamp et al. 1972, S. 353). Je nach Gelenkstellung vermitteln sie etwa die Hälfte der Kontaktfläche im Kniegelenk (Putz 1995, S. 80). Sie übertragen zwischen 45 % und 70 % der Last (in Beugung bis zu 95 %), je nach Studie, je nach Betrachtung des medialen oder lateralen Kompartimentes und Anteil der durch den Meniskus bedeckten Fläche im jeweiligen Kompartiment (Fukubayashi et al. 1980, S. 876; Kurosawa et al. 1980, S. 287; Chen et al. 1996, S. 178; Clark et al. 1983, S. 544; Seedhom 1979, S. 215; Seedhom et al. 1979, S. 225; Ahmed et al. 1983, S. 223). Durch ihren keilförmigen Querschnitt wird die Druckbelastung hauptsächlich in Zugbelastung umgesetzt. Die vorwiegend zirkulär angeordneten Kollagenfasern stehen in strengem Einklang zu dieser Zugbelastung im Meniskus (Putz 1995, S. 80, 83). Nach Menishektomie verkleinert sich die femoro-tibiale Kontaktfläche enorm und die Höchstbelastungen auf den tibialen Gelenkknorpel erhöhen sich (Kettelkamp et al. 1972, S. 352; Fukubayashi et al. 1980, S. 877; Kurosawa et al. 1980, S. 287; Paletta et al. 1997, S. 696). In einem Kompressionsmodell am Kniegelenk konnte gezeigt werden, dass eine partielle Menishektomie, bei der nur zentrale Anteile entfernt werden, zu einem ähnlichen Kompressionsverhalten führt wie im unoperierten Kniegelenk (Kohn et al. 1993, S. 401). Jedoch können in diesem Modell weder die stabilisierende Funktion noch die Gewährleistung der Kongruenz innerhalb des Gelenkes durch die Menisken berücksichtigt und gemessen werden und es kann keine Aussage

darüber gemacht werden, ob durch eine solche partielle Menishektomie degenerativen Knorpelveränderungen vorgebeugt werden kann.

Beim Versuch der partiellen Menishektomie bei großen Rissen ist es zum Teil nicht möglich, die Peripherie sowie die Ansatzligamente zu schonen, so dass er seine Aufgabe der Lastübertragung nicht mehr übernehmen kann (Seedhom et al. 1979, S.225; Paletta et al. 1997, S.696). Diese partiellen Menishektomien resultieren so funktionell in totalen Menishektomien (Messner et Gao 1998, S. 170). Damit ließe sich auch der Umstand erklären, dass in einem Vergleich zwischen partiellen und totalen Menishektomien der Unterschied im Grad der degenerativen Knorpelveränderungen nicht signifikant hoch war (Rockborn et Gillquist 1996, S. 611). Es muß also in Zukunft genauer darauf geachtet werden, wie viel Gewebe entfernt wird und vor allem, in welchen Gebieten und ob die Ansatzligamente betroffen sind.

Die oben beschriebenen Funktionen des Meniskus werden möglich durch seine starke anteriore und posteriore Verankerung am Knochen (Messner et al. 1998, S. 164). Die Ansatzligamente selbst bei Kaninchen halten in vitro je nach Ansatzstelle Belastungen zwischen 75 N und 158 N aus (Goertzen et al. 1996, S. 127). Selbst nach Excision eines zentralen Segmentes des Meniskuskörpers bei jedoch intakt gelassenen Ansatzstellen und peripheren zirkumferenten Fasern überträgt der Meniskus signifikante Lastanteile (Burke et al. 1978, S.91). Meniskusgewebe ist weicher und weniger permeabel als Gelenkknorpel (Woo et al. 1987, S. 4.35). Es gibt Unterschiede in der Druck- und Zugsteifheit einerseits zwischen humanem und Rindermeniskus, aber auch je nach Lokalisation innerhalb des Meniskus (Fithian et al. 1989, S. 205; Proctor et al. 1989, S. 780; Skaggs et al. 1990, S. 248). Die Zugfestigkeit des medialen humanen Meniskus beträgt im Durchschnitt 19,9 N/mm² (Kohn et al. 1993, S. 400). Der Schafmeniskus ist dem humanem in seinen biomechanischen Eigenschaften am ähnlichsten verglichen mit Menisken anderer häufig verwendeter Tiere (Joshi et al. 1995, S. 826).

Zu biomechanischen Messungen standen uns lediglich sechs Explantate zur Verfügung, da die anderen Untersuchungen Vorrang vor den biomechanischen hatten und die meisten Explantate nicht groß genug waren. Daher ist die statistische Aussagekraft der Ergebnisse stark eingeschränkt und eine Interpretation nur bedingt möglich. Es zeigten sich im Vergleich zwischen der besiedelten und der unbesiedelten Gruppe jedoch keine signifikanten Unterschiede im Widerstand des Gewebes, seiner Relaxation und seines Impressionsverhaltens. Tendenziell ist zu sagen, dass das Gewebe während des Zeitraumes, in dem es implantiert war, eher an Steifigkeit verloren hat und seine Relaxation zugenommen hat im Vergleich zum unbehandelten Kollagenmeniskus. Eine Schlussfolgerung hieraus zu ziehen, ist aufgrund der relativ kurzen Dauer, die die Kollagenmenisken sich in vivo befanden, schwer möglich. Die Vorstellung, dass das Kollagengewebe langsam abgebaut und umgebaut werden soll und temporär durch biomechanisch minderwertiges Gewebe ersetzt wird, kann die Vermutung unterstützen, dass das Gewebe in

dieser Zeit zunächst an Widerstand verliert, bevor sich ein festeres, steiferes Gewebe entwickelt.

4.3.4 Histologien

Ein Hauptaugenmerk in unserer Studie lag in der histologischen Untersuchung der explantierten Kollagenmenisken.

Insgesamt gibt es noch sehr wenige histologische Untersuchungen den Meniskus betreffend. Auch die Studien zur Transplantation von Allografts befassen sich nur selten mit der Histologie der transplantierten Menisken (Rodeo 2001, S. 258). Jackson et al. untersuchten an der Ziege die DNS der Zellen und stellten fest, dass nach einer Woche die Spenderzellen durch Zellen des Empfängers ersetzt wurden (Jackson et al. 1993, S. 546). Arnoczky et al. fanden an Hunden heraus, dass die transplantierten tiefgefrorenen Allografts von Zellen wiederbesiedelt wurden, die von der anliegenden Synovialmembran stammten (Arnoczky et al. 1992, S. 434). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Rodeo et al., die in kleinen Biopsaten von transplantierten Allografts ebenfalls Zellen fanden, die wahrscheinlich der Synovialmembran entstammten. In einigen Stücken zeigten sich Hinweise auf eine leichte chronische Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat, diese stand aber in keinem Zusammenhang zum klinischen Ergebnis (Rodeo et al. 2000, S. 1081).

Wir konnten keine Daten zu histologischen Auswertungen von tissue-engineerten Menisken finden. Aus diesen Gründen erstellten wir anhand vorhandener Schemata zur Knorpelbeurteilung und Histologien nativer Menisken ein neues Schema zur Beurteilung der tissue-engineerten Kollagenmenisken. Durch Interpretation der verschiedenen Kriterien lassen sich Rückschlüsse ziehen auf klinisch relevante Auswirkungen.

Den makroskopischen Veränderungen am Meniskus gehen zum Beispiel histologisch sichtbare voraus, es handelt sich dabei sowohl um zelluläre als auch biochemische Veränderungen (Hellio Le Graverand et al. 2001, S. 60). Diese histologische Degeneration des Meniskus geht wiederum den später folgenden degenerativen Knorpelveränderungen voraus.

Es lässt sich histologisch sehr exakt der Grad und die Art der Entzündung beurteilen und es lassen sich so Hinweise auf Abstoßungsreaktionen feststellen. Des Weiteren weist eine Beurteilung der Zellmorphologie zusammen mit den Kollagenfasern auf die Art des entstehenden Gewebes hin. Ein Explantat, das überwiegend Fibrochondrocyten-ähnliche Zellen und viele kleine, frisch synthetisierte Kollagenfasern enthält, ist sicherlich positiv zu beurteilen und hier wird im weiteren Verlauf wahrscheinlich meniskusähnliches Gewebe entstehen. Die Vaskularisierung spielt eine ganz entscheidende Rolle, denn ohne Gefäßeinsprossung können keine Zellen versorgt werden und keine zusätzlichen einwandern.

