

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
LEITER: PROF. DR. M. Nerlich  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und einer porösen  
Polyurethanmatrix zur Reparatur von Meniskusläsionen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Felix Paul Achatz

2016



AUS DER ABTEILUNG  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
LEITER: PROF. DR. M. Nerlich  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und einer porösen  
Polyurethanmatrix zur Reparatur von Meniskusläsionen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Felix Paul Achatz

2016

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Johannes Zellner

2. Berichterstatter:

PD Dr. Stefan Brunner

Tag der mündlichen Prüfung:

18.01.2017

Meiner Familie

Wesentliche Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

*Materials* 2016, 9(4), 276; doi:10.3390/ma9040276

***In Vitro Testing of Scaffolds for Mesenchymal Stem Cell-Based Meniscus Tissue Engineering—Introducing a New Biocompatibility Scoring System***

**Felix P. Achatz**, Richard Kujat, Christian G. Pfeifer, Matthias Koch, Michael Nerlich, Peter Angele and Johannes Zellner

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Der humane Meniskus – Anatomie, Funktion und Biomechanik .....	7
1.2	Besonderheiten des Kaninchenmeniskus .....	10
1.3	Meniskuläsionen – Ätiologie und Klassifikation .....	11
1.4	Therapie von Meniskuläsionen.....	12
1.5	Einsatz von Tissue Engineering zur Regeneration von Meniskusdefekten .....	14
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material .....	21
2.1.1	Verbrauchsmaterial und Geräte .....	21
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.3	Antikörper .....	24
2.1.4	Kits .....	25
2.1.5	Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren.....	25
2.1.6	Adhäsions- und Wachstumsfaktoren .....	26
2.1.7	Puffer und Lösungen .....	27
2.1.8	Medikamente.....	29
2.1.9	Versuchstiere.....	29
2.1.10	Biomaterial (Scaffolds) .....	29
2.1.11	Software .....	31
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Zuschneiden und Sterilisation der Scaffolds.....	31
2.2.2	Zellkultur allgemein und in vitro Differenzierungen .....	32
2.2.3	Histologie .....	34
2.2.4	Beladen der Scaffolds mit Zellen/Medium mittels Vakuum .....	37
2.2.5	In vitro Testung von verschiedenen Scaffolds für die Meniskusregeneration mit mesenchymalen Stammzellen .....	38
2.2.6	In vitro Analyse der Eignung eines Actifit®-Scaffolds für Tierversuche am Neuseelandhasen .....	43
2.2.7	In vivo Analyse: Regeneration von gemischt vaskulär-avaskulären Defekten des Meniskus lateralis im Tiermodell .....	44
3	Ergebnisse .....	50
3.1	In vitro Testung von verschiedenen Scaffolds für die Meniskusregeneration mit mesenchymalen Stammzellen .....	50
3.1.1	Actifit® .....	50
3.1.2	Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds .....	52
3.1.3	Poröser Polyurethanschaum mit Kollagenfasern .....	54
3.1.4	Scoring .....	56
3.2	In vitro Analyse der Eignung eines Actifit®-Scaffolds für Tierversuche am Neuseelandhasen .....	57
3.2.1	Mit Chondrozyten befüllte Scaffolds .....	58
3.2.2	Mit mesenchymalen Stammzellen befüllte Scaffolds .....	59

3.3	In vivo Analyse: Regeneration von gemischt vaskulär-avaskulären Defekten des lateralen Meniskus im Tiermodell .....	61
3.3.1	Ergebnisse der Meniskusreparatur nach 6 Wochen .....	61
3.3.2	Ergebnisse der Meniskusreparatur nach 12 Wochen .....	66
3.3.3	Scoring .....	72
3.3.4	Spezielle Betrachtung des Proteoglykangehalts im Reparaturgewebe .....	74
3.3.5	Spezielle Betrachtung der Integration des Reparaturgewebes in den nativen Meniskus .....	75
3.3.6	Spezielle Betrachtung der Gefäßarchitektur .....	76
4	Diskussion .....	77
5	Zusammenfassung .....	94
6	Literaturverzeichnis .....	95
7	Anhang .....	103
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	103
7.2	Tabellenverzeichnis .....	110
7.3	Lebenslauf .....	111
7.4	Danksagung .....	112
7.5	Eidesstattliche Erklärung .....	113

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin
CD31	Cluster of Differentiation 31
CMI®	Collagen Meniscus Implant®
DAB	Diaminobenzidin
DMMB	Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green fluorescent protein
HCl	Chlorwasserstoff, in H <sub>2</sub> O gelöst, Salzsäure
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenit
M	Molar (mol/L)
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
TGF	Transforming Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 1 Einleitung

Noch immer stellen vor allem komplexe und großflächige traumatische Meniskusläsionen eine der größten ungelösten Herausforderungen der Traumatologie dar. Dem Anspruch, eine sowohl anatomisch als auch funktionell vollständige Reparatur des Meniskus zu erreichen, kann die Chirurgie derzeit oftmals nicht gerecht werden. [1] Mit Naht, Klammern und Ankern kann der Meniskus zwar prinzipiell erhalten werden, doch diese Form der Therapie stößt bei komplexeren größeren Läsionen des Meniskus an ihre Grenzen. [2] Üblicherweise muss dann eine partielle Meniskektomie durchgeführt werden.

Schon 1923 wurde von McNeill Love vermutet, dass der Verlust des Meniskus zu sekundärer Osteoarthritis führen kann. [3] Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass ein Fehlen des Meniskus eine Prädisposition für osteoarthrotische Veränderungen darstellt. [3–6]

So führt eine totale Meniskektomie zu einer 132-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit der Notwendigkeit eines kompletten Knieersatzes [7].

Pathophysiologisch scheint der Verlust der Pufferfunktion des Meniskus ausschlaggebend für degenerative Veränderungen zu sein. Weil die Kontaktfläche der Gelenkoberflächen kleiner wird, steigt der Kontaktdruck der Gelenkoberflächen um ein Vielfaches. [8]

Doch auch eine lediglich partielle Meniskektomie verändert die herrschenden Kräfte im Gelenk dramatisch [9], was auch hier zu osteoarthrotischen Veränderungen führt.

Zwei unterschiedliche Kollektive machen die wohl auch in Zukunft wachsende Anzahl von Meniskusverletzungen und die volkswirtschaftliche Bedeutung plausibel. Zum einen ist bei jungen und sportlich aktiven Menschen das Knie das verletzungsanfälligste Gelenk, wobei bei 15 % dieser Knieverletzungen der Meniskus beteiligt ist. [9] Ein großflächiger Meniskusverlust beim jungen Menschen führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer Arthrose. Zum anderen führt der demographische Wandel der westlichen Bevölkerung dazu, dass immer mehr alte Menschen auch im fortgeschrittenen Alter noch einen aktiven Lebensstil führen können und wollen. [9] Bedenkt man, dass bei 60-jährigen die Wahrscheinlichkeit einer Meniskusruptur im Vergleich zu 20-jährigen 4-fach erhöht ist [10], wird klar, dass eine adäquate Therapie dieser Verletzungen dringend benötigt wird.

Tissue Engineering mit zellbesiedelten Scaffolds zählt dabei zu den innovativsten Therapiekonzepten bei Meniskusverletzungen und scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein.

## **1.1 Der humane Meniskus – Anatomie, Funktion und Biomechanik**

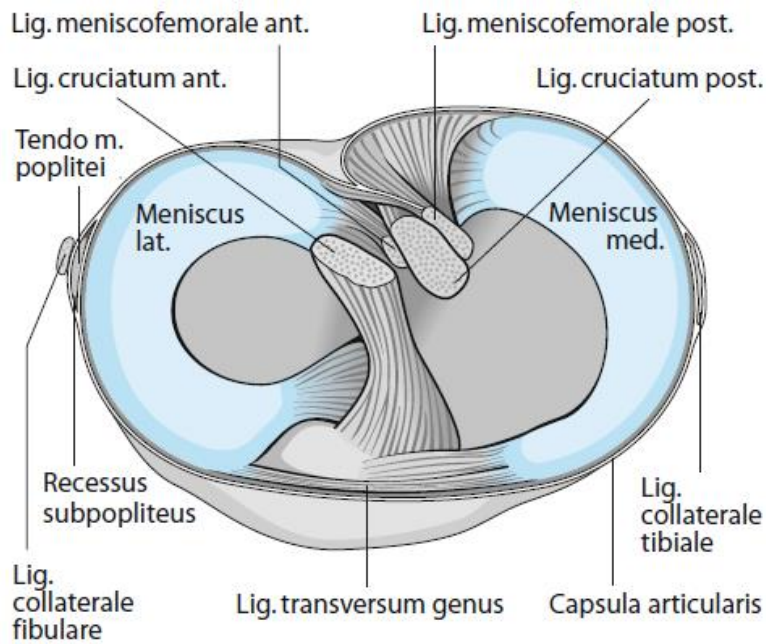
Die Menisken des Kniegelenks sind keilförmige Faserknorpelscheiben, die in der Aufsicht halbmondförmig imponieren. Die lateinische Bezeichnung „Meniscus“ bedeutet eben „Halbmond“. Man unterscheidet den nahezu ringförmigen Meniscus lateralis vom sichel- oder C-förmigen Meniscus medialis. [11] Beide liegen dem Tibiaplateau auf (Abbildung 1.1). Prinzipiell unterteilt man beide Menisken jeweils in Vorderhorn, Pars intermedia und Hinterhorn. Der periphere Teil des Meniskus, die Basis, ist etwa 1,5 cm hoch. [8] Zur Gelenkmitte läuft der Meniskus spitz zu.

Die zur Tibia gerichtete Unterseite des Meniskus ist flach, während die zum Femur gerichtete Oberfläche konkav imponiert. Somit wird die Inkongruenz des Kniegelenks, welche auch durch die konvexen Femurkondylen verursacht wird, teilweise kompensiert. Die Menisken tragen im Kniegelenk den Hauptteil der Last, da die Femurkondylen nur im Zentrum des Gelenks auf dem Tibiaplateau aufliegen, im Randbereich lagern die Kondylen auf den Menisken.

Bei Flexion im Kniegelenk verlagern sich die Menisken nach posterior, bei Extension nach anterior. [11] Das Vorderhorn des Innenmeniskus ist nahe der Fossa intercondylaris anterior vor der Insertion des vorderen Kreuzbandes am Tibiaplateau befestigt, das Hinterhorn in der Fossa intercondylaris posterior zwischen Außenmeniskus und Insertion des hinteren Kreuzbandes. [12] Faserzüge der fächerförmigen Befestigung des Vorderhorns sind mit dem vorderen Kreuzband verwachsen. [13] Außerdem ist die Pars intermedia über Faserzüge im Ligamentum collaterale mediale verankert.

Der Außenmeniskus ist dagegen nicht mit dem Ligamentum collaterale laterale verbunden. Das Vorderhorn des Außenmeniskus ist anterior der Eminentia intercondylaris angrenzend zur Insertion des vorderen Kreuzbandes an der Tibia befestigt. [12] Das Hinterhorn des Außenmeniskus inseriert direkt vor der der Ansatzstelle des Hinterhorns des Innenmeniskus. [13] Zusätzlich existieren mit den Humphrey- und Wrisberg-Ligamenten variabel ausgebildete Verbindungen zum Femur, wobei zumindest eines der beiden Bänder in über 90 % der Fälle vorhanden ist. [14]

## Einleitung

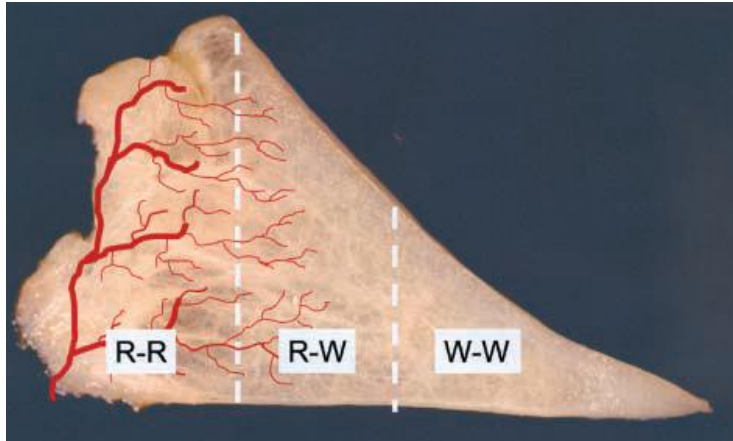


**Abbildung 1.1: Aufsicht auf rechtes Tibiaplateau (aus: Weigel B, Nerlich M. Praxisbuch Unfallchirurgie. Berlin: Springer, 2011: S. 588).**

Insgesamt bedeckt der Außenmeniskus einen größeren Teil der Gelenkfläche als der Innenmeniskus.

Bei Innen- und Außenmeniskus ist die Basis an der Gelenkkapsel befestigt. Untereinander sind sie an den Vorderhörnern über das variabel angelegte Ligamentum transversum genus verbunden. [15] Die Blutversorgung der Menisken erfolgt durch Äste der Aa. Articularis inferiores, medialis und lateralis, welche wiederum aus der A. poplitea

stammen. [11] Ein Kapillarnetz geht in der Synovia und den Kapselstrukturen aus diesen Arterien hervor und erstreckt sich an den peripheren Meniskusanteilen. [16] Nur 10-30 % des medialen und 10–25 % des lateralen Meniskus werden so direkt durch Gefäße versorgt. [16,17] Dabei finden sich die Gefäße nur im basisnahen Anteil der Menisken, während im zentralen, avaskulären Bereich des Meniskus die Versorgung durch Diffusion der Synovialflüssigkeit erfolgt (Abbildung 1.2). Vorder- und Hinterhorn sind stärker vaskularisiert als die Pars intermedia. [18–20]



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des Meniskus. Kapselnah liegt die gut durchblutete rot-rote Zone (R-R). Zur Gelenkmitte liegt die kaum durchblutete weiß-weiße Zone (W-W). Dazwischen findet sich die rot-weiße Zone (R-W). (aus: Fink, C. (2001): Meniskusrefixation - Anatomische und biologische Grundlagen. In: Arthroskopie 14 (4), S. 248–253)**

Zu etwa 78 % besteht der Meniskus aus Wasser. Die Trockenmasse wird zu 75 % aus Kollagen gebildet, vor allem aus Kollagen I. Es finden sich aber auch Kollagene vom Typ II, III, IV und VI. [1] Elektronenmikroskopisch zeigt sich oberflächlich eine parallel zur Oberfläche ungeordnete, ansonsten überwiegend eine zirkuläre Verlaufsrichtung der dichten Kollagenfibrillen. [17] In geringerer Zahl finden sich einzelne radiäre Fasern. [12] Zwischen den Kollagenfasern liegen einzelne Fibrochondrozyten [21] oder kleine isogene Knorpelzellgruppen. [8]

Vereinzelte Fibroblasten und Mastzellen sind in geringerem Maße vorhanden. [21]

Menisken enthalten vor allem in den Hörnern freie Nervenendigungen und Mechanorezeptoren, [22,23] Nervenfasern finden sich aber im gesamten Meniskus mit Ausnahme des mittleren Drittels. Die Innervation des Meniskus erfüllt vermutlich wichtige Aufgaben im Rahmen der Propriozeption [15] und der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gewebe. [24]

Die makroskopische und mikroskopische Anatomie der Menisken spiegelt sich in ihren zahlreichen biomechanischen Funktionen wider. [12] Bei folgenden Aufgaben übernehmen die Menisken wichtige Funktionen im Kniegelenk: Kraftverteilung [25–28], Schockabsorption [27,29–31], Stabilität [29,32–34], Nährstoffversorgung [35,36], Lubrikation [37] und Propriozeption [38,39]. Außerdem erhöhen sie die Kontaktfläche im Knie [40].

Auf das Kniegelenk einwirkende Kräfte werden durch Gelenkknorpel und die Menisken gedämpft. [28] Dabei erhöht der Meniskus die Kongruenz der Gelenkflächen und sorgt so für eine bessere Verteilung der Kontaktdrücke, was den Gelenkknorpel vor zu hohen Belastungen schützt. [28] Zudem werden axiale Kräfte in Ringspannung umgewandelt. [8,17] Innen- und Außenmeniskus nehmen bis zu 70 % der im Kniegelenk herrschenden Drücke auf. [5]

Die konkave Oberseite der Menisken verbessert die Interaktion der Gelenkflächen und stabilisiert somit das Kniegelenk. [12] Die Verschiebbarkeit der Menisken lässt auch in Flexion eine stabile Belastung des Gelenks zu. [5] Bei Fehlen des vorderen Kreuzbandes, aber auch im

## Einleitung

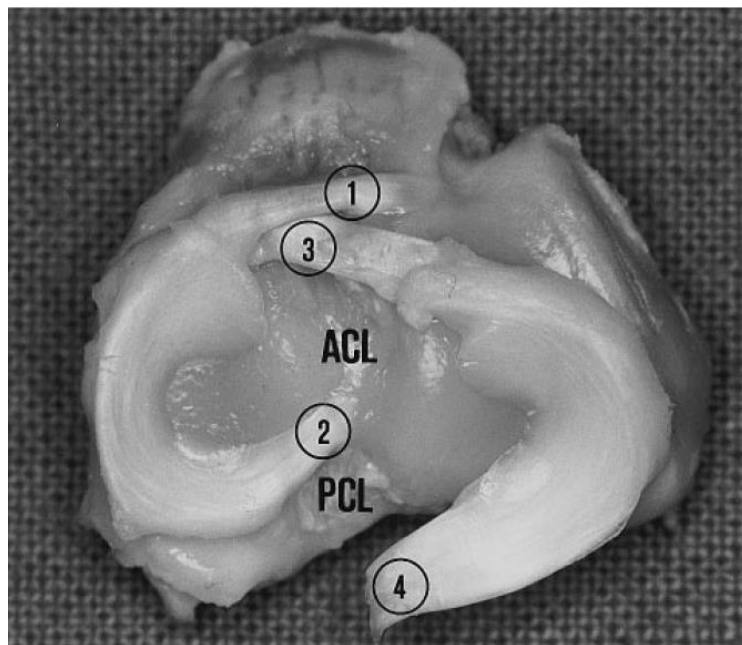
normalen Knie, begrenzen die Menisken überschießende Bewegungen der Gelenkflächen in alle Richtungen. [12,41]

Belastungen auf das Knie, wie sie zum Beispiel beim Gehen vorkommen, werden durch Verformung der Menisken abgemildert. Die viskoelastischen Eigenschaften des intakten Meniskus erhöhen die Schockabsorptionskapazität des Gelenks. [30]

Durch Mitgleiten der Menisken bei Flexion und Extension wird Synovialflüssigkeit im Gelenk verteilt und somit die Gleitfähigkeit erhöht. [8]

### 1.2 Besonderheiten des Kaninchenmeniskus

Prinzipiell ist der Kaninchenmeniskus dem menschlichen sehr ähnlich [42], dennoch gibt es einige Unterschiede. So findet sich in der Pars intermedia des Kaninchenmeniskus überwiegend Kollagen II, dessen Gehalt zur Meniskusspitze hin zunimmt. [43] Dabei nimmt der relative Gehalt an Kollagen II im Laufe des Lebens zu. Kollagen I findet sich vor allem in der Nähe der Basis. [44]



**Abbildung 1.3: Aufsicht auf rechtes Kaninchtibia-plateau. 1. Vorderes Insertionsband des Innenmeniskus. 2. Hinteres Insertionsband des Innenmeniskus 3. Vorderes Insertionsband des Außenmeniskus. 4. Hinteres Insertionsband des Außenmeniskus, welches nur am Femur befestigt ist. (aus Messner, Karola; Gao, Jizong (1998): The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. In: J Anatomy 193 (2), S. 161–178)**

## Einleitung

Beim Kaninchenmeniskus finden sich zentral vor allem Zellen, die Chondrozyten ähneln. Dagegen sind in den peripheren Anteilen des Kaninchenmeniskus hauptsächlich Zellen, die eher Fibrozyten gleichen. [15]

Auch makroskopisch lassen sich Unterschiede feststellen (Abbildung 1.3). Beim Kaninchen fehlt das Ligamentum transversum. [45] Die Insertionsbänder der Vorderhörner der Kaninchenmenisken sind im Vergleich zum Menschen auffällig lang. [43]

Das Hinterhorn des Kaninchenaußenmeniskus besitzt keine Verbindungsfasern zum Tibiaplateau, es ist lediglich über ein Insertionsband am Femur fixiert. [15] Trotz dieser Unterschiede zum humanen Meniskus ist das Kaninchen aufgrund der überwiegenden Ähnlichkeit der anatomischen Situation, als adäquates Modell zur Analyse von Meniskusbehandlungen geeignet. [2,42,46]

### **1.3 Meniskuläsionen – Ätiologie und Klassifikation**

Zunächst muss zwischen degenerativen und traumatischen Läsionen unterschieden werden. Während degenerative Läsionen auch spontan, also bei normalen Bewegungen, oder durch ein Bagatelltrauma verursacht werden können, bedarf es für eine frische Meniskusruptur einer großen Krafteinwirkung. [5,28]

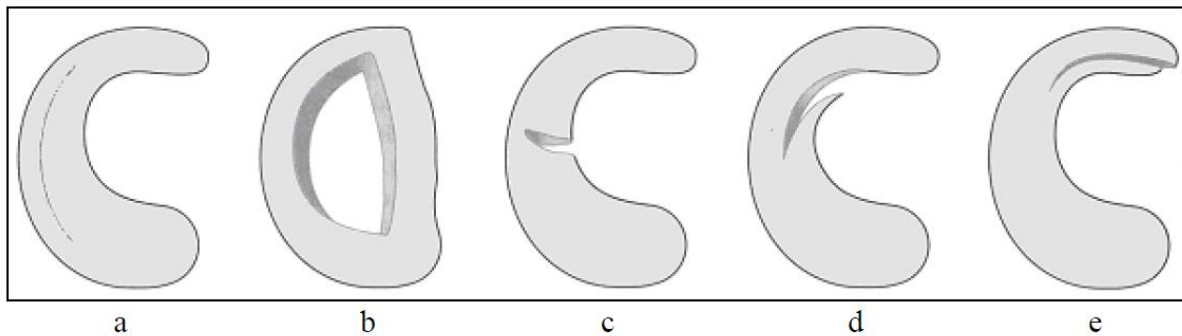
Indirekt traumatische Meniskuläsionen treten häufig nach kombinierten Flexions- und Rotationsbewegungen auf, wobei das Risiko dafür bei Kontaktsportarten wie Fußball deutlich erhöht ist. [5] Dabei ist der mediale Meniskus etwa doppelt so häufig wie der Außenmeniskus betroffen. [47] Ursächlich ist die Fixierung des Innenmeniskus am medialen Kollateralband, während der Außenmeniskus nicht mit dem lateralen Kollateralband verbunden ist. [13]

Aufgrund der relativ geschützten Lage der Menisken sind direkt traumatische Läsionen durch ein äußeres Trauma eher selten. [5] Bei Tibiakopffrakturen ist jedoch in mehr als der Hälfte der Fälle ebenfalls eine Meniskusverletzung vorhanden. [48]

Symptome der Meniskusverletzung können, unter anderem, Kniegelenksschmerzen, Bewegungseinschränkungen, Gelenkblockaden und, nach einigen Tagen, ein durch eine Synovialitis verursachter Kniegelenkserguss sein.

Häufig kann die Diagnose schon durch klinische Tests gestellt werden. Aufgrund ihres hohen Weichteilkontrasts ist die Kernspintomographie die nicht-invasive Bildgebung der Wahl.

Man kann die Meniskuläsionen bezüglich ihrer Form einteilen (Abbildung 1.4). Dies geschieht nach der Klassifikation nach Trillat. [49] Dabei unterscheidet man einen Längsriss, Korbhenkelriss, Radiärriss, Querriss, Horizontalriss und Lappenriss. [50]



**Abbildung 1.4 Morphologie der Meniskusrissen: a: Längsriss, b: Korbhenkelriss, c: Radiärriss, d: Querriss, e: Horizontalriss (aus: Weigel B, Nerlich M. Praxisbuch Unfallchirurgie. Berlin: Springer, 2005, S. 600)**

Daneben existieren weitere Klassifikationen, beispielsweise die Klassifikation nach Reicher et al., welche die Meniskusrissen anhand des MRT-Befundes in Grad 0 – III einteilt und sich auf Veränderungen im Meniskus und deren Bezug zur Oberfläche bezieht. [5]

#### **1.4 Therapie von Meniskusrissen**

Eine konservative Therapie von Meniskusrissen ist nur in Ausnahmefällen bei stabilen, basisnahen Rissen möglich. Zur seltenen Spontanheilung kommt es am ehesten, wenn bei bestimmten Rissformen eine gleichzeitige Bandverletzung zu einem Hämarthros führt. Der genaue Mechanismus hinter dieser Heilung ist noch nicht aufgeklärt. [28] Für behandlungsbedürftige Meniskusrissen ist die arthroskopische Therapie Goldstandard. [5] Primär sollte versucht werden eine Refixation des Meniskus anzustreben, dies ist jedoch nur bei frischen kapselnahen Rissen in der rot-roten, oder rot-weißen Zone möglich. [21] Auch darf der Meniskus für eine erfolgversprechende Refixation keine wesentlichen Degenerationserscheinungen zeigen. Somit eignet sie sich vor allem für jüngere Patienten. [5] Nachteil einer Meniskusrefixationstherapie ist die im Vergleich zur partiellen Meniskektomie deutlich längere Rehabilitationszeit. Die Patienten dürfen sich erst nach 6 Monaten wieder voll sportlich betätigen. [5]

Um die Erfolgchancen einer Refixation im bradytrophem Meniskusgewebe zu erhöhen, gibt es verschiedene Optionen, die vor der Refixation durchgeführt werden können: das Anfrischen, das Needling, die perimeniskale Synovektomie und der Blutpatch. [51]

Für die Refixation eignen sich drei verschiedene Nahttechniken, wobei meist resorbierbares Nahtmaterial mit der Stärke 2-0 verwendet wird. [51] Die Outside-in-Naht und die Inside-out-Naht eignen sich für Rissen im Vorderhorn und in der Pars intermedia. Die All-inside-Naht wird vor allem bei Hinterhornrissen angewendet.

## Einleitung

Starre Implantate für die Meniskusrefixation, z.B. Pfeile oder Klammern, die sowohl resorbierbar als auch permanent sein können, sind in die Kritik geraten, weil sie zu Knorpelschäden und Reizung der Synovia führen können. [28]

In der Literatur schwanken die angegebenen Heilungsraten der Meniskusfixationstherapie zwischen 50 % und 90 %. [28] Diese große Schwankung liegt wohl daran, dass die Heilung nur durch eine Rearthroskopie wirklich aussagekräftig beurteilt werden kann und diese nur selten durchgeführt wird. [28][28] Eine aktuelle Übersichtsarbeit von Nepple et al. [52] zeigt demgegenüber eine relativ konstante Rate von Therapieversagen nach offener oder arthroskopischer Meniskusreparatur in bis zu 24 % der Fälle.

Obwohl man mittlerweile bemüht ist, soviel Meniskusgewebe wie möglich zu erhalten, muss man bei nicht reparablen Läsionen noch immer zur partiellen Meniskektomie greifen, wobei hier der Augenmerk eindeutig auf der Erreichung der subjektiven Beschwerdefreiheit des Patienten liegt. Nötig wird die partielle Meniskektomie vor allem dann, wenn die Läsion im zentralen, avaskulären Bereich liegt, eine komplexe Läsion vorliegt, oder der Meniskus degenerativ vorgeschädigt ist. [5]

Um die biomechanische Funktion des Meniskus möglichst zu erhalten, sollte eine stabile Randleiste belassen werden, was aber nicht immer möglich ist. Schon die bloße partielle Meniskektomie stellt einen großen Eingriff in die Biomechanik des Knies dar [16]. Wird auch noch die Kontinuität des Rings unterbrochen, führt dies zu einem noch um ein Vielfaches größeren Funktionsverlust, denn durch die Durchtrennung der Meniskusbasis ist eine Umwandlung der Kompressionskräfte in eine Ringspannung nicht mehr möglich, was biomechanisch einer Meniskektomie gleichzusetzen ist. [5]

Es gilt so viel verletztes Meniskusgewebe wie nötig, aber so wenig wie möglich zu entfernen. In klinischen Studien zeigten nach 8 -16 Jahren 20 – 60 % der Patienten mit partieller Meniskektomie radiologische Veränderungen im Sinne einer Osteoarthrose. [53]

Durch die veränderten Kräfteverhältnisse und daraus resultierenden Knorpelschäden im Kniegelenk nach partieller Meniskektomie steigt das Risiko für die frühzeitige Entwicklung einer Osteoarthrose. [16,21,53–55] Dabei sind die Veränderungen in der Biomechanik proportional zur Menge an reseziertem Meniskusgewebe. [56]

Allogene Meniskustransplantationen brachten in klinischen Studien signifikante Besserung der Beschwerden und der Funktion [57], aber ein chondroprotektiver Effekt ist noch ungewiss. [57,58] Die Allografts bergen einige Nachteile. Einerseits kommt es häufig zu beträchtlicher Implantatschrumpfung [59] und auch immunologische Abstoßungsreaktionen [28,60,61]

können vorkommen, andererseits besteht die Gefahr von Infektionsübertragungen. [62,63]  
Zudem sind die Allografts in Deutschland schlecht verfügbar. [8,54]

### **1.5 Einsatz von Tissue Engineering zur Regeneration von Meniskusdefekten**

Wie der Name schon impliziert, bezeichnet Tissue Engineering die Kombination aus biomedizinischer und ingenieurwissenschaftlicher Forschung. Per definitionem bedient sich das Tissue Engineering dreier Komponenten, nämlich: Scaffolds (auch als Matrix bezeichnet), Zellen (differenziert oder undifferenziert) und biologisch aktiver Substanzen oder Wachstumsfaktoren. [64] Diese drei Komponenten können in Kombination, oder auch einzeln in den verletzten Bereich implantiert werden. [64] Die verwendeten Zellen sind im Bereich der Meniskusreparatur vor allem mesenchymale Stammzellen oder Meniskuszellen (Fibrochondrozyten). [55]

Prinzipiell gibt es zwei Hauptansätze des Tissue Engineerings. Entweder man implantiert ein azelluläres Konstrukt in welches dann aus der Peripherie Zellen einwandern sollen, oder aber man besetzt ein Konstrukt in vitro mit Zellen und anschließend soll dieses zellbesiedelte Konstrukt in vivo reifen.

Wie oben beschrieben, zeigen basisnahe Defekte zumindest eine gewisse Heilungstendenz. Der Grund dafür ist wohl die Gefäßversorgung. Im avaskulären Bereich findet keine Heilung statt, während in vaskularisierten Bereichen die Heilung möglich ist. [18] Man vermutet, dass die Basis für diese Heilung möglicherweise die Einwanderung von putativen Reparaturzellen, nämlich mesenchymalen Stammzellen aus der Synovia oder dem Gefäßsystem ist. [18,65,66] Diese wiederum benötigen aber ein bestimmtes Milieu, um erfolgreich meniskustypische Matrix bilden zu können. [67,68] Dieses Milieu scheint vor allem im avaskulären Bereich des Meniskus nicht gegeben zu sein. In experimentellen Studien wurde mit verschiedenen Autografts versucht, dieses Problem zu lösen, jedoch mit begrenztem Erfolg. [55]

Die Implantation eines Hoffaschen Fettkörpers in einen Meniskusdefekt erwies sich als ebenso ungeeignet [69] wie die Implantation von Periost. [70] Der Einsatz von Perichondrium zeigte zwar etwas bessere Ergebnisse, als die bloße Meniskektomie, doch konnten die Eigenschaften von Meniskusgewebe nicht erreicht werden. [71] In zwei klinischen Studien erwies sich der Einsatz von semimembranösen Sehnen in Meniskusdefekten als wirkungslos. [72,73] Zwar führte die in vitro Zellkultur von Meniskuszellen mit platelet-rich Plasma zu einer verstärkten Proliferation der Meniskuszellen, [74] jedoch wurde von Zellner et al. beim Einsatz eines Scaffolds zusammen mit platelet-rich Plasma in einem in vivo Tierversuch keine signifikante Verbesserung beobachtet. [4]

## Einleitung

Dagegen wurde mit Hilfe eines gestielten Synoviaumschlags in einer in vivo Studie mit New Zealand White Rabbits in 75 % der Fälle eine Heilung von Läsionen im avaskulären Bereich erreicht. [73] Offen bleibt jedoch, ob dieser experimentell vielversprechende Ansatz klinisch umsetzbar ist. Es ist mittlerweile bekannt, dass in der Synovia Schmerzfasern zu finden sind, die unter anderem bei mechanischer Reizung aktiviert werden. [75] Somit ist es gut vorstellbar, dass der Einsatz eines gestielten Synoviaumschlags schmerzhaft sein könnte.

Pittenger et al. [76] wiesen nach, dass pluripotente mesenchymale Stammzellen aus dem Beckenkamm chondrogen differenzieren können. Brachte man aber lediglich mesenchymale Stammzellen oder ein Knochenmarkaspirat in das Kniegelenk ein, zeigten sich zwar einzelne Bereiche der Heilung des defekten Meniskus, aber gleichzeitig wurden Narbengewebe und freies Gewebe im Gelenk gebildet. [55,77]

In vielen klinischen Studien wurde und wird momentan der Einsatz von azellulären Scaffolds untersucht. [64] Dagegen geht bei präklinischen Studien der Trend klar zur Verbesserung der Funktion von Scaffolds mittels Einsatz von Zellen oder Wachstumsfaktoren. [64] Prinzipiell unterscheidet man zwischen resorbierbaren und nicht-resorbierbaren Scaffold-Materialien. Während die resorbierbaren Materialien mit der Zeit abgebaut werden und so Platz für körpereigenes Reparaturgewebe machen sollen, sollen die nicht-resorbierbaren Materialien dauerhaft die Funktion des Meniskus übernehmen.