In unseren Ergebnissen zeigten sich weder in der 3-Monats- noch in der 6-Monats-Gruppe signifikante Unterschiede zwischen besiedelten und unbesiedelten Kollagenmenisken. Generell bestand vor allem in der 6-Monats-

Gruppe das Problem der sehr geringen Fallzahlen und damit der eingeschränkten statistischen Aussagekraft. Tendenziell sind die Scores in den besiedelten Kollagenmenisken jedoch im Durchschnitt etwas höher.

Die Ursachen für ein schlechtes histologisches Ergebnis hängen zum Teil wahrscheinlich mit anderen Faktoren zusammen, so zum Beispiel mit der in einigen Fällen insuffizienten Fixierung des Kollagenmeniskus. Ist das Transplantat nicht entlang der gesamten Meniskusbasis integriert und befindet es sich nicht exakt in anatomisch korrekter Lage, können die Zellen wahrscheinlich nicht optimal ernährt werden und werden unphysiologischen Belastungen ausgesetzt. Um die Reliabilität des verwendeten Schemas zu überprüfen, sind weitere eng standardisierte Versuche mit möglichst großen Fallzahlen und wenigen Variablen nötig.

In zukünftigen Studien zum tissue-engineerten Meniskusersatz müsste auf die histologische Untersuchung der Explantate mehr Wert gelegt werden, da sich so die zellulären und extrazellulären Bestandteile des Gewebes sehr gut beurteilen lassen. Für die Physiologie eines Organs oder eines Gewebes ist es unabdingbar, dass die Organisation auf zellulärer Ebene funktioniert.

Zusätzlich zu den klassischen Histologien haben wir in unserer Studie noch immunhistochemische Färbungen gemacht, um Kollagen Typ I und Typ II nachzuweisen, und Glykosaminoglykane gemessen, um die extrazelluläre Matrix noch spezifischer zu untersuchen. Die Aktivität der Zellen in den Explantaten wurde mit Hilfe des Sulphat-Uptakes gemessen. Diesen Teil der Studie hat Frau Verena Conrades in ihrer Dissertation bearbeitet (Conrades 2006/2007).

4.4 Meniskustransplantation und Ausblick

Die Ziele des Meniskusersatzes bzw. der Transplantation sind folgende: 1. die Schmerzen, die bei manchen Patienten nach Meniskektomie persistieren, zu lindern, 2. degenerative Veränderungen am Gelenkknorpel und am subchondralen Knochen im Folge der Meniskektomie zu verhindern und somit auch der Entwicklung von Arthrose vorzubeugen und 3. im Idealfall die biomechanischen Eigenschaften des Kniegelenkes wiederherzustellen (Verdonk 2002, S. 118). Der Meniskusersatz stellt eine besondere Herausforderung in der Orthopädie dar, da ein großes Patientenkollektiv betroffen ist, das zudem noch sehr aktiv (es sind häufig Sportler betroffen) und jung ist. Das durchschnittliche Alter der Patienten, die einen Meniskusallgraft transplantiert bekommen, liegt bei 33 Jahren (Goble et al. 1999, S. 150).

Da es sich noch immer um ein experimentelles Verfahren handelt, haben sich noch keine klaren Indikationen zur Meniskustransplantation bzw. zum Meniskusersatz ergeben und man stellt die Indikation zum gegenwärtigen Zeitpunkt des Wissens unter folgenden Gesichtspunkten:

-totale Meniskektomie mit beginnender Arthrose, um den degenerativen Prozeß aufzuhalten oder zu verlangsamen.

-Verlust des vorderen Kreuzbandes, um zusätzliche Stabilisation zu erreichen und das VKB zu schützen.

-gleichzeitige valgisierende hohe tibiale Osteotomie, um deren entlastende Wirkung auf den medialen Gelenkspalt bei varischer Beinachse zu verbessern und wiederholte Deformität zu verzögern.

-prophylaktische Transplantation nach Resektion eines größeren Meniskusanteiles, z.B. bei Korbhockelläsion, um die Folgen einer Meniskektomie zu verhindern.

Der optimale Patient hätte nach Peters et al. somit einen Meniskusschaden, ein stabiles Knie und ein gutes axiales Alignment und wäre jünger als 50 Jahre (Peters et al. 2003, S. 20).

Inzwischen wurden und werden experimentell viele verschiedene Möglichkeiten des Meniskusersatzes getestet.

Der Einsatz von Prothesen aus Teflon und Dacron zeigte einen gewissen chondroprotektiven Wert im Kaninchenknie, aber die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkes entsprachen eher denjenigen eines meniskektomierten als eines normalen Gelenks (Messner 1994, S. 246).

Autografts haben den zusätzlichen Nachteil, in Zeiten von minimal invasiver Kniechirurgie durch die Entnahme der Grafts die Morbidität zu erhöhen. Die meisten unter ihnen, so z.B. ein Fettkissen (fatpad), führten jedoch nicht zu guten Ergebnissen (Kohn et al. 1997, S. 236). Weiterhin wurden Sehnen-Autografts verwendet, von der Quadrizepssehne (Kohn et al. 1999, S. 179; Kohn 1993, S. 124; Peters et al. 1998, Präsentation), der Achillessehne (Hokama et al. 1995, Präsentation) und der Patellarsehne (Kohn et al. 1992, S. 915). Die Ergebnisse mit Quadrizepssehnen und Achillessehnen waren zum Teil Erfolg versprechend, jedoch scheinen sich die Transplantate nicht in meniskusähnliches Gewebe umzuwandeln und die gegenwärtige Forschung hat sich eher von Sehnentransplantaten entfernt.

Der beste Allograft ist anscheinend der frische, da die lebenden Zellen in den frischen Transplantaten die extrazelluläre Matrix aufrechterhalten sollen und so die mechanische Stabilität erhalten bleibt (Arnoczky et al. 1990, S. 125; Kohn 1994, S. 167; Kuhn et al. 1996, S. 542). An Schafen zeigte sich nach 6 Monaten Beobachtungszeit ein Unterschied in der Entwicklung degenerativer Knorpelveränderungen zwischen der meniskektomierten Kontrollgruppe und derjenigen, die einen frischen Allograft bekam (Aagaard et al. 1999, S. 188). In einer anderen Studie konnte zwischen entsprechenden Gruppen nach 21 Monaten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, jedoch zeigten sich in beiden Gruppen deutliche degenerative Knorpelveränderungen (Edwards et al. 1996, S. 224). Bei Allografts besteht stets das Risiko der Abstoßungsreaktion sowie die Gefahr der Krankheitsübertragung (Conrad et al. 1995, S. 214; Asselmeier et al. 1993, S. 170).

Es zeigte sich in tiefgefrorenen Autografts, dass nach ca. 1-2 Wochen Zellen beginnen, in das Transplantat einzuwandern und diese nach 6 Monaten Fibrochondrocyten ähneln (Arnoczky et al. 1992, S. 432).

Cryokonservierte Allografts werden vor allem in den USA weitverbreitet verwendet, zum Teil mit Erfolg (Friedmann 1998, Präsentation; Arnoczky et al. 1990, S. 124), sind aber relativ teuer. Stollsteimer et al. fanden 2000 bei ihren Patienten eine Abnahme der Schmerzen, konnten aber keine Aussagen darüber machen, ob die Transplantation degenerativen Knorpelveränderungen vorbeugt (Stollsteimer et al. 2000, S. 347).

Mit frisch gefrorenen Allografts wurden experimentell (Milachowski et al. 1987, S. 23; Wirth et al. 1986, S. 510) und klinisch (Rodeo et al. 1998, Präsentation; Yoldas et al. 1998, Präsentation) teilweise gute Ergebnisse erzielt, aber auch hier besteht die Gefahr der Krankheitsübertragung, die auch durch Bestrahlung nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Gefriergetrocknete Grafts haben sich nicht bewährt, da sie deutlich schrumpften und folglich schlechte Ergebnisse lieferten (Wirth et al. 1986, S. 510; Wirth et al. 2002, S. 178).