Mit nicht-resorbierbaren Materialien wie Teflon, Polyvinylalkohol-hydrogel und Dacron als komplettem Meniskusersatz konnte experimentell in mehreren Studien der Verlust von Gelenkknorpel nicht verhindert werden. [78]

Nachdem Nusurface®, ein nicht-anatomisches im Gelenk frei flottierendes Implantat aus Polycarbonat-Polyurethan für den kompletten medialen Meniskusersatz, in der Simulation am Kniemodell meniskusähnliche biomechanische Eigenschaften zeigte [79], wurde mit einer nicht-randomisierten klinischen Sicherheitsstudie mit dem Implantat begonnen. [78] Jedoch ist hier die Indikation eher bei älteren Menschen gegeben um als Spacer den Progress zur Osteoarthrose aufzuhalten.

Van Tienen et. al [78] arbeiten zurzeit an einem anatomisch geformten synthetischen Meniskusersatzmaterial aus einem thermoplastischen Elastomer, welches als Ersatz für schwer vorgeschädigte Menisken in Knien mit beginnender Osteoarthrose verwendet werden soll. Ein Tierversuch, der die Langzeitfunktion und das chondroprotektive Potenzial klären soll, ist angesetzt. [78]

Für den partiellen Meniskusersatz sind mit Actifit® und CMI® bereits zwei als sicher geltende Produkte im klinischen Einsatz. [80]

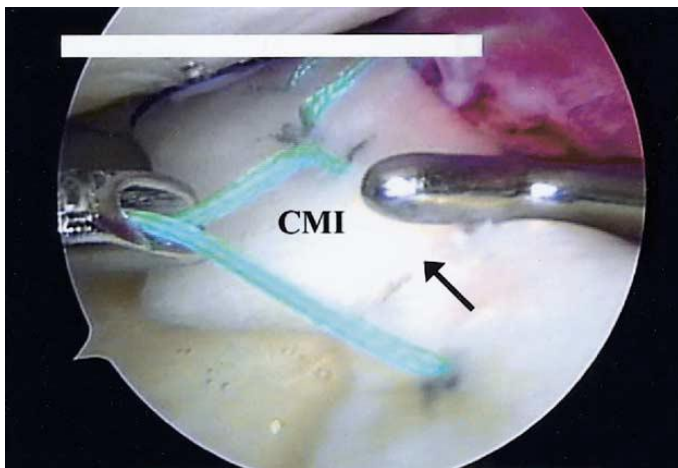
## Einleitung

CMI® (Abbildung 1.5) ist ein biologisches, resorbierbares Meniskusimplantat aus gereinigtem Kollagen I, welches aus Rinderachillessehnen gewonnen wird.

In präklinischen und klinischen Biopsien zeigte das Material ein Einwachsen von Faserknorpel-ähnlichem Gewebe. [81] Einige klinische Studien zeigten eine Verbesserung der Funktion und des klinischen Outcomes [82,83] und auch radiologisch gute Ergebnisse, jedoch wurden diese Studien von verschiedenen Autoren kritisiert, weil die Anzahl der Patienten gering war und es keine Vergleichsgruppe gab. [81,84]

Zaffagnini et al. [85] beobachteten in einer klinischen Studie nach 6 – 8 Jahren eine deutliche Verkleinerung des CMI®. Ein weiterer Nachteil ist die initial dem Meniskus unterlegene biomechanische Stabilität des Scaffolds, so dass es nur verwendet werden kann, wenn noch eine stabile Randleiste aus nativem Meniskus vorhanden ist. [81] Bemängelt wurde auch das schlechte intraoperative Handling. [86]

Trotzdem ist CMI® das Material, welches bereits am längsten im klinischen Einsatz ist. Es gilt als sicher und es scheint keine Schäden am Gelenkknorpel zu verursachen. [83,85,87,88]



**Abbildung 1.5 CMI®, das gerade angenäht wird und den Meniskusdefekt auffüllt. Der Pfeil kennzeichnet die Grenze zwischen dem Biomaterial und dem nativen Meniskus. (aus: Steadman, J. Richard; Rodkey, William G. (2005): Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results. In: Arthroscopy 21 (5), S. 515–525)**

Das andere im klinischen Einsatz befindliche Biomaterial ist Actifit® von der Firma Orteq (Abbildung 1.6).

Actifit® ist ein synthetisches Material bestehend aus Polycaprolacton und Polyurethan. Der Abbau beginnt mit Hydrolyse der Esterbindungen im Polycaprolacton, ein Prozess der wohl etwa 5 Jahre dauert. [89] Die stabileren Urethanssegmente werden letztendlich entweder phagozytiert oder in das umliegende Gewebe eingebaut. [90,91]

Im Vergleich zum nativen Meniskus haben Polyurethanscaffolds initial einen deutlich höheren Reibungskoeffizient.

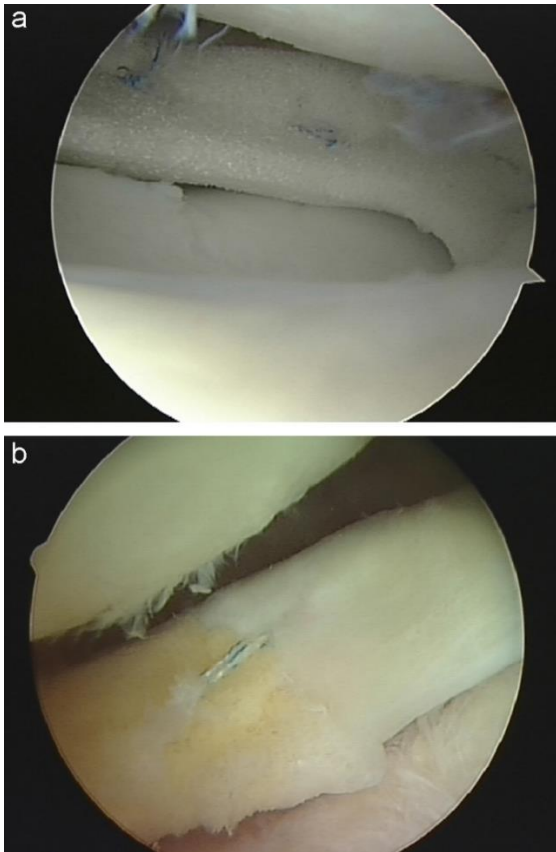
Dieser nähert sich aber durch Einwachsen von Gewebe in vivo dem Reibungskoeffizienten des nativen Meniskus an. [92]

Ein Vorteil des Biomaterials Actifit® ist, dass es bereits initial ohne eingewachsenes Gewebe mechanisch stabil ist und so die Biomechanik des Kniegelenks sofort verbessern kann. [93]

Außerdem wird es als robust und flexibel im intraoperativen Handling beschrieben. [86]

## Einleitung

Actifit® ist stark porös, 80 % des Scaffolds werden von interkonnektiven Poren eingenommen. [89] Maher et al. [94] konnten in einer präklinischen Studie an Schafen zeigen, dass das Material das Einwachsen von Gewebe fördert, ohne dabei Schaden am Gelenkknorpel zu verursachen.



**Abbildung 1.6 a: Arthroskopische Annäherung eines Actifit®-Scaffolds an den nativen Meniskus; b: Relook-Arthroskopie nach 24 Monaten. Man kann in das Biomaterial einwachsendes Gewebe erkennen. (Aus: Bouyarmane, H.; Beaufils, P.; Pujol, N.; Bellemans, J.; Roberts, S.; Spalding, T. et al. (2014): Polyurethane scaffold in lateral meniscus segmental defects: Clinical outcomes at 24months follow-up. In: Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 100 (1), S. 153–157)**

festgestellt werden. [98]

Verdonk et al. [89] konnten in einer klinischen Studie bei Patienten mit partiellem Meniskusersatz bereits nach 3 Monaten ein frühes Einwachsen von Gewebe in das Biomaterial feststellen. Zudem ergaben Biopsien Charakteristika des eingewachsenen Gewebes, die meniskusähnlich imponierten. Zwar war nach einem Jahr noch keine vollständig

In einer 2-Jahres-follow-up Studie an Hunden stellten Welsing et al. [95] eine gute Integration des Scaffolds in das umliegende Gewebe und fibrocartilaginäre Differenzierung des eingewachsenen Gewebes mit Bildung von Kollagen I fest. Zudem erwies sich das Material als gut verträglich und die Fremdkörperreaktion fiel auch in den schlechtesten Fällen nur sehr mild aus. Jedoch konnte das Biomaterial weder das Auftreten von Knorpelschäden verhindern, noch konnte Gewebe mit den typischen Meniskuseigenschaften gebildet werden. [95]

Actifit® wird aktuell zum Ersatz von partiellen Meniskusdefekten verwendet. Ursprünglich sollte es auch für den kompletten Meniskusersatz eingesetzt werden, doch es erwies sich im Tierversuch wegen fehlender mechanischer Stabilität als ungeeignet für diese Indikation. [9,96]

In einer 2-Jahres-follow-up Studie mit 26 Patienten, die ein Actifit®-Implantat zum partiellen Meniskusersatz erhalten hatten, ergab sich im Vergleich zum präoperativen Zustand eine signifikante Verbesserung der Klinik und der Funktion. [97] Klinische Verbesserung und Sicherheit des Implantats konnten auch in weiteren Studien

## Einleitung

meniskustypische Morphologie gegeben, [89] jedoch fehlen noch Langzeitergebnisse. Es gibt noch keine Studienergebnisse, welche über den relativ kurzen Zeitraum von 2 Jahren hinausgehen. Außerdem handelte es sich bei den Studien jeweils um single-arm Studien ohne Vergleichsgruppe. Trotzdem scheint der Einsatz einer zellfreien Actifit®-Matrix vielversprechend zu sein.

Durch intensive Biomaterialforschung konnte auch in der eigenen Abteilung ein vielversprechendes Biomaterial speziell für den Meniskusersatz entwickelt werden. Das Material ist eine poröse Hyaluronsäure-Gelatine-Matrix, die innerhalb von ungefähr zwei Wochen degradiert und ein gutes Milieu für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen schafft. [99] Angele et al. [100] erreichten mit einem mit mesenchymalen Stammzellen besetzten und 14 Tage vorkultivierten Hyaluronsäure-Gelatine-Scaffold die Reparatur eines kompletten Defekts der Pars intermedia im medialen Neuseelandhasenmeniskus. Meniskusähnliches Gewebe wurde gebildet und das Zell-Scaffold-Konstrukt wurde in den nativen Meniskus integriert. [100]

Weiter konnten Zellner et al. [2,4] in mehreren Tierversuchen zeigen, dass die Kombination aus mesenchymalen Stammzellen und einem Scaffold eine signifikant bessere Meniskusdefektreparatur als mit alleinigem Einsatz eines azellulären Scaffolds erreichen kann. Im Neuseelandhasen konnten zirkuläre Stanzdefekte von 2 mm Durchmesser im avaskulären Bereich mit einem nicht vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Scaffold repariert werden. Das Biomaterial wurde komplett in den nativen Meniskus integriert und es entstand meniskusähnliches Reparaturgewebe. [4]

Die eingesetzten mesenchymalen Stammzellen waren green fluorescent protein (GFP)-markiert und konnten nach 6 Wochen in vivo noch immer nachgewiesen werden. [4]

Ebenfalls im Neuseelandhasen konnte in 4 mm langen Rissdefekten im avaskulären Bereich des Meniskus mit einem 14 Tage lang mit mesenchymalen Stammzellen chondrogen vorkultivierten Hyaluronsäure-Gelatine-Scaffold meniskusähnliches Reparaturgewebe erzeugt werden. Bemerkenswerterweise wies dieses Reparaturgewebe eine meniskusähnliche mechanische Stabilität auf. [2]

Es lässt sich also die Vermutung aufstellen, dass mesenchymale Stammzellen bei der Reparatur von Meniskusdefekten im avaskulären Bereich eine wichtige Rolle spielen.

Untersuchungen, ob das Meniskusreparaturpotenzial der Polyurethanmatrix Actifit® durch die Besiedelung mit mesenchymalen Stammzellen verbessert werden kann wurden bisher nicht durchgeführt oder noch nicht publiziert.

Ebenso wurde bisher noch kein direkter in vitro Vergleich zwischen Actifit® und einer Hyaluronsäureester-Gelatine-Komposit-Matrix durchgeführt.

### **1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Trotz der gerade in den letzten Jahren intensiv durchgeführten Forschung und innovativen Therapiekonzepten konnte bisher noch keine optimale Therapie für kritisch große Meniskusdefekte etabliert werden, vor allem wenn diese im avaskulären Bereich situiert sind. Verlust an gesundem Meniskus kann, wie oben beschrieben, zu degenerativen Veränderungen führen. Die enormen volkswirtschaftliche Kosten durch Osteoarthrose und der große Leidensdruck der betroffenen Patienten verdeutlicht, wie dringend eine Lösung dieses Problems benötigt wird.

Der Einsatz der porösen Polyurethanmatrix Actifit® ohne Zellbesiedelung erwies sich in ersten klinischen Studien als vielversprechend. Möglicherweise könnte eine Befüllung mit mesenchymalen Stammzellen diese Therapie weiter verbessern.

Dieser Ansatz soll daher in dem vorliegenden Versuchsvorhaben näher untersucht werden.

Dazu sollen folgende Hypothesen getestet werden:

Hypothese 1: Actifit® ist ein für das Tissue Engineering für den Meniskusersatz geeignetes Biomaterial. Dazu wurden verschiedene in vitro Tests im Vergleich mit einem Hyaluronsäure-Gelatine-Scaffold und weiteren Biomaterialien durchgeführt.

Hypothese 2: Chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in vitro in Actifit® ist möglich.

Hypothese 3: Mesenchymale Stammzellen von Neuseelandhasen können in vitro in Actifit® chondrogen differenzieren.

Hypothese 4: Chondrozyten aus dem Meniskus von Neuseelandhasen können in vitro in Actifit® überleben und meniskusähnliche Matrix bilden.

Hypothese 5: Ein mit mesenchymalen Stammzellen beladenes Scaffold besitzt in vivo Vorteile bei der Meniskusreparatur gegenüber einem zellfreien Konstrukt.

## Einleitung

Hypothese 6: Ein zellbeladenes Implantat integriert in vivo besser in natives Gewebe, als ein zellfreies Implantat.

Hypothese 7: Ein mit mesenchymalen Stammzellen beladenes Scaffold führt in vivo zu einer schnelleren Meniskusreparatur als ein zellfreies Implantat.

Hypothese 8: Actifit® ist in vivo ein angiotaktisches Material.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Actifit®	Orteq, Groningen, Niederlande
Autoklav Typ V-95	Sytec, Wetzlar
Biopsy Punches 5mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Butterfly (21G)	Becton, Brasilien
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell 240	Kendro Heraeus, Hanau
Combitips plus biopur	Eppendorf, Hamburg
Cups (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (24 x 32 mm, 24 x 40 mm, 24 x 50 mm, 24 x 60 mm)	Roth, Karlsruhe
Digitalkamera Lumix DMC-FS35	Panasonic Deutschland, Hamburg
Digitalkamera Nikon Coolpix5700	Nikon GmbH, Düsseldorf
Drehschieber-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Einwegspritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Express Pipettierhilfe	Falcon BD, Heidelberg
Färbekammern	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Invertmikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Kaltlichtquelle PL 2000	Optech Microscope Services, Thame, Großbritannien
Kanülen BD Microlance 3 (18 G, 20 G)	Becton Dickinson, Heidelberg
Konische Röhrchen, Polypropylen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Kryoröhrchen Nalgene (2 ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Lichtleiter Optech PL 2000	Optech Microscope Services, Thame, Großbritannien
Lochtücher Secu-Drape 75 x 90 cm	Sengewald, Rohrdorf-Thansau
Melatron 23 Autoklav	Melag, Berlin

## Material und Methoden

Mirkoskop Fluovert FU

Mikroskop Nikon eclipse TE2000-U

Mikroskop Optech Base

Mikroskopkamera DMC 2

Milli-Q Biocel Wasseraufbereitungssystem

Multipette plus

Nahtmaterial Ethicon PDS II 4-0 Polydioxonan

Nahtmaterial Ethicon Vicryl 3-0 resorbierbar

Neubauer Zählkammer

Objektträger Starfrost 76x 26 mm geputzt

OP-Instrumente

Pasteur-Pipetten Glas 230 mm

pH-Meter

Pipetten, Costar Stripette (5, 10, 25, 50 ml)

Pipetten Eppendorf Research

(10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Präzisionswaage 770-60

Rasierklingen Personna

Röhrchen 8 ml

Safety-Multifly-Set

Shandon Coverplates

Schüttelgerät Polymax 2040

Sicherheitsbank HERAsafe Typ 12

Sicherheitsbank HERAsafe Typ 18

Silikonstopfen, konisch,

Leitz, Wetzlar

Nikon GmbH, Düsseldorf

Optech Microscope Services,  
Thame, Großbritannien

Polaroid, Offenbach

Merck, Darmstadt

Eppendorf, Hamburg

Johnson & Johnson Medical GmbH  
Norderstedt

Johnson & Johnson Medical GmbH  
Norderstedt

Brand GmbH, Wertheim

Waldemar Knittel

Glasbearbeitungs-GmbH,  
Braunschweig

Aesculap Braun, Melsungen

Brand GmbH, Wertheim

Knick, Berlin

Corning, Corning USA

Eppendorf, Hamburg

Kisker Biotech GmbH, Steinfurt

Kern & Sohn GmbH, Balingen-  
Frommern

American Safety Razor Company,  
Verona, USA

Sarstedt, Nürnberg

Sarstedt, Nürnberg

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Heidolph Instruments GmbH,  
Schwabach

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

LabMarket GmbH, Mannheim

## Material und Methoden

Durchmesser 14,5- 10,5 mm

Skalpelle Nr. 11

Feather, Köln

Skalpelle Nr. 22

Feather, Köln

Spritzenfilter Filtropur S 0.2

Sarstedt, Nürnberg

Vakuumpumpe RZ 5

Vacuubrand GmbH, Wertheim

Vortex Genie 2

Scientific-Industries, Bohemia

Waage Kern PBJ/PBS

Kern & Sohn GmbH,

Balingen-Frommern

Wärmeschrank Heraeus Function Line Typ

Kendro Heraeus, Hanau

UT 12

Wasserbad GFL 1003

GFL, Burgwedel

Wellplatten 24 Loch

TPP, Trasadingen, Schweiz

Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>

Sarstedt, Nürnberg

Zellkulturschalen (24 Well)

Sarstedt, Nürnberg

Zentrifuge Biofuge fresco

Kendro Heraeus, Hanau

Zentrifuge Multifuge 3S-R

Kendro Heraeus, Hanau

Zentrifuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400

G-Kisker, Steinfurt

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Albumin, bovine (BSA)

Sigma Aldrich, Steinheim

Ascorbinsäure-2-Phosphat

Sigma Aldrich, Steinheim

Berliner Blau, löslich

Waldeck GmbH, Münster

Calciumchlorid

Roth, Karlsruhe

Chrom(III)-kaliumsulfat-Dodecahydrat (Chromalaun)

Fluka, Buchsheim

Citronensäure

Roth, Karlsruhe

CoCl<sub>2</sub>

Sigma Aldrich, Steinheim

Collagenase II, Lösung

GE Healthcare Europe GmbH,

Freiburg

D(+)-Saccharose

Roth, Karlsruhe

DePex-Eindeckmittel

Serva, Heidelberg

Diaminobenzidin 3,3' (DAB)

Sigma Aldrich, Steinheim

Dimethylmethylenblau (DMMB)

Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma Aldrich, Steinheim

## Material und Methoden

Essigsäure 4 %	Merck, Darmstadt
Gelatine Type A Porcine Skin 300 Bloom	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd 25 %	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol 70 %	Braun, Melsungen
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Karion Sorbitol-Lösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin from hog stomach	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Pikrinsäure C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Riedel-de Haën GmbH, Seelze
Propanol	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Tokyo, Japan
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Base)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tryptanblau-Lösung 0,4 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck aus Darmstadt bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a.

### 2.1.3 Antikörper

Biotin-SP-conjugated Affine Pure	Dianova, Hamburg
Goat-Anti-Mouse IgG (H + L) (Sekundärantikörper)	
Endverdünnung: 1:100	

## Material und Methoden

Monoclonal Anti-Collagen Type I Mouse IgG Endkonzentraion: 2,6 µg/ml	Sigma Aldrich, Steinheim
Monoclonal Anti-Collagen Type II Mouse IgG Endkonzentration: 1 µg/ml	Calbiochem, Darmstadt
Monoclonal CD31 Mouse anti human und anti-rabbit Klon JC-70A IgG1 light chain type kappa (mouse) Endkonzentration: 1,5 µg/ml	Abcam, Cambridge, UK

Die primären Antikörper wiesen eine bekannte Kreuzreaktion gegen Rabbit auf.

### 2.1.4 Kits

ABC Elite	Vector Laboratories, Burlingame USA
-----------	--

### 2.1.5 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/l) + Phenolrot	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (1 g/L)+ Phenolrot	Gibco, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum Fötale Kälberserum (FCS), nicht hitzeinaktiviert	PAN Biotech GmbH, Aidenbach PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glutamin Stock 2 mM	Sigma Aldrich, Steinheim
HEPES Buffer 1 M	Gibco, Karlsruhe
L-Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat 100 mM	Sigma Aldrich, Steinheim
Normal Goat Serum	Dako, Hamburg
PBS Dulbecco's (1x)	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml, 10g/ml)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium + Phenolrot	Gibco, Karlsruhe

### Chondrogenes Medium (Differenzierungsmedium)

High Glucose DMEM (4,5 g/l)  
+1 % Natrium- Pyruvat (Stammlösung)  
+1 % ITS +3 (Lösung)

## Material und Methoden

+Dexamethason 100  $\mu$ M

+TGF $\beta$ 1 recombinant 10 ng/ml

+Ascorbinsäure Phosphat 200  $\mu$ M (37.5  $\mu$ g/ml)

### Expansionsmedium für mesenchymale Stammzellen

DMEM low glucose (1 g/l)

+ 10 % FCS

+ 1 % Penicillin/Streptomycin

+ 1 % HEPES Buffer

Je Zellkulturflasche 15 ml des fertigen Mediums + 6  $\mu$ l FGF-Stammlösung (Endkonzentration im Medium: 100 ng/ml)

### Expansionsmedium für Chondrozyten

RPMI 1640 mit Phenolrot

+ 10 % FCS

+ 1 % Penicillin/Streptomycin

+ 1 % HEPES Buffer

### FGF Stammlösung

FGF lyophilisiert in 0,1% sterilem BSA lösen, Stockkonzentration 25 $\mu$ g/ml

## **2.1.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren**

Dexamethason

Sigma Aldrich, Steinheim

Insulin-transferrin-sodium selenite

Sigma Aldrich, Steinheim

media supplement (ITS+3)

Recombinant Human Fibroblast Growth Factor

R&D Systems, Wiesbaden

(FGF) basic, lyophilisiert

Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 human recombinant  
(TGF $\beta$ 1)

R&D Systems, Wiesbaden

### Dexamethason Stock

50  $\mu$ M in Ethanol (EtOH)

## Material und Methoden

### Dexamethason Gebrauchslösung

200 µl Stocklösung +19,8 ml DMEM High Glucose

### **2.1.7 Puffer und Lösungen**

#### ABC-Komplex-Lösung (Vector Elite Standard Kit)

2,5 ml TRIS-Puffer 0,1 M pH 7

+ 1 Tropfen (=40 µl) Lösung A

+ 1 Tropfen (=40 µl) Lösung B

Vor Gebrauch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

#### Berliner-Blau-Lösung für die Darstellung der Scaffoldporengeometrie

0,5 % Berliner Blau, 10 % BSA

in destilliertem Wasser

#### Blockingpuffer für Immunhistochemie

120 ml TRIS 0,2 M, 2400 g NaCl, 60 ml TritonX100, 60 ml Aqua dest.

Vor Gebrauch zu je 8 ml Blockingpuffer 1 ml FCS und 1 ml goat serum zugeben.

#### DAB-Stammlösung

Aqua dest. mit 0,5 % DAB und 0,1 % BSA

#### DAB-Arbeitslösung:

9000 µl m-PBS (0,1 M)

+ 1000 µl DAB/BSA (DAB-Stammlösung)

+ 240 µl Ni/Co-Stammlösung

+ 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)

#### Gelatinelösung zum Beschichten von Objektträgern

0,75 g Gelatine Type A Porcine Skin 300 Bloom, 0,05 g Chromalaun, 125 µl Glutaraldehyd,  
50 ml Aqua dest.

## Material und Methoden

Mit 5 ml Wasser eine Chromalaunlösung herstellen. Die Gelatine im restlichen Wasser quellen lassen und dann bis zur vollständigen Lösung erwärmen. Nach Erkalten werden die Chromalaunlösung und Glutaraldehyd zugegeben.

### McIlvaine-Puffer

Lösung A: 21 g Zitronensäure mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen (0,1 M)

Lösung B: 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen (0,2 M)

67,8 ml Lösung A + 32,2 ml Lösung B

pH = 3,6

m-PBS-Puffer 1 M

47,2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

6,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

36,0 g NaCl

Mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

### Ni/Co-Stammlösung

Lösung A: 100 mg  $\text{NiCl}_2$ , 5 mg  $\text{CoCl}_2$ , 5 ml destilliertes Wasser

Lösung B: 10 mg BSA, 5ml destilliertes Wasser

Die beiden Lösungen 1:1 unter Rühren zusammengeben.

### Pepsinandaulösung 0,1 %

1 mg Pepsin in 1 ml McIlvaine-Puffer (pH = 3,6)

### Phosphatpuffer 0,2 M

Lösung I: 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (MW = 177,91) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Lösung II: 13,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (MW = 137,99) mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Lösung I und Lösung II mischen (circa 5+1) bis pH auf 7,4 sinkt.

### Saccharoselösung 40 %

40g D(+)-Saccharose mit 0,1 M Phosphatpuffer auf 100 ml auffüllen

### Standardfixans

4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer

## Material und Methoden

### Standardfixans mit Pikrinsäure

Standardfixans mit 15 % gesättigter Pikrinsäure

### Tris-Puffer 0,2 M

24,228 g TRIS base in 900 ml destilliertem Wasser lösen und mit HCl den pH auf 7,0 einstellen. Anschließend mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen.

### Waschpuffer für Immunhistochemie

780 ml TRIS 0,2 M

2220 ml destilliertes Wasser

24,96 g NaCl

### **2.1.8 Medikamente**

Braunovidon Salbe 10 %

Braun, Melsungen

Heparin 25.000 I.E./5 ml

Rotexmedica GmbH, Trittau

Ketamin 10 %

WDT, Garbsen

Pentobarbital (Narcoren)

Merial GmbH, Hallbergmoos

Xylazin 2 %

Serumwerk, Bernburg

### **2.1.9 Versuchstiere**

New Zealand White Rabbits (Gewicht 2,5-3,5 kg)

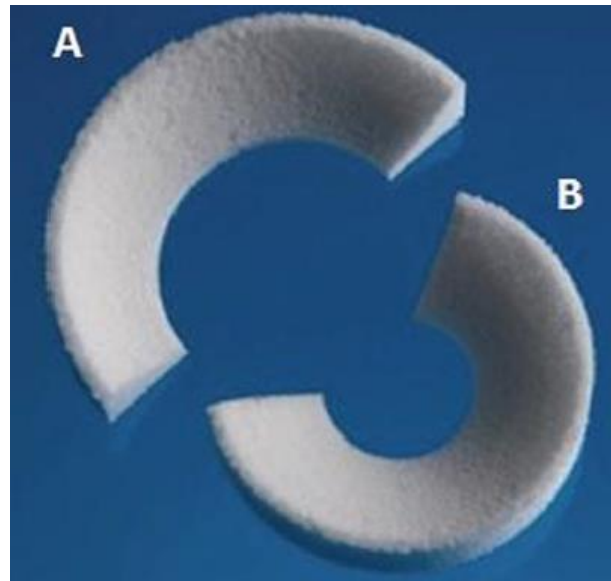
Harlan und Winkelmann, Borcheln

Gehalten wurden die Tiere in Einzelkäfigen im Tierstall des Klinikums der Universität Regensburg (Forschungsbau H4).

### **2.1.10 Biomaterial (Scaffolds)**

#### Actifit®

Actifit® ist ein kommerziell erhältliches Produkt der Firma Orteq. Die Scaffolds wurden von der Firma gebrauchsfertig geliefert (Abbildung 2.1). Das Biomaterial besteht aus aliphatischem Polyurethan, wird in vivo abgebaut und ist hochporös (etwa 80 % Porenanteil am Gesamtvolumen). [98]



**Abbildung 2.1 Die Polyurethanmatrix Actifit® ist als mediales (a) und laterales (b) Implantat erhältlich. (aus: Bouyarmane, H.; Beaufils, P.; Pujol, N.; Bellemans, J.; Roberts, S.; Spalding, T. et al. (2014): Polyurethane scaffold in lateral meniscus segmental defects: Clinical outcomes at 24months follow-up. In: Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 100 (1), S. 153–157)**

#### Poröser Polyurethanschaum mit Kollagenfasern

Die Scaffolds wurden zu Testzwecken gebrauchsfertig von einem externen Hersteller geliefert. Dabei wurden 8 verschiedene Chargen verwendet.

#### Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Komposit-Scaffolds

Das Material wurde nach patentiertem Verfahren (Europäisches Patent Nr.: PCT/EP99/09444) im eigenen Labor hergestellt. Die Masse bestand zu 70 % aus Hyaluronan (kommerziell erhältliches Produkt Jaloskin®, Fidia Advances Biopolymers, Abano Terme, Italien) und zu 30 % aus Gelatine (hydrolysiertes bovines Kollagen, Sigma, Seelze).

Zur Herstellung wurde die sogenannte „solvent casting particulate leaching“-Technik verwendet. Die beiden Komponenten wurden gelöst, gemischt und nach Zufügen von NaCl-Kristallen luftgetrocknet. Das Salz wurde mit Wasser ausgewaschen und das Material, nach stufenweiser Überführung in 100 % Aceton, im Vakuum getrocknet. Die Porengröße betrug 350-450 µm. [8,101]

### **2.1.11 Software**

IBM SPSS Statistics 21

IBM, Armonk, USA

Microsoft Excel

Microsoft Corp., Redmond, USA

NIS-Elements AR 3.2

Nikon GmbH, Düsseldorf

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zuschneiden und Sterilisation der Scaffolds**

#### ***2.2.1.1 Biomaterial-Zylinder für in vitro Versuche***

Zunächst wurden mit Hilfe von Rasierklingen exakt 2 mm dicke Scheiben aus dem Biomaterial hergestellt. Aus diesen Scheiben wurden dann mit einem Biopsy-punch Zylinder mit 5 mm Durchmesser ausgestanzt. Diese fertigen Zylinder, mit einer Höhe von 2 mm und einem Durchmesser von 5 mm wurden anschließend mittels Betastrahlung sterilisiert.

#### ***2.2.1.2 Actifit®-Keile für den in vivo Versuch***

Aus Actifit® wurden mit Hilfe von handelsüblichen Rasierklingen Keile hergestellt, die in etwa die Größe und Form der Pars intermedia des Kaninchenmeniskus hatten. Dabei wurde der natürlichen Anatomie entsprechend darauf geachtet, dass die Dicke der Keile an der Basis ca. 4 mm betrug und der Keil Richtung Spitze dünner wurde. Die Breite betrug an der Basis ca. 7 mm. Somit waren alle Keile in etwa gleich groß und die Vergleichbarkeit der Zellbesiedelung bei der Vakuumbeimpfung war gegeben. Die fertigen Keile wurden mittels Betastrahlung sterilisiert und intraoperativ gegebenenfalls nochmals zugeschnitten, damit sich die Keile exakt in den nativen Meniskus einfügten.

#### ***2.2.1.3 Sterilisation der Scaffolds***

Sterilisation der zugeschnittenen Scaffolds erfolgte mittels Betastrahlung mit 25 kGy, durchgeführt von Beta-Gamma-Service GmbH, Saal.

## **2.2.2 Zellkultur allgemein und in vitro Differenzierungen**

### **2.2.2.1 Allgemein**

Alle Kultivierungen und in vitro Differenzierungen erfolgten bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigt. Bei allen Kultivierungen erfolgte zweimal pro Woche ein Mediumwechsel, wobei das alte Medium abgesaugt und 15 ml neues 37 °C warmes Expansionsmedium pro Flasche nachgefüllt wurden. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte stets mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

### **2.2.2.2 Auftauen von Zellen**

Die Cups mit den Zellen wurden durch Schwenken in warmem Wasser langsam aufgetaut. Der Inhalt eines Cups wurde anschließend zusammen mit 9 ml Vollmedium für 7,5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in je 1 ml Vollmedium pro  $2 \times 10^6$  Zellen aufgenommen und resuspendiert. Nach Auszählung und Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen wurden je Zellkulturflasche 200.000 – 300.000 Zellen ausgesät und 15 ml Vollmedium hinzugegeben.

### **2.2.2.3 Passagieren der Zellen**

Zuerst wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und anschließend der Zellrasen mit circa. 5 ml PBS Dulbecco gespült. Danach wurden 3 ml Trypsin/EDTA zugegeben bis sich die Zellen vom Boden lösten, was nach etwa 3 -5 Minuten der Fall war. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Trypsin wurde mit 5 ml Vollmedium inaktiviert und durch Auf- und Abpipettieren eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach dem Zentrifugieren und Auszählen der Zellen konnten sie für Versuche verwendet oder für spätere Verwendung eingefroren werden.

### **2.2.2.4 Einfrieren von Zellen**

Nachdem die Zellen zunächst wie oben beschrieben trypsiniert (passagiert) wurden, wurde eine Zellsuspension mit Vollmedium mit  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter hergestellt.

Zu der Zellsuspension wurde dann dasselbe Volumen FCS zugegeben. Anschließend wurde unter Rühren tropfenweise DMSO bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben.

## Material und Methoden

Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurden die Kryocups mit der Suspension umgehend in einer Einfrierbox mit Isopropanol auf  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Nach 48 Stunden wurden die Cups entweder auf  $-80\text{ °C}$  eingefroren oder in Flüssigstickstoff überführt.

### ***2.2.2.5 Aufbereitung von Knochenmark aus dem Neuseelandhasen zur Kultur von mesenchymalen Stammzellen***

DMEM low glucose Medium wurde im Wasserbad auf  $37\text{ °C}$  erwärmt. Zu 10 ml Knochenmarkpunktat wurden 15 ml Medium hinzugegeben und eine Suspension hergestellt. Die Suspension wurde zentrifugiert (1700 U/min, 5 Minuten) und der Überstand verworfen. Die Zahl der kernhaltigen Zellen wurde bestimmt und anschließend wurden die Zellen zu je  $2 \times 10^7$  pro Flasche ausgesät und 15 ml Vollmedium hinzugegeben.

### ***2.2.2.6 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus humanem Knochenmark***

Low glucose Medium und Ficoll® wurden im Wasserbad auf  $37\text{ °C}$  erwärmt. Anschließend wurde das Knochenmarkaspirat in ein Becherglas mit 100 ml Medium eingebracht. In Falcons wurden je 15 ml Ficoll® vorgelegt und dann mit je 30 ml des Knochenmark-Medium-Gemisches überschichtet.

Nach Zentrifugation (1680 U/min, 35 min) wurde die Schicht mit den mesenchymalen Stammzellen abgenommen und erneut zentrifugiert (1000 U/min, 10 min). Die Zellschicht wurde danach erneut in Medium aufgenommen und zu je  $2 \times 10^6$  Zellen in eine Zellkulturflasche ausgesät.

### ***2.2.2.7 Gewinnung und Zellkultur von Chondrozyten aus Kaninchen-Menisken***

Es wurden lediglich Chondrozyten aus dem vaskulären Bereich des Meniskus verwendet. Dazu wurde der vaskuläre Teil des Meniskus abgetrennt, mit einem Skalpell No.22 zerhackt und so zu einem Brei verarbeitet. Für den Verdau wurde eine 1:4 mit purem RPMI Medium verdünnte Collagenase II Lösung verwendet. Über Nacht wurden je 0,5 ml des Meniskusbreis zusammen mit 3 ml der fertigen Verdaulösung in einem 15 ml Falcon auf dem Schüttler verdaut.

Am nächsten Tag wurde das Falcon mit 12 ml RPMI Vollmedium aufgefüllt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in eine Zellkulturflasche mit 15 ml RPMI Vollmedium überführt. Nach einer Woche erfolgte der erste Mediumwechsel, alle weiteren Mediumwechsel erfolgten zweimal wöchentlich.

## Material und Methoden

Nach Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und gingen in den Versuch.

### **2.2.2.8 In vitro Differenzierungen**

Bei allen in vitro Differenzierungen wurde dreimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt und pro Well 1 ml frisch angesetztes, 37 °C warmes Differenzierungsmedium nachgefüllt.

### **2.2.3 Histologie**

#### **2.2.3.1 Gefrierschnitt histologie**

##### 2.2.3.1.1 Fixierung und Einbettung des Materials aus den in vitro Versuchen

- 2 Stunden Fixierung in Standardfixans
- Spülung mit Phosphatpuffer 0,1 M
- 2 Stunden Phosphatpuffer 0,1 M
- 2 Stunden Phosphatpuffer 0,1 M mit 10 % Saccharose
- 2 Stunden Phosphatpuffer 0,1 M mit 20 % Saccharose
- 2 Stunden Phosphatpuffer 0,1 M mit 30 % Saccharose
- 2 Stunden Phosphatpuffer 0,1 M mit 30 % Saccharose + selbe Menge TissueTek
- 2 Stunden reines TissueTek
- Einbettung in TissueTek und Einfrieren mit Flüssigstickstoff

Vor dem Einbetten wurde das zylindrische Biomaterial mit zwei Rasierklingen vorsichtig halbiert, wobei der Schnitt quer durch die Kreisfläche ging.

##### 2.2.3.1.2 Fixierung der entnommenen Menisken aus dem in vivo Versuch

Verwendet wurde Standardfixans mit 15 % Pikrinsäure. Alle Inkubationsschritte dauerten 4 Stunden. Der Meniskus wurde als Ganzes so eingebettet, dass beim Schneiden axiale Schnitte angefertigt wurden. Ansonsten entsprach das Protokoll dem des oben genannten Protokolls der in vitro Versuche.

##### 2.2.3.1.3 Anfertigung der Kryoschnitte

Die Temperatur des jeweiligen Blocks und des Kryotoms lagen bei -30 °C. Der Messerwinkel betrug 28,5 °C und die Schnittdicke 10 µm. Die Schnitte wurden auf vorher mit Gelatine

beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte zur besseren Adhäsion der Schnitte.

### **2.2.3.2 Konventionelle Färbungen**

#### 2.2.3.2.1 Wässrige DMMB-Färbung

Dazu wurden auf jeden Objektträger 300 µl der DMMB-Karion-Sorbitol-Lösung aufgebracht. Diese Lösung bestand aus einer 1:20 Verdünnung von DMMB 0,1 % in Karion-Sorbitol-Lösung. Anschließend wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme einer Pinzette ein Deckglas aufgesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen mit eingeschlossen wurden. Die gefärbten Schnitte wurden in der Regel am nächsten Tag, spätestens aber nach einer Woche, unter dem Mikroskop ab fotografiert. Das war notwendig, da bei dieser Färbung nach circa 2 Wochen Kristallbildung einsetzt und die Schnitte somit unbrauchbar werden.

#### 2.2.3.2.2 DMMB-Färbung mit anschließender Entwässerung

Dazu wurden die Objektträger für eine Minute in einer DMMB-Lösung mit 0,1 % DMMB in destilliertem Wasser gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Daraufhin wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanolreihe und in Xylol entwässert und in DePex eingedeckelt.

Im Gegensatz zur wässrigen DMMB-Färbung entstanden hierbei haltbare Dauerpräparate.

### **2.2.3.3 Immunhistochemische Färbungen**

Für die Immunhistochemie wurden kommerziell erhältliche Färbekammern verwendet.

#### 2.2.3.3.1 Kollagen I und Kollagen II

Die Schnitte wurden mit Waschpuffer rehydriert. Die endogenen Peroxidasen wurden durch 30 minütige Inkubationen mit einer PBS-Lösung (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 10 % Methanol) blockiert. Nach Spülung mit Waschpuffer erfolgte das Einspannen der Schnitte. Auf jeden Schnitt wurden 150 µl Pepsinandaulösung pipettiert und nach 15 Minuten dreimal mit Waschpuffer gespült. Danach wurden auf jeden Schnitt 150 µl Blockingpuffer aufgebracht und 60 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Blockingpuffer mit den jeweiligen Primärantikörpern gegen Kollagen I oder Kollagen II in 1:100 Verdünnung aufgebracht und über Nacht inkubiert.

## Material und Methoden

Am nächsten Tag wurde zuerst dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann der Sekundär-Antikörper Biotin-SP-conjugated Affine Pure goat-anti-mouse in 1:100 Verdünnung in Blockingpuffer aufgebracht und 60 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit des Sekundärantikörpers wurde die ABC-Lösung hergestellt, da diese 30 Minuten vor Gebrauch inkubieren muss. Anschließend wurde wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen, pro Objektträger 150 µl ABC-Lösung aufgebracht und für 90 Minuten inkubiert.

Darauf folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, nachdem die Schnitte aus den Haltern genommen wurden. Die Schnitte wurden unter mikroskopischer Kontrolle mit DAB-Lösung entwickelt. Diese Lösung wurde anschließend durch kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser entfernt und die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanolreihe entwässert, in Xylol überführt und schließlich mit DePex eingedeckelt.

### 2.2.3.3.2 CD31

Die Durchführung der CD31-Färbung unterschied sich von der Immunhistochemie für Kollagen nur in zwei Punkten:

Zum einen wurde kein Pepsinverdau durchgeführt. Zum anderen wurden als Primärantikörper CD31-Antikörper in 1:50 Verdünnung in Blockingpuffer verwendet.

## 2.2.4 Beladen der Scaffolds mit Zellen/Medium mittels Vakuum



**Abbildung 2.2**  
**Fertiges Beimpfröhrchen mit aufgesetztem Sterilfilter und inliegendem Scaffold**

### 2.2.4.1 Herstellung der Beimpfröhrchen

Es wurden kommerziell erhältliche 8 ml Plastikröhrchen verwendet, bei denen der Deckel entfernt wurde.

Der Verschluss erfolgte mit Silikonstopfen. Diese wurden wiederum mit einer 18 G Kanüle durchstoßen und diese Kanüle im Stopfen belassen, so dass die Kanülenspitze im Inneren des Röhrchens platziert war (Abbildung 2.2).

Die Beimpfröhrchen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden Sterilfilter auf die Kanülen geschraubt.

### 2.2.4.2 Beladen der Scaffolds

Dazu wurden eine für das jeweilige Matrixvolumen und den entsprechenden Versuchsaufbau passende Zellzahl in einem definierten Volumen chondrogenem Medium zusammen mit dem Scaffold in ein zuvor autoklaviertes Beimpfröhrchen gegeben. Dieses wurde verschlossen und mit einem Sterilfilter auf der Kanüle gedeckelt. Während von den größeren Meniskuskeilen jeweils nur ein Scaffold pro Beimpfvorgang befüllt wurde, war es bei den kleineren Matrixzylindern möglich bis zu 5 Matrices gleichzeitig zu beimpfen, solange dies mit derselben Zelllinie erfolgte.

Mithilfe der Vakuumpumpe wurden nun Zellsuspension, bzw. das Differenzierungsmedium in die Matrix gesaugt (Abbildung 2.3). Dabei wurde zehnmal für je 10 Sekunden ein Vakuum angesetzt und nach jedem Durchgang das Röhrchen belüftet. Die Stärke des Vakuums wurde manuell mittels eines Drehhebels so gewählt, dass eine leichte Schaumbildung des Mediums zu beobachten war.



**Abbildung 2.3 Aufbau für das Befüllen von Matrices. Zu sehen sind die Vakuumpumpe mit Drehhebel zum Regulieren des Vakuums und ein angeschlossenes Beimpröhrchen**

nach Größe der Matrix, 1-2 ml chondrogenes Medium pro Well zugegeben und die Wellplatte zurück in den Brutschrank gestellt.

Zum Adhären der Zellen wurden die so befüllten Matrices anschließend auf einer 24-Wellplatte für 75 Minuten im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung inkubiert. Um dabei ein Austrocknen der Matrices zu verhindern wurde in die randständigen (leeren) Wells PBS-Dulbecco je 1 ml PBS-Dulbecco pipettiert.

Anschließend wurden, je

## **2.2.5 In vitro Testung von verschiedenen Scaffolds für die Meniskusregeneration mit mesenchymalen Stammzellen**

Getestet wurden insgesamt 11 verschiedene Biomaterialien. Davon waren 8 Biomaterialien verschiedene Polyurethanschäume mit Kollagenfasern von einem externen Hersteller.

Zwei weitere Biomaterialien stammten aus eigener Herstellung des Labors der Unfallchirurgie der Universität Regensburg und bestanden aus 70 % Hyaluronsäureester und 30 % hydrolysiertem Kollagen. Bei den beiden Biomaterialien des Labors der Unfallchirurgie handelte es sich prinzipiell um identisches Material, wobei ein Teil der Matrices mit einem zusätzlichen Spülschritt behandelt wurde. Da es keinen Unterschied zwischen den zusätzlich gespülten und normal behandelten Scaffolds gab gingen sie gemeinsam in das Scoring ein.

Das letzte Biomaterial war die Polyurethanmatrix Actifit®, welche auch im in vivo Versuch zum Einsatz kam.

### **2.2.5.1 Testung der Bioeigenschaften mit einem in vitro Versuch**

Bei diesem Versuch wurden Matrixzylinder getestet, die einen Durchmesser von 5 mm und eine Höhe von 2 mm hatten. Verwendet wurden humane mesenchymale Stammzellen aus einer

einzigsten Zelllinie. Die Stammzellen wurden ursprünglich durch Knochenmarkpunktion gewonnen und waren ein Restbestand eines anderen Versuchs mit genehmigtem Ethikantrag. Die Zellen waren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und wurden für den *in vitro* Versuch aufgetaut. In T75 Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit Expansionsmedium für mesenchymale Stammzellen kultiviert, bis 80 % Konfluenz erreicht war. Dabei fand zweimal pro Woche ein Mediumwechsel statt, bei dem pro Flasche 15 ml neues Medium und  $6\text{ }\mu\text{l}$  FGF ersetzt wurden. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert, ausgezählt und in Differenzierungsmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Matrices mit der Zellsuspension beimpft. Pro Matrix wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in  $50\text{ }\mu\text{l}$  Differenzierungsmedium verwendet. Pro Biomaterial gingen 6 Matrices in den Versuch.

Am nächsten Tag wurde je Biomaterial eine Matrix als Beimpfkontrolle aus dem Versuch genommen. Die restlichen Matrices wurden 21 Tage in Differenzierungsmedium in 24 Wellplatten im Brutschrank aufbewahrt. Jede Matrix war in einem eigenen Well in 1 ml Differenzierungsmedium. Dabei wurde das Medium dreimal wöchentlich gewechselt.

Nach der Differenzierungszeit wurden die Matrices fixiert und in TissueTek eingebettet und im Kryotom geschnitten.

Es wurden eine wässrige DMMB-Färbung, eine immunhistochemische Kollagen I Färbung und eine immunhistochemische Kollagen II Färbung durchgeführt.

### ***2.2.5.2 Makroskopische Beurteilung der Porenbeschaffenheit***

Dazu wurde je Biomaterial ein ganzer Matrixmeniskus in 2 mm dicke Scheiben zerlegt, anschließend wurden die Oberflächen fotografiert und beurteilt.

### ***2.2.5.3 Befüllung der Scaffolds mit einer Berliner-Blau-Lösung zur Darstellung der Porengeometrie***

Pro Biomaterial wurden zwei 2 mm dicke Scheiben mit einer Berliner-Blau-BSA-Lösung befüllt. Diese bestand aus 0,5 % Berliner Blau und 10 % BSA in destilliertem Wasser.

Die Befüllung erfolgte mittels Vakuum, mit derselben Methode, wie bei der Beimpfung mit Zellen. Statt Medium und Zellen wurde jedoch besagte Berliner-Blau-BSA-Lösung verwendet.

Die so befüllten Scaffolds wurden über Nacht in Phosphatpuffer 0,1 M mit 4 % Paraformaldehyd und 1 % Glutaraldehyd fixiert und am nächsten Tag in TissueTek eingebettet.

Der Block wurde dann im Kryotom geschnitten und die Oberfläche im Kryotom abfotografiert. Dabei wurde immer eine  $100\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schicht vom Block heruntergeschnitten, die Oberfläche

des Blocks fotografiert und nach einer weiteren 100 µm Schicht der Vorgang wiederholt, um eine repräsentative Bilderserie zu erhalten.

Da die Berliner-Blau-Lösung nur in den von außen zugänglichen Poren zu finden war, konnte so die Offenporigkeit und die Interkonnektivität der Poren beurteilt werden.

### **2.2.5.4 Scoring**

Aus der Literatur ist derzeit kein Scoringssystem für eine derart intensive in vitro Testung von Scaffolds für die Meniskusreparatur bekannt. Es wurde deshalb ein eigenes Punktescoringsystem (Tabelle 1) für die standardisierte Untersuchung und Beurteilung von Ergebnissen der in vitro Analyse entwickelt. Dieser Score soll nicht über die Eignung für den klinischen Einsatz entscheiden, wohl aber als Instrument zur Vorauswahl für eine intensive in vivo-Testung fungieren. Der Aufbau des Scoringssystems wurde von Florian Zeman, einem Statistiker vom Zentrum für klinische Studien der Universität Regensburg geprüft.

Das Scoringssystem setzt sich aus sieben Einzelitems zusammen. Die Einzelitems können Werte von 0 (= schlecht) bis 3 (=vielversprechend) annehmen. Die Einzelwerte lassen sich zu einem Gesamtscore zusammenfassen, der Werte zwischen 0 (= schlechtes Biomaterial) bis 21 (= vielversprechendes Biomaterial) annehmen kann.

Scoringwert	0	1	2	3
<b>1. Porengeometrie/Gleichmäßigkeit der Poren (Prozentuale Größenabweichung von der Durchschnittsgröße)</b>	Poren variieren in ihrer Größe um  > 200 %	große Ungleichmäßigkeiten: Größenabweichung um  100 % - 199 %	leichte Ungleichmäßigkeiten: Größenabweichung um  50 % - 99 %	völlig gleichmäßige Porenstruktur: Größenabweichung um  <50 %
<b>2. Interkonnektivität der Poren (Anteil der interkonnektiven, befüllten Poren)</b>	0 %	1 % - 25 %	26 % - 75 %	> 75 %
<b>3. Zellverteilung im Scaffold (Anteil der zellbesiedelten Poren)</b>	0 %	1 % - 25 %	26 % - 75 %	> 75 %
<b>4. Vitalität und Überleben der Zellen (Anteil der vitalen Zellen)</b>	0 %	1 % - 25 %	26 % - 75 %	> 75 %
<b>5. Bildung von extrazellulärer Matrix (Anteil der mit proteoglykanhaltiger Matrix befüllten Porenfläche)</b>	Keine Befüllung mit proteoglykanhaltiger extrazellulärer Matrix	<25 %	25 % - 75 %	>75 %
<b>6. Anteil von Kollagen I in Relation zur gesamten extrazellulären Matrix</b>	> 75 %	25-75 %	< 25 %	Keine Anfärbung von Kollagen I
<b>7. Anteil von Kollagen II in Relation zur gesamten extrazellulären Matrix</b>	Keine Anfärbung von Kollagen II	<25 %	25 % - 75 %	>75 %

**Tabelle 1 Scoringssystem für den Biomaterialvergleich**

Nachfolgend finden sich Erläuterungen zur Durchführung der Bewertung der sieben Einzelitems:

### 1. Porengeometrie

Dazu wurde je Biomaterial ein ganzer Meniskus in 2 mm Scheiben geschnitten und so die Porenstruktur beurteilt. Als Kriterium wurde die Gleichmäßigkeit der Porengröße verwendet (Stärkste prozentuale Abweichung von Poren von der Durchschnittsgröße).

### 2. Interkonnektivität der Poren

Dazu wurden je Biomaterial zwei 2 mm dicke Scheiben mit einer BSA-Berliner-Blau-Lösung befüllt, fixiert, eingeblockt und im Kryotom geschnitten. Der Block wurde geschnitten und 10 Schnittebenen abfotografiert.

## Material und Methoden

Für die Punkte 3.-7. des Scorings wurden je Biomaterial 5 Matrixzylinder (2 mm hoch, Durchmesser 5mm) mit humanen mesenchymalen Stammzellen beimpft und 21 Tage in chondrogenem Medium differenziert. Danach erfolgte die histologische und immunhistochemische Analyse. Für jedes Biomaterial wurde für jedes aufgeführte Kriterium jeder Matrixzylinder einzeln beurteilt. Der durchschnittliche Punktwert für jedes Kriterium ging dann in das Scoring ein.

### 3. Zellverteilung im Scaffold

Dazu wurde anhand einer DMMB-Färbung die Verteilung der Zellen im Scaffold beurteilt.

### 4. Vitalität/Überleben der Zellen

Dazu wurde anhand einer DMMB-Färbung der Anteil der vitalen Zellen bestimmt. Als Vitalitätsparameter fungierten die Zellmorphologie (glatte Berandung bei vitalen Zellen) und die Adhäsion an den Porenwänden (avitale Zellen zeigen eine aufgehobene Adhäsion).

### 5. Bildung von extrazellulärer Matrix

Dazu wurde anhand einer DMMB-Färbung der Anteil der mit metachromatischer (= proteoglykanhaltiger) extrazellulären Matrix befüllten Porenfläche bestimmt.

### 6. Kollagen I-Bildung

Beurteilung anhand einer immunhistochemischen Färbung von Kollagen I im Vergleich mit einer DMMB-Färbung eines benachbarten Schnittes. Somit konnte der prozentuale Anteil von Kollagen I an der gesamten extrazellulären Matrix beurteilt werden. Kollagen I-Bildung wird hier negativ bewertet, da das Chondrogenesemodell für die Bildung von Kollagen II standardisiert ist.

### 7. Kollagen II-Bildung

Beurteilung anhand einer immunhistochemischen Färbung von Kollagen II im Vergleich mit einer DMMB-Färbung eines benachbarten Schnittes. Somit konnte der prozentuale Anteil von Kollagen II an der gesamten extrazellulären Matrix beurteilt werden.

### **2.2.5.5 Statistik**

Das Sammeln der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Diagrammerstellung und statistische Auswertung erfolgte mit SPSS. Zum Vergleich nicht normalverteilter Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Das Signifikanzniveau betrug 0,05.

### **2.2.6 In vitro Analyse der Eignung eines Actifit®-Scaffolds für Tierversuche am Neuseelandhasen**

Bei diesem Versuch wurden Actifit®-Matrixzylinder verwendet, die einen Durchmesser von 5 mm und eine Höhe von 2 mm hatten.

Für den Versuch wurden restliche Kaninchenzellen aus vorangegangenen Versuchen verwendet. Diese waren bei -80 °C eingefroren, wurden aufgetaut und in T 75 Zellkulturflaschen kultiviert. Verwendet wurden je zwei Zelllinien mesenchymale Stammzellen und Chondrozyten aus dem vaskulären Bereich des Meniskus. Bei wöchentlich zweimaligem Mediumwechsel erhielten die mesenchymalen Stammzellen pro Zellkulturflasche 15 ml Expansionsmedium für mesenchymale Stammzellen und 6 µl FGF. Die Chondrozyten erhielten pro Zellkulturflasche und zweimal wöchentlichem Mediumwechsel 15 ml Expansionsmedium für Chondrozyten. Die Zellkultur erfolgte bis zu 80 % Konfluenz, was bei den mesenchymalen Stammzellen nach etwa vier Wochen und bei den Chondrozyten nach fünf Wochen der Fall war. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert, ausgezählt und in Differenzierungsmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Matrices mit der Zellsuspension beimpft. Pro Matrix wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 50 µl Differenzierungsmedium verwendet. 7 Matrices wurden mit mesenchymalen Stammzellen beimpft, weitere 8 Matrices mit Chondrozyten.

Am nächsten Tag wurde je Zelllinie eine Matrix als Beimpfkontrolle aus dem Versuch genommen. Die restlichen Matrices wurden 21 Tage in chondrogenem Medium in 24-Wellplatten im Brutschrank aufbewahrt. Jede Matrix war in einem eigenen Well in 1 ml Differenzierungsmedium. Dabei wurde das Medium dreimal wöchentlich gewechselt.

Nach der Differenzierungszeit wurden die Matrices fixiert und in TissueTek eingebettet und im Kryotom geschnitten. Es wurden eine wässrige DMMB-Färbung, eine Kollagen I-Immunhistochemie und eine Kollagen II-Immunhistochemie durchgeführt.

### **2.2.7 In vivo Analyse: Regeneration von gemischt vaskulär-avaskulären Defekten des Meniskus lateralis im Tiermodell**

In den Versuch gingen 20 Tiere. Bei 10 der Tiere sollte das Biomaterial 6 Wochen lang, bei den anderen 10 Tieren 12 Wochen lang im Gelenk verbleiben.

Jedem Tier wurde in das linke Knie eine mit autologen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark besiedelte Matrix und in das rechte Knie eine zellfreie Matrix als Kontrolle eingesetzt. Das verwendete Biomaterial war Actifit® der Firma Orteq, eine kommerziell erhältliche Polyurethanmatrix.

Während die 12-Wochen-Gruppe den Versuch komplett vollenden konnte, mussten bei der 6-Wochen-Gruppe 3 Tiere aus dem Versuch genommen werden. Bei zwei Tieren konnten aus den Knochenmarkpunktionen nicht genügend mesenchymalen Stammzellen kultiviert werden. Bei einem Tier verhinderte ein ungünstiger Situs erst einen zufriedenstellenden Einbau des Biomaterials und eine Infektion im Knie führte dann zum endgültigen Versuchsausschluss (dies war ohne Verfälschung des Gesamtergebnisses zulässig, da somit je Gruppe ein Meniskus aus dem Versuch herausfiel). Dieser Tierversuch und alle involvierten Eingriffe wurden nach zuvor erfolgtem Tierversuchsantrag vom Tierschutzbeauftragten der Universität Regensburg genehmigt.

#### **2.2.7.1 Knochenmarkpunktion bei New Zealand White Rabbits**

Das Knochenmark wurde aus den Beckenkämmen von New Zealand White Rabbits gewonnen. Zunächst wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von je 2 ml Xylazin und Ketamin narkotisiert. Die Haut über den Beckenkämmen wurde rasiert, mit Isopropanol desinfiziert und das Tier mit einem Lochtuch steril abgedeckt.

Ein kleiner Hautschnitt wurde durchgeführt, die Faszie inzidiert, der Beckenkamm dargestellt (Abbildung 2.4) und mit einer 18 G Kanüle die Kortikalis durchstoßen. Dieser Zugang wurde dann mit einer 16 G Kanüle erweitert. Der Eingriff wurde bilateral durchgeführt und mittels einer auf eine 16 G Kanüle aufgesetzten Spritze, in der 1 ml Heparin vorgelegt war, je Seite circa 5 ml Knochenmark aspiriert (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.4** Darstellung des Beckenkamms



**Abbildung 2.5** Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm

Anschließend wurden sowohl die Faszie als auch die Haut mit fortlaufender Nahttechnik verschlossen und die Wunde mit Braunovidon-Salbe versorgt.

Das Knochenmarkspirat wurde wie oben beschrieben aufbereitet und die mesenchymalen Stammzellen daraus mit Expansionsmedium bis zu 80 % Konfluenz der Zellen kultiviert. Dies dauerte 3-4 Wochen.

#### **2.2.7.2 Befüllung der Matrices**

Die zuvor zugeschnittenen und sterilisierten Matrixkeile wurden wie oben beschrieben befüllt. Die Hälfte der Scaffolds wurde mit je  $4 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l Differenzierungsmedium beimpft. Die andere Hälfte wurde mit 200  $\mu$ l Differenzierungsmedium ohne Zellen befüllt. Die so befüllten Matrices wurden über Nacht in chondrogenem Medium im Brutschrank gelagert und am nächsten Tag implantiert.

#### **2.2.7.3 Erzeugung des Meniskusdefekts und Einsetzen der Scaffolds**

Die Tiere wurden betäubt mittels intramuskulärer Injektion von 2 ml Xylazin und 2 ml Ketamin. Bei Bedarf erfolgte intraoperativ eine weitere Betäubung mit 1 ml Xylazin und 1 ml Ketamin. Vor der Operation wurde bei den betäubten Tieren der Operationsbereich großzügig rasiert, mit Isopropanol desinfiziert und das Tier mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt.

Es wurde eine partielle parapatellare Kniegelenkseröffnung durchgeführt und so der laterale Gelenkanteil eröffnet. Der Hoffasche Fettkörper wurde partiell entfernt und etwaige Blutungen

## Material und Methoden

mit Tupfern gestillt. Der laterale Meniskus wurde teilweise mobilisiert und nach anterior luxiert. Mithilfe eines Stichskalpell (Feather disposable Skalpell No. 11) wurde eine partielle Meniskektomie durchgeführt. Dabei wurde ein circa 7 mm breiter Defekt in der pars intermedia des Meniskus lateralis geschaffen. Dieser Defekt umfasste den kompletten Meniskus von der Spitze bis zur Basis. Es wurde kein Rest der Basis, also keine Randleiste, belassen. Somit lag eine komplette Durchtrennung des Meniskus vor (Abbildung 2.7). Der Meniskusdefekt erstreckte sich folglich sowohl über den vaskulären, als auch den avaskulären Teil. In diesen Defekt wurde die Actifit®-Matrix (Abbildung 2.6) eingepasst und mit je einer Einzelknopfnah am Crus superior und am Crus anterior des Meniskus lateralis befestigt (Abbildung 2.8). Dafür wurde ein resorbierbarer 4-0 Faden verwendet.

Der Eingriff erfolgte einzeitig bilateral. Dabei wurde der Meniskusdefekt wie folgt bestückt:

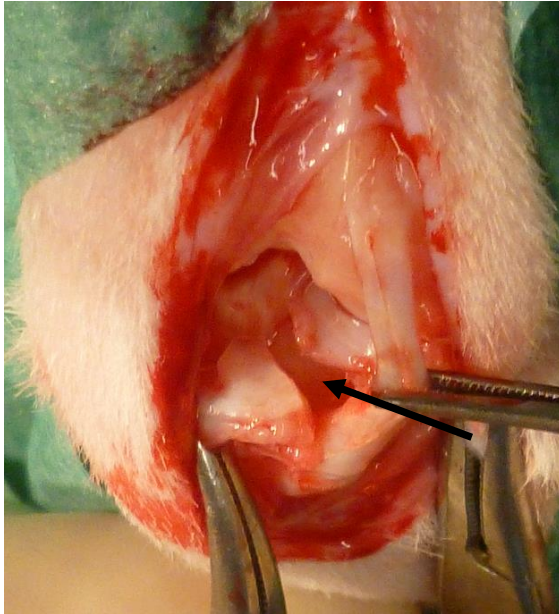
- 1) Linkes Knie: Actifit®-Scaffold, besetzt mit mesenchymalen Stammzellen
- 2) Rechtes Knie: zellfreies Actifit®-Scaffold



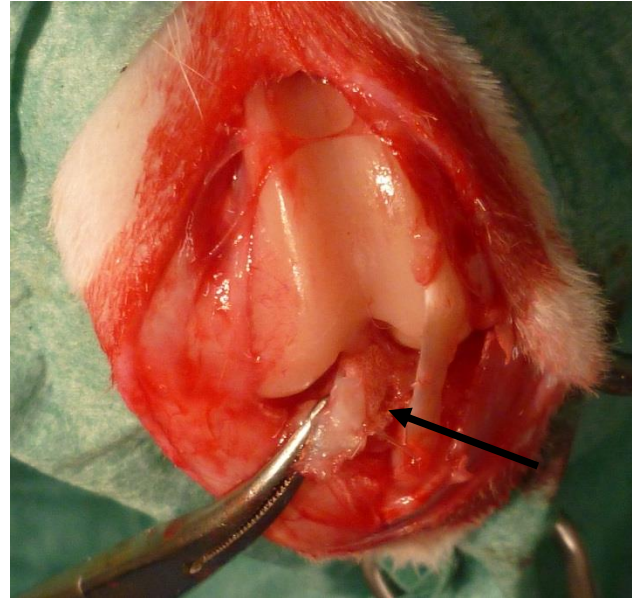
**Abbildung 2.6 Die entfernte native Pars intermedia des Meniskus lateralis (oben) neben dem neu eingebauten Actifit®-Keil (unten)**

Nach der Annah wurde der Meniskus reponiert und die Gelenkkapsel ebenfalls mit einem resorbierbaren 4-0 Faden mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

Die Hautnaht erfolgte mit einem 4-0 Vicrylfaden mit fortlaufender Naht. Die Wunde wurde anschließend mit Braunovidonsalbe versorgt. Die Tiere konnten sich nach der Anästhesie wieder frei bewegen, wobei keine Probleme bei der Motilität beobachtet werden konnten. Es wurde keine weitere Schmerzmedikation benötigt und die Tiere erholten sich postoperativ rasch.



**Abbildung 2.7** Eröffnetes Kniegelenk. Nach anterior luxierter Meniskus lateralıs mit Meniskusdefekt. Pfeil: in der Pars intermedia erzeugter Meniskusdefekt.



**Abbildung 2.8** In den Meniskusdefekt eingeinähtes Actifit®. Der Pfeil zeigt auf das Actifit®.

#### ***2.2.7.4 Gewinnung der Menisken zur Analyse der durchgeführten Meniskusreparatur***

Nachdem das Biomaterial 6 bzw. 12 Wochen in den Tieren verblieben war, wurden die Tiere nach vorheriger Narkose durch eine in eine Ohrvene injizierte Überdosis Pentobarbital eingeschläfert.

Das Kniegelenk wurde eröffnet, wobei die Patellarsehne, die Kreuzbänder und die Kniegelenkshöhle durchtrennt wurden. Der vorgefundene Situs wurde abfotografiert und der Meniskus makroskopisch beurteilt. Die Integration des Biomaterials und des Reparaturgewebes, die Stabilität und Lokalisation der Menisken, die Oberflächen der Menisken und die Beschaffenheit der Gelenkoberflächen wurden qualitativ beurteilt. Diese Beurteilung wurde durch einen erfahrenen Orthopäden (Dr. med. Johannes Zellner) und einen erfahrenen Anatomen (Dr. rer. nat. Richard Kujat) vorgenommen. Beide haben umfassende Erfahrung sowohl auf dem Gebiet der Meniskusreparatur, als auch bei Tierversuchen mit Kaninchen.

Nach der Beurteilung wurde der Meniskus lateralıs entnommen und sofort in Standardfixans mit 15 % Pikrinsäure überführt. Darin wurde der Meniskus 4 Stunden lang fixiert.

Vor der Einbettung in TissueTek wurde der entnommene Meniskus nochmals makroskopisch in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert.

### **2.2.7.5 Histologie**

Der Meniskus wurde wie oben beschrieben in TissueTek eingebettet, wobei der Meniskus als Ganzes im Block zu liegen kam. Pro Meniskus wurden 50 horizontale Schnitte erstellt, die den gesamten Meniskus abbildeten. Es wurden eine wässrige DMMB-Färbung und eine DMMB-Färbung mit Entwässerung durchgeführt. Außerdem wurden immunhistochemische Kollagen I-, Kollagen II- und CD31-Färbungen durchgeführt. Die CD31-Färbung erfolgte zur Darstellung der Gefäße.