Die meisten Patienten berichten nach der Transplantation über einen Rückgang der Schmerzen und der Schwellung. Auch der Lysholm-Score verbesserte sich vorübergehend, wurde dann häufig aber wieder schlechter. Ob allerdings ein chondroprotektiver Effekt durch eine Transplantation besteht, ist noch nicht klar (Felix et al. 2003, S. 15; Cameron et al. 1997, S. 169; Rath et al. 2001, S. 413; Stollsteimer et al. 2000, S. 347; Veltri et al. 1994, S. 51; Wirth et al. 2002, S. 178).

Die Transplantation von Meniskusallografts sorgt für systemische und lokale Immunreaktionen, die in einigen Fällen sicherlich für ein Scheitern des Meniskusersatzes verantwortlich ist (Goble et al. 1999, S. 155).

Zusammengefaßt rühren die Ursachen für ein Scheitern bei der Transplantation von Allografts somit hauptsächlich von eingeschränkter Zelldichte, abnormalem Umbau und Schrumpfung der Allografts her (Noyes 1995, Präsentation; Stollsteimer et al. 2000, S. 344). Es gibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch zu wenige Langzeitergebnisse und die Ergebnisse bei Patienten mit fortgeschrittenen degenerativen Knorpelveränderungen sind schlecht (Rodeo 2001, S. 260).

Es gibt nun aber durchaus gute Ergebnisse mit der Transplantation von Allografts, doch konnte sich noch kein Verfahren gegenüber den anderen durchsetzen und nachhaltig überzeugen. Ein Vergleich der verschiedenen Verfahren und Studien ist zudem schwierig, da sie von Ansatz und Zielsetzung her sehr unterschiedlich sind und in vielen Fällen Langzeitergebnisse fehlen (Peters et al. 2003, S. 24). Auf absehbare Zeit wird die Meniskustransplantation daher ein experimentelles Verfahren bleiben, das nur in erfahrenen, großen Zentren durchgeführt werden sollte (Eriksson 2003, S.131).

Die viel versprechendste Therapiemethode bei komplexen Meniskusverletzungen scheint auf Dauer der tissue-engineerte Meniskusersatz zu sein. Das Ziel besteht darin, ein Gewebe herzustellen, das dem nativen Meniskus so ähnlich wie möglich ist in seinen zellulären und biomechanischen Eigenschaften und auch in seiner Form. Ibarra et al. brachten biopsierte

Fibrochondrocyten auf ein PGA-Gerüst und implantierten dieses subkutan in Mäuse. Sie explantierten nach einigen Wochen ein meniskusähnliches Gewebe, in dem die Fasern zum Teil auch eine gewisse Anordnung besaßen (Ibarra et al. 1997, S. 987). Peretti et al. erreichten 2001 mit einer ähnlichen Methode eine Heilung von Korbhenkelrissen im inneren Drittel von Menisken, indem sie mit Chondrocyten besiedelte Meniskusmatrizes in die Risse einnähten. Die eingenähten Meniskusstücke waren vor der Besiedelung devitalisiert worden und dann subkutan in Mäuse implantiert worden (Peretti et al. 2001, S. 281). Auch Muskelzellen besitzen das Potential, durch Stimulation bestimmter Wachstumsfaktoren bei der Knochen- und Gelenkheilung mitzuwirken. Sie sind in der Lage, ihren Phänotyp zu ändern und sind zudem durch Muskelbiopsien sehr leicht zugänglich (Pelinkovic et al. 2000, S. 404).

Um jedoch vor allem den biomechanischen Anforderungen des Meniskus gerecht werden zu können, ist ein Transplantat oder Gerüst notwendig, das zum Zeitpunkt der Implantation ähnliche biomechanische Eigenschaften besitzt wie der native Meniskus. Dazu ist eine exakte Anordnung und Ausrichtung der Kollagenfasern und der Glykosaminoglykane notwendig, die unter Druckbelastung entsteht. Kontrollierte Druckbelastung stimuliert die Kollagensynthese und erhöht die Festigkeit und Stärke von Bindegewebe (Wolff's Gesetz).

Um die Dedifferenzierung der Zellen zu verhindern und die Zellproliferation zu fördern, wurde und wird in verschiedenen Studien der Einsatz von Wachstumsfaktoren an muskuloskeletalen Geweben untersucht (Martinek et al. 2002, S. 109; Day et al. 1997, S. 901; Goto et al. 1999, S. 923; Baltzer et al. 1999, S. 201). Die Machbarkeit des Gentransfers mittels verschiedener Vektoren wurde in diesen Studien in vitro und in vivo gezeigt. Mit Hilfe kontinuierlicher Expression von Wachstumsfaktoren könnte die Zellproliferation und die Matrixsynthese sowie die biomechanischen Eigenschaften der Transplantate dauerhaft verbessert werden. Hier, also in der Kombination aus Tissue Engineering und Gentherapie, liegt sicherlich die Zukunft in der Therapie der Meniskusläsion und des Meniskusverlustes (Musgrave et al. 2002, S. 11).

Bevor der Gentransfer jedoch in klinischer Routine zum Einsatz kommen kann, müssen noch viele offene Fragen geklärt werden, so die Sicherheit der Gentherapie an sich und auch die Möglichkeit, die Synthese von Wachstumsfaktoren zu regulieren.

Ein Problem besteht zur Zeit noch darin, die Transplantate und den Gelenkknorpel immer erst nach ihrer Explantation untersuchen und beurteilen zu können. So können nur zu festgelegten Zeitpunkten Messungen durchgeführt werden und es bleibt unklar, wie sich das Gewebe in der Zwischenzeit entwickelt hat. Zur Überwachung von Gewichtsverteilung und stabilisierender Funktion des Transplantats perioperativ sowie im Follow-up müssten Methoden entwickelt werden (Messner et al. 1999, S. 181), ebenso routinemäßig einsetzbare nichtinvasive Methoden zur Überwachung von

Veränderungen am Gelenkknorpel. Inzwischen wurden experimentell einige viel versprechende Methoden zur Messung der Dicke des Gelenkknorpels sowie zur Früherkennung von degenerativen Veränderungen am Knorpel entwickelt (Eckstein et al. 2002, S. 254), die schon in epidemiologischen Studien Anwendung finden. Erste Studien beschäftigen sich zudem damit, die biochemische Zusammensetzung des Gelenkknorpels mit Hilfe der Magnetresonanztomographie zu messen (Bashir et al. 1999, S. 863). Diese Methoden müssen weiterentwickelt werden, so dass sie auch auf andere Gewebe wie den tissue-engineerten Meniskusersatz anwendbar werden.

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass bei der Vielzahl von experimentellen Verfahren zum Meniskusersatz bis jetzt kein Standardprotokoll zur Rehabilitation und zum postoperativen Follow-up existiert. Zur optimalen Therapie gehört aber dieser Teil genauso dazu wie die Auswahl der besten Operationstechnik. In klinischen Studien sollte die Rehabilitation und das postoperative Follow-up mehr Beachtung finden, um sobald wie möglich ein standardisiertes Schema zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Meniskusverletzungen stellen eines der häufigsten Probleme in der Orthopädie dar. Die Therapie bestand früher zunächst in der totalen Meniskektomie, doch stellte man mit der Zeit fest, dass degenerative Knorpelveränderungen und Arthrose die Folge waren. Auch partielle Meniskektomien führten nach einer gewissen Latenzzeit zu degenerativen Knorpelveränderungen und man begann, verschiedene Methoden der Refixation und dann auch der Transplantation zu untersuchen. Die meisten Studien befassten sich mit der Transplantation von Meniskusallotrafts, es gibt aber nach wie vor kein Verfahren, das sich durchsetzen konnte und in die klinische Routine übergegangen ist.

Der Meniskus hat im Kniegelenk komplexe Funktionen zu übernehmen. Er ist den hohen biomechanischen Anforderungen durch seinen zellulären und extrazellulären Aufbau optimal angepasst.

Beim Einsatz von Transplantaten, seien es Allotrafts oder tissue-engineerte Transplantate, ist es von zentraler Bedeutung, dass die Transplantate dem nativen Meniskus schon zum Zeitpunkt der Implantation so ähnlich wie nur möglich sind. Dabei sind für die Funktion des Kniegelenks vor allem die biomechanischen Eigenschaften wichtig.