### **2.2.7.6 Scoring**

Zur standardisierten Evaluation der Reparatur von Meniskusdefekten wurde am Lehrstuhl für Unfallchirurgie der Universität Regensburg ein Scoringssystem veröffentlicht. [8] Das Scoringssystem wurde bereits in mehreren Versuchen verwendet und ist für die Bewertung des verwendeten Defektmodells etabliert. Es bezieht makroskopische und mikroskopische Auswertung mit ein. Das Scoringssystem besteht aus 8 Einzelitems, welche jeweils Werte von 0 (=meniskusuntypisch, schlecht) bis 3 (=meniskustypisch, gut) annehmen können. Die Einzelwerte lassen sich zu einem Gesamtscore summieren, welcher Werte von 0 (=kein Reparaturgewebe) bis 24 (=meniskusähnliches Reparaturgewebe) erreichen kann. Durch die hohe interne Konsistenz des Scores (Cronbach's  $\alpha = 0,88$ ) ist diese Summenbildung legitim. [8] Folgende Einzelitems werden betrachtet: makroskopische Defektfüllung, Oberfläche, Integration, Zellzahl, Zellmorphologie, Proteoglykangehalt, Kollagen Typ II-Gehalt und Stabilität.

Die Gesamtergebnisse der beiden Versuchsgruppen wurden statistisch ausgewertet. Dem Versuchsaufbau entsprechend erfolgte ein gepaarter t-Test für die Gesamtscoringergebnisse, bei dem jeweils die Gruppe mit dem zellfreien Scaffold mit der Gruppe mit dem zellbesiedelten Scaffold desselben Zeitpunkts verglichen wurde.

Zur besseren Übersichtlichkeit folgt eine Darstellung des Scoringystems in tabellarischer Form. (Tabelle 2)

Scoringwert	0	1	2	3
Makroskopische Defektfüllung	Keine Füllung	<25 %	25-75 %	>75 %
Oberfläche	Keine Oberfläche	Komplettriss	Rau, zerklüftet	Meniskoider Schichtaufbau
Integration	Keine Integration	Partielle, einseitige Integration	Beidseits partielle bzw. einseitig komplette Integration	Beidseits komplette Integration
Zellzahl	Keine Zellen	>10 Zellcluster/Schnitt	<10 Zellcluster/Schnitt Zell/ Matrixverhältnis >0,5	Meniskus-ähnliches Verhältnis
Zellverteilung/-morphologie	Keine meniskoiden Zellen, Fibroblasten	<25 % meniskoide Zellen	25-75 % meniskoide Zellen	>75 % meniskoide Zellen
Proteoglykangehalt	Keine Färbung	<25 %	25-75 %	>75 %
Kollagen Typ II-Gehalt	Kein Kollagen II	<25 %	25-75 %	>75 %
Stabilität	Keine Stabilität	Weich, gerissen	formstabil	Druck- und zugelastisch

**Tabelle 2 Scoringssystem für die in vivo Analyse. Ursprünglich publiziert von Zellner et al. [8]**

### 2.2.7.7 Statistik

Die Erstellung von Tabellen und Datensätzen erfolgte mit Microsoft Excel. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS. Die grafische Darstellung in Balkendiagrammen erfolgte ebenfalls mit SPSS. Zunächst wurde eine deskriptive Statistik erstellt, wobei beim in vivo Versuch jeweils die Mittelwerte und die Konfidenzintervalle der Gesamtscorewerte für die Kontrollgruppe (zellfreies Implantat) und die Therapiegruppe (zellbesiedeltes Implantat) unter Berücksichtigung der beiden Entnahmezeitpunkte (6 Wochen und 12 Wochen) berechnet wurden. Selbiges erfolgte auch für die Einzelitems Integration und Proteoglykangehalt. Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Beim Vergleich von normalverteilten Variablen wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Beim Vergleich von nicht normalverteilten Variablen wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag dabei jeweils bei  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

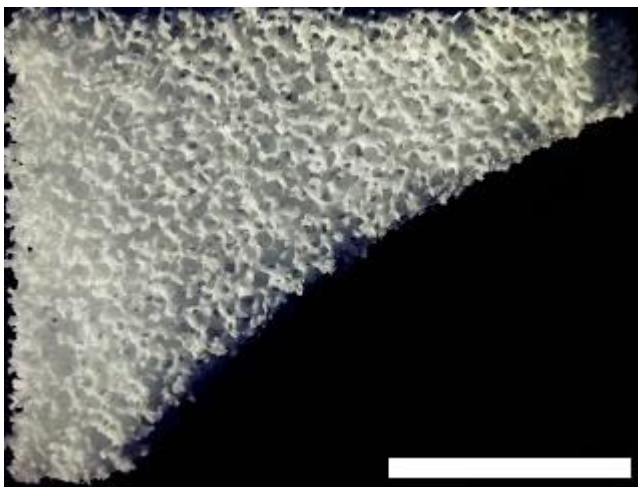
#### 3.1 In vitro Testung von verschiedenen Scaffolds für die Meniskusregeneration mit mesenchymalen Stammzellen

Wie oben beschrieben wurde eine intensive Materialtestung verschiedener Biomaterialien durchgeführt.

Um die Porengeometrie zu untersuchen, wurden die Oberflächen der Scaffolds fotografiert. Die Interkonnektivität der Poren wurde mittels Befüllung mit einer Berliner-Blau-BSA dargestellt. In einem in vitro Versuch wurden Scaffold-Zylinder mit humanen mesenchymalen Stammzellen befüllt und eine 21-tägige in vitro Chondrogenese durchgeführt. Histologisch wurden dann die Zellverteilung, die Vitalität der Zellen und die Bildung von extrazellulärer Matrix (DMMB-Färbung) analysiert. Mittels immunhistochemischen Färbungen wurden schließlich die Bildung von Kollagen I und die Bildung von Kollagen II untersucht.

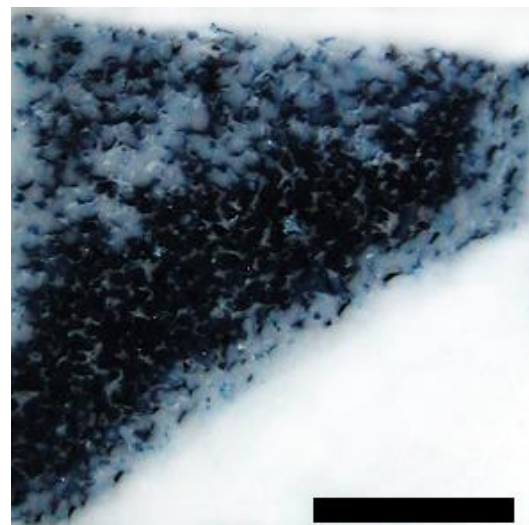
##### 3.1.1 Actifit®

In der Oberflächenaufnahme (Abbildung 3.1) zeigten sich durchwegs einheitlich große Poren



**Abbildung 3.1** Makroskopische Oberflächenaufnahme eines Actifit®-Scaffolds.

**Balken = 1 mm**

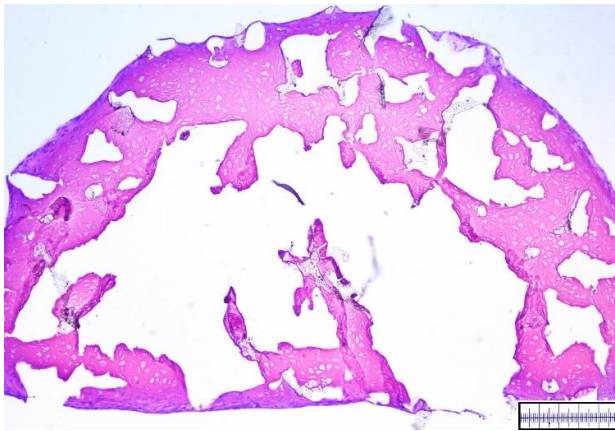


**Abbildung 3.2** Darstellung der Porengeometrie eines Actifit®-Scaffolds. Schwarze Bereiche bedeuten eine Zugänglichkeit der entsprechenden Poren, weiße Bereiche zeigen nach außen abgeschlossene, unzugängliche Poren an. **Balken = 1 mm**

mit einer gleichmäßigen Struktur. Die Befüllung mit der Berliner-Blau-Lösung (Abbildung 3.2) zeigte eine starke Interkonnektivität der Poren vor allem im Innenbereich der Matrix.

## Ergebnisse

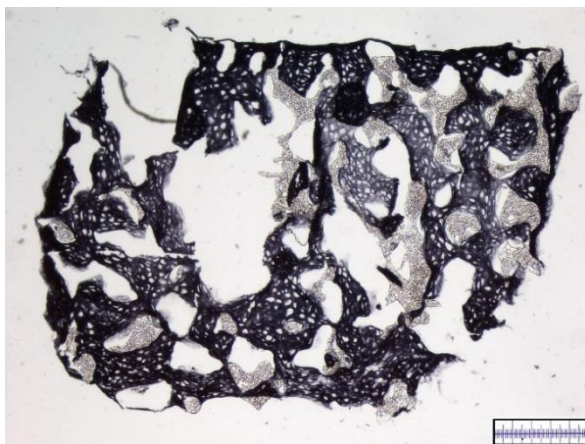
In der Peripherie blieben jedoch einige Poren leer, schienen also unzugänglich. Im Beimpfversuch ließen sich die Scaffolds gleichmäßig über die gesamte Matrix hinweg gut befüllen. Die Zellen adhärten gut an dem Biomaterial.



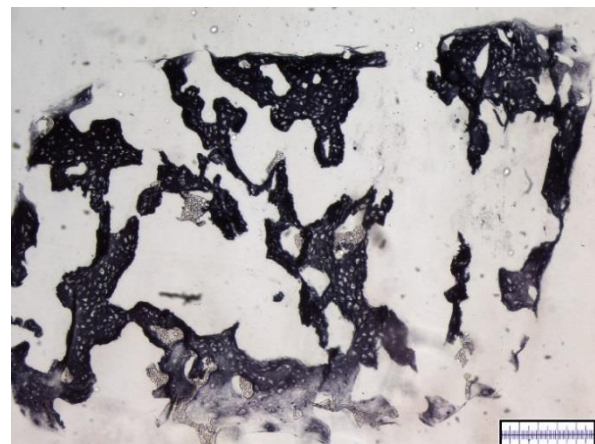
**Abbildung 3.3** Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Rötlich imponierende Extrazellulärmatrix umgibt die Zellen. Das Actifit® ist porös und gräulich-weiß. Die großen Löcher im Zentrum des Schnitts sind auf Schneide- und Färbeartefakte zurückzuführen. Balken = 500 µm

Nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese gab es keinerlei Anzeichen für Zelltod, alle Zellen imponierten vital. Die Poren der Scaffolds waren dicht mit in der DMMB-Färbung (Abbildung 3.3) metachromatischer, also proteoglykanreicher, extrazellulärer Matrix gefüllt. Immunhistochemisch zeigten sich große Mengen an Kollagen I (Abbildung 3.4) und Kollagen II (Abbildung 3.5).

Nach der Chondrogenese waren die Scaffolds druck- und zugstabil und imponierten in der Konsistenz meniskusähnlich. Eine Degradation wurde nicht beobachtet.



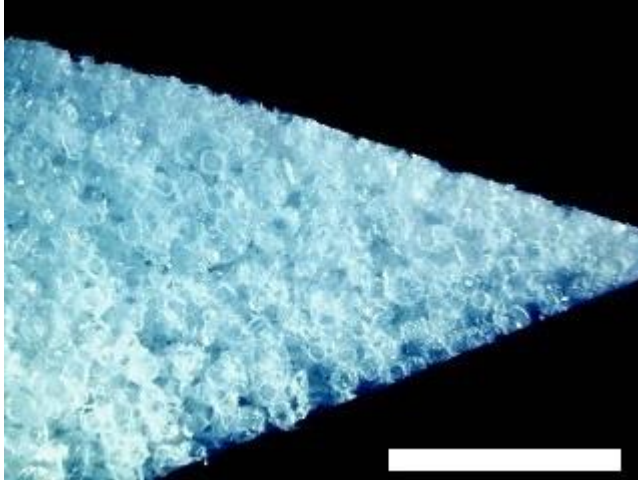
**Abbildung 3.4** Immunhistochemische Färbung von Kollagen I eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm



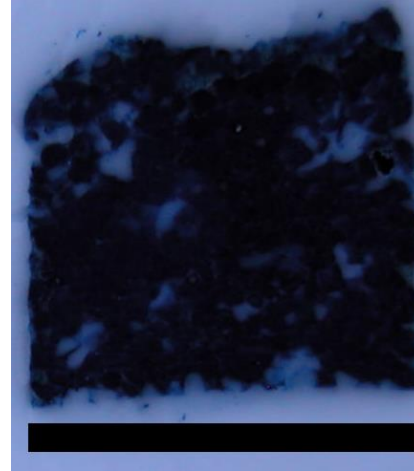
**Abbildung 3.5** Immunhistochemische Färbung von Kollagen II eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm

### 3.1.2 Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds

In der Oberflächenaufnahme (Abbildung 3.6) zeigten sich durchwegs einheitlich große Poren mit einer gleichmäßigen Struktur. Die Befüllung mit der Berliner-Blau-Lösung (Abbildung 3.7) zeigte eine starke Interkonnektivität der Poren über die gesamte Matrix.



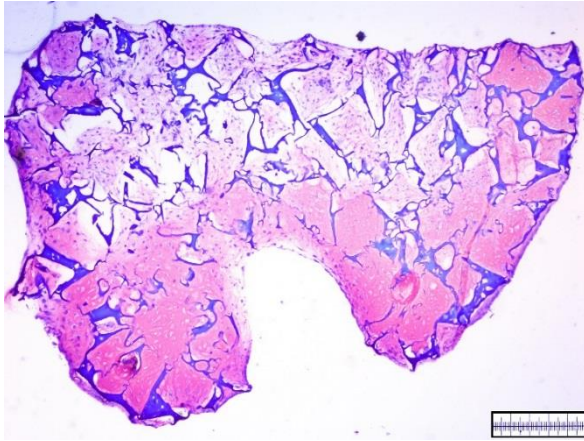
**Abbildung 3.6** Makroskopische Oberflächenaufnahme eines Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds. Balken = 1 mm



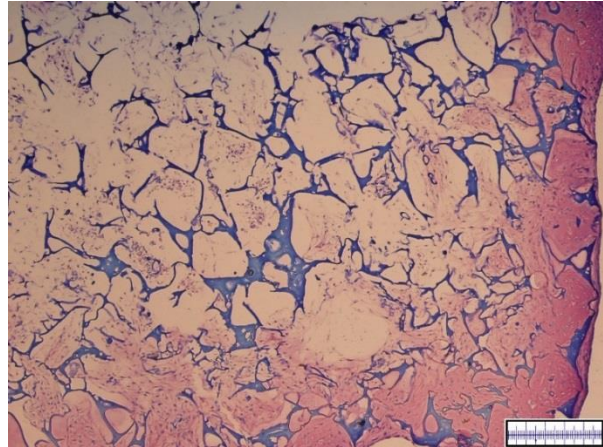
**Abbildung 3.7** Darstellung der Porengeometrie eines Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds. Schwarze Bereiche bedeuten eine Zugänglichkeit der entsprechenden Poren, weiße Bereiche zeigen nach außen abgeschlossene, unzugängliche Poren an. Balken = 2 mm

Im Beimpfversuch ließen sich die Scaffolds gleichmäßig über die gesamte Matrix hinweg gut beimpfen. Die Zellen adhärten gut an dem Biomaterial. Nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese imponierten die Zellen in der Peripherie der Scaffolds vital, jedoch zeigten sich zentral nekrotische Anteile mit avitalen Zellen. Dementsprechend fand zwar in den Außenzonen Bildung von reichlich in der DMMB-Färbung (Abbildung 3.8) metachromatisch imponierender, also proteoglykanreicher, extrazellulärer Matrix statt, im zentralen Anteil (Abbildung 3.9) dagegen war dies kaum der Fall. Ebenso wurden nur in den Randbereichen der Matrix reichlich Kollagen I (Abbildung 3.10) und Kollagen II (Abbildung 3.11) gebildet.

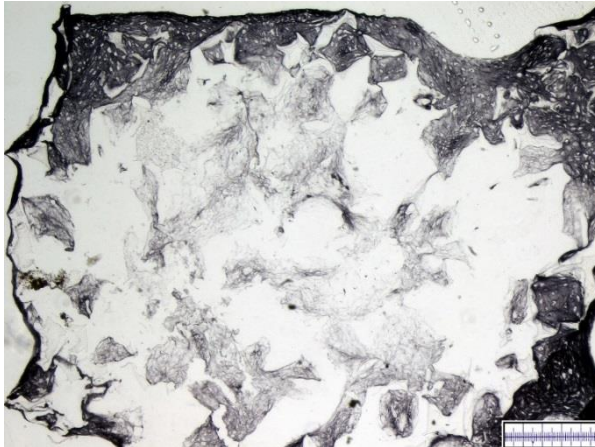
Nach 21 Tagen in chondrogenem Medium wiesen die Scaffolds schon augenscheinlich Degradation auf. Sie imponierten instabil und Brösel lösten sich bereits bei leichtem Druck oder Zug. Eines der 10 Scaffolds (5 normal behandelt, 5 extra gespült) musste aus dem Versuch herausgenommen werden, da sich in ihm eine Kontamination fand.



**Abbildung 3.8** Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Schnitt durch den Randbereich des Scaffolds. Extrazellulärmatrix imponiert rötlich. Scaffoldmaterial imponiert bläulich. Balken = 500  $\mu\text{m}$

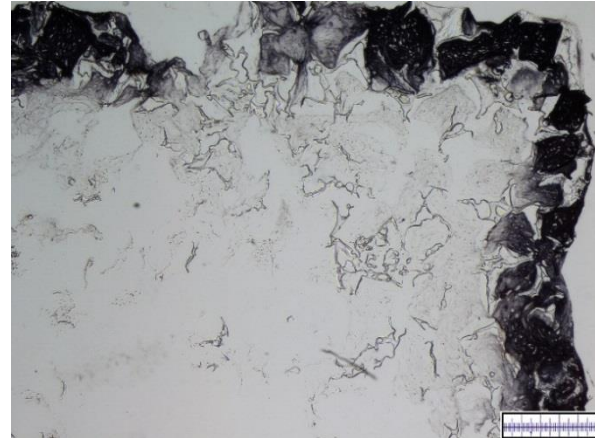


**Abbildung 3.9** Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Schnitt durch den zentralen Bereich des Scaffolds mit sichtbarem Zelluntergang. Extrazellulärmatrix imponiert rötlich. Scaffoldmaterial imponiert bläulich. Balken = 500  $\mu\text{m}$



**Abbildung 3.10** Immunhistochemische Kollagen I-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz.

Balken = 500  $\mu\text{m}$



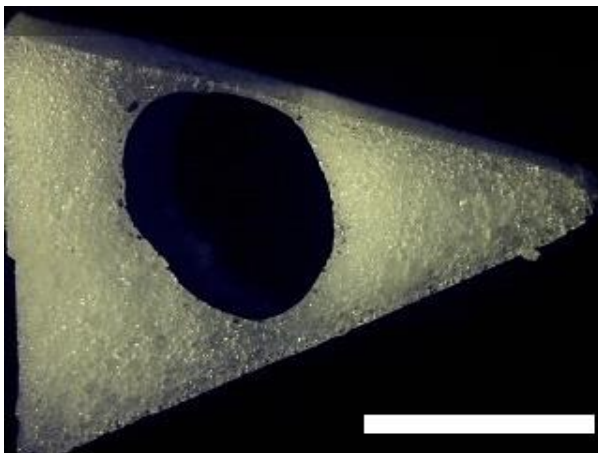
**Abbildung 3.11** Immunhistochemische Kollagen II-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz.

Balken = 500  $\mu\text{m}$

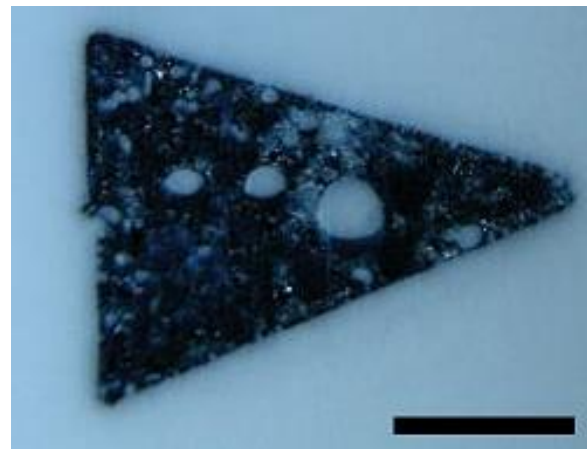
### 3.1.3 Poröser Polyurethanschaum mit Kollagenfasern

Die Ergebnisse der Scaffolds aus porösem Polyurethanschaum mit Kollagenfasern werden zur Vereinfachung hier gemeinsam dargestellt. Da die Ergebnisse bei allen Scaffolds der Gruppe ähnlich waren können so im Wesentlichen die entscheidenden Punkte in Kürze dargestellt werden.

In der Oberflächenaufnahme (Abbildung 3.12) zeigte sich eine ungleichmäßige Porenstruktur, teilweise besaßen einzelne Poren einen Durchmesser von mehreren Millimetern. Die Befüllung mit der Berliner-Blau-Lösung (Abbildung 3.13) zeigte eine eingeschränkte Interkonnektivität der Poren. Im gesamten Bereich der Matrix blieben große Areale farblos, waren also nicht zugänglich.



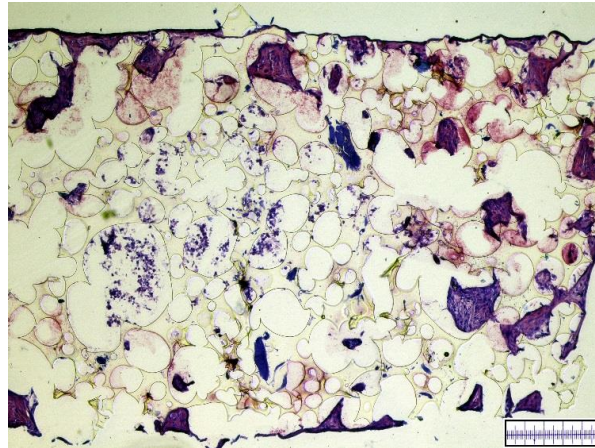
**Abbildung 3.12 Makroskopische Oberflächenaufnahme eines Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds. Balken = 1 mm**



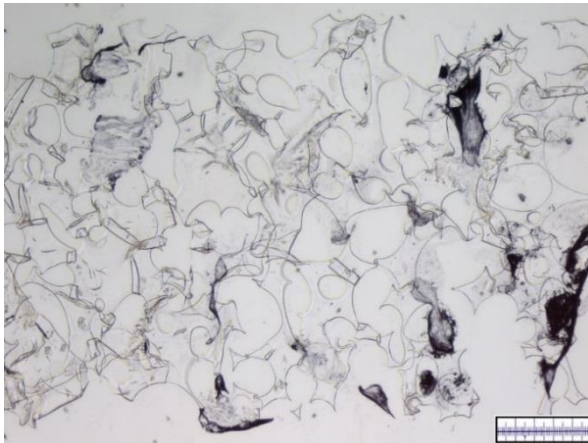
**Abbildung 3.13 Darstellung der Porengeometrie eines Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds. Schwarze Bereiche bedeuten eine Zugänglichkeit der entsprechenden Poren, weiße Bereiche zeigen nach außen abgeschlossene, unzugängliche Poren an. Balken = 1 mm**

Im Beimpfversuch ließen sich die Scaffolds schlecht beimpfen. Die Verteilung der Zellen war ungleichmäßig und letztlich blieb der Großteil der Matrix zellfrei. Zellen fanden sich nur vereinzelt, dann zumeist konzentriert auf ein kleines Areal. Die Zellen konnten sich nur schlecht an dem Biomaterial adhären. Nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese gab es Anzeichen für Zelltod, gerade in den zentralen Anteilen der Scaffolds zeigte sich Detritus. Extrazelluläre Matrix wurde kaum gebildet und das wenige gebildete Material schien nur wenig Proteoglykane zu enthalten (Abbildung 3.14).

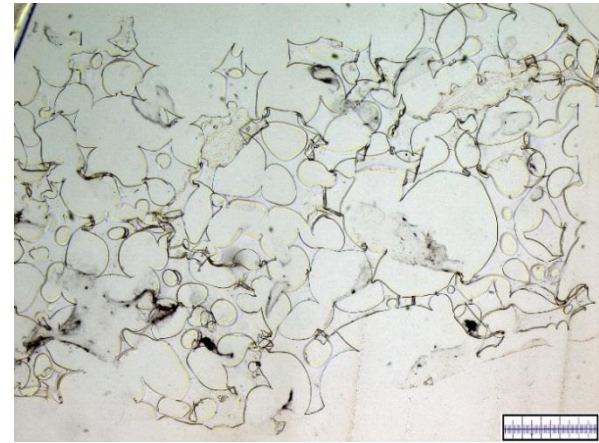
Immunhistochemisch zeigten sich nur geringe Mengen an Kollagen I (Abbildung 3.15) und Kollagen II (Abbildung 3.16). In manchen der Scaffolds wurde praktisch gar kein Kollagen II gebildet.



**Abbildung 3.14** Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Extrazellulärmatrix imponiert lila, etwas dunkler imponieren die darin enthaltenen Zellen. Zentral erscheinen nekrotische Zellen als unscharfe lila Flecken. Das Scaffoldmaterial imponiert transparent-weißlich. Balken = 500  $\mu\text{m}$



**Abbildung 3.15** Immunhistochemische Kollagen I Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Scaffoldmaterial imponiert transparent-weißlich. Balken = 500  $\mu\text{m}$

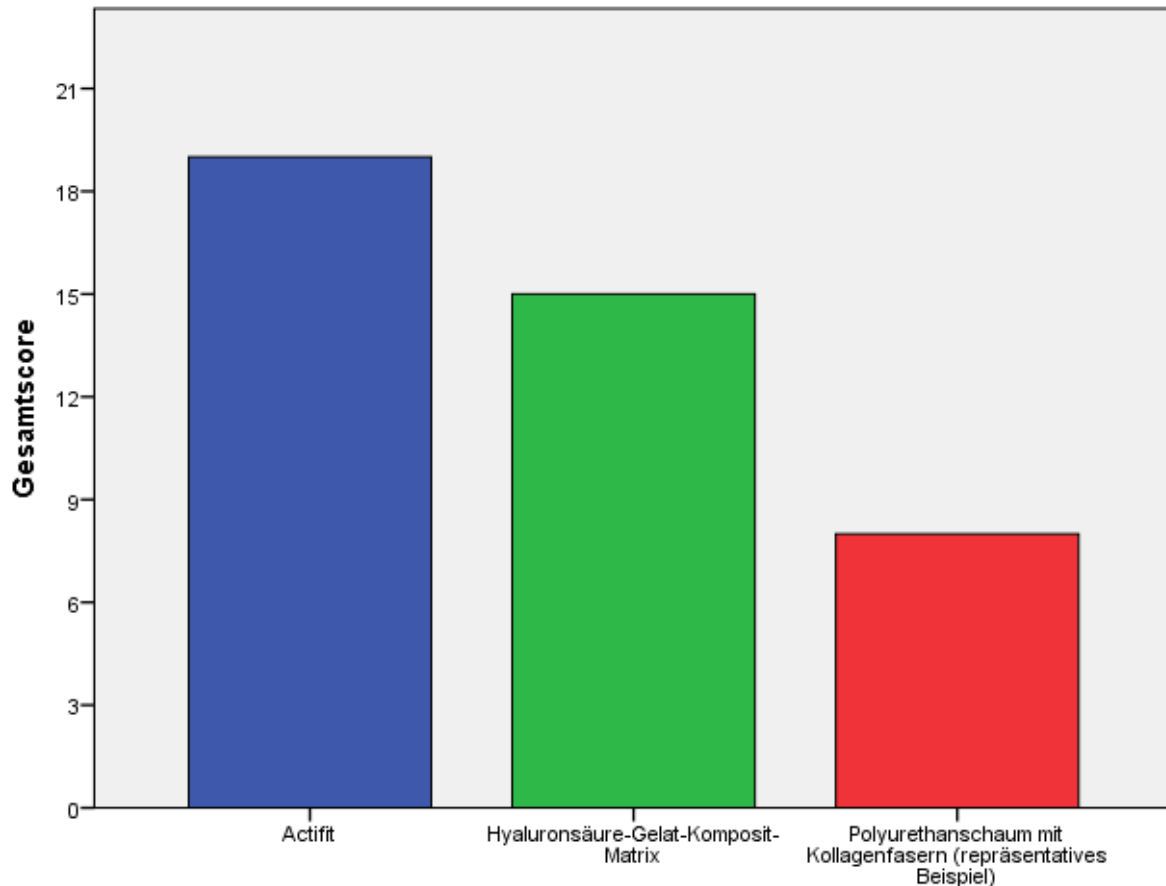


**Abbildung 3.16** Immunhistochemische Kollagen II Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Scaffoldmaterial imponiert transparent-weißlich. Balken = 500  $\mu\text{m}$

Nach der Chondrogenese waren die Scaffolds in Konsistenz und Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Ausgangszustand unverändert. Eine Degradation wurde nicht beobachtet.

### 3.1.4 Scoring

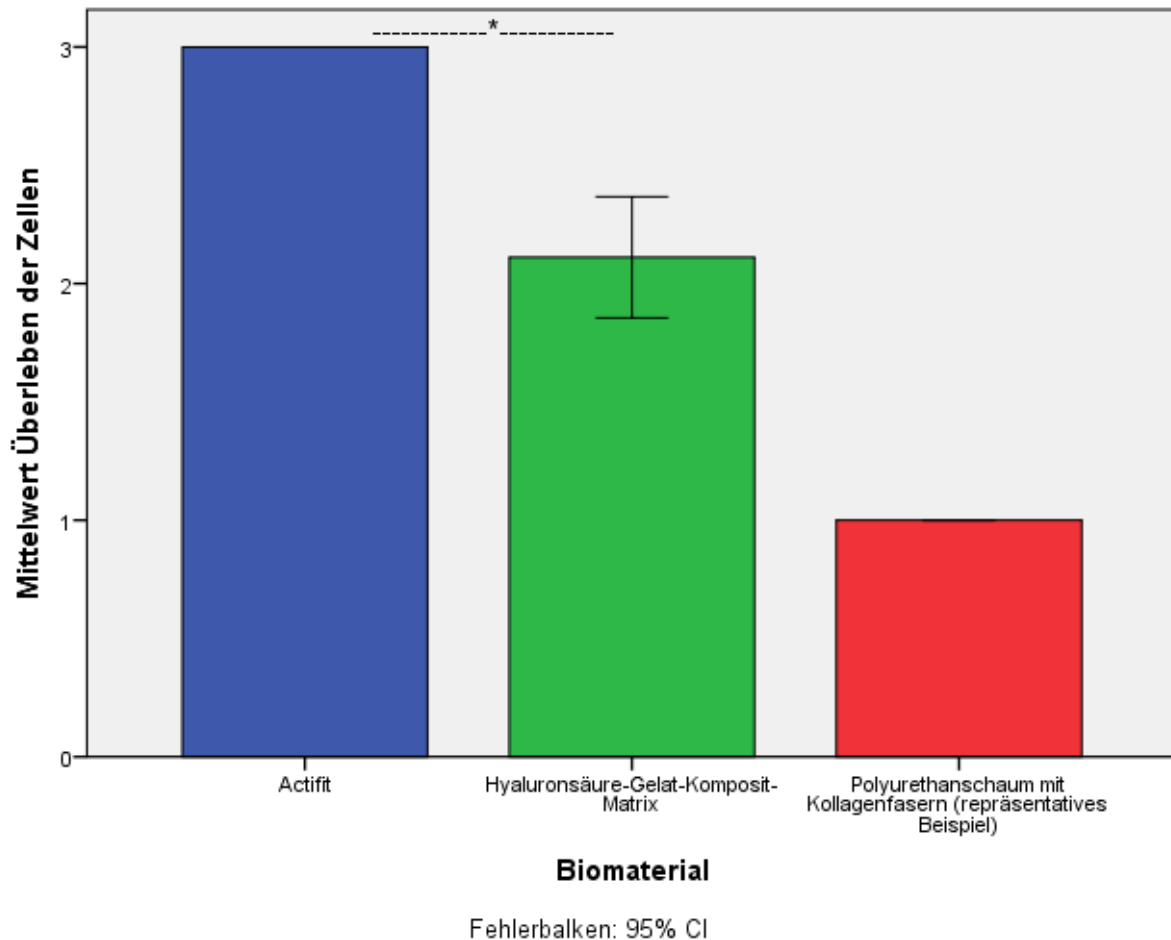
Im Gesamtscoring (Abbildung 3.17) schnitt Actifit® mit 19 Punkten am besten ab. Die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix erhielt 15 Punkte. Deutlich schlechter waren die Polyurethan-Kollagenfaserscaffolds zu bewerten. Sie erhielten Gesamtscoringergebnisse zwischen 6 und 9 Punkten.



**Abbildung 3.17 Diagramm Gesamtscoringergebnisse der getesteten Biomaterialien: Actifit® (im Diagramm blau) erreichte den höchsten Scoringwert, danach folgte die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix (im Diagramm grün). Deutlich geringere Scoringwerte erreichten die Polyurethan-Kollagenfaserscaffolds (im Diagramm rot).**

Die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix erhielt einen Punkt mehr als Actifit® für die Interkonnektivität der Poren. Jedoch erhielt Actifit® statistisch signifikant mehr Punkte beim Überleben der Zellen (Abbildung 3.18) im Biomaterial bei der in vitro Chondrogenese. Bei der Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix waren in den zentralen Anteilen viele nekrotische Zellen zu sehen.

Dementsprechend wurden in diesen Arealen auch weniger Proteoglykane und Kollagen II gebildet, wodurch weitere Punkte eingebüßt wurden.