Die amerikanische Arbeitsgruppe um Stone, Rodkey und Steadman entwickelten ein Kollagengerüst zum Einsatz als Meniskusersatz. Die Ergebnisse waren zum Teil Erfolg versprechend, aber es waren beispielsweise zuvor an diesem Gerüst keine biomechanischen Untersuchungen unternommen worden.

Wir besiedelten die Kollagenmenisken vor der Implantation mit autologen Fibrochondrocyten, die wir nach einer kleinen Meniskusbiopsie in Zellkultur vermehrt hatten. Nach 3 bzw. 6 Monaten explantierten wir die tissue-engineerten Kollagenmenisken und führten eine Reihe von Untersuchungen durch, unter anderem beurteilten wir die Explantate histologisch. Unsere histologischen Ergebnisse sind durchaus viel versprechend. Es ist ein deutlicher Trend erkennbar, dass eine Besiedelung der Kollagenmenisken mit autologen Fibrochondrocyten positive Auswirkungen auf die zelluläre Organisation und den zügigen Umbau des Gerüsts hat. Die histologische Aufarbeitung von tissue-engineertem Meniskus sollte stets Teil zukünftiger Studien sein.

Die Ursachen weniger guter Ergebnisse einzelner Transplantate sind in unserer Studie wahrscheinlich auf die teilweise insuffiziente Fixierung der Implantate und vor allem auf die minderwertigen biomechanischen Eigenschaften des Kollagenmeniskus zurückzuführen. Die Fixierung ließe sich unter Umständen über einen arthroskopischen Zugang verbessern, insgesamt reicht aber die Nahtausreißkraft des von uns verwendeten Gerüsts nicht aus, den hohen wirkenden Kräften zu widerstehen. Somit müssen Trägermaterialien entwickelt werden, die schon unbehandelt eine vielfach höhere Steifigkeit aufweisen und den enormen Zugbelastungen standhalten können, um die Aufgaben des Meniskus ausreichend übernehmen zu können. Den biomechanischen

Eigenschaften des Trägermaterials sollte also weit mehr Aufmerksamkeit in der Forschung zuteil werden als bisher. Im nächsten Schritt können dann die Eigenschaften des Gerüsts durch Zellbesiedelung und den Einsatz spezifischer Wachstumsfaktoren weiter verbessert werden und das Gewebe dem nativen Meniskus so weit wie möglich angeglichen werden.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass der begangene Weg ohne Zweifel der richtige ist, aber in Zukunft vor allem daran gearbeitet werden muss, Transplantate mit besseren biomechanischen Eigenschaften zu entwickeln. Diese ließen sich dann suffizient im Kniegelenk fixieren und sie könnten direkt nach Implantation den hohen Anforderungen standhalten. Durch die zusätzliche Anwendung von Wachstumsfaktoren könnte die Proliferation der Zellen stimuliert und die Regeneration des Meniskus beschleunigt werden.

Die Therapie von Meniskuläsionen bleibt also ein hochaktuelles und dringliches Problem in der Orthopädie, aber durch die Verwendung von neuen tissue-engineerten Transplantaten, in der Zukunft kombiniert mit Gentransfer, gibt es inzwischen sehr viel versprechende Therapieansätze, die große Fortschritte in der Behandlung der Meniskusverletzungen bringen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aagaard H, Jorgensen U, Bojsen-Moller F.
Reduced degenerative articular cartilage changes after meniscal allograft transplantation in sheep.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1999;7(3):184-91.
- Aagaard H, Verdonk R.
Function of the normal meniscus and consequences of meniscal resection.
Scand J Med Sci Sports. 1999;9:134-40.
- Adams ME, Ho YA.
Localization of glycosaminoglycans in human and canine menisci and their attachments.
Connect Tissue Res. 1987;16(3):269-79.
- Adams ME, Muir H.
The glycosaminoglycans of canine menisci.
Biochem J. 1981;197(2):385-9.
- Ahmed AM, Burke DL.
In vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints- Part I: Tibial surface of the knee.
J Biomech Eng. 1983;105:216-25.
- Allen PR, Denham RA, Swan AV.
Late degenerative changes after meniscectomy. Factors affecting the knee after operation.
J Bone Joint Surg. [Br] 1984;66:666-71.
- Amin AR, DiCesare PE, Vyas P, et al.
The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: Evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase.
J Exp Med. 1995;182:2097-102.
- Angele P, Johnstone B., Kujat R., Nerlich M., Goldberg V., Yoo J.
Meniscus repair with mesenchymal progenitor cells in a biodegradable composite matrix.
Poster presentation, 46th Annual Meeting, ORS, March 12-15, 2000, Orlando.
- Appel H.
Late results after meniscectomy in the knee joint. A clinical and roentgenologic follow-up investigation.
Acta Orthop Scand Suppl. 1970;133:1-111.

Arnoczky SP.
Building a meniscus. Biologic considerations.
Clin Orthop. 1999 Oct;367 (Supl):244-53. Review.

Arnoczky SP, DiCarlo EF, O'Brien SJ, Warren RF.
Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog.
J Arthrosc. 1992;8:428-36.

Arnoczky SP, Warren RF, McDevitt CA.
Meniscal replacement using a cryopreserved allograft.
Clin Orthop. 1990 March;252:121-8.

Arnoczky SP, Warren RF.
Microvasculature of the human meniscus.
Am J Sports Med. 1982;10:90-5.

Arnoczky SP, Warren RF.
The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog.
Am J Sports Med. 1983 May-Jun;11(3):131-41.

Arnoczky SP, Warren RF, Kaplan N.
Meniscal remodeling following partial meniscectomy. An experimental study in the dog.
J Arthrosc. 1985;1:247-52.

Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM.
Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs.
J Bone Joint Surg Am. 1988 Sep;70(8):1209-17.

Aspden RM, Yarker YE, Hukins DWL.
Collagen orientations in the meniscus of the knee joint.
J Anat. 1985 May;140:371-80.

Asselmeier MA, Caspari RB, Bottenfield S.
A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus.
Am J Sports Med. 1993 Mar-Apr;21(2):170-5.Review.

Baker P, Coggon D, Reading I, Barrett D, McLaren M, Cooper C.
Sports injury, occupational physical activity, joint laxity, and meniscal damage.
J Rheumatol. 2002 Mar;29(3):557-63.

Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Braunstein S, Robbins PD, Evans CH.
A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene
expression in a New Zealand white rabbit model.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1999;7(3):197-202.

Bashir A, Gray ML, Hartke J, Burstein D.
Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI.
Magn Reson Med. 1999 May;41(5):857-65.

Bellabarba C, Bush-Joseph CA, Bach BJ.
Patterns of meniscal injury in the anterior cruciate-deficient knee: a review of the
literature.
Am J Orthop. 1997;26:18-23.

Benya PD, Shaffer JD.
Differentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when
cultured in agarose gels.
Cell. 1982;30:215-24.

Bhargava MM, Attia ET, Murrell GA, Dolan MM, Warren RF, Hannafin JA.
The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells.
Am J Sports Med. 1999 Sep-Oct;27(5):636-43.

Bland SJ.
Ligaments, their nature and morphology.
2nd Ed. 1897, London.

Bolano LE, Grana WA.
Isolated arthroscopic partial meniscectomy. Functional radiographic evaluation at five
years.
Am J Sports Med. 1993 May-Jun;21(3):432-7.

Brindle KM.
Investigating the performance of intensive mammalian cell bioreactor systems using
magnetic resonance imaging and spectroscopy.
Biotechnol Genet Eng Rev. 1998;15:499-520. Review.

Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W.
Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-
model.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2000;8(6):364-9.

Bujia J, Rotter N, Minuth W, Burmester G, Hammer C, Sittinger M.
Züchtung menschlichen Knorpelgewebes in einer dreidimensionalen Perfusions-
kulturkammer: Charakterisierung der Kollagensynthese.
Laryngo-Rhino-Otol. 1995;74:559-63.

Bullough PG, Munuera L, Murphy J, Weinstein AM.
The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure.
J Bone Joint Surg. [Br] 1970;52:564-70.

Burke DL, Ahmed Ah, Miller J.
A biomechanical study of partial and total medial meniscectomy of the knee.
Trans Orthop Res Society. 1978;3:91.

Burr DB, Radin EL.
Meniscal function and the importance of meniscal regeneration in preventing late
medial compartment osteoarthritis.
Clin Orthop. 1982 Nov-Dec;171:121-6.