**Abbildung 3.18** Diagramm Scoringwerte für das Überleben und die Vitalität der Zellen in den Scaffolds. Signifikant bessere Werte für Actifit®-Scaffolds (im Diagramm blau, n=5) im Vergleich zur Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix (im Diagramm grün, n=9) nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung *in vitro* (\*= $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test). Zum Vergleich ist ein Vertreter der deutlich schlechter abscheidenden Polyurethan-Kollagenfaserscaffolds (im Diagramm rot, n=5) mit aufgeführt. (CI = 95 % Konfidenzintervall)

### 3.2 In vitro Analyse der Eignung eines Actifit®-Scaffolds für Tierversuche am Neuseelandhasen

Wie oben beschrieben, wurden zylindrische Actifit®-Scaffolds mit mesenchymalen Kaninchenstammzellen oder mit Chondrozyten aus Kaninchenmenisken befüllt und unter chondrogenen Bedingungen 21 Tage kultiviert.

Das Biomaterial Actifit® stellte im *in vitro* Versuch ein geeignetes Scaffold für Kaninchenchondrozyten dar. Ebenso ist *in vitro* die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Neuseelandhasen in diesem Material möglich.

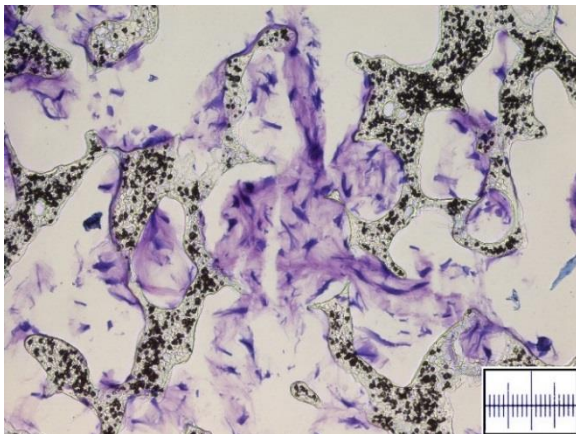
### 3.2.1 Mit Chondrozyten befüllte Scaffolds

In der DMMB-Färbung (Abbildung 3.19) zeigte sich nach 21 Tagen Differenzierung in chondrogenem Medium folgendes Bild:

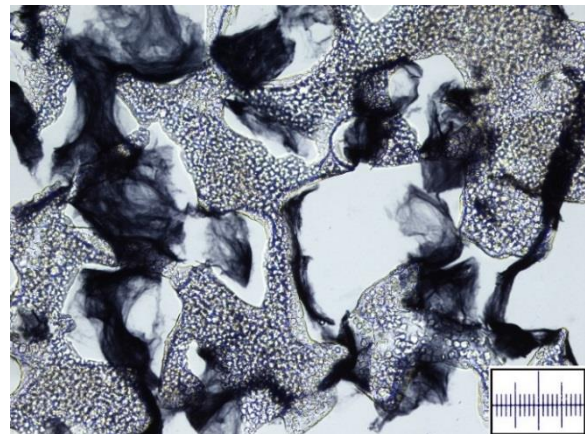
Von den 6 mit Chondrozyten beimpften Matrices waren 3 nur spärlich mit Zellen besiedelt. Diese 3 sind gleichzeitig mit derselben Zelllinie in einem Beimpfröhrchen beimpft worden. Auch die Matrix, die als zugehörige Beimpfkontrolle nach einem Tag entnommen wurde, zeigte eine nur spärliche Beimpfung mit Zellen. Dies legt nahe, dass der Beimpfvorgang fehlerhaft war, vermutlich war das angesetzte Vakuum nicht stark genug.

Trotz der spärlichen Besiedelung konnte in der DMMB-Färbung nach 21 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium die Bildung von metachromatischer extrazellulärer Matrix beobachtet werden, entsprechend der geringen Zellzahl jedoch in dementsprechend geringem Umfang.

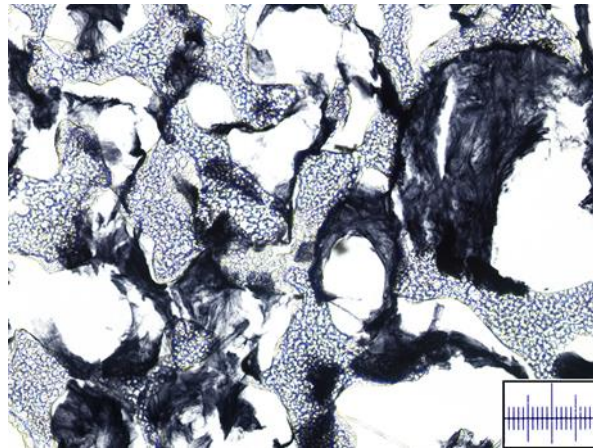
Die anderen 3 mit Chondrozyten beimpften Matrices zeigten nach 21 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium eine dichtere Besiedelung mit Zellen und auch eine stärker ausgeprägte Bildung von extrazellulärer Matrix.



**Abbildung 3.19** Wässrige DMMB-Färbung: Actifit® mit Chondrozyten befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Extrazellulärmatrix imponiert lila, die darin enthaltenen Zellen in dunklerem lila. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 200  $\mu\text{m}$



**Abbildung 3.20** Kollagen I immunhistochemische Färbung: Actifit® mit Chondrozyten befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 200  $\mu\text{m}$



**Abbildung 3.21 Kollagen II immunhistochemische Färbung: Actifit® mit Chondrozyten befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 200 μm**

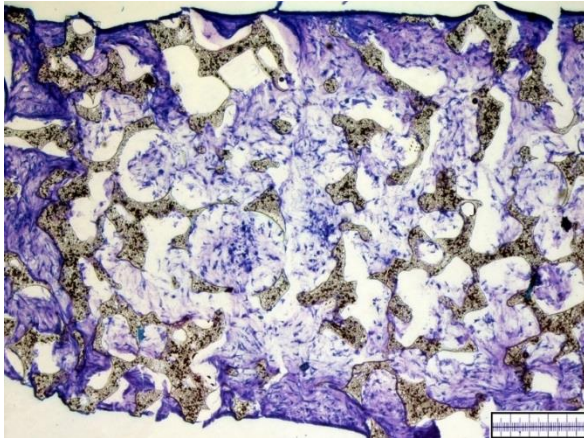
Die Immunhistochemie mit Kollagen I-Antikörpern (Abbildung 3.20) und Kollagen II-Antikörpern (Abbildung 3.21) nach 21 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium zeigte folgende Ergebnisse:

In den mit Chondrozyten beimpften Matrices wurde bei allen Matrices in gleichem Maße reichlich Kollagen I und Kollagen II gebildet, welches sich homogen über die gesamte Matrix erstreckte. Der hohe Gehalt an Kollagen ähnelt dem Aufbau von Meniskusgewebe.

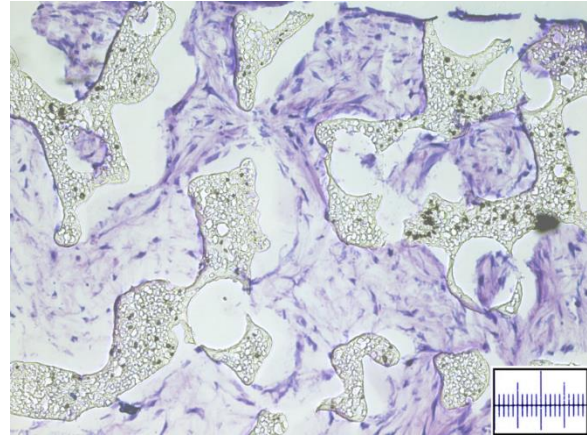
### **3.2.2 Mit mesenchymalen Stammzellen befüllte Scaffolds**

Zwei der mit mesenchymalen Stammzellen beimpften Matrices imponierten in der DMMB-Färbung nach 21 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium nahezu komplett zellfrei und zeigten somit auch keinerlei extrazelluläre Matrixbildung. Auch die zugehörige Beimpfkontrolle war ebenso zellfrei. Da diese drei Matrices wiederum gleichzeitig beimpft worden waren, lag auch hier vermutlich ein technischer Fehler beim Beimpfvorgang vor.

Drei weitere mit mesenchymalen Stammzellen beimpfte Matrices zeigten nach 21 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium eine dichte und gleichmäßige Zellbesiedelung mit reichlicher Bildung von metachromatischer, glykosaminreicher extrazellulärer Matrix (Abbildungen 3.22 und 3.23).



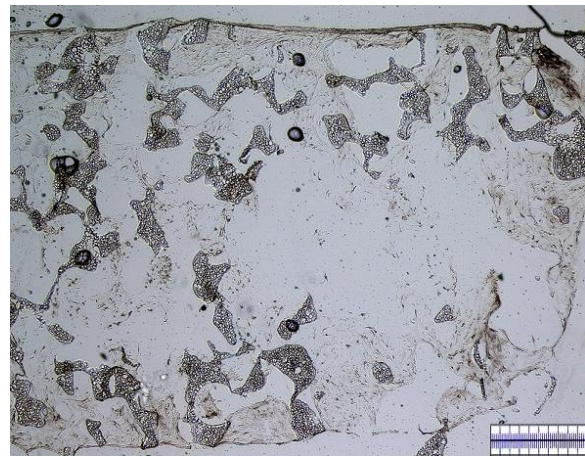
**Abbildung 3.22** Wässrige DMMB-Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Extrazellulärmatrix imponiert lila, die darin enthaltenen Zellen in dunklerem lila. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm



**Abbildung 3.23** Wässrige DMMB-Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Extrazellulärmatrix imponiert lila, die darin enthaltenen Zellen in dunklerem lila. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 200 µm



**Abbildung 3.24** Kollagen I immunhistochemische Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm



**Abbildung 3.25** Kollagen II immunhistochemische Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm

Die Immunhistochemie mit Kollagen I-Antikörpern (Abbildung 3.24) und Kollagen II-Antikörpern (Abbildung 3.25) nach 21 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium zeigte folgende Ergebnisse: In den 3 erfolgreich mit mesenchymalen Stammzellen beimpften Matrices konnte reichlich dichte, gleichmäßig verteilte Bildung von Kollagen I festgestellt werden. Jedoch wurde nur wenig Kollagen II gebildet, welches sich größtenteils in einzelnen Arealen der Matrices konzentrierte.

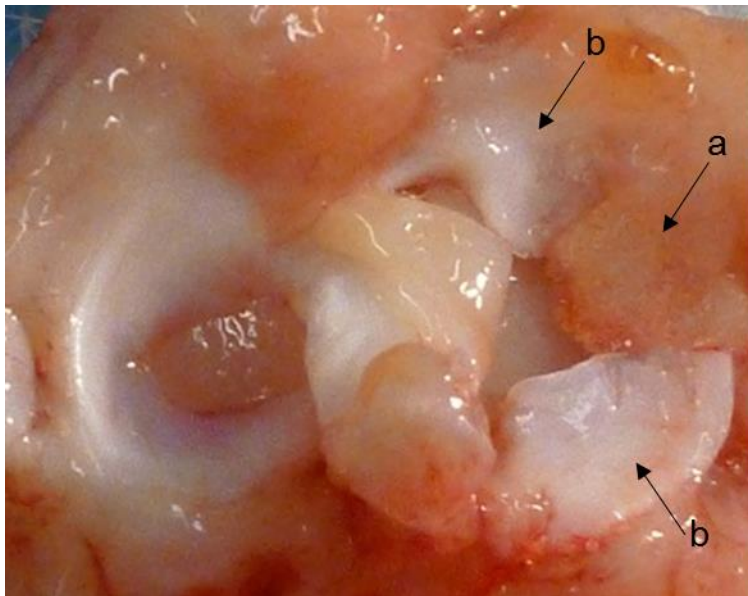
### 3.3 In vivo Analyse: Regeneration von gemischt vaskulär-avaskulären Defekten des lateralen Meniskus im Tiermodell

Wie oben beschrieben, wurde in Neuseelandhasen die Pars intermedia des Meniskus lateralis entnommen und der entstandene Defekt mit einer Actifit®-Matrix gefüllt. In das linke Knie wurde ein mit autologen mesenchymalen Stammzellen besetztes Konstrukt eingesetzt und in das kontralaterale Knie ein zellfreies Konstrukt. Nach 6, beziehungsweise 12 Wochen, wurde das entstandene Reparaturgewebe beurteilt.

#### 3.3.1 Ergebnisse der Meniskusreparatur nach 6 Wochen

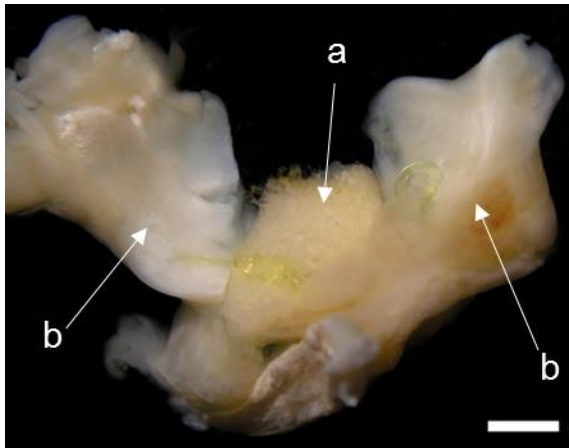
##### 3.3.1.1 Meniskusdefektregeneration mit einer zellfreien Polyurethanmatrix nach 6 Wochen

6 Wochen nach Implantation eines zellfreien Actifit®-Scaffolds zeigte sich in allen Tieren (n=7) ein makroskopisch klar abgrenzbarer Defekt.

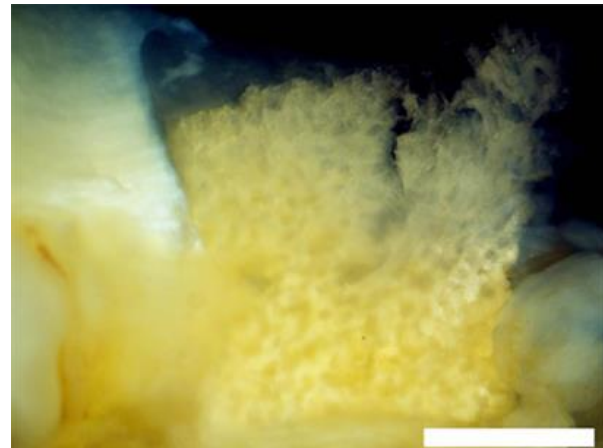


**Abbildung 3.26 In situ: Meniskusregeneration mit einem zellfreien Actifit® Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Der Defekt ist annähernd komplett gefüllt. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus.**

Nur in einem Tier zeigte sich eine annähernd komplette Füllung des Defekts (Abbildung 3.26), während in 6 Tieren eine partielle Füllung zu beobachten war. In 4 Fällen zeigte sich eine zerklüftete Oberfläche (Abbildung 3.28) und in 3 Fällen ein Komplettriss des Meniskus. Nur in einem Tier war das Reparaturgewebe komplett in den nativen Meniskus integriert. In weiteren 3 Tieren wurde lediglich eine beidseits partielle (Abbildung 3.27) oder nur einseitig komplette Integration erreicht. Bei 4 Tieren, also mehr als der Hälfte, wurde nur eine einseitig partielle Integration erreicht.

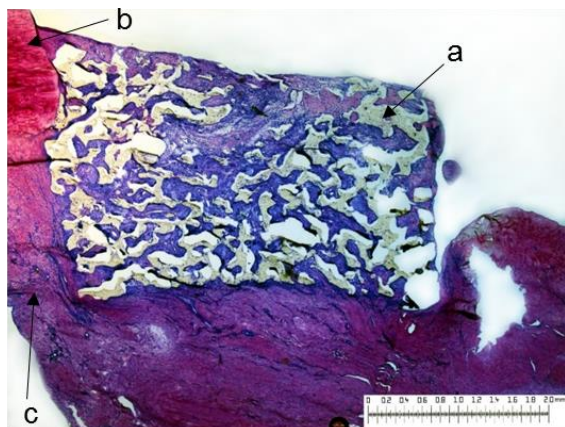


**Abbildung 3.27 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Der Defekt ist nur partiell gefüllt. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. Balken = 2 mm**



**Abbildung 3.28 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Balken = 2 mm**

Im Reparaturgewebe fand sich stets eine deutlich größere Zellzahl als in nativem Meniskusgewebe. Von diesen Zellen waren weniger als ein Viertel meniskoid.



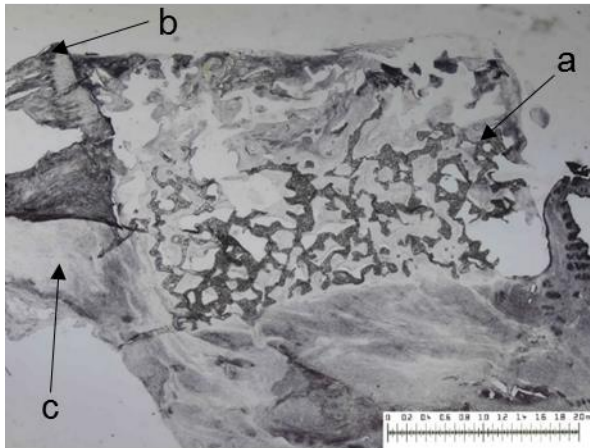
**Abbildung 3.29 Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Das Scaffold ist nur einseitig integriert. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2mm**

In allen Tieren fand sich im Reparaturgewebe nur ein geringer Anteil an Glykosaminoglykanen (Abbildung 3.29) und Kollagen II (Abbildung 3.31). Es fand sich jedoch ein hoher Gehalt an Kollagen I (Abbildung 3.30). Das entstandene Gewebe besaß wenig Stabilität und imponierte weich und teilweise gerissen.

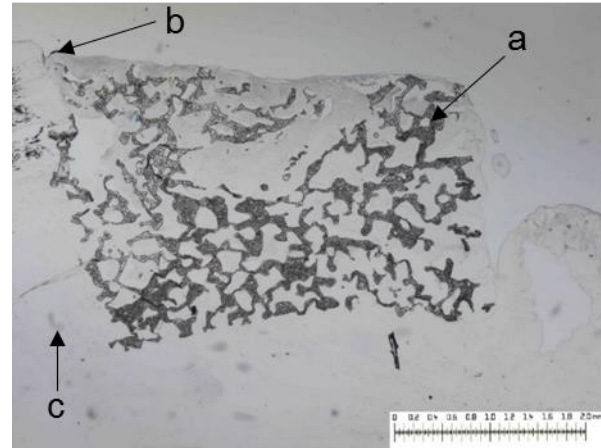
Das Biomaterial selbst war in allen Tieren noch nachweisbar und zeigte keinerlei Anzeichen von Degradation.

In einem Tier wurde in einem Kniegelenk ein Kniegelenksempyem beobachtet. Das Tier wurde aus dem Versuch herausgenommen.

Bei keinem der anderen Tiere fanden sich Entzündungsreaktionen. Im Bereich der Scaffolds fanden sich histologisch weder Riesenzell- noch Fremdkörperreaktionen.

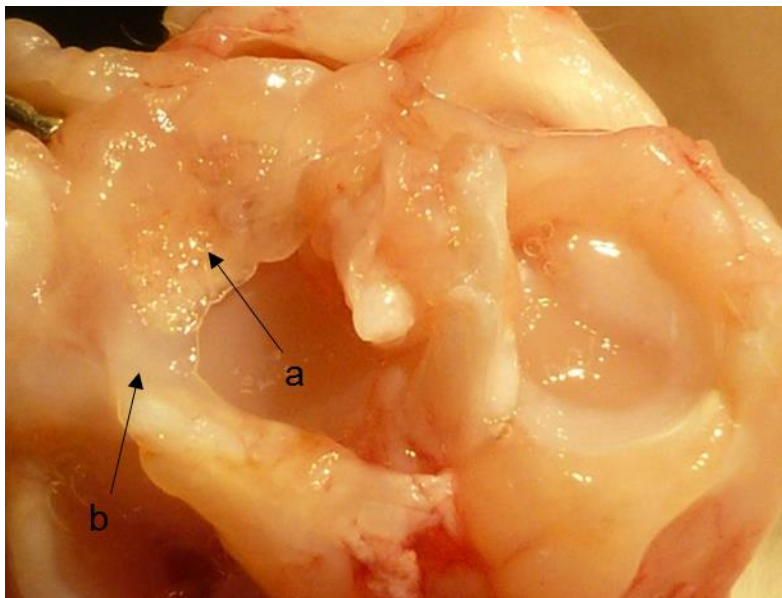


**Abbildung 3.30 Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm**



**Abbildung 3.31 Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm**

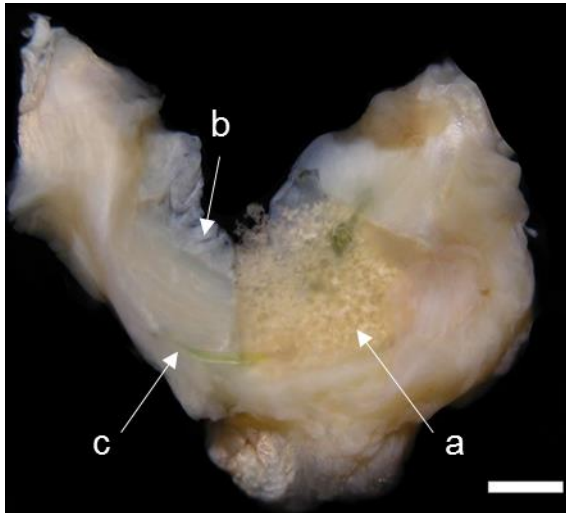
### 3.3.1.2 Meniskusdefektregeneration mit einer zellbesiedelten Polyurethanmatrix nach 6 Wochen



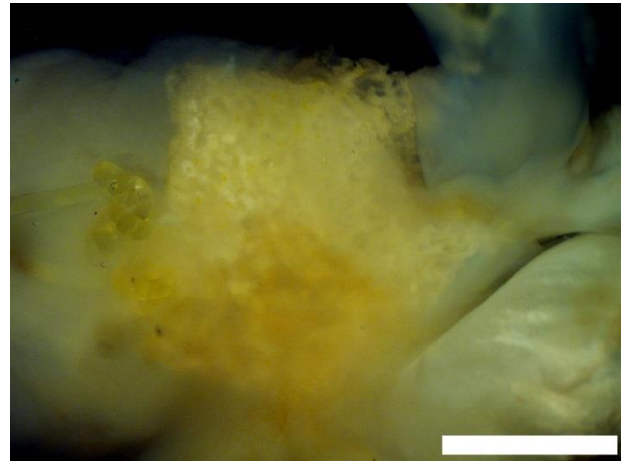
**Abbildung 3.32 In situ: Meniskusregeneration mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Der Defekt ist fast vollständig gefüllt. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus.**

Nach 6 Wochen zeigten sich bei der Meniskusreparatur mit einem zellbesiedeltem Actifit®-Scaffold (n=7) folgende Ergebnisse. Bei 4 Tieren zeigte sich eine fast vollständige Defektfüllung (Abbildungen 3.32, 3.33 und 3.34), bei 3 Tieren waren mehr als die Hälfte des Defekts gefüllt. Die Oberfläche des Reparaturmaterials war zwar bei allen Tieren rau, es gab aber keine Komplettrisse.

In 3 Fällen zeigte sich eine beidseits vollständige Integration des Regenerats in den nativen Meniskus. In 4 Fällen war das Regenerat nur einseitig komplett, oder beidseits partiell integriert.



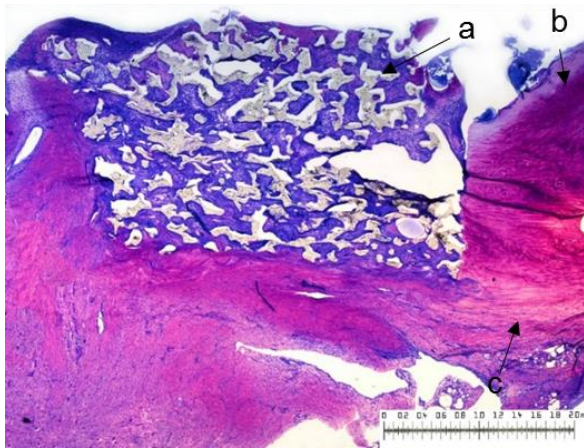
**Abbildung 3.33 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm**



**Abbildung 3.34 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Balken = 2 mm**

Im Vergleich mit der Zellzahl von nativem Meniskusgewebe war die Zellzahl im Reparaturgewebe in allen Fällen deutlich erhöht.

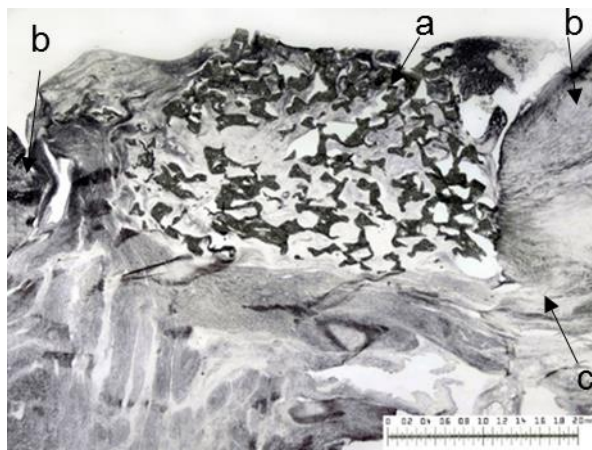
Bei 6 Tieren hatten im Reparaturgewebe mehr als ein Viertel der Zellen eine meniskoide Morphologie. Der Proteoglykangehalt (Abbildung 3.35) lag in allen Fällen zwischen 25 % und 75 %, ebenso wie der Kollagen I Gehalt (Abbildung 3.36).



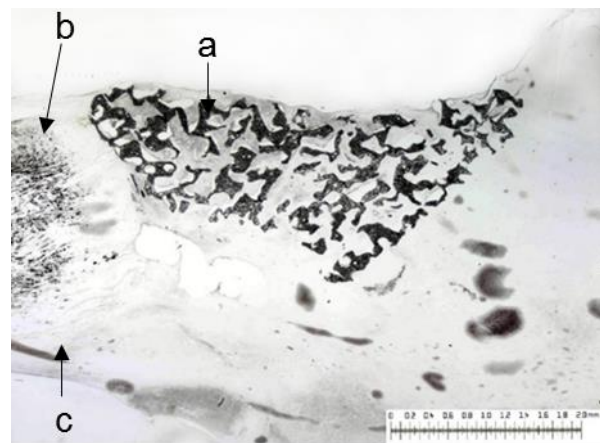
**Abbildung 3.35** Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm

Der Gehalt an Kollagen II lag unter 25 % (Abbildung 3.37). Das Reparaturgewebe war in 6 Fällen formstabil und in einem Fall weich und gerissen.

Das Biomaterial selbst war in allen Tieren noch nachweisbar und zeigte keinerlei Anzeichen von Degradation.



**Abbildung 3.36** Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm

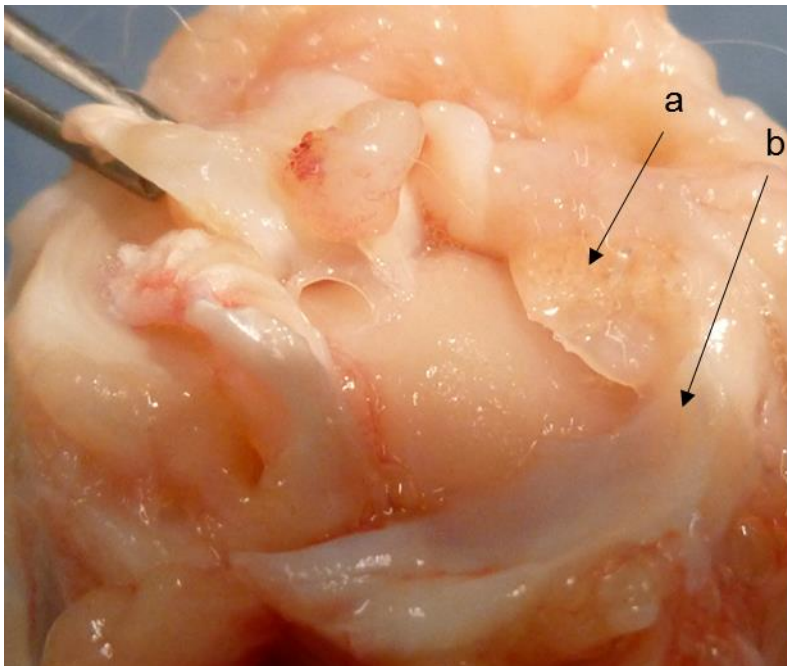


**Abbildung 3.37** Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm

### 3.3.2 Ergebnisse der Meniskusreparatur nach 12 Wochen

#### 3.3.2.1 Meniskusdefektregeneration mit einer zellfreien Polyurethanmatrix nach 12 Wochen

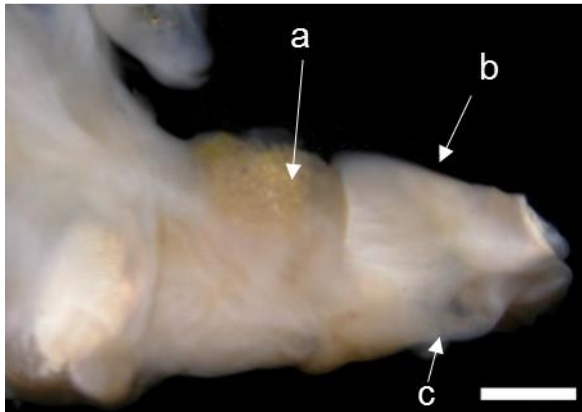
Nach 12 Wochen (n=10) zeigte die Defektreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold folgende Ergebnisse.



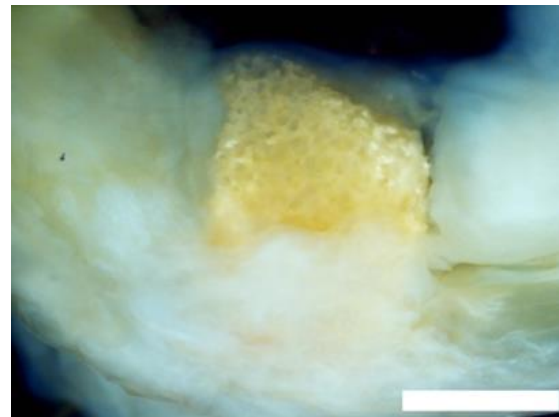
**Abbildung 3.38 In situ: Meniskusregeneration mit einem zellfreien Actifit® Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus.**

Noch immer ließ sich der Defekt makroskopisch bei allen Tieren klar abgrenzen. Bei 2 Tieren zeigte sich eine komplette Füllung des Defekts, bei 7 Tieren eine partielle Füllung (Abbildung 3.38) und bei einem Tier eine geringe Füllung mit Reparaturgewebe.

Bei 4 Tieren zeigte die Oberfläche des Reparaturgewebes einen meniskoiden Schichtaufbau, bei 5 Tieren erschien sie rau und zerklüftet und bei einem Tier zeigte sich ein kompletter Riss.



**Abbildung 3.39** Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm



**Abbildung 3.40** Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Balken = 2 mm

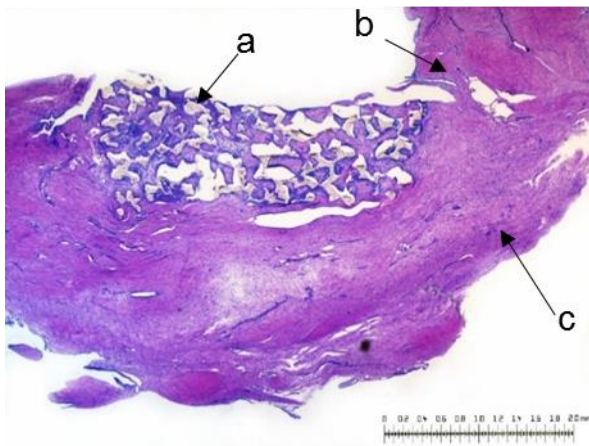
In 3 Fällen war das Reparaturgewebe komplett (Abbildung 3.39) in den nativen Meniskus integriert, in den restlichen Fällen zeigte sich eine beidseits partielle oder eine einseitig komplette Integration (Abbildungen 3.40 und 3.42).

Das Reparaturgewebe war im Vergleich zu nativem Meniskusgewebe deutlich zellreicher.

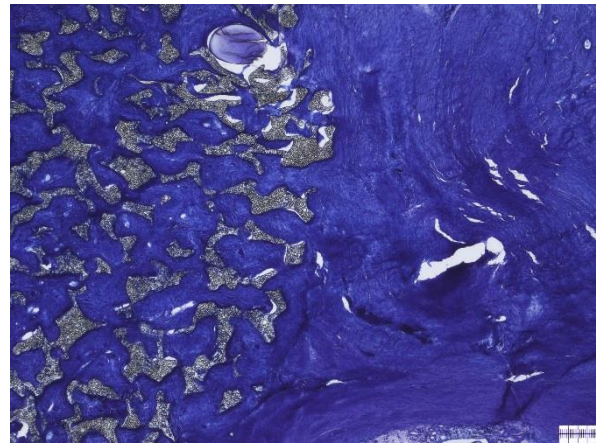
In 7 Fällen zeigte etwa die Hälfte der Zellen eine meniskoide Morphologie, in 3 Fällen war dies bei weniger als einem Viertel der Zellen der Fall. In 4 Fällen blieb der Proteoglykangehalt (Abbildung 3.41) im Reparaturgewebe unter 25 %, in 6 Fällen bewegte er sich zwischen 25 % und 75 %.

Nur in einem Fall überstieg der Kollagen II Gehalt (Abbildung 3.44) des Reparaturgewebes 25 %. Der Kollagen I Gehalt (Abbildung 3.43) bewegte sich dagegen immer zwischen 25 % und 75 %.