Bylski-Austrow DI, Ciarelli MJ, Kayner DC, Matthews LS, Goldstein SA.
Displacements of the menisci under joint load: an in vitro study in human knees.
J Biomech. 1994;27:421-31.

Callies R., Jackson ME, Brindle KM.
Measurements of the growth and distribution of mammalian cells in a hollow-fiber
bioreactor using nuclear magnetic resonance imaging.
Biotechnology (NY). 1994 Jan;12(1):75-8.

Cameron JC, Saha S.
Meniscal allograft transplantation for unicompartmental arthritis of the knee.
Clin Orthop Relat Res. 1997 Apr;(337):164-71.

Carver SE, Heath CA.
Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure
to regenerating cartilage.
Tissue Eng. 1999;5:1-11.

Chen MI, Branch TP, Hutton WC.
Is it important to secure the horns during lateral meniscal transplantation? A
cadaveric study.
Arthroscopy. 1996 Apr;12(2):174-81.

Cheung HS.

Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci.

Connect Tissue Res. 1987;16(4):343-56.

Choi YC, Morris GM, Lee FS, Sokoloff L.

The effect of serum on monolayer cell culture of mammalian articular chondrocytes.

Conn Tissue Res. 1980;7:105-12.

Choi YC, Morris GM, Sokoloff L.

Effect of platelet lysate on growth and sulphated glycosaminoglycan synthesis in articular chondrocyte cultures.

Arthritis Rheum. 1980;23:220-4.

Clark CR, Ogden JA.

Development of the menisci of the human knee joint: morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury.

J Bone Joint Surg [Am] 1983;65:538-47.

Collier S, Ghosh P.

Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus.

Osteoarthritis Cartilage. 1995 Jun;3(2):127-38.

Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM.

Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation.

J Bone Joint Surg. [Am] 1995;77(2):214-24.

Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR.

Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial.

Am J Sports Med. 1999 Sep-Oct;27(5):658-65.

Cox JS, Nye CE, Schaefer WW, Woodstein IJ.

The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees.

Clin Orthop. 1975;(109):178-83.

Czipott Z, Baradnay G.

Studies on replacement tissue formation following meniscectomy.

Z Orthop. 1971;109:440-51.

- Danzig L, Resnik D, Gonsalves M, Akeson WH.
Blood supply to the normal and abnormal menisci of the human knee.
Clin Orthop. 1983;172:271-6.
- Day B, MacKenzie WG, Shim SS, Leung G.
The vascular and nerve supply of the human meniscus.
Arthroscopy. 1985;1:58-62.
- Day CS, Kasemkijwattana C, Menetrey J, Floyd SS Jr, Booth D, Moreland MS, Fu FH, Huard J.
Myoblast-mediated gene transfer to the joint.
J Orthop Res. 1997 Nov;15(6):894-903.
- DeHaven KE.
Meniscus repair.
Am J Sports Med. 1999 Mar-Apr;27(2):242-50. Review.
- Djurasovic M, Aldridge JW, Grumbles R, Rosenwasser MP, Howell D, Ratcliffe A.
Knee joint immobilization decreases aggrecan gene expression in the meniscus.
Am J Sports Med. 1998;26:460-6.
- Drachman DB, Sokoloff L.
The role of movement in embryonic joint development.
Devel Biol. 1966;14:401-20.
- Eckstein F, Englmeier KH, Reiser M.
Quantitative Knorpelanalyse mit der Magnetresonanztomographie (qMRI) – Neue Ära der Arthrodiagnostik?
Z Rheumatol. 2002 Jun;61(3):250-9. Review.
- Edwards DJ, Whittle SL, Nissen MJ, Cohen B, Oakeshott RD, Keene GC.
Radiographic changes in the knee after meniscal transplantation. An experimental study in a sheep model.
Am J Sports Med. 1996 Mar-Apr;24(2):222-6.
- Elliott DM, Guilak F, Vail TP, Wang JY, Setton LA.
Tensile properties of articular cartilage are altered by meniscectomy in a canine model of osteoarthritis.
J Orthop Res. 1999 Jul;17(4):503-8.
- Elmer RM, Moskowitz RW, Frankel VH.
Meniscal regeneration and postmeniscectomy degenerative joint disease.
Clin Orthop. 1977;124:304-10.

- Eriksson E.
Meniscus transplantation.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2003 May;11(3):131.
- Espley AJ, Waugh W.
Regeneration of menisci after total knee replacement.
J Bone Joint Surg [Br] 1981;63:387-90.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD.
Orthopaedic gene therapy.
Clin Orthop Relat Res. 2004 Dec;(429):316-29. Review.
- Evans CH, Stefanovic-Racic M, Lancaster J.
Nitric oxide and its role in orthopaedic disease.
Clin Orthop. 1995;312:275-94.
- Evans CH, Robbins PD.
Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system.
Clin Orthop. 1999 Oct;367 (Suppl):410-8. Review.
- Evans DK.
Repeated regeneration of a meniscus in the knee.
J Bone Joint Surg [Br] 1963;45:748-9.
- Eyre DR, Wu JJ.
Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus.
FEBS Lett. 1983 Jul 25;158(2):265-70.
- Fairbank TJ.
Knee joint changes after meniscectomy.
J Bone Joint Surg [Br] 1948;30(B):664-70.
- Fauno P, Nielsen AB.
Arthroscopic partial meniscectomy: a long-term follow-up.
Arthroscopy. 1992;8(3):345-9.
- Felix NA, Paulos LE.
Current status of meniscal transplantation.
Knee. 2003 Mar;10(1):13-7. Review.
- Fithian DC, Schmidt MB, Ratcliffe A, Mow VC.
Human meniscus tensile properties: regional variation and biochemical correlation.
Trans Orthop Res Society. 1989;14:205.

Friedman MJ.

Meniscal allografts.

Presented at the AANA speciality day, 65th annual meeting AAOS, Mar 22, 1998, New Orleans, Louisiana.

Forman SK, Oz MC, Lontz JF, Treat MR, Forman TA, Kiernan HA.

Laser-assisted fibrin clot soldering of human menisci.

Clin Orthop. 1995 Jan;(310):37-41.

Fu FH, Harner CD, Johnson DL, Miller MD, Woo SL.

Biomechanics of knee ligaments: basic concepts and clinical application.

Instr Course Lect. 1994;43:137-48. Review.

Fukubayashi T, Kurosawa H.

The contact area and pressure distribution pattern of the knee: a study of normal and osteoarthritic knee joints.

Acta Orthop Scand. 1980;51(6):871-9.

Gao J, Messner K.

Natural healing of anterior and posterior attachments of the rabbit meniscus.

Clin Orthop. 1996 Jul;328:276-84.

Gao J, Wei X, Messner K.

Healing of the anterior attachment of the rabbit meniscus to bone.

Clin Orthop. 1998;348:246-58.

Ghadially FN, Thomas I, Yong NK, LaLonde J-MA.

Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages.

J Anat. 1978;125:499-517.

Goble EM, Kohn D, Verdonk R, Kane SM.

Meniscal substitutes - human experience.

Scand J Med Sci Sports. 1999 Jun;9(3):146-57. Review.

Goto H, Shuler FD, Lamsam C, Moller HD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH.

Transfer of lacZ marker gene to the meniscus.

J Bone Joint Surg Am. 1999 Jul;81(7):918-25.

Goto H, Shuler FD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH.

Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGFbeta(1)gene.

Osteoarthritis Cartilage. 2000 Jul;8(4):266-71.

Gray ML, Burstein D, Xia Y.
Biochemical (and functional) imaging of articular cartilage.
Semin Musculoskelet Radiol. 2001 Dec;5(4):329-43. Review.

Hall BK.
In vitro studies on the mechanical evocation of adventitious cartilage in the chick.
J Exper Zool. 1968;168:283-306.

Hall BK.
The formation of adventitious cartilage by membrane bones under the influence of
mechanical stimulation applied in vitro.
Life Sci. 1967;6:663-7.

Heath CA, Magari SR.
Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro.
Biotechnol Bioeng. 1996;50:430.

Hede A, Jensen DB, Blyme P, Sonne-Holm S.
Epidemiology of meniscal lesions in the knee. 1,215 open operations in
Copenhagen 1982-84.
Acta Orthop Scand. 1990 Oct;61(5):435-7.