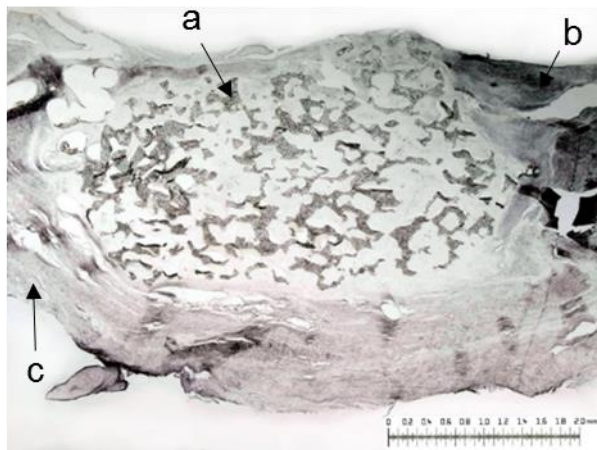
Bei 8 Tieren war das Regenerat formstabil und bei 2 Tieren weich und gerissen. Das Biomaterial selbst war in allen Tieren noch nachweisbar und zeigte keinerlei Anzeichen von Degradation. Bei keinem der Tiere fanden sich Entzündungsreaktionen. Im Bereich der Scaffolds fand sich histologisch weder eine Riesenzell- noch eine Fremdkörperreaktion.



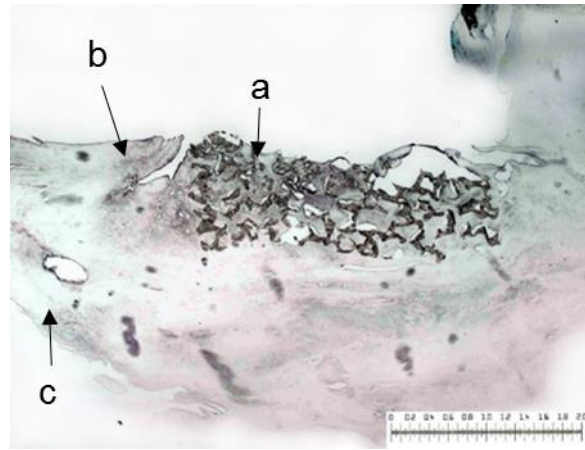
**Abbildung 3.41** Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm



**Abbildung 3.42** Entwässerte DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo, Übergang vom Reparaturgewebe mit Actifit® (linke Seite im Bild) zum nativen (rechte Seite) Meniskus. Balken = 200 µm



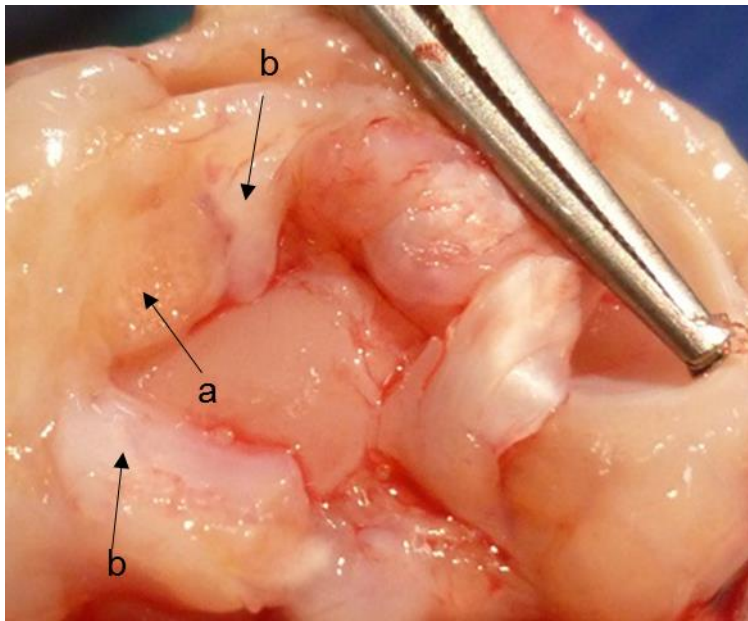
**Abbildung 3.43** Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm



**Abbildung 3.44** Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm

### 3.3.2.2 Meniskusdefektregeneration mit einer zellbesiedelten Polyurethanmatrix nach 12 Wochen

Nach 12 Wochen zeigte die Meniskusreparatur mit einer zellbesiedelten Polyurethanmatrix (n=10) folgende Ergebnisse:



**Abbildung 3.45 In situ: Meniskusregeneration mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit® Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus.**

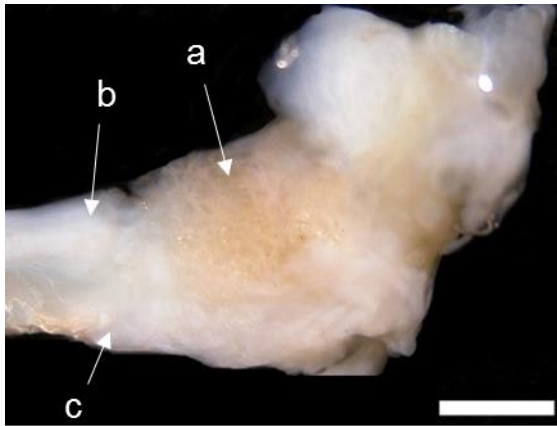
Bei 3 Tieren war der Meniskusdefekt fast vollständig mit Regenerat gefüllt (Abbildung 3.45), bei den restlichen Tieren war mehr als die Hälfte des Defekts gefüllt.

Ebenso zeigte sich in 3 Fällen ein meniskoider Schichtaufbau der Oberfläche.

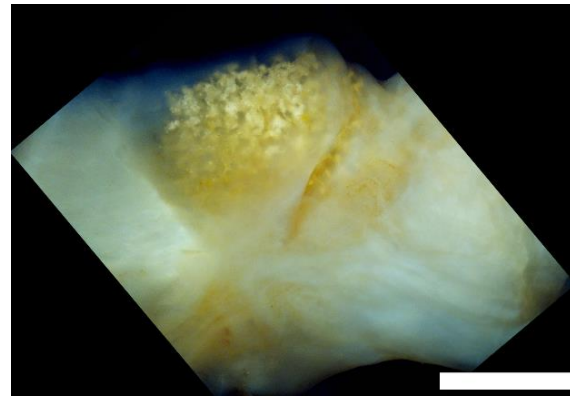
In 7 Fällen imponierte die Oberfläche des Regenerats rau und zerklüftet, es gab aber keine Komplettrisse.

Bei 2 Tieren konnte eine komplette Integration (Abbildung 3.46) des Reparaturgewebes

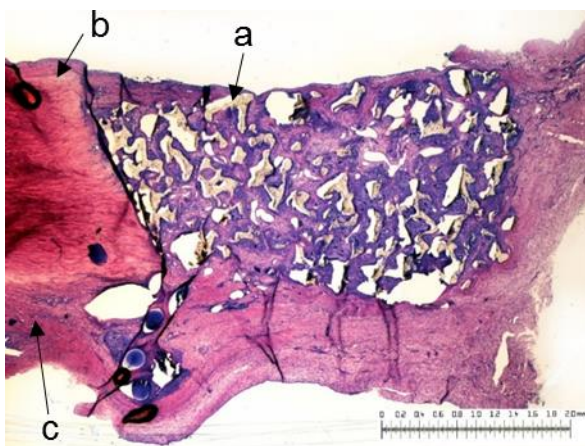
in den nativen Meniskus erreicht werden, bei weiteren 6 gab es nur eine einseitig komplette (Abbildungen 3.47 und 3.49) oder beidseits partielle Integration und bei einem Tier nur eine einseitige, partielle Integration.



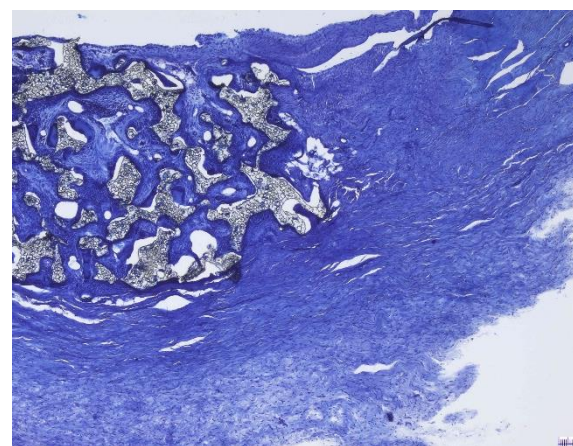
**Abbildung 3.46** Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm



**Abbildung 3.47** Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Balken = 2 mm



**Abbildung 3.48** Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm



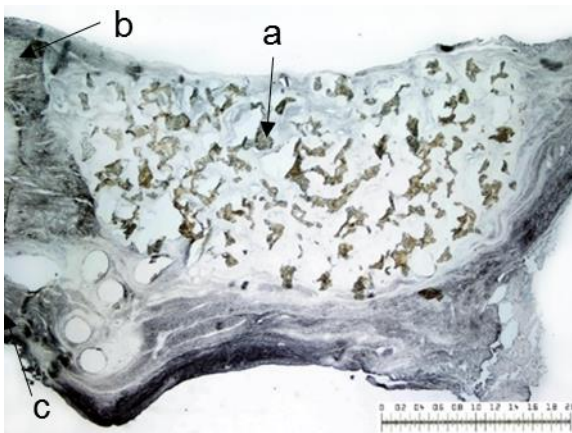
**Abbildung 3.49** Entwässerte DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo, Übergang vom Reparaturgewebe mit Actifit® (linke Bildseite) zum nativen (rechte Bildseite) Meniskus. Balken = 200 µm

Im Vergleich mit der Zellzahl von nativem Meniskusgewebe war die Zellzahl im Reparaturgewebe in allen Fällen deutlich erhöht. Bei fast allen Tieren hatten zwischen 25 % und 75 % der Zellen im Reparaturgewebe eine meniskoide Morphologie.

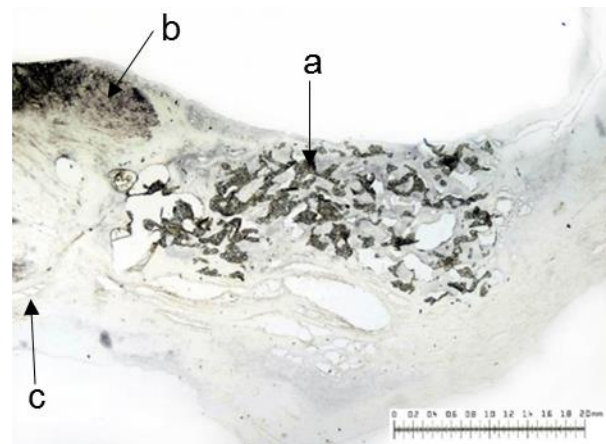
## Ergebnisse

Auch der Proteoglykangehalt (Abbildung 3.48) bewegte sich fast immer zwischen 25 % und 75 %. Dagegen konnte nur bei 2 Tieren ein Kollagen II-Gehalt (Abbildung 3.51) im Regenerat über 25 % festgestellt werden. Der Gehalt an Kollagen I (Abbildung 3.50) lag mit 25-75 % deutlich höher.

Bei 7 Tieren war das Regeneratgewebe formstabil und bei 3 Tieren weich oder gerissen. Das Biomaterial selbst war in allen Tieren noch nachweisbar und zeigte lediglich geringe Anzeichen von Degradation.



**Abbildung 3.50 Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm**



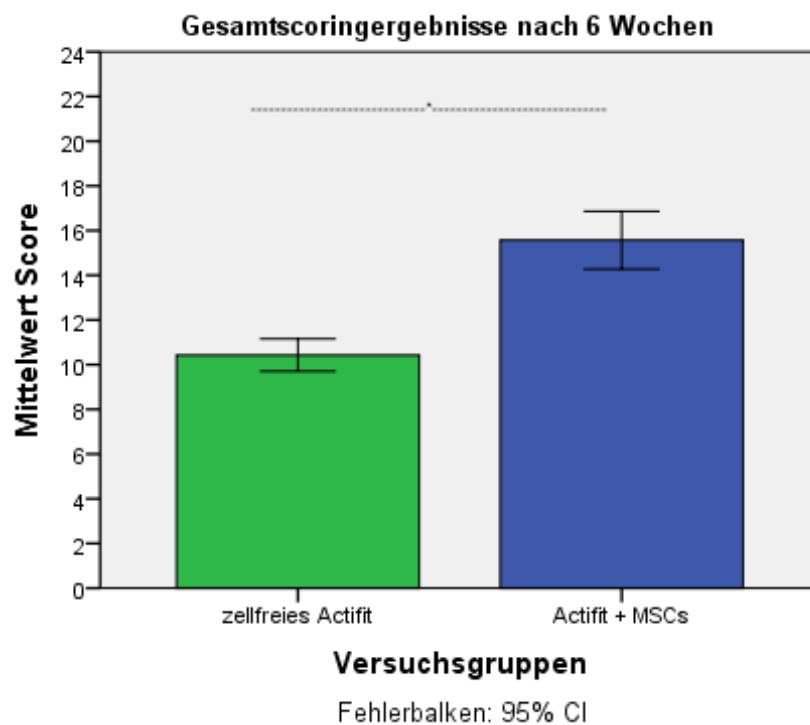
**Abbildung 3.51 Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm**

### 3.3.3 Scoring

Wie oben bereits erwähnt, wurde zur einheitlichen Beurteilung der Ergebnisse ein für diese Art der Experimentalstudie etablierter Score verwendet.

#### 3.3.3.1 Gesamtscoringergebnisse nach 6 Wochen

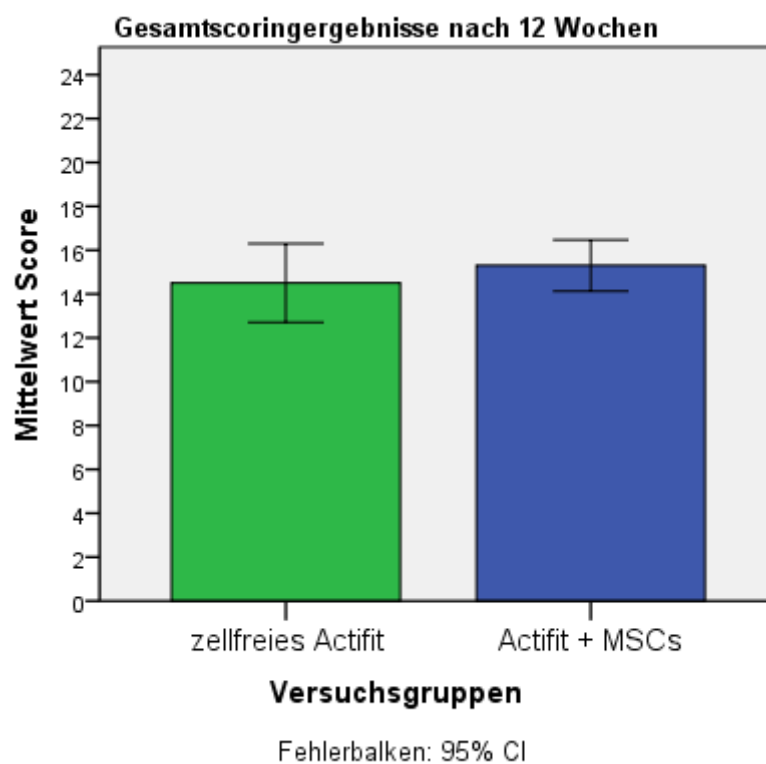
Nach 6 Wochen ergab sich für die mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Scaffolds (Scoringdurchschnitt: 15,6) im Vergleich zu den zellfreien Konstrukten (Scoringdurchschnitt: 10,4) ein statistisch signifikanter Vorteil ( $p < 0,05$ ) im Gesamtscoring (Abbildung 3.52).



**Abbildung 3.52 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI), Gesamtscoringergebnisse nach 6 Wochen. Statistisch signifikant (t-Test, \* =  $p < 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds.**

### 3.3.3.2 Gesamtscoreergebnisse nach 12 Wochen

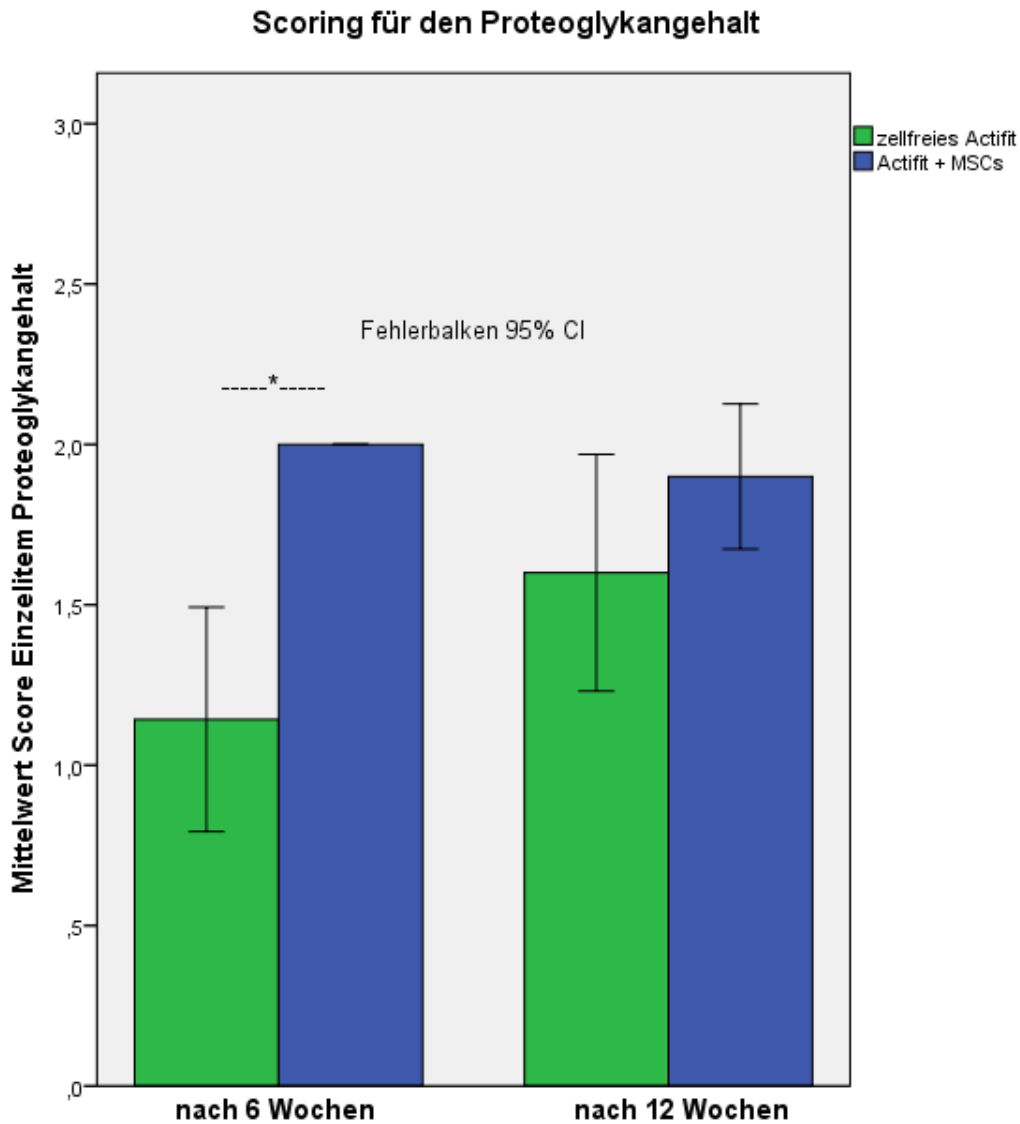
Nach 12 Wochen ergab sich für die mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Scaffolds (Scoringdurchschnitt: 15,3) im Vergleich zu den zellfreien Konstrukten (Scoringdurchschnitt: 14,5) kein statistisch signifikanter Vorteil ( $p > 0,05$ ). Jedoch zeigte sich mit einem zellbesiedeltem Scaffold ein Trend zur Verbesserung der Reparatur (Abbildung 3.53).



**Abbildung 3.53 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI), Gesamtscoreergebnisse nach 12 Wochen. Statistisch nicht signifikant ( $t$ -Test,  $p > 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds.**

### 3.3.4 Spezielle Betrachtung des Proteoglykangehalts im Reparaturgewebe

Beim 6-Wochen-Zeitpunkt ergab sich ein statistisch signifikant (Whitney-Mann-U-Test,  $p < 0,05$ ) höherer Proteoglykangehalt des Reparaturgewebes bei den zellbesiedelten Scaffolds (Durchschnitt für den Proteoglykangehalt: 2,0) im Vergleich zu den zellfreien Scaffolds (Scoringdurchschnitt für den Proteoglykangehalt: 1,1).

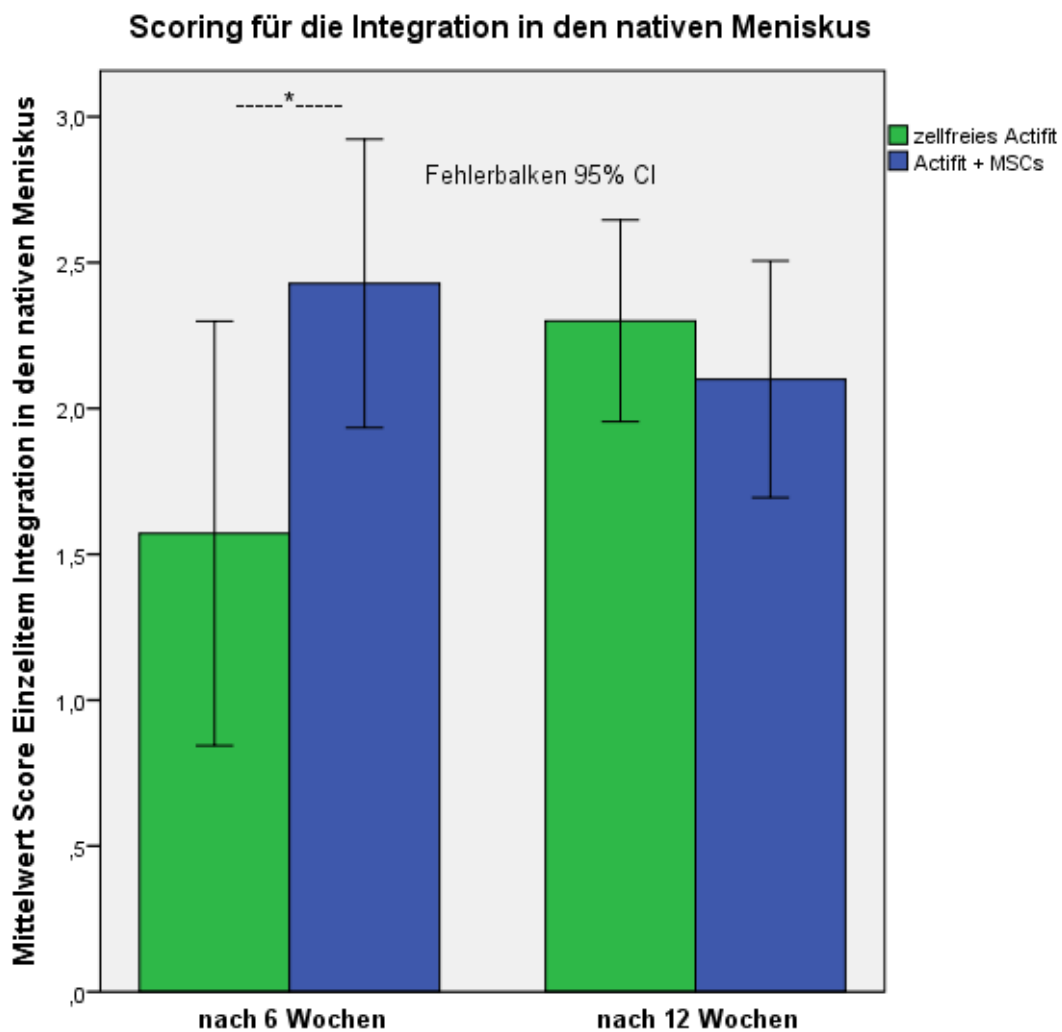


**Abbildung 3.54 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI) Scoring für den Proteoglykangehalt. Statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test,  $*=p < 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds nach 6 Wochen.**

Beim 12-Wochen-Zeitpunkt ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, jedoch ein Trend zu höherem Proteoglykangehalt beim zellbesiedelten Konstrukt (Abbildung 3.54).

### 3.3.5 Spezielle Betrachtung der Integration des Reparaturgewebes in den nativen Meniskus

Beim 6-Wochen-Zeitpunkt ergab sich eine statistisch signifikant bessere (t-Test,  $p < 0,05$ ) Integration des Reparaturgewebes in den nativen Meniskus bei den zellbesiedelten Scaffolds (Scoringdurchschnitt für die Integration: 2,4) im Vergleich zu den zellfreien Scaffolds (Scoringdurchschnitt für die Integration: 1,6).



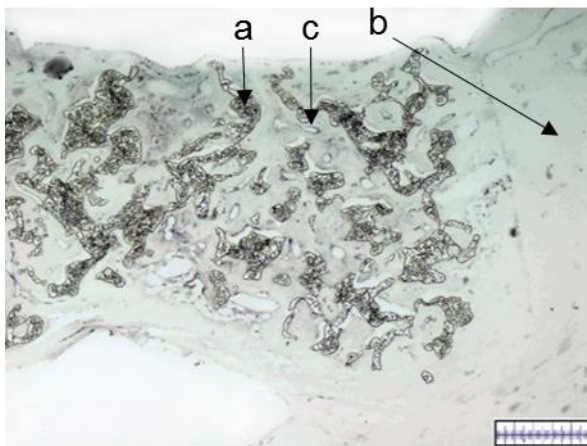
**Abbildung 3.55 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI) Scoring für die Integration in den nativen Meniskus. Statistisch signifikant (t-Test,  $*=p < 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds nach 6 Wochen.**

Beim 12-Wochen-Zeitpunkt ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 3.55).

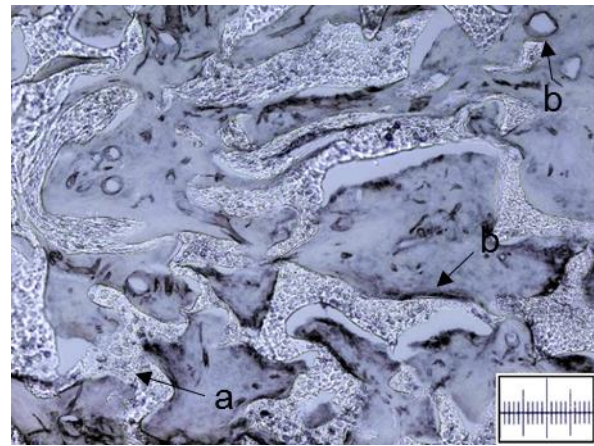
### 3.3.6 Spezielle Betrachtung der Gefäßarchitektur

Durch eine immunhistochemische Färbung mit CD31-Antikörpern wurde die Gefäßarchitektur im Regeneratgewebe dargestellt (n=34).

Dabei zeigten sich bei allen Versuchstieren sowohl beim zellgebundenen, als auch beim zellfreien Konstrukt übereinstimmend folgende Ergebnisse, die auch zwischen den beiden verschiedenen Zeitpunkten nicht unterschiedlich waren. Im Reparaturgewebe zeigte sich eine dichte Vaskularisation mit zahlreichen longitudinalen und queren Gefäßanschnitten mit variierendem Kaliber (Abbildungen 3.56 und 3.57). Bemerkenswerterweise zeigten sich Gefäße nicht nur auf Höhe der im nativen Meniskus gut vaskularisierten Basis, sondern auch auf Höhe der Meniskusspitze, die im nativen Meniskus nicht durchblutet ist.



**Abbildung 3.56** Immunhistochemische CD31-Färbung zur Darstellung der Gefäßarchitektur. Gefäßendothelzellen stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. Pfeil c: Beispiel für ein Gefäß. Balken = 500 µm



**Abbildung 3.57** Immunhistochemische CD31-Färbung zur Darstellung der Gefäßarchitektur. Gefäßendothelzellen stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: exemplarisches Gefäß. Balken = 200 µm

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit legen nahe, dass der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen die Scaffold-basierte Meniskusreparatur weiter verbessern kann. Besonders bemerkenswert scheint dabei eine wohl durch die Verwendung von Stammzellen erreichte Beschleunigung der Heilung zu sein. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Actifit® prinzipiell für die Kombination mit mesenchymalen Stammzellen geeignet ist. Im Zuge dessen wurde ein neues in vitro Biomaterialtestsystem etabliert.

Die Thematik dieser Arbeit ist sowohl medizinisch, als auch volkswirtschaftlich bedeutend, denn Meniskuläsionen im avaskulären Bereich stellen nach wie vor ein ungelöstes Problem dar. [2] Während bei Meniskuläsionen im gut durchbluteten basisnahen Bereich durch konventionelle Meniskusreparatur, wie zum Beispiel Naht, gute Heilungschancen bestehen, muss bei Läsionen im avaskulären Bereich oft eine partielle Meniskektomie durchgeführt werden. [5] Diese prädisponiert jedoch zu einer vorzeitigen Entwicklung von Osteoarthritis. [16,21,53–55]

Ein möglicher Ansatz zur Lösung dieses Problems stellt die Verwendung von Scaffolds bei großem Meniskussubstanzverlust dar, dies wird auch bereits klinisch durchgeführt. Eine Verbesserung dieses Ansatzes könnte die zusätzliche Verwendung von autologen mesenchymalen Stammzellen darstellen. Diese könnten die Therapie von Meniskuläsionen im avaskulären Bereich verbessern, eine schnellere Biologisierung des Implantats bewirken und so eine größere Chance auf Heilung dieser Verletzungen ermöglichen.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Verwendung von autologen mesenchymalen Stammzellen einen substantiellen Vorteil gegenüber einem zellfreiem Konstrukt bringt. Außerdem wurden verschiedene Biomaterialien näher auf ihre Eignung für den zellgebundenen Meniskusersatz untersucht.

Tatsächlich konnten mit der vorliegenden Arbeit einige Vorteile der Therapie eines Meniskusdefekts mit einer zellbesiedelten Polyurethanmatrix gegenüber der Therapie mit einem zellfreien Konstrukt nachgewiesen werden. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen.

Zunächst wurde in vitro nach einem guten Biomaterial für die weitere in vivo Testung gesucht. Dieses Biomaterial wurde im Anschluss auf die Kompatibilität mit der verwendeten Versuchstierart untersucht. Schließlich wurde der Tierversuch durchgeführt.

Eingangs wurden die Bioeigenschaften unterschiedlicher Biomaterialien in einer in vitro Analyse detailliert betrachtet. Getestet wurden die Polyurethanmatrix Actifit® des Herstellers

## Diskussion

Orteq, eine Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix aus eigener Herstellung und mehrere verschiedene Chargen einer Polyurethanmatrix mit Kollagenfasern eines externen Herstellers. Insbesondere wurde die Eignung der Materialien für den Meniskusersatz mit einem zellbesiedeltem Konstrukt überprüft.

Welche Eigenschaften sollte ein gutes Biomaterial für den Meniskusersatz haben? Stone et al. [102] stellten dafür folgende Anforderungen an das Scaffold: Biokompatibilität, anatomische Form (oder die Möglichkeit, diese intraoperativ herzustellen), offenporöse Struktur um das Einwachsen von Zellen zu erleichtern, initiale mechanische Stabilität für den Einbau, initiale in vivo Stabilität für die Funktion als Gerüst für Zellen und Permeabilität für Makromoleküle. Freed et al. [103] forderten des Weiteren, dass das Biomaterial eine Zelladhäsion zulassen müsse. In dem in vitro Test dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk vor allem auf die beiden essentiellen Eigenschaften Biokompatibilität und die Qualität der Porosität gelegt. Da in der Literatur kein etabliertes Scoringssystem speziell für diese Testeigenschaften existiert, wurde ein neues Scoringssystem entwickelt. Generell könnte das in dieser Arbeit entwickelte Scoring bereits für sich allein genommen nützlich sein, um aus der Vielzahl neuer Biomaterialien schon durch in vitro Tests vielversprechende Scaffolds auszuwählen. Dadurch müsste man weniger Tierversuche durchführen, was nicht nur aus ethischer Sicht, sondern auch aus Gründen der Ressourcenschonung und Kosteneinsparung wünschenswert wäre.

In unserem Scoring wurden die biomechanischen Eigenschaften der Scaffolds nicht miteinbezogen. Maher et al. [104] haben jedoch erst kürzlich ein Testregime eben für die biomechanischen und funktionellen Eigenschaften der Scaffolds beschrieben. Kombiniert man also das Testregime von Maher et al. [104] und das in vitro Scoringssystem der vorliegenden Arbeit, so erhält man eine nützliche und umfassende präklinische Testplattform für Biomaterialien. Somit kann man wohl, wenn diese beiden Testregime gemeinsam angewendet werden, bereits durch in vitro Versuche differenzierte Vorhersagen über den Verlauf einer etwaigen in vivo oder klinischen Testung eines neuen Biomaterials für den Meniskusersatz treffen.

Nimmt man beispielsweise die guten Ergebnisse des Biomaterials Actifit® im in vitro Scoring dieser Arbeit und die guten Ergebnisse von Actifit® im präklinischen Test von Maher et al. [104] so ließe sich daraus schließen, dass klinische Tests ähnlich gut verlaufen werden.

Vielversprechende Ergebnisse in bisher durchgeführten klinischen Tests [86,97,98] scheinen diese Vermutung zu bestätigen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Kombination unseres Scoring mit der von Maher beschriebenen Testung in der Praxis zu validen Vorhersagen führen könnte.