Hede A, Larsen E, Sandberg H.
Partial versus total meniscectomy. A prospective, randomised study with long-term
follow-up.
J Bone Joint Surg. [Br] 1992;74:118-21.

Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness G, Hart DA.
Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I : Cellular
and matrix alterations.
Osteoarthritis Cartilage. 2001;9:56-64.

Henning CE, Lynch MA, Clark JR.
Vascularity for healing of meniscus repairs.
Arthroscopy. 1987;3:13-8.

Herwig J, Egner E, Buddecke E.
Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration.
Ann Rheum Dis. 1984 Aug;43(4):635-40.

Hokama R, Muneta T, Murakami S, et al.
Meniscal reconstruction with autogenous and allogeneic Achilles tendon: an experimental study in rabbits.
Presented at the 41st annual meeting, Orthopaedic Research Society, Feb 13-16, 1995, Orlando, Florida.

Horwitz A, Dorfman A.
The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension.
J Cell Biol. 1970;45:434-8.

Hoser C, Fink C, Brown C, Reichkender M, Hackl W, Bartlett J.
Long-term results of arthroscopic partial lateral meniscectomy in knees without associated damage.
J Bone Joint Surg Br. 2001 May;83(4):513-6.

Hoshikawa Y, Kurosawa H, Fukubayashi T, Watarai K.
The prognosis of meniscectomy in athletes. The simple meniscus lesions without ligamentous instabilities.
Am J Sports Med. 1983;11:8-13.

Huard J, Li Y, Peng H, Fu FH.
Gene therapy and tissue engineering for sports medicine.
J Gene Med. 2003 Feb;5(2):93-108. Review.

Ibarra C, Jannetta C, Vacanti CA, Cao Y, Kim TH, Upton J, Vacanti JP.
Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogeneic meniscus transplantation.
Trans Proc. 1997 Feb-Mar;29(1-2):986-8.

Ibarra C, Koski JA, Warren RF.
Tissue engineering meniscus: cells and matrix.
Orthop Clin North Am. 2000 Jul;31(3):411-8. Review.

Jackson DW, McDevitt CA, Simon TM, Arnoczky SP, Atwell EA, Silvino NJ.
Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in goats.
Am J Sports Med. 1992 Nov-Dec;20(6):644-56.

Jackson DW, Whelan J, Simon TM.
Cell survival after transplantation of fresh meniscal allografts. DNA probe analysis in a goat model.
Am J Sports Med. 1993 Jul-Aug;21(4):540-50.

Jackson JP.

Degenerative changes in the knee after meniscectomy.

Br Med J. 1968;2:525-7.

Jaureguito JW, Elliot JS, Lietner T, Dixon LB, Reider B.

The effects of arthroscopic partial lateral meniscectomy in an otherwise normal knee: a retrospective review of functional, clinical, and radiographic results.

Arthroscopy. 1995 Feb;11(1):29-36.

Jorgensen U, Sonne-Holm S, Lauridsen F, Rosenklint A.

Long-term follow-up of meniscectomy in athletes. A prospective longitudinal study.

J Bone Joint Surg. [Br] 1987;69:80-3.

Joshi MD, Suh J-K, Marui T, Woo SL-Y.

Interspecies variation of compressive biomechanical properties of the meniscus.

J Biomed Mat Res. 1995;29:823-8.

Kettelkamp DB, Jacobs AW.

Tibiofemoral contact area – determination and implications.

J Bone Joint Surg [Am] 1972;54:349-56.

King D.

Regeneration of the semilunar cartilage.

Surg Gynecol Obstet. 1936;62:167-70.

King D.

The function of semilunar cartilage.

J Bone Joint Surg [Am] 1936;18:1069-76.

King D.

The healing of semilunar cartilages.

J Bone Joint Surg [Am] 1936;18:333-42.

Kiraly K, Hyttinen MM, Parkkinen JJ, Arokoski JA, Lapvetelainen T, Torronen K, Kiviranta I, Helminen HJ.

Articular cartilage collagen birefringence is altered concurrent with changes in proteoglycan synthesis during dynamic in-vitro loading.

Anat Rec. 1998;251:28-36.

Klomp maker J, Veth RP, Jansen HW, Nielsen HK, de Groot JH, Pennings AJ.

Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog.

Biomaterials. 1996 Jun;17(12):1169-75.

Kohn D.
Autograft meniscus replacement: experimental and clinical results.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1993;1:123-5.

Kohn D.
Meniskusersatz.
Orthopade. 1994 Apr;23(2):164-70.

Kohn D, Aagaard H, Verdonk R, Dienst M, Seil S.
Postoperative follow-up and rehabilitation after meniscus replacement.
Scand J Med Sci Sports. 1999;9(3):177-80.

Kohn D, Moreno B.
Meniskusinsertion.
Orthopade. 1994;23:98-101.

Kohn D, Rudert M, Wirth CJ, Plitz W, Reiss G, Maschek H.
Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. An experimental study in sheep.
Int Orthop. 1997;21(4):232-8.

Kohn D, Wirth CJ, Reiss G, Plitz W, Maschek H, Erhardt W, Wulker N.
Medial meniscus replacement by a tendon autograft. Experiments in sheep.
J Bone Joint Surg Br. 1992 Nov;74(6):910-7.

Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG.
Mechanical changes in the knee after meniscectomy.
J Bone Joint Surg Am. 1976 Jul;58(5):599-604.

Kuhn JE, Wojtys EM.
Allograft meniscus transplantation.
Clin Sports Med. 1996 Jul;15(3):537-46. Review.

Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H.
Load-bearing mode of the knee joint: physical behaviour of the knee joint with or without menisci.
Clin Orthop. 1980;149:283-90.

Lazovic D, Wirth CJ, Knösel T, Gosse F, Maschek HG.
Der Meniskusersatz mit inkongruenten Transplantaten – eine experimentelle
Untersuchung.
Z Orthop. 1997;135:131-7.

Lazovic D, Wirth CJ, Sieg A, Gosse F, Maschek HG.
Der Einfluß der Operationstechnik auf Meniskustransplantate. Eine histologische,
tierexperimentelle Studie.
Unfallchirurg. 1997;100:541-6.

Lou J, Manske PR, Aoki M, Joyce ME.
Adenovirus-mediated gene transfer into tendon and tendon sheath.
J Orthop Res. 1996 Jul;14(4):513-7.

MacConaill MA.
The function of intra-articular fibrocartilages, with special reference to the knee and
inferior radio-ulnar joints.
J Anat. 1932;66:210.

Maitra RS, Miller MD, Johnson DL.
Meniscal reconstruction. Part I: indications, techniques, and graft considerations.
Am J Orthop. 1999 Apr;28(4):213-8 contd. Review.

Martinek V, Friederich NF.
To brace or not to brace? How effective are knee braces in rehabilitation?
Orthopade. 1999 Jun;28(6):565-70. Review.

Martinek V, Ueblacker P, Imhoff AB.
Current concepts of gene therapy and cartilage repair.
J Bone Joint Surg Br. 2003 Aug;85(6):782-8. Review.

Martinek V, Usas A, Pelinkovic D, Robbins P, Fu FH, Huard J.
Genetic engineering of meniscal allografts.
Tissue Eng. 2002 Feb;8(1):107-17.

McAndrews PT, Arnoczky SP.
Meniscal repair enhancement techniques.
Clin Sports Med. 1996 Jul;15(3):499-510.

McDevitt CA, Webber RJ.
The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage.
Clin Orthop. 1990 Mar;252:8-18. Review.

McGinty JB, Geuss LF, Marvin RA.
Partial or total meniscectomy. A comparative analysis.
J Bone Joint Surg. [Am] 1977;59:763-6.

Meakin JR, Shrive NG, Frank CB, Hart DA.
Finite element analysis of the meniscus: the influence of geometry and material properties on its behaviour.
Knee. 2003 Mar;10(1):33-41.

Medlar RC, Mandiberg JJ, Lyne EO.
Meniscectomies in children: report of long term results in 80 children.
Am J Sports Med. 1980;8:87-92.

Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Fu FH, Moreland MS, Huard J.
Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament.
Tissue Eng. 1999 Oct;5(5):435-42.

Messner K.
Meniscal regeneration or meniscal transplantation?
Scand J Med Sci Sports. 1999 Jun;9(3):162-7. Review.