## Diskussion

Das Polyurethan Actifit® zeigte in der in vitro Testung der vorliegenden Arbeit durchwegs positive Eigenschaften und erhielt auch die größte Punktzahl im Gesamtscoreergebnis. Kollagenbildung und Proteoglykanbildung erfolgte gleichmäßig über die gesamte Matrix. Die Porosität war zufriedenstellend und die entstandene extrazelluläre Matrix wies starke Ähnlichkeiten mit Meniskusgewebe auf, hatte also einen hohen Anteil an Proteoglykanen und Kollagen. Zudem konnten sich die Zellen gut an dem Biomaterial adhären. Das Biomaterial erscheint also vielversprechend und die weitere Testung in einem in vivo Versuch war sinnvoll. Die eben beschriebene gute Biokompatibilität von Actifit® wurde auch bereits von anderen Autoren beschrieben. [89,105]

Das zweitbeste Gesamtscoreergebnis des in vitro Tests erreichten die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Scaffolds. Die Porengeometrie und die Interkonnektivität waren bei diesem Biomaterial besser als bei den anderen untersuchten Materialien. Bei den Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Scaffolds wurden aber nur in den Randzonen Kollagen und Proteoglykane gebildet. Durch die Beimpfkontrolle konnte jedoch nachgewiesen werden, dass initial sehr wohl Zellen auch im Zentrum der Scaffolds vorhanden waren. Offensichtlich kam es zum Absterben der zentral gelegenen Zellen. Mögliche Gründe könnten eine schlechte Zugänglichkeit für Nährstoffe, oder etwaige Abbauprodukte des Scaffolds sein. In den Randzonen der Scaffolds entstand zwar sehr wohl chondrogen differenziertes Gewebe, doch für eine erfolgversprechende Meniskusreparatur genügt dies nicht. Auch die schnelle Degradation des Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Scaffolds ist als problematisch zu sehen. Bereits nach 21 Tagen in chondrogenem Medium hatte die Matrix merklich an Stabilität verloren. Generell scheint aber ein zu schneller Abbau von Scaffolds problematisch, denn initiale Stabilität ist für den klinischen Einsatz wichtig. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Biodegradation und Stabilität sollte daher angestrebt werden. Vorteilhaft könnte ein Abbau der Scaffold-Oberfläche nach circa einem Jahr sein [78], wobei es aber noch keinen wissenschaftlich belegten optimalen Zeitraum für den Abbau von Scaffolds gibt.

Die Polyurethanmatrices mit Kollagenfasern des externen Herstellers zeigten durchweg unbefriedigende Ergebnisse, wobei als Hauptkritikpunkte die ungleichmäßige Porosität und die mangelnde Interkonnektivität der Poren genannt seien. Für Tissue Engineering mit einem zellbesiedelten Konstrukt scheinen diese Scaffolds also denkbar ungeeignet zu sein, da schon die initiale Zellbesetzung nur unzureichend durchgeführt werden kann. Ebenso unmöglich erscheint ein sekundäres Einwandern von Zellen in die nicht zugänglichen Bereiche der Scaffolds. Des Weiteren bot das Biomaterial nur ungenügende Adhäsionsmöglichkeiten für die Zellen.

## Diskussion

Lara et al. [106] beschrieben erst kürzlich durch in vitro Studien die Wichtigkeit der Porosität der Biomaterialien. Scaffolds mit höherer Porosität (Volumenanteil der Poren in Relation zum soliden Material) integrierten dabei deutlich besser in den nativen Meniskus und auch die Reife des Reparaturgewebes war deutlich größer, als dies bei Scaffolds mit niedriger Porosität der Fall war. Die genannte Arbeitsgruppe machte auch bei einer in vivo Studie dieselbe Beobachtung. [106]

Die Ergebnisse im Gesamtscoreing lassen also Actifit® in der Tat als geeignetes Material für das Tissue Engineering zum Meniskusersatz erscheinen. Außerdem wurde gezeigt, dass die chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in Actifit® möglich ist. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse, wurde die Polyurethanmatrix Actifit® weiter untersucht.

Zunächst sollte die prinzipielle Kompatibilität des Scaffolds für einen Tierversuch im Neuseelandhasen geklärt werden, da der in vivo Versuch an diesen Tieren durchgeführt werden sollte. Dafür wurde einerseits geprüft, ob mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Neuseelandhasen in dem Biomaterial in vitro chondrogen differenzieren können. Andererseits wurde ebenfalls in vitro die Besiedelung und Redifferenzierung mit Chondrozyten aus dem vaskulären Anteil von Menisken aus Neuseelandhasen in Actifit® erprobt.

Sowohl Chondrozyten aus dem Meniskus von Neuseelandhasen, als auch mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, zeigten nach dreiwöchiger Kultur unter chondrogenen Bedingungen in Actifit® eine hohe Überlebensrate. Nach dreiwöchiger Kultur konnte der positive Nachweis der Bildung von Kollagen und Glykosaminoglykanen erbracht werden, es konnte also meniskusähnliches Material gebildet werden und die mesenchymalen Stammzellen konnten offenbar chondrogen differenzieren. Dadurch scheint die Kompatibilität der Actifit®-matrix mit dem Tiermodell bestätigt. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen von Hannink, de Mulder, van Tienen und Buma [46], die ebenfalls mit einer Polyurethanmatrix in Kaninchen experimentierten. In ihrem Tierversuch erwiesen sich die Kaninchen als durchaus geeignetes Versuchstier für die Verwendung von Polyurethanscaffolds.

Trotzdem ist die Verwendung der Tierart Kaninchen auch zu den Limitationen der vorliegenden Arbeit zu zählen. Einerseits ist der gesamte Situs, damit auch ein Meniskus, deutlich kleiner als beim Menschen. Andererseits resultiert durch das geringe Gewicht der Tiere auch eine deutlich geringere wirkende Kraft auf das Implantat. Darüber hinaus ist auch die Kraftverteilung anders als beim Menschen. [46] Außerdem wurde bei den Kaninchen ein offener Eingriff durchgeführt, während man beim Menschen eher arthroskopisch vorgehen würde. Durch die offene Operation wurde also hier ein ungleich größeres Trauma gesetzt [95], zusätzlich begünstigt der kleine

## Diskussion

Kaninchensitus iatrogene Schädigungen. Des Weiteren ist im Kaninchenmeniskus die Dichte der Chondrozyten um 10 % höher als beim Menschen was eventuell zu einer schnelleren und besseren Heilung von Meniskusdefekten führen könnte. [46]

Dem gegenüber attestierten Ghadially et al. dem Kaninchenmeniskus generell große Ähnlichkeit zum humanen Meniskus [2,42] und auch Hannink, de Mulders, van Tienen und Buma sehen Kaninchen als geeignete Versuchstiere für Meniskusdefektmodelle. [46]

Das Meniskusdefektmodell in diesem Tier ist in der hiesigen Arbeitsgruppe etabliert und hat sich in mehreren Versuchen bewährt.

Nachdem die Eignung des gewählten Tiermodells bestätigt schien, wurde der Einsatz einer zellbesiedelten Actifit®-Matrix in vivo in einem Tierversuch mit Neuseelandhasen untersucht. Im Rahmen des Tierversuchs wurde die komplette Pars intermedia des Meniskus lateralis entnommen und der entstandene Defekt mit einer Actifit®-Matrix gefüllt. Dabei wurde ein zellfreier Ansatz mit einem mit autologen mesenchymalen Stammzellen besetzten Konstrukt verglichen. Nach 6 und nach 12 Wochen erfolgte die Evaluation der Meniskusreparatur.

Zum 6-Wochen-Zeitpunkt stellte sich ein statistisch signifikanter Vorteil im Gesamtscore des zellbesiedelten Konstrukts im Vergleich zum zellfreien Konstrukt dar. Ebenso war zum selben Zeitpunkt eine statistisch signifikant bessere Integration des zellbesiedelten Konstrukts in den nativen Meniskus zu beobachten. Weiterhin wurde in den zellbesiedelten Scaffolds zum 6-Wochen-Zeitpunkt eine statistisch signifikant größere Menge an Proteoglykanen gebildet.

Im Gegensatz dazu ergab sich beim 12-Wochen-Zeitpunkt im Gesamtscore ein Trend zum Vorteil des zellbesiedelten Ansatzes ohne statistische Signifikanz. Darüber hinaus gab es beim 12-Wochen-Zeitpunkt bei einigen Einzelitems des Scorings tendenzielle Vorteile der zellbesiedelten Matrices.

Daraus lässt sich folgern, dass der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen die Heilung qualitativ verbessern und vor allem beschleunigen kann. Dies könnte in der Praxis bedeutende Vorteile haben. Denkbar wäre beispielsweise, dass durch die Befüllung des Biomaterials mit mesenchymalen Stammzellen eine frühere Mobilisation und eine frühere Belastung des operierten Knies ermöglicht werden könnte. Auch der Aufbau der Belastung könnte wohl schneller voranschreiten.

Moffet et al. [107] kamen nach ihrer randomisierten kontrollierten Studie zu dem Schluss, dass frühe und intensive Rehabilitationsmaßnahmen essentiell für ein gutes funktionelles Outcome nach partieller Menishektomie sind. Es liegt nahe, dass selbiges auch für die Meniskusreparatur gelten muss. Umso wichtiger könnte die schnellere Heilung, die durch Besiedelung mit mesenchymalen Stammzellen erreicht werden kann, für ein besseres Outcome sein, denn die

## Diskussion

schnellere Heilung könnte auch frühere Rehabilitationsmaßnahmen mit Belastung ermöglichen. Möglicherweise könnte die schnellere Heilung auch zu kürzeren Immobilisierungszeiten führen. Eriksson und Häggmark [108] beobachteten, dass bereits nach 5 Wochen Immobilisierung in Folge von Kniechirurgie durch Atrophie die Masse des Musculus quadriceps femoris um 40 % abnehmen kann. Gerade älteren Patienten kann es schwer fallen, verlorene Muskelmasse wieder aufzubauen. [109,110] Bei Sportlern ist es sogar essentiell, dass der Quadriceps wieder die volle Stärke erreicht, bevor wieder Wettkampfsport betrieben werden kann. [111] Deshalb wäre es wünschenswert, durch frühere Mobilisation das Auftreten einer ausgeprägten Muskelatrophie zu verhindern. Auch in Tierversuchen konnten die Vorteile einer frühen Mobilisation nach Meniskusreparatur demonstriert werden. [111] Mehrere neuere Studien gelangen zur Empfehlung, dass Immobilisierungszeiten verkürzt werden sollten. [112,113] Weiterhin könnte die kürzere Ausfallzeit den Patienten dazu animieren, eine meniskusreparierende Therapie anzustreben. Das ist vor allem vor dem Hintergrund bedeutend, da potenziell meniskusreparierende Therapien initial mit längeren Ausfallzeit verbunden sind, als die bloße Meniskektomie, bei der postoperativ schnell wieder voll belastet werden darf. [111] Der hohe (zeitliche) Aufwand von Seiten des Patienten, der bisher bei einer Meniskusreparatur mit einem zellfreien Konstrukt betrieben werden muss, könnte eine Hemmschwelle für den Entschluss zu einer potentiell wirklich heilenden Therapie darstellen und zur Bevorzugung der nur auf Symptombeseitigung ausgelegten, aber vergleichsweise unkomplizierten, partiellen Meniskektomie führen. Durch die oben beschriebenen Vorteile der schnelleren Heilung durch Zellbesiedelung einer Polyurethanmatrix würden möglicherweise mehr Patienten eine Meniskusreparatur anstatt einer partiellen Meniskektomie anstreben. Dass dies wünschenswert ist, erklärt sich aus der oben schon ausführlich beleuchteten Tatsache, dass schon eine partielle Meniskektomie zu einem vielfach erhöhten Risiko für die Entwicklung von Osteoarthrose führt. [21,54]

Die in der vorliegenden Studie beobachtete kürzere Reparaturzeit durch den Einsatz eines zellbesetzten Konstruktes wurde auch von anderen Autoren nach in vitro Studien propagiert. [106]

Im Vergleich zum nativen Meniskus haben Polyurethanscaffolds initial einen deutlich höheren Reibungskoeffizienten. Dieser nähert sich aber durch Einwachsen von Gewebe in vivo dem Reibungskoeffizienten des nativen Meniskus an. [92] Auch deshalb könnte die schnellere Heilung durch die zellbesiedelten Scaffolds wichtig sein. Es könnte so rascher die physiologische Biomechanik im Kniegelenk wiederhergestellt werden.

## Diskussion

Verdonk et al. [89] konnten in einer klinischen Studie bei Patienten mit partiellem Meniskusersatz bereits nach 3 Monaten ein frühes Einwachsen von Gewebe in das Biomaterial feststellen. Zudem ergaben Biopsien Charakteristika des eingewachsenen Gewebes, die meniskusähnlich imponierten. Nach einem Jahr war aber noch keine vollständig meniskustypische Morphologie gegeben. [89] Dies ist im Wesentlichen konkordant mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Im unserem Tierversuch konnte sowohl bei den zellbesiedelten, als auch bei den zellfreien Scaffolds meniskusähnliches, aber nicht meniskustypisches Reparaturgewebe festgestellt werden. Das Einwachsen von Gewebe ausgehend von der Defektumgebung in den mit Actifit® gefüllten Defekt bereits nach 3 Monaten könnte eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse unseres Tierversuchs sein. Denn nach 6 Wochen zeigten sich bei den mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Scaffolds noch deutliche Vorteile gegenüber dem zellfreien Ansatz. Nach 12 Wochen waren die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen jedoch nur noch tendenziell mit Vorteil für die zellbesiedelte Gruppe.

In einer 2-Jahres-follow-up Studie an Hunden stellten Welsing et al. [95] eine gute Integration des Scaffolds in das umliegende Gewebe und fibrokartilaginäre Differenzierung des eingewachsenen Gewebes mit Bildung von Kollagen I fest. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine gute Integration und die Bildung von Kollagen I beobachtet werden.

In der Tierstudie der vorliegenden Arbeit wurden die Scaffolds nach der Zellbesiedlung nicht vorkultiviert. Lediglich über Nacht wurde das zellbesetzte Konstrukt im Brutschrank gelagert um eine Adhäsion der Zellen zu gestatten. In mehreren in vivo und in vitro Studien wurde zwar beobachtet, dass eine Vorkultivierung zu besserer Differenzierung der Zellen führen kann, jedoch wurde dieser Vorteil dann meist durch eine deutlich schlechtere Integration des Scaffolds in den nativen Meniskus nivelliert. [4,106] Folglich wurde hier bewusst auf eine Vorkultur in chondrogenem Medium verzichtet und wie erwartet eine gute Integration der Scaffolds erreicht.

Die Hypothese, dass ein zellbesiedeltes Implantat besser in das native Meniskusgewebe integriert als ein zellfreies Implantat, konnte in der vorliegenden Tierstudie nur für den 6-Wochen-Zeitpunkt bestätigt werden. Zum 12-Wochen-Zeitpunkt konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

Im Tierversuch wurde bei allen Tieren eine dichte Vaskularisierung über die Scaffolds hinweg beobachtet. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den zellbesiedelten und zellfreien Konstrukten. Die Vaskularisierung schien schnell von statten gegangen zu sein, denn es gab keine auffälligen Unterschiede zwischen dem 6-Wochen- und dem 12-Wochen-Zeitpunkt.

## Diskussion

Bemerkenswerterweise fand sich die dichte Vaskularisierung nicht nur in den basisnahen Anteilen der Scaffolds, sondern auch in den meniskusspitzennahen Anteilen. Beim nativen Meniskus finden sich, wie oben beschrieben, die Gefäße fast ausschließlich basisnah. Verdonk et al. fanden in einer klinischen Studie ebenfalls starke Anhaltspunkte für das Einwachsen von Gefäßen in die Actifit®-Matrix. [89] Das Biomaterial Actifit® scheint also tatsächlich angiogentische Eigenschaften zu besitzen. Doch welche Bedeutung hat diese starke Neovaskularisierung des neugebildeten Reparaturgewebes? Letztlich kann diese Frage durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. In der Literatur lassen sich sowohl Argumente für eine positive Rolle der Vaskularisierung als auch Argumente für eine eher negative Bedeutung der Gefäße finden.

Petersen et al. [114] führten in Merinoschafen eine Meniskusreparatur mittels mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beschichteten Nähten durch. Dies führte jedoch, im Vergleich zu Nähten ohne VEGF-Beschichtung, zu einer schlechteren Meniskusreparatur. Da VEGF als potentester angiogentischer Faktor gilt [114], sprechen die Ergebnisse der Studie von Petersen et al. somit eher für eine negative Rolle von Gefäßen bei der Meniskusreparatur. Ashraf et al. [115] fanden in einer Studie an menschlichen Leichen eine positive Korrelation von Angiogenese im Meniskus und osteoarthrotischen Veränderungen im Knie. Daraus postulierten sie, dass das Einwachsen von Gefäßen und Nervenfasern in den Meniskus ein möglicher Grund für die Entstehung von Schmerzen bei Osteoarthritis sein könnte.

Andererseits zeigen die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien mit Einsatz eines Actifit®-Scaffolds, bei dem es vermutlich ebenfalls zum Einwachsen von Gefäßen kam, eine signifikante Schmerzreduktion im Vergleich zum präoperativen Zustand. [86,97,98,116]

Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich durch eine Betrachtung der unterschiedlichen Ausgangssituationen der Vaskularisierung auflösen. Bei den Osteoarthroseschmerzen entwickeln sich die Gefäße wohl aufgrund von Reizung und Entzündung, während dies bei den Scaffolds eher nicht der Fall ist.

Unabhängig von der Rolle der Gefäße bei der Schmerzentstehung scheinen Gefäße für die Reparatur von Meniskusdefekten wichtig zu sein. Ein Indiz dafür ist die erfolgreiche Anwendung der sogenannten Trephination oder des Needling. Dabei wird versucht, durch das Setzen von Stichkanälen eben eine (Re-) Vaskularisierung von verletztem Meniskusgewebe zu erlangen. [5,28,117,118] Außerdem ist es allgemein anerkannt, dass der avaskuläre Bereich des Meniskus im Vergleich zum vaskulären Bereich eine geringere Heilungskapazität besitzt. [2,16]

## Diskussion

Nicht zuletzt finden sich mesenchymale Stammzellen, welchen von vielen Autoren eine positive Wirkung auf die Heilung von Meniskusläsionen zugesprochen wird, oft mit örtlichem Bezug zu den Blutgefäßen. [119]

Klompaker et al. [68] beobachteten im Tierversuch am Hund ebenfalls mit einer Polyurethanmatrix eine initial starke Vaskularisierung im Bereich des Scaffolds, die jedoch nach Umwandlung des Gewebes in fibrokartilaginäres Gewebe wieder verschwand. Da in der Studie der vorliegenden Arbeit relativ kurze Versuchszeiten gewählt wurden, ist es durchaus möglich, dass man zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls einen Rückgang der Gefäße beobachten hätte können. In der Summe spricht einiges dafür, dass Gefäße einen positiven Beitrag zur Heilung von Meniskusläsionen liefern.

Gleich welche Rolle die Neovaskularisierung nun spielt, scheint es sehr wahrscheinlich, dass Actifit® tatsächlich das Einwachsen von Gefäßen begünstigt. Die Hypothese, dass Actifit® angiostatische Eigenschaften besitzt, scheint also zutreffend zu sein. Denn die Beobachtung einer starken Vaskularisierung bis hin zur Meniskusspitze wurde nicht nur in dem Tierversuch der vorliegenden Arbeit gemacht. Auch Verdonk et al. [89] fanden in einer klinischen Studie mit 44 Patienten, bei denen Meniskusdefekte ebenfalls mit einem Actifit® behandelt wurden, radiologische Zeichen für Neovaskularisierung und, bei Second-Look-Arthroskopien nach 12 Monaten, auch in Biopsien histologische Zeichen für eine Neovaskularisierung im Reparaturgewebe.

In unserem Tierversuch wurde deutlich mehr Kollagen I als Kollagen II gebildet. Beim klinischen Einsatz von Actifit® konnten Verdonk et al. [89] ebenfalls ein hauptsächlich an Kollagen I reiches Regenerat beobachten. Möglicherweise kommt es erst zu späterer Zeit zu stärkerer Bildung von Kollagen II.

Im Tierversuch der vorliegenden Arbeit wurden bei fast allen Tieren keine Entzündungsreaktionen vorgefunden. Histologisch konnte im Bereich der Scaffolds keine Riesenzell- oder Fremdkörperreaktion beobachtet werden. Lediglich bei einem Tier fand sich in einem Kniegelenk ein Kniegelenksempyem, welches aber wahrscheinlich durch eine Infektion bedingt war. Auch in den bisherigen klinischen Tests erwies sich Actifit® als sicher, was somit in Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie steht. [9]

Wie oben beschrieben, wurde in dieser Arbeit ein zellfreies Actifit®-Implantat mit einem mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Konstrukt in einem in vivo Versuch verglichen.

Dabei war nach 6 Wochen das Gesamtscoreing beim zellbesiedelten Implantat signifikant besser, nach 12 Wochen jedoch ergab sich lediglich ein statistisch nicht signifikanter Trend zum Vorteil für das zellbesiedelte Konstrukt.

## Diskussion

Folgende Frage kann also auch durch diese Arbeit nicht abschließend beantwortet werden:

Sind Zellen im Allgemeinen und mesenchymale Stammzellen im Speziellen notwendig für eine suffiziente Meniskusreparatur?

Vieles spricht trotzdem dafür. Auch die meisten Verfechter und Anwender eines initial zellfreien Implantats setzen letztendlich darauf, dass in vivo dann Zellen in das Scaffold einwandern. Dass dies durchaus der Fall sein kann, hat sich bereits in mehreren klinischen Studien gezeigt. [83,89] Fraglich ist dabei, ob dann ein die Meniskusreparatur begünstigender Zelltyp einwandert. Möglicherweise könnten prinzipiell sesshafte Fibrochondrozyten durch ein Trauma mobilisiert werden. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass die Fibrochondrozyten aus dem umliegenden Meniskusgewebe in großer Zahl einwandern, denn diese sind schon an sich nur mit relativ geringer Zellzahl im nativen Meniskus vorhanden und werden möglicherweise auch noch durch die dichte extrazelluläre Matrix am Einwandern in das Implantat gehindert. [120] Außerdem haben Ionescu et al. [121] in einer in vitro Studie mit Meniskuszellen aus verschiedenen alten Rindern Hinweise dafür erhalten, dass mit zunehmendem Alter auch mit Hilfe von Scaffolds das endogene Reparaturpotenzial der Meniskuszellen abnimmt. Somit erscheint es durchaus sinnvoll, ein bereits zellbesetztes Implantat in den Meniskusdefekt einzubringen.

Für diese Zellbesetzung kommen prinzipiell unterschiedliche Zellen in Frage. Im in vitro Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Fibrochondrozyten aus dem Meniskus prinzipiell in einer Actifit®-Matrix überleben und dort auch meniskusähnliche Substanz produzieren können. Prinzipiell hätten Fibrochondrozyten den Vorteil, dass der bei den mesenchymalen Stammzellen notwendige Differenzierungsvorgang entfallen würde.

Jedoch stellt sich die Frage nach der Sinnhaftigkeit der Verwendung solcher Zellen, denn um eine Meniskusreparatur mit Meniskuszellen durchzuführen, muss man diese erst gewinnen. Man würde also paradoxerweise zunächst weiteres, potentiell noch intaktes natives Meniskusgewebe zerstören, um Meniskusreparaturgewebe zu produzieren. Aufgrund der oben schon beschriebenen geringen Zahl von Meniskuszellen wäre es wohl in den meisten Fällen auch nicht suffizient, nur aus den beschädigten Meniskusanteilen zu gewinnen, zumal die Vitalität und Kulturfähigkeit solcher Zellen fraglich wäre.

In Experimenten erwiesen sich besonders mesenchymale Stammzellen aus der Synovia der Kniegelenkscapsel als durchaus vielversprechender Zelltyp für die Besetzung von Scaffolds. [122] Ein Nachteil dieser Zellen ist jedoch, dass man sie durch Synovektomie und anschließende Zellkultur gewinnt, also eine zusätzliche Arthroskopie von Nöten ist. [123] Auch wenn die Regeneration der entnommenen Synovia in der Regel schnell und unkompliziert von

statten geht [124], ist das Setzen eines zusätzlichen Traumas in der Region in der man eigentlich eine Reparatur durchführen möchte durchaus kritisch zu sehen.

Hoben et al. [125] haben folgende Anforderungen an den idealen Zelltyp für die zellbasierte Meniskusreparatur gestellt: die Zellen sollten autolog sein, minimalinvasiv gewinnbar, in reichlicher Menge vorhanden, fähig zur in vitro Expansion in der Zellkultur und fähig zur Produktion stabiler fibrocartilaginärer Matrix. All dies scheint im Großen und Ganzen auf mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark zuzutreffen. Selbstverständlich können diese im Normalfall autolog verwendet werden. Zwar stellen sie nur einen geringen Prozentsatz der Zellen im Knochenmark dar, aber sie können sowohl in vivo rasch durch Proliferation ersetzt, als auch in der Zellkultur schnell und effizient vermehrt werden, ohne dabei ihre Stammzeleigenschaften zu verlieren. [126] Dabei ist die Gewinnung durch Knochenmarkpunktion, wie zum Beispiel im vorliegenden Versuch am Beckenkamm, relativ unkompliziert und sicher. [127] Allgemein anerkannt ist, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark die Fähigkeit haben, in unterschiedliche Zelllinien zu differenzieren. [76,126] Auch die letztgenannte Anforderung von Hoben et al. [125], nämlich die Fähigkeit zur Produktion von stabiler fibrocartilaginärer Matrix scheint wohl erfüllt zu sein, da Zellner et al. [2] im Tierversuch durch Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen mechanisch stabiles meniskusähnliches Gewebe erzeugen konnten.

Viele weitere Studienergebnisse verdeutlichen, dass die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen für die Reparatur von Meniskusläsionen sinnvoll sein kann. In einer noch nicht veröffentlichten Studie konnten Sekiya et al. zeigen, dass in der Synovialflüssigkeit von Knien mit verletztem Meniskus deutlich mehr pluripotente Zellen vorhanden sind, als in Knien mit intaktem Meniskus. [128] Der Gedanke liegt nahe, dies als körpereigenen Reparaturversuch zu werten. Doch wenn dem so wäre, warum erlangt der Körper so trotzdem keine vollständige Selbstheilung? Möglicherweise gelangen nicht genügend pluripotente Stammzellen an die verletzte Stelle. Die Zahl der in der Synovialflüssigkeit vorhandenen mesenchymalen Stammzellen könnte also zu gering sein. Durch das Einbringen von mesenchymalen Stammzellen in die Gelenkkapsel alleine kann dieses Problem jedoch nicht gelöst werden. In in vivo Experimenten mit Ratten wurden bei alleinigem Einbringen von mesenchymalen Stammzellen in das Knie zwar einzelne Areale der Meniskusheilung beobachtet, gleichzeitig bildeten sich aber Vernarbungen und freies Gewebe im Gelenk, was den klinischen Einsatz limitiert. [55,77] Vangsness et al. [129] beobachteten in einer klinischen Studie, dass Patienten, die nach partieller Menisektomie eine Injektion von mesenchymalen Stammzellen in das Kniegelenk erhielten, im Vergleich zur bloßen Injektion von Hyaluronsäure eine signifikante

## Diskussion

Besserung der Schmerzen erfahren. Auch wurde bei der Gruppe mit der Stammzellinjektion eine signifikante Zunahme der Meniskusmasse beobachtet. Jedoch ergab sich keine vollständige Defektfüllung.

Für die Meniskusreparatur mit Hilfe von mesenchymalen Stammzellen scheint es also einerseits wichtig, die mesenchymalen Stammzellen in hoher Konzentration an die verletzte Stelle zu bringen, andererseits darf die Konzentration der Zellen in der Synovialflüssigkeit nicht zu hoch werden, da sonst negative Effekte zu erwarten sind.

Des Weiteren erscheint es logisch, dass die mesenchymalen Stammzellen eine vor mechanischer Zerstörung geschützte und gleichzeitig gut mit Nährstoffen versorgte Umgebung benötigen, die außerdem ein dreidimensionales Gerüst für die Zellen bereitstellt. Möglicherweise kann eine solche Umgebung und eine hohe lokale Konzentration der mesenchymalen Stammzellen mit zellbesiedelten Scaffolds erreicht werden.

Zellner et al. konnten in zwei verschiedenen Tierversuchen durch den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark eine signifikante Verbesserung der Therapie von Meniskusläsionen erreichen. Dabei wurden mit mesenchymalen Stammzellen besiedelte Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrices verwendet, wobei eine zellfreie Matrix als Kontrolle fungierte. Sowohl bei der Reparatur eines zirkulären Punch-Defekts im avaskulären Bereich [4], als auch bei einem longitudinalen Rissdefekt im avaskulären Bereich des Meniskus [2] wurde ein signifikant besseres Ergebnis im Vergleich zur zellfreien Kontrolle erreicht, wobei gut integriertes, meniskusähnliches Gewebe gebildet wurde. Mit derselben Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix konnten auch Angele et al. [100] eine Verbesserung der Therapie von Meniskusdefekten durch Besiedelung des Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark erreichen. Das von Angele et al. verwendete Defektmodell, nämlich ein circa 5 mm breiter, kompletter gemischt vaskulär-avaskulärer Defekt der Pars intermedia des Meniskus vom Neuseelandhasen, unterscheidet sich dabei nur in einem Punkt von dem Meniskusdefektmodell, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde: Angele et al. untersuchten einen Defekt des medialen Meniskus, während die vorliegende Arbeit einen Defekt im lateralen Meniskus betrachtet.

Wie gerade beschrieben, scheinen mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark eine Verbesserung der Therapie von Meniskusläsionen möglich zu machen. Doch warum ist dies so? Letztendlich ist diese Frage noch nicht vollständig geklärt, aber es gibt einige plausible Erklärungsansätze, die im Folgenden erläutert werden.

Caplan et al. [130] beschrieben eine duale Rolle der mesenchymalen Stammzellen bei der Gewebereparatur. Zunächst könnten mesenchymale Stammzellen direkt eine Heilung von

## Diskussion

Meniskusläsionen bewirken, da sie zu Fibrochondrozyten differenzieren können. [76,131] Neben der direkten Defektreparatur scheinen mesenchymale Stammzellen auch indirekt die Heilung von Meniskusdefekten zu begünstigen. So besitzen mesenchymale Stammzellen trophische Aktivität durch Sekretion von bioaktiven Substanzen [119] und begünstigen so möglicherweise die Selbstheilung. Zudem werden den mesenchymalen Stammzellen immunoregulatorische Eigenschaften zugeschrieben. [119] Ihre Fähigkeit ein regeneratives Mikromilieu zu schaffen, könnte mutmaßlich sowohl die Bildung von Narbengewebe als auch den Zelluntergang in verletztem Gewebe verringern. [119]

Wie beschrieben, scheint also der Einsatz von mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Scaffolds vielversprechend, doch noch befinden sich nur zellfreie Konstrukte in der klinischen Anwendung. Sicherlich ist der klinische Einsatz von zellfreien Konstrukten unkomplizierter und – zumindest kurzfristig- billiger als der Einsatz eines zellbesiedelten Konstruktes. Will man ein mit autologen mesenchymalen Stammzellen besetztes Scaffold einsetzen, so muss ein zweizeitiger Eingriff durchgeführt werden. Es muss einige Zeit vor der eigentlichen Meniskusreparatur eine Knochenmarkpunktion erfolgen, bei der mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und erst zu einem zweiten Zeitpunkt kann dann das zellbesiedelte Scaffold eingesetzt werden. Dadurch ergeben sich nicht nur zusätzliche Kosten, sondern auch Unannehmlichkeiten für den betroffenen Patienten. Dies muss sorgfältig gegenüber einem möglichen Langzeitbenefit durch zellbesiedelte Implantate abgewogen werden.

Neben den bereits oben genannten Nachteilen des gewählten Tiermodells hatte der Tierversuch der vorliegenden Arbeit die im Folgenden genannten Limitationen. Prinzipiell wäre eine längere Versuchsdauer wünschenswert, jedoch wurde hier ganz bewusst der Fokus auf die frühen Heilungsprozesse gelegt. Ein weiterer Mangel ist, dass die Kaninchen sofort nach der OP wieder die Möglichkeit zur vollen Belastung und zum freien Bewegen hatten, während man in der klinischen Rehabilitation nach Meniskusreparatur die Belastung erst langsam wieder aufbauen würde.

In der vorliegenden Tierstudie wurde in vivo nach 6 und nach 12 Wochen kaum Degradation der Polyurethanscaffolds festgestellt. Dies wurde auch so erwartet, da man annimmt, dass der Abbau des Actifit®-Polymers circa 5 Jahre dauert. [89] Auch in bisherigen klinischen Studien wurde nach 2 Jahren keine nennenswerte Degradation der Matrix beobachtet. [89]

Um großflächige Meniskusläsionen zu reparieren scheint es notwendig eine Art von zumindest temporär stabilem Ersatzmaterial zu verwenden, um eine Heilung oder Funktionswiederherstellung zu ermöglichen. Versuche, bei denen lediglich Blutgerinnsel [132], lose Zellen, Hyaluronsäure [129] oder ähnliches verwendet wurden, blieben jedenfalls

## Diskussion

zumeist ohne Erfolg. Deshalb scheint der Einsatz von stabilem Material nötig zu sein. Vielfältige Ansätze wurden dabei, vor allem in vitro und tierexperimentell, aber teils auch in klinischen Studien, bereits erprobt. Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, auf all diese Ansätze einzugehen. Jedoch sollen exemplarisch einige besonders relevante oder besonders vielversprechende Ansätze dargestellt werden.

In klinischen Studien brachten humane Meniskusallografts eine Besserung der Beschwerden und der Funktion. [57] Jedoch fehlen Langzeitergebnisse und ein chondroprotektiver Effekt ist noch nicht nachgewiesen. [57,58] Außerdem sind die Allografts in Deutschland schlecht verfügbar [8,54] und die Indikationen für einen solchen Eingriff limitiert. [63] Problematisch sind die teils beträchtlichen Implantatschrumpfungen [59] und das Auftreten von immunologischen Abstoßungsreaktionen. [28,60,61] Möglicherweise besteht zudem das Risiko von Infektionsübertragungen. [62,63] Humane Allografts scheinen also nicht die optimale Lösung zu sein. Nicht zuletzt deshalb wurden verschiedene künstliche Meniskusersatzmaterialien aus natürlichen oder synthetischen Bestandteilen entwickelt.