Messner K.
Meniscal substitution with a Teflon-periosteal composite graft: a rabbit experiment.
Biomaterials. 1994 Feb;15(3):223-30.

Messner K.
The concept of a permanent synthetic meniscus prosthesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using Dacron and Teflon implants.
Biomaterials. 1994 Mar;15(4):243-50. Review.

Messner K, Gao J.
The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment.
J Anat. 1998;193:161-78. Review.

Messner K, Kohn D, Verdonk R.
Future research in meniscal replacement.
Scand J Med Sci Sports. 1999 Jun;9(3):181-3.

Milachowski KA, Kohn D, Wirth CJ.
Transplantation of allogeneic menisci
Orthopade. 1994 Apr;23(2):160-3.

Milachowski KA, Weismeier K, Erhardt W, Remberger K.
Transplantation of the meniscus: an experimental study in sheep.
Sportverletz Sportschaden. 1987 Apr;1(1):20-4.

Mooney V, Ferguson AB Jr..

The influence of immobilization and motion on the formation of fibrocartilage in the repair granuloma after joint resection in the rabbit.

J Bone Joint Surg. [Am] 1966;48:1145-55.

Morel J, Bastian P, Vanvelcenaher F.

Regeneration of meniscus of the knee following meniscectomy.

Rev Chir Orthop. 1953;38:137-41.

Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burnstein AH, Frankel VH.

Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit.

Arthritis Rheum. 1973;16:397-405.

Murrell GAC, Dolan MM, Jang D, Szabo C, Warren RF, Hannafin JA.

Nitric oxide: An important articular free radical.

J Bone Joint Surg [Am] 1996;78-A:265-74.

Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J.

Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone.

Bone. 1999 Jun;24(6):541-7.

Musgrave DS, Fu FH, Huard J.

Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery.

J Am Acad Orthop Surg. 2002 Jan-Feb;10(1):6-15. Review.

Nakano T, Thompson JR, Aherne FX.

Distribution of glycosaminoglycans and the nonreducible collagen crosslink, pyridinoline in porcine menisci.

Can J Vet Res. 1986 Oct;50(4):532-6.

Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, Horibe S, Tada K, Ochi T, Yoshikawa H.

Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering.

Clin Orthop. 2001 Oct;391 (Suppl):208-18.

Nakhostine M, Gershuni DH, Anderson R, Danzig LA, Weiner GM.

Effects of abrasion therapy on tears in the avascular region of sheep menisci.

Arthroscopy. 1990;6(4):280-7.

Nielsen AB, Yde J.

Epidemiology of acute knee injuries: a prospective hospital investigation.
J Trauma. 1991 Dec;31(12):1644-8.

Noyes FR.

A histological study of failed human meniscal allograft.
Oral presentation, Speciality Day, Arthroscopy Association of North America,
Orlando, FL, February 1995.

Noyes FR, Barber-Westin SD.

Irradiated meniscal allografts in the human knee: a two-to-five year follow-up study.
Presented at the 1995 AAOS Meeting in Orlando, FL.

O'Driscoll SW.

The healing and regeneration of articular cartilage.
J Bone Joint Surg [Am]. 1998 Dec;80(12):1795-812. Review.

O'Driscoll SW, Salter RB.

The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under
the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the
rabbit.

J Bone Joint Surg. [Am] 1984;66:1248-57.

Oretorp N, Alm A, Ekstrom H, Gillquist J.

Immediate effects of meniscectomy on the knee joint. The effects of tensile load
on knee joint ligaments in dogs.

Acta Orthop Scand. 1978 Aug;49(4):407-14.

Paletta GA Jr, Manning T, Snell E, Parker R, Bergfeld J.

The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and
pressures in the human knee. A biomechanical study.

Am J Sports Med. 1997 Sep-Oct;25(5):692-8.

Palmoski JP, Brandt KD.

Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro.
Arthritis Rheum. 1984;27:675-81.

Pelinkovic D, Martinek V, Engelhardt M, Lee JY, Fu F, Huard J.

Tissue engineering and gene therapy of the musculoskeletal system with muscle
cells.

Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2000 Sep-Oct;138(5):402-6. Review.

Peretti GM, Caruso EM, Randolph MA, Zaleske DJ.
Meniscal repair using engineered tissue.
J Orthop Res. 2001 Mar;19(2):278-85.

Peters G, Wirth CJ.
The current state of meniscal allograft transplantation and replacement.
Knee. 2003 Mar;10(1):19-31. Review.

Peters G, Wirth CJ, Kohn D, Sander-Beuermann A, Stuhlmann N.
Clinical results of meniscal replacement with a tendon autograft.
Presented at the 8th congress of the European Society of Sports Traumatology, Knee
Surgery and Arthroscopy, Apr 29-May 2, 1998, Nice, France.

Pfeuffer J, Flogel U, Leibfritz D.
Monitoring of cell volume and water exchange time in perfused cells by diffusion-
weighted ¹H NMR spectroscopy and imaging.
NMR Biomed. 1998;11(1):11-8.

Poehling GG, Ruch DS, Chabon SJ.
The landscape of meniscal injuries.
Clin Sports Med. 1990 Jul;9(3):539-49.

Post WR, Akers SR, Kish V.
Load to failure of common meniscal repair techniques: effects of suture
technique and suture material.
Arthroscopy. 1997 Dec;13(6):731-6.

Proctor CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC.
Material properties of the normal medial bovine meniscus.
J Orthop Res. 1989;7(6):771-82. Review.

Putz R.
Anatomy and biomechanics of the knee joint
Radiologe. 1995 Feb;35(2):77-86. Review. German.

Rangger C, Klestil T, Gloetzer W, Kemmler G, Benedetto KP.
Osteoarthritis after arthroscopic partial meniscectomy.
Am J Sports Med. 1995 Mar-Apr;23(2):240-4.

Rath E, Richmond JC, Yassir W, Albright JD, Gundogan F.
Meniscal allograft transplantation. Two- to eight-year results.
Am J Sports Med. 2001 Jul-Aug;29(4):410-4.

Rimmer MG, Nawana NS, Keene GC, Pearcy MJ.
Failure strengths of different meniscal suturing techniques.
Arthroscopy. 1995 Apr;11(2):146-50.

Rockborn P, Gillquist J.
Long term results after arthroscopic meniscectomy: the role of preexisting cartilage fibrillation in a 13 year follow-up of 60 patients.
Int J Sports Med. 1996 Nov;17(8):608-13.

Rodeo SA.
Meniscal allografts - where do we stand?
Am J Sports Med. 2001 Mar-Apr;29(2):246-61. Review.

Rodeo SA, Seneviratne A, Suzuki K, Felker K, Wickiewicz TL, Warren RF.
Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report.
J Bone Joint Surg Am. 2000 Aug;82-A(8):1071-82.

Rodeo SA, Wickiewicz TL, Berkowitz MM, Cohen S, Warren RF.
Evaluation of meniscal allograft transplantation at minimum 2-year follow-up.
Presented at the 65th annual meeting American Academy of Orthopaedic Surgeons, Mar 19-23, 1998, New Orleans, Louisiana.

Rodkey WG, Steadman JR, Li ST.
A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus.
Clin Orthop. 1999 Oct;367 (Suppl):281-92.

Roeddecker K, Nagelschmidt M, Koebeke J, Guensche K.
Meniscal healing: a histological study in rabbits.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1993;1(1):28-33.

Roos H, Lauren M, Adalberth T, Roos EM, Jonsson K, Lohmander LS.
Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls.
Arthritis Rheum. 1998 Apr;41(4):687-93.

Roos H, Lindberg H, Gardsell P, Lohmander LS, Wingstrand H.
The prevalence of gonarthrosis and its relation to meniscectomy in former soccer players.
Am J Sports Med. 1994;22:219-22.

Säämanen AM, Puustjarvi K, Ilves K, Lammi M, Kiviranta I, Jurvelin J, Helminen HJ, Tammi M.

Effect of exercise on proteoglycans and collagen content in the intervertebral disc of young dogs.

Int J Sports Med. 1993;14:48-51.

Salter RB, Minster RR, Clements N, Bogoch E, Bell RS.

Continuous passive motion and the repair of full-thickness articular cartilage defects. A one-year follow-up.

Orthop Trans. 1982;6:266-7.

Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND.

The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit.

J Bone Joint Surg. [Am] 1980;62:1232-51.

Seedhom BB.

Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of the menisci: part I: anatomy, analysis, and apparatus.

Engineering Med. 1979;8:207-19.

Seedhom BB, Hargreaves DJ.

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 Med. 1979;8:220-8.

Setton LA, Guilak F, Hsu EW, Vail TP.

Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair.

Clin Orthop. 1999 Oct;367 (Suppl):254-72. Review.

Shoemaker SC, Markolf KL.

The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee.

J Bone Joint Surg. [Am] 1986;68:71-9.

Skaggs DL, Mow VC.

Function of radial tie fibers in the meniscus.

Trans Orthop Res Society. 1990;15:248.

Smillie IS.

Observations on the regeneration of the semilunar cartilages in man.

Br J Surg. 1944;31:398-401.

Smith RL, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ.

Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism.
Biorheology. 2000;37:95-107.

Sokoloff L, Malemud CJ, Srivastave ML, Morgan WD.
In vitro culture of articular chondrocytes.
Fed Proc. 1973;32:1499.

Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH.
Nitric oxide and arthritis.
Arthritis Rheum. 1993;36:1036-44.

Stollsteimer GT, Shelton WR, Dukes A, Bombay AL.
Meniscal allograft transplantation: a 1- to 5-year follow-up of 22 patients.
Arthroscopy. 2000;16(4):343-7.

Stone KR, Rodkey WG, McKinney LA, Steadman JR.
Autogenous replacement of the meniscus cartilage: analysis of results and mechanisms of failure.
Arthroscopy. 1995 Aug;11(4):395-400.

Stone KR, Rodkey WG, Webber R, McKinney L, Steadman JR.
Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically.
Am J Sports Med. 1992 Mar-Apr;20(2):104-11.

Stone KR, Steadman JR, Rodkey WG, Li ST.
Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data.
J Bone Joint Surg Am. 1997 Dec;79(12):1770-7.

Stone KR, Stoller DW, Irving SG, Elmquist C, Gildengorin G.
3D MRI volume sizing of the knee meniscus cartilage.
Arthroscopy. 1994;10(6):641-4.

Sweigart MA, Athanasiou KA.
Toward tissue engineering of the knee meniscus.
Tissue Eng. 2001 Apr;7(2):111-29. Review.

Szomor ZL, Martin TE, Bonar F, Murrell GA.
The protective effects of meniscal transplantation on cartilage. An experimental study in sheep.
J Bone Joint Surg Am. 2000 Jan;82(1):80-8.

- Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y.
Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1999;7(2):75-80.
- Thelwall PE, Neves AA, Brindle KM.
Measurement of bioreactor perfusion using dynamic contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging.
Biotechnol Bioeng. 2001 Dec 20;75(6):682-90.
- Ueblacker P, Wagner B, Kruger A, Vogt S, DeSantis G, Kennerknecht E, Brill T, Hillemanns M, Salzmann GM, Imhoff AB, Plank C, Gansbacher B, Martinek V.
Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects.
Osteoarthritis Cartilage. 2004 Sep;12(9):711-9.
- Vailas AC, Zernicke RF, Matsuda J, Curwin S, Durivage J.
Adaption of rat knee meniscus to prolonged exercise.
J Appl Physiol. 1986;60:1031-4.
- Van Kampen GPJ, Veldhuijzen JP, Kuijjer R, van de Stadt RJ, Schipper CA.
Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte culture.
Arthritis Rheum. 1985;28:419-24.
- Veldhuijzen JP, Huisman AH, Vermeiden JPW, Prah-Andersen B.
The growth of cartilage cells in vitro and effect of intermittent compressive force. A histological evaluation.
Connect Tissue Res. 1987;16:187-96.
- Veltri DM, Warren RF, Wickiewicz TL, O'Brien SJ.
Current status of allograft meniscal transplantation.
Clin Orthop. 1994 Jun;(303):44-55. Review.
- Verdonk R.
Meniscal transplantation.
Acta Orthop Belg. 2002 Apr;68(2):118-27. Review.
- Voloshin AS, Wosk J.
Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study.
J Biomed Eng. 1983;5(2):157-61.
- Walker PS, Erkman MJ.
The role of the menisci in force transmission across the knee.
Clin Orthop. 1975;109:184-92.

- Webber RJ.
Effect of TGF- β on canine meniscal fibrochondrocytes in cell and organ culture.
Trans Orthop Res. 1990;15:217.
- Webber RJ.
In vitro culture of meniscal tissue.
Clin Orthop. 1990 Mar;252:114-20. Review.
- Webber RJ, Harris MG, Hough AJ Jr..
Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate.
J Orthop Res. 1985;3(1):36-42.
- Webber RJ, Hough AJ Jr..
Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes II. Sulfated proteoglycan synthesis.
Biochimie. 1988 Feb;70(2):193-204.
- Webber RJ, Norby DP, Malemud CJ, Goldberg VM, Moskowitz RW.
Characterization of newly synthesized proteoglycans from rabbit menisci in organ culture.
Biochem J. 1984;221:875-84.
- Webber RJ, York JL, Vanderschilden JL, Hough AJ Jr..
An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus.
Am J Sports Med. 1989;17:393-400.
- Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ Jr..
In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex.
Arthritis Rheum. 1986 Aug;29(8):1010-6.
- Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ Jr..
Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response.
J Orthop Res. 1988;6(1):13-23.
- Williams SNO, Callies RM, Brindle KM.
Mapping of oxygen tension and cell distribution in a hollow-fiber bioreactor using magnetic resonance imaging.
Biotechnol Bioeng. 1997;56(1):56-61.

Wilson AS, Legg PG, McNeur JC.

Studies on the innervation of the medial meniscus in the human knee joint.
Anatomical Record. 1969;165:485-91.

Wirth CJ, Milachowski KA, Weismeier K.

Meniscus transplantation in animal experiments and initial clinical results.
Z Orthop. 1986;124:508-12.

Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, Weismeier KG, Kohn D.

Long-term results of meniscal allograft transplantation.
Am J Sports Med. 2002 Mar-Apr;30(2):174-81.

Woo SL-Y, Mow VC, Lai WM.

Biomechanical properties of articular cartilage.
In : "Handbook of Bioengineering", Ed. Skalak R, Chien S.
McGraw-Hill, New York, 1987:pp. 4.1-4.41.

Yasui K.

Three dimensional architecture of normal human menisci.
J Jpn Orthop Assoc. 1978;52:391-9.

Yoldas EA, Dowdy PA, Irrgang JJ, Fu FH, Harner CD.

Arthroscopically assisted meniscal transplantation using nonirradiated fresh frozen menisci.

Presented at the 65th annual meeting American Academy of Orthopaedic Surgeons,
Mar 19-23, 1998, New Orleans, Louisiana.

Zhang Z, Arnold JA, Williams T, McCann B.

Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats.

Am J Sports Med. 1995 Jan-Feb;23(1):35-41.

Zhang ZN, Tu KY, Xu YK, Zhang WM, Liu ZT, Ou SH.

Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination.

Arthroscopy. 1988;4(3):151-9.

Anhang

Dankvermerk

Herrn Prof. Dr. A: Imhoff danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Betreuung.

Herrn PD Dr. V. Martinek danke ich für die Betreuung der Arbeit und dass ich ihm jederzeit Fragen stellen konnte.

Herrn Dr. P. Ueblacker danke ich für die gute Einarbeitung und Betreuung und dafür, dass er immer Zeit für meine Fragen gefunden hat und jederzeit sehr hilfsbereit war.

Herrn Prof. Dr. B. Gänsbacher danke ich für die Unterstützung während der Versuche und die Möglichkeit, seine Laborräume nutzen zu dürfen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Onkologie danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung im Rahmen der Versuche, ebenso den beteiligten Veterinärmedizinern und Tierpflegern für die Pflege der Tiere.

Frau Dr. Specht danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der Histologien.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. K. Bräun und den Mitarbeitern der Abteilung für Biomechanik der Sportorthopädie für ihre Hilfe danken.

Ich möchte mich schließlich noch bei allen bedanken, die mir geholfen haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

Meinen Eltern und meinem Bruder Christian möchte ich dafür danken, dass sie stets für mich da sind und ich mich in jeder Situation auf sie verlassen kann.