Die zwei im Folgenden beschriebenen Scaffolds befinden sich seit einigen Jahren in der klinischen Testung.

CMI® (ReGen Biologics Inc., Redwood, USA) ist ein poröses Meniskusersatzscaffold aus Kollagen I. [81] Für ein Implantat aus Kollagen spricht, dass es geringe Immunogenität besitzt, als Leitstruktur für das Einwachsen von Gewebe dienen kann, die Porengröße angepasst werden kann und der Umbau des Implantats durch eingewachsenes Gewebe vergleichsweise einfach ist. [81,133–135] Ein großer Nachteil des CMI® sind die initial im Vergleich zum nativen Meniskus deutlich unterlegenen biomechanischen Eigenschaften des Implantats, weshalb es wohl zumindest anfangs nicht zur physiologischen Kraftverteilung des Meniskus beitragen kann. [81] In mehreren klinischen Studien brachte die Implantation eines CMI® im Vergleich zur präklinischen Situation signifikant bessere Klinik, teils mit Rückkehr zu voller sportlicher Aktivität, geringeren Schmerzen, bioptisch beobachtetem Einwachsen von Gewebe und radiologisch evaluiertem Stopp der Progression von Osteoarthrose. [82,84,85,87,88,136] Klinisch scheint CMI® sicher zu sein. [137] Problematisch mutet jedoch die mehrfach beobachtete, teils schnelle Implantatschrumpfung des CMI® an, deren Konsequenzen noch nicht absehbar sind. [55,82,136] Mehrere Autoren von Reviews bemängeln zudem die teils unzulängliche Studienqualität der CMI®-Studien wegen oft kleiner Patientenzahlen, häufig fehlenden Kontrollgruppen und die nur selten durchgeführten Biopsien zur histologischen Evaluation. [78,81,84] Außerdem wurden viele der Studien von den ursprünglichen Erfindern des CMI® durchgeführt [81], was zumindest verlangt, die Ergebnisse kritisch zu hinterfragen.

## Diskussion

Eine weitere Gruppe von Meniskusersatzmaterialien besteht aus synthetischen Polymeren. Synthetische Materialien besitzen einige Vorteile. So stehen sie, da industriell fertigbar, nahezu unbegrenzt zu Verfügung und können, zumindest in der Theorie, in Form, Biomechanik und Porengeometrie nach Belieben modifiziert werden. [1] Actifit®, ein Vertreter dieser Gruppe, besteht aus Polyurethanpolymeren, die aus einer Kombination aus biologisch abbaubaren Polyestersegmenten und teilweise abbaubaren steifen Segmenten aufgebaut sind. [9] Ein denkbares Risiko ist, dass durch Akkumulation von Abriebpartikeln des Polyurethans möglicherweise unerwünschte Effekte auftreten könnten [138], jedoch erwies sich das Material in den bisherigen Tests als sicher. [9] Das Scaffold war ursprünglich für den kompletten Meniskusersatz konzipiert, erwies sich dafür aber als ungeeignet [139] und ist nun lediglich für den partiellen Meniskusersatz indiziert, wofür es sich im Rindermodell als geeignet erwies. [94] Wie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Rinderstudie ein Einwachsen von Gewebe in das Implantat. In einem partiellen Meniskusdefektmodell an einer menschlichen Leiche verbesserte die Actifit®-Matrix zudem die Biomechanik. [93]

Verdonk et al. [97] publizierten eine klinische Fallserie von 52 partiellen Meniskektomien, welche mit einem Actifit®-Implantat behandelt worden waren. Im 2-Jahres-follow-up zeigte sich dabei eine signifikante und relevante Verbesserung der Klinik mit Schmerzreduktion und verbesserter Funktion und verbessertem Knorpelstatus. Auch in mehreren weiteren klinischen Studien bestätigte sich die klinische Besserung durch Actifit® und die Sicherheit des Implantats sowohl in lateralen, als auch in medialen partiellen Meniskusdefekten. [86,98,116] Verdonk et al. [89] beobachteten in einer klinischen Studie, bei der 52 Patienten ein zellfreies Actifit®-Implantat erhielten, bereits nach 3 Monaten ein Einwachsen von Gefäßen. In der Second-Look-Arthroskopie nach einem Jahr zeigte sich bis auf einen Fall eine gute Integration des Scaffolds in den nativen Meniskus. Biopsien zeigten vitale Zellen und das Einwachsen von meniskusähnlichem Gewebe. Bei den bisherigen klinischen Tests des Actifit®-Implantats fehlten allerdings randomisierte Kontrollen und auch Langzeitergebnisse stehen noch aus.

Spencer et al. [140] verglichen die Outcomes beim Einsatz von Actifit® und CMI®. Bei beiden zeigte sich eine signifikante Besserung der Klinik. Es konnte kein Unterschied im Outcome zwischen den beiden Scaffolds festgestellt werden. Aber Actifit® hat wegen seiner polymeren Struktur eine größere mechanische Stärke als CMI® und somit auch ein einfacheres intraoperativeres Handling. [141]

Ein möglicher Nachteil von Actifit® gegenüber CMI® könnte die relativ langsame Degradation sein, von der man annimmt, dass sie erst nach 4 – 6 Jahren auftritt. [141] Jedoch

## Diskussion

könnte ein zu schneller Abbau deutlich negativere Effekte haben, als ein zu langsamer Abbau. [78]

Um zu klären, welches Scaffold nun für den partiellen Meniskusersatz besser geeignet ist, müssen noch randomisierte kontrollierte Studien mit Langzeit-follow-up durchgeführt werden. Trotzdem scheint das Actifit®-Scaffold bereits jetzt als zellfreies Konstrukt sicher und vielversprechend. Deshalb ist es umso erstrebenswerter, diesen Ansatz durch den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen weiter zu optimieren.

Dass auch die Implantation einer zellfreien Actifit®-Matrix einen Benefit bringen kann, wird deutlich, wenn man die Ergebnisse der vorliegenden Tierstudie mit den Ergebnissen eines Tierversuchs von Angele et al. [100] vergleicht. Dessen Defektmodell unterschied sich nur dadurch, dass der Defekt im Innenmeniskus lag. Die bloße partielle Meniskektomie führte nach 12 Wochen zu unzureichender Bildung von Narbengewebe und auch die Füllung mit einem zellfreien Hyaluronsäure-Gelatine-Scaffold führte in den meisten Fällen nur zum selben Ergebnis. Dagegen wurde im Tierversuch der vorliegenden Arbeit sowohl bei den zellbesiedelten, als auch bei den zellfreien Actifit®-Scaffolds nach 12 Wochen gute Ergebnisse erzielt. Die Defekte waren makroskopisch bei beiden Gruppen gut gefüllt und zumeist auch gut in den nativen Meniskus integriert.

Die vorliegende Arbeit lässt die Behandlung von partiellen Meniskusdefekten mittels einer mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark besetzten Actifit®-Matrix sinnvoll erscheinen. Gerade die schnelle Einheilung der zellbesetzten Matrix macht den Einsatz von Stammzellen vielversprechend. Die angiotaktischen Eigenschaften des Materials, welche möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Meniskusheilung haben könnten, wurden in dieser Studie deutlich.

Bevor die Kombination aus Actifit® und mesenchymalen Stammzellen klinisch getestet wird, sollten noch Tierversuche mit längeren Verweildauern durchgeführt werden. Dazu wäre die Verwendung einer schwereren Tierart wünschenswert, bei der die herrschenden Kräfte eher denen beim Menschen nahe kommen. Außerdem sollte dann, wenn möglich, auch im Tierversuch arthroskopisch operiert werden, da eine offene Operation ein deutlich größeres Trauma darstellt. [78]

Die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark könnte den entscheidenden Durchbruch für die Meniskusreparatur darstellen und sollte deshalb weiterhin intensiv erforscht werden. Auch sollten weiterhin verschiedene Biomaterialien untersucht werden, um das optimale Scaffold für den Meniskusersatz zu finden. Das in dieser Arbeit

## Diskussion

entwickelte und getestete Scoring für die in vitro Erprobung von Biomaterial könnte hierbei hilfreich sein.

Unabhängig von der Verwendung von mesenchymalen Stammzellen ist es nötig, dass mit den beiden bereits in klinischer Testung befindlichen Scaffolds Actifit® und CMI® randomisierte kontrollierte klinische Studien durchgeführt werden. Gerade im Hinblick auf die Tatsache, dass diese beiden Implantate in kommerzieller Hand sind, wäre es wichtig, diese von unabhängiger Seite vergleichend auf ihre biomechanischen Eigenschaften zu testen.

## 5 Zusammenfassung

Noch immer muss bei Läsionen im avaskulären Bereich des Meniskus häufig auf die das Arthroserisiko erhöhende (partielle) Meniskektomie zurückgegriffen werden. Tissue Engineering des Meniskus könnte zur Lösung dieses Problems entscheidend beitragen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Kombination aus Scaffold und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.

Zunächst wurden verschiedene Biomaterialien *in vitro* intensiv auf wichtige Eigenschaften getestet und die Ergebnisse mittels eines eigens entwickelten Scoringsystems bewertet. Dieses könnte in Zukunft ein Tool für eine relativ einfache, aber trotzdem aussagekräftige Testung von Biomaterialien sein. Actifit® zeigte in diesem Test die besten Bioeigenschaften der getesteten Scaffolds. Es wird momentan als zellfreies Konstrukt klinisch eingesetzt.

Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob die Therapie von Meniskusläsionen im avaskulären Bereich durch die Befüllung eines Actifit®-Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen verbessert werden kann.

Zur *in vivo* Testung wurde ein etabliertes Meniskusdefektmodell im Neuseelandhasen verwendet. In einem ersten Schritt wurde die Kompatibilität des Biomaterials Actifit® mit dem Tiermodell *in vitro* untersucht und bestätigt. Im anschließenden Tierversuch wurde ein kompletter Defekt in der Pars intermedia des Außenmeniskus gesetzt. Ein Actifit®-Scaffold wurde mit autologen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark besetzt und ohne Vorkultur in den Defekt eingenäht. Als kontralaterale Kontrolle diente ein zellfreies Actifit®-Scaffold. Die Meniskusreparatur wurde makroskopisch und mikroskopisch mithilfe eines etablierten Scoringsystems beurteilt. Nach sechs Wochen waren der Gesamtscorewert, die Proteoglykanbildung und die Integration der zellbesiedelten Scaffolds signifikant besser als bei der zellfreien Kontrolle. Nach 12 Wochen zeigten beide Gruppen allerdings weitgehend gleiche Ergebnisse. Bei beiden Gruppen zeigte sich im Bereich der Scaffolds eine dichte Vaskularisierung. Actifit® könnte also das Einwachsen von Gefäßen begünstigen.

Das Polyurethan Actifit® scheint auch als zellfreies Konstrukt gut zur Therapie von Meniskusdefekten geeignet. Jedoch könnten den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge durch die zusätzliche Besetzung mit mesenchymalen Stammzellen die Heilung vorteilhaft beschleunigt werden.

Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten Motivation für weitere Testung des Konstrukts aus Actifit® und mesenchymalen Stammzellen sein. Generell scheint der Einsatz mesenchymaler Stammzellen zur Meniskusreparatur sinnvoll.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: Structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*. 2011;32:7411–31.
2. Zellner J, Hierl K, Mueller M, Pfeifer C, Berner A, Dienstknecht T, et al. Stem cell-based tissue-engineering for treatment of meniscal tears in the avascular zone. *J. Biomed. Mater. Res*. 2013;101:1133–42.
3. McDermott ID, Amis AA. The consequences of Meniscectomy. *Bone Joint Surg Br* 2006;88:1549–1556;2006.
4. Zellner J, Mueller M, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, Nerlich M, et al. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J. Biomed. Mater. Res*. 2010;9999A:NA.
5. Grifka J, Kuster M. Orthopädie und Unfallchirurgie: Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung. SpringerLink : Bücher. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
6. Veth RP. Clinical significance of knee joint changes after meniscectomy. *Clin Orthop Relat Res*. 1985;56–60.
7. Pengas IP, Assiotis A, Nash W, Hatcher J, Banks J, McNicholas MJ. Total meniscectomy in adolescents: A 40-year follow-up. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*. 2012;94-B:1649–54.
8. Zellner J. Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen. Medizinische Dissertation. Regensburg; 2006.
9. Vrancken, Anne Christiane Theodora, Buma P, Tienen TG. Synthetic meniscus replacement: a review. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2013;37:291–99.
10. Jones JC, Burks R, Owens BD, Sturdivant RX, Svoboda SJ, Cameron KL. Incidence and Risk Factors Associated with Meniscal Injuries Among Active-Duty US Military Service Members. *J Athl Train*. 2012;47:67–73.
11. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus Lernatlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 2nd ed. Stuttgart: G.Thieme; 2007.
12. Fox, A. J. S., Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Human Knee Menisci: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*. 2012;4:340–51.
13. Kohn D, Moreno B. Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: A morphological cadaveric study. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1995;11:96–103.
14. Gupte CM, Smith A, McDermott ID, Bull, A. M. J., Thomas RD, Amis AA. Menisconfemoral ligaments revisited. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2002;84:846–51.
15. Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anatomy*. 1998;193:161–78.
16. Brindle T, Nyland J, Johnson DL. The meniscus: review of basic principles with application to surgery and rehabilitation. *J Athl Train*. 2001;36:160–69.
17. Petersen W, Tillmann B. Funktionelle Anatomie der Menisken des Kniegelenks Kollagenfasertextur und Biomechanik. *Arthroscopie*. 1998;11:133–35.
18. Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*. 1982;10:90–95.
19. Danzig L, Resnick D, Gonsalves M, Akeson WH. Blood supply to the normal and abnormal menisci of the human knee. *Clin Orthop Relat Res*. 1983:271–76.

20. Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G. The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy*. 1985;1:58–62.
21. Fink C. Meniskusrefixation - Anatomische und biologische Grundlagen. *Arthroskopie*. 2001;14:248–53.
22. O'Connor BL. The mechanoreceptor innervation of the posterior attachments of the lateral meniscus of the dog knee joint. *J Anat*. 1984;138 (Pt 1):15–26.
23. Wilson AS, Legg PG, McNeur JC. Studies on the innervation of the medial meniscus in the human knee joint. *The Anatomical record*. 1969;165:485–91.
24. Dye SF, Vaupel GL, Dye CC. Conscious neurosensory mapping of the internal structures of the human knee without intraarticular anesthesia. *Am J Sports Med*. 1998;26:773–77.
25. Fukubayashi T, Kurosawa H. The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints. *Acta Orthop Scand*. 1980;51:871–79.
26. Walker PS, Erkman MJ. The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 1975:184–92.
27. Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*. 1976;58:599–604.
28. Weigel B, Nerlich ML. *Praxisbuch Unfallchirurgie*. 2nd ed. SpringerLink : Bücher. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
29. Fithian DC, Kelly MA, Mow VC. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res*. 1990:19–31.
30. Voloshin AS, Wosk J. Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng*. 1983;5:157–61.
31. Seedhom BB, Terayama K. Knee forces during the activity of getting out of a chair with and without the aid of arms. *Biomed Eng*. 1976;11:278–82.
32. Hsieh HH, Walker PS. Stabilizing mechanisms of the loaded and unloaded knee joint. *J Bone Joint Surg Am*. 1976;58:87–93.
33. Levy IM, Torzilli PA, Gould JD, Warren RF. The effect of lateral meniscectomy on motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1989;71:401–06.
34. Levy IM, Torzilli PA, Warren RF. The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64:883–88.
35. Bird MD, Sweet MB. Canals in the semilunar meniscus: brief report. *J Bone Joint Surg Br*. 1988;70:839.
36. Bird MD, Sweet MB. A system of canals in semilunar menisci. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1987;46:670–73.
37. Renstrom P, Johnson RJ. Anatomy and biomechanics of the menisci. *Clin Sports Med*. 1990;9:523–38.
38. Akgun U, Kocaoglu B, Orhan EK, Baslo MB, Karahan M. Possible reflex pathway between medial meniscus and semimembranosus muscle: an experimental study in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthr*. 2008;16:809–14.
39. Assimakopoulos AP, Katonis PG, Agapitos MV, Exarchou EI. The innervation of the human meniscus. *Clin Orthop Relat Res*. 1992:232–36.
40. Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res*. 1980:283–90.
41. Allen CR, Wong EK, Livesay GA, Sakane M, Fu FH, Woo SL. Importance of the medial meniscus in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *J. Orthop. Res*. 2000;18:109–15.

42. Ghadially FN, Thomas I, Yong N, Lalonde JM. Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages. *J Anat.* 1978;125:499–517.
43. Taeger C. Tissue Engineering mit autologen Wachstumsfaktoren und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen. Medizinische Dissertation. Regensburg; 2008.
44. Bland YS, Ashhurst DE. Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. *Histochem J.* 1996;28:265–74.
45. Gao J, Oqvist G, Messner K. The attachments of the rabbit medial meniscus. A morphological investigation using image analysis and immunohistochemistry. *J Anat.* 1994;185 (Pt 3):663–67.
46. Hannink G, de Mulder, Eric L W, van Tienen, Tony G, Buma P. Effect of load on the repair of osteochondral defects using a porous polymer scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100:2082–89.
47. Campbell SE, Sanders TG, Morrison WB. MR imaging of meniscal cysts: incidence, location, and clinical significance. *AJR Am J Roentgenol.* 2001;177:409–13.
48. Abdel-Hamid MZ, Chang C, Chan Y, Lo Y, Huang J, Hsu K, et al. Arthroscopic evaluation of soft tissue injuries in tibial plateau fractures: retrospective analysis of 98 cases. *Arthroscopy.* 2006;22:669–75.
49. Trillat A. Traumatic lesions of the internal meniscus of the knee. Anatomical classification and clinical diagnosis. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1962;48:551–60.
50. Rupp S, Seil R, Kohn D. Meniscus lesions. *Orthopade.* 2002;31:812–28; quiz 829–831.
51. Agneskirchner JD, Lobenhoffer P. Arthroskopische Meniskuschirurgie: Technisch-operative Verfahren. *Unfallchirurg.* 2004;107:795–802.
52. Nepple JJ, Dunn WR, Wright RW. Meniscal repair outcomes at greater than five years: a systematic literature review and meta-analysis. *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* 2012;94:2222–27.
53. Petty CA, Lubowitz JH. Does arthroscopic partial meniscectomy result in knee osteoarthritis? A systematic review with a minimum of 8 years' follow-up. *Arthroscopy.* 2011;27:419–24.
54. Scheffler S. Allogene Meniskustransplantation. *Arthroscopie.* 2011;24:36–41.
55. Liu C, Toma IC, Mastrogiacomo M, Krettek C, Lewinski G von, Jagodzinski M. Meniscus reconstruction: today's achievements and premises for the future. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2013;133:95–109.
56. 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.
57. Verdonk, Peter C M, Demurie A, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G, Verdonk R. Transplantation of viable meniscal allograft. Survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:715–24.
58. Coninck T de, Huysse W, Verdonk R, Verstraete K, Verdonk P. Open versus arthroscopic meniscus allograft transplantation: magnetic resonance imaging study of meniscal radial displacement. *Arthroscopy.* 2013;29:514–21.
59. Carter T, Economopoulos KJ. Meniscal allograft shrinkage-MRI evaluation. *J Knee Surg.* 2013;26:167–71.
60. Hamlet W, Liu SH, Yang R. Destruction of a cryopreserved meniscal allograft: a case for acute rejection. *Arthroscopy.* 1997;13:517–21.
61. 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;82-A:1071–82.

62. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive *Streptococcus pyogenes* after allograft implantation--Colorado, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003;52:1174–76.
63. Crook TB, Ardolino A, Williams, L A P, Barlow IW. Meniscal allograft transplantation: a review of the current literature. *Ann R Coll Surg Engl.* 2009;91:361–65.
64. Pereira H, Frias AM, Oliveira JM, Espregueira-Mendes J, Reis RL. Tissue engineering and regenerative medicine strategies in meniscus lesions. *Arthroscopy.* 2011;27:1706–19.
65. Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, Sekiya I, Caroom CT, Prockop DJ, et al. Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:701–12.
66. Heatley FW. The meniscus--can it be repaired? An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 1980;62:397–402.
67. Klompmaaker J, Jansen HW, Veth RP, Nielsen HK, de Groot, J H, Pennings AJ. Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage. *Clin Mater.* 1993;14:1–11.
68. Klompmaaker J, Veth R, Jansen H, Nielsen H, Groot JH de, Pennings AJ, et al. Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity. *Biomaterials.* 1996;17:1685–91.
69. Kohn D, Rudert M, Wirth CJ, Plitz W, Reiss G, Maschek H. Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. *International Orthopaedics.* 1997;21:232–38.
70. Walsh CJ, Goodman D, Caplan AI, Goldberg VM. Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng.* 1999;5:327–37.
71. Bruns J, Kahrs J, Kampen J, Behrens P, Plitz W. Autologous perichondral tissue for meniscal replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80:918–23.
72. Pressel T, V Lewinski G, Kohn D, Wirth CJ. Meniscus replacement with quadriceps tendon--a long-term analysis. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2005;143:42–47.
73. Cisa J, Basora J, Madarnas P, Ghibely A, Navarro-Quilis A. Meniscal repair by synovial flap transfer. Healing of the avascular zone in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1995;66:38–40.
74. Ishida K, Kuroda R, Miwa M, Tabata Y, Hokugo A, Kawamoto T, et al. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng.* 2007;13:1103–12.
75. Mapp PI. Innervation of the synovium. *Ann Rheum Dis.* 1995;54:398–403.
76. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.* 1999;284:143–47.
77. Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, et al. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14:1307–14.
78. Rongen JJ, van Tienen, Tony G., van Bochove B, Grijpma DW, Buma P. Biomaterials in search of a meniscus substitute. *Biomaterials.* 2014;35:3527–40.
79. Shemesh M, Asher R, Zylberberg E, Guilak F, Linder-Ganz E, Elsner JJ. Viscoelastic properties of a synthetic meniscus implant. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;29:42–55.
80. Hasan J, Fisher J, Ingham E. Current strategies in meniscal regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2013.
81. Buma P, van Tienen T, Veth R. The collagen meniscus implant. *Expert Rev Med Devices.* 2007;4:507–16.

82. Rodkey WG, Steadman JR, Li ST. A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus. *Clin Orthop Relat Res.* 1999:S281-92.
83. Steadman JR, Rodkey WG. Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results. *Arthroscopy.* 2005;21:515–25.
84. Harston A, Nyland J, Brand E, McGinnis M, Caborn, David N M. Collagen meniscus implantation: a systematic review including rehabilitation and return to sports activity. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20:135–46.
85. Zaffagnini S, Giordano G, Vascellari A, Bruni D, Neri MP, Iacono F, et al. Arthroscopic collagen meniscus implant results at 6 to 8 years follow up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15:175–83.
86. Bouyarmane H, Beaufils P, Pujol N, Bellemans J, Roberts S, Spalding T, et al. Polyurethane scaffold in lateral meniscus segmental defects: Clinical outcomes at 24months follow-up. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research.* 2014;100:153–57.
87. Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery, William H 3rd, Baker, Champ L Jr, Beck, Charles L Jr, Hormel SE, et al. Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90:1413–26.
88. Zaffagnini S, Marcheggiani Muccioli, Giulio Maria, Bulgheroni P, Bulgheroni E, Grassi A, Bonanzinga T, et al. Arthroscopic collagen meniscus implantation for partial lateral meniscal defects: a 2-year minimum follow-up study. *Am J Sports Med.* 2012;40:2281–88.
89. Verdonk R, Verdonk P, Huysse W, Forsyth R, Heinrichs E. Tissue Ingrowth After Implantation of a Novel, Biodegradable Polyurethane Scaffold for Treatment of Partial Meniscal Lesions. *The American Journal of Sports Medicine.* 2011;39:774–82.
90. Zuidema J, van Minnen B, Span MM, Hissink CE, van Kooten, T G, Bos, R R M. In vitro degradation of a biodegradable polyurethane foam, based on 1,4-butanediisocyanate: a three-year study at physiological and elevated temperature. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90:920–30.
91. van Minnen B, van Leeuwen, M B M, Kors G, Zuidema J, van Kooten, T G, Bos, R R M. In vivo resorption of a biodegradable polyurethane foam, based on 1,4-butanediisocyanate: a three-year subcutaneous implantation study. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85:972–82.
92. Galley NK, Gleghorn JP, Rodeo S, Warren RF, Maher SA, Bonassar LJ. Frictional properties of the meniscus improve after scaffold-augmented repair of partial meniscectomy: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469:2817–23.
93. Brophy RH, Cottrell J, Rodeo SA, Wright TM, Warren RF, Maher SA. Implantation of a synthetic meniscal scaffold improves joint contact mechanics in a partial meniscectomy cadaver model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92:1154–61.
94. Maher SA, Rodeo SA, Doty SB, Brophy R, Potter H, Foo L, et al. Evaluation of a Porous Polyurethane Scaffold in a Partial Meniscal Defect Ovine Model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery.* 2010;26:1510–19.
95. Welsing, Roy T C, van Tienen, Tony G, Ramrattan N, Heijkants R, Schouten AJ, Veth, Rene P H, et al. Effect on tissue differentiation and articular cartilage degradation of a polymer meniscus implant: A 2-year follow-up study in dogs. *Am J Sports Med.* 2008;36:1978–89.
96. Hannink G, Tienen TG, Schouten AJ, Buma P. Changes in articular cartilage after meniscectomy and meniscus replacement using a biodegradable porous polymer implant. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:441–51.

97. Verdonk P, Beaufils P, Bellemans J, Djian P, Heinrichs E, Huysse W, et al. Successful Treatment of Painful Irreparable Partial Meniscal Defects With a Polyurethane Scaffold: Two-Year Safety and Clinical Outcomes. *The American Journal of Sports Medicine*. 2012;40:844–53.
98. Efe T, Getgood A, Schofer MD, Fuchs-Winkelmann S, Mann D, Paletta, Jürgen R. J., et al. The safety and short-term efficacy of a novel polyurethane meniscal scaffold for the treatment of segmental medial meniscus deficiency. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20:1822–30.
99. Angele P, Müller R, Schumann D, Englert C, Zellner J, Johnstone B, et al. Characterization of esterified hyaluronan-gelatin polymer composites suitable for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res*. 2009;91A:416–27.
100. Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, et al. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J. Biomed. Mater. Res*. 2008;85A:445–55.
101. Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B. Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng*. 1999;5:545–54.
102. 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;79:1770–77.
103. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*. 1994;12:689–93.
104. Maher SA, Rodeo SA, Potter HG, Bonassar LJ, Wright TM, Warren RF. A pre-clinical test platform for the functional evaluation of scaffolds for musculoskeletal defects: the meniscus. *HSS J*. 2011;7:157–63.
105. Verdonk R, Espregueira-Mendes J, Monllau JC. *Meniscal transplantation*. Heidelberg, New York: Springer; 2013.
106. Lara C. Ionescu, PhD, and Robert L. Mauck, PhD. Porosity and Cell Preseeding Influence Electrospun Scaffold Maturation and Meniscus Integration In Vitro. *Tissue Eng Part A*. 2013;2013.
107. Moffet H, Richards CL, Malouin F, Bravo G, Paradis G. Early and intensive physiotherapy accelerates recovery postarthroscopic meniscectomy: results of a randomized controlled study. *Arch Phys Med Rehabil*. 1994;75:415–26.
108. Eriksson E, Haggmark T. Comparison of isometric muscle training and electrical stimulation supplementing isometric muscle training in the recovery after major knee ligament surgery. A preliminary report. *Am J Sports Med*. 1979;7:169–71.
109. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, et al. Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *J Physiol*. 2011;589:511–24.
110. Suetta C, Hvid LG, Justesen L, Christensen U, Neergaard K, Simonsen L, et al. Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107:1172–80.
111. Frizziero A, Ferrari R, Giannotti E, Ferroni C, Poli P, Masiero S. The meniscus tear. State of the art of rehabilitation protocols related to surgical procedures. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2012;2:295–301.
112. Hanks GA, Gause TM, Sebastianelli WJ, O'Donnell CS, Kalenak A. Repair of peripheral meniscal tears: open versus arthroscopic technique. *Arthroscopy*. 1991;7:72–77.

113. Jakob RP, Staubli HU, Zuber K, Esser M. The arthroscopic meniscal repair. Techniques and clinical experience. *Am J Sports Med.* 1988;16:137–42.
114. Petersen W, Pufe T, Starke C, Fuchs T, Kopf S, Neumann W, et al. The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007;127:235–40.
115. Ashraf S, Wibberley H, Mapp PI, Hill R, Wilson D, Walsh DA. Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2011;70:523–29.
116. Schuttler KF, Pottgen S, Getgood A, Rominger MB, Fuchs-Winkelmann S, Roessler PP, et al. Improvement in outcomes after implantation of a novel polyurethane meniscal scaffold for the treatment of medial meniscus deficiency. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014.
117. Fox JM, Rintz KG, Ferkel RD. Trephination of incomplete meniscal tears. *Arthroscopy.* 1993;9:451–55.
118. Zhang Z, Arnold JA, Williams T, McCann B. Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats. *Am J Sports Med.* 1995;23:35–41.
119. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213:341–47.
120. McNulty AL, Moutos FT, Weinberg JB, Guilak F. Enhanced integrative repair of the porcine meniscus in vitro by inhibition of interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3033–42.
121. Ionescu LC, Lee GC, Garcia GH, Zachry TL, Shah RP, Sennett BJ, et al. Maturation state-dependent alterations in meniscus integration: implications for scaffold design and tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2011;17:193–204.
122. Fox DB, Warnock JJ. Cell-based meniscal tissue engineering: a case for synoviocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469:2806–16.
123. Tateishi K, Higuchi C, Ando W, Nakata K, Hashimoto J, Hart DA, et al. The immunosuppressant FK506 promotes development of the chondrogenic phenotype in human synovial stromal cells via modulation of the Smad signaling pathway. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15:709–18.
124. Ostergaard M, Ejbjerg B, Stoltenberg M, Gideon P, Volck B, Skov K, et al. Quantitative magnetic resonance imaging as marker of synovial membrane regeneration and recurrence of synovitis after arthroscopic knee joint synovectomy: a one year follow up study. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:233–36.
125. Hoben GM, Athanasiou KA. Meniscal repair with fibrocartilage engineering. *Sports Med Arthrosc.* 2006;14:129–37.
126. Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus.* 2007;5:120–29.
127. Hernigou P, Desroches A, Queinnee S, Flouzat Lachaniette, Charles Henri, Poignard A, Allain J, et al. Morbidity of graft harvesting versus bone marrow aspiration in cell regenerative therapy. *Int Orthop.* 2014.
128. Leopold SS. Editor's Spotlight/Take 5: Mesenchymal Stem Cells in Synovial Fluid Increase After Meniscus Injury. *Clin Orthop Relat Res.* 2014.
129. Vangsness, C Thomas Jr, Farr J2, Boyd J, Dellaero DT, Mills CR, LeRoux-Williams M. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96:90–98.
130. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 2006;98:1076–84.

131. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238:265–72.
132. Nakhostine M, Gershuni DH, Danzig LA. Effects of an in-substance conduit with injection of a blood clot on tears in the avascular region of the meniscus. *Acta Orthop Belg.* 1991;57:242–46.
133. Stone KR, Rodkey WG, Webber RJ, McKinney L, Steadman JR. Future directions. Collagen-based prostheses for meniscal regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1990:129–35.
134. Buma P, Pieper JS, van Tienen T, van Susante, Job L C, van der Kraan, Peter M, Veerkamp JH, et al. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects--a study in rabbits. *Biomaterials.* 2003;24:3255–63.
135. Geutjes PJ, Daamen WF, Buma P, Feitz WF, Faraj KA, van Kuppevelt, Toin H. From molecules to matrix: construction and evaluation of molecularly defined bioscaffolds. *Adv Exp Med Biol.* 2006;585:279–95.
136. Steadman JR, Rodkey WG. Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results. *Arthroscopy.* 2005;21:515–25.
137. Zaffagnini S, Marcheggiani Muccioli, Giulio Maria, Lopomo N, Bruni D, Giordano G, Ravazzolo G, et al. Prospective long-term outcomes of the medial collagen meniscus implant versus partial medial meniscectomy: a minimum 10-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 2011;39:977–85.
138. van Tienen, Tony G, Hannink G, Buma P. Meniscus replacement using synthetic materials. *Clin Sports Med.* 2009;28:143–56.
139. Tienen TG, Heijkants, Ralf G J C, de Groot, Jacqueline H, Pennings AJ, Schouten AJ, Veth, Rene P H, et al. Replacement of the knee meniscus by a porous polymer implant: a study in dogs. *Am J Sports Med.* 2006;34:64–71.
140. Spencer SJ, Saithna A, Carmont MR, Dhillon MS, Thompson P, Spalding T. Meniscal scaffolds: early experience and review of the literature. *Knee.* 2012;19:760–65.
141. Scotti C, Hirschmann MT, Antinolfi P, Martin I, Peretti GM. Meniscus repair and regeneration: review on current methods and research potential. *Eur Cell Mater.* 2013;26:150–70.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufsicht auf rechtes Tibiaplateau (aus: Weigel B, Nerlich M. Praxisbuch Unfallchirurgie. Berlin: Springer, 2011: S. 588).....	8
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des Meniskus. Kapselnah liegt die gut durchblutete rot-rote Zone (R-R). Zur Gelenkmitte liegt die kaum durchblutete weiß-weiße Zone (W-W). Dazwischen findet sich die rot-weiße Zone (R-W). (aus: Fink, C. (2001): Meniskusrefixation - Anatomische und biologische Grundlagen. In: Arthroskopie 14 (4), S. 248–253).....	9
Abbildung 1.3: Aufsicht auf rechtes Kaninchentibiaplateau. 1. Vorderes Insertionsband des Innenmeniskus. 2. Hinteres Insertionsband des Innenmeniskus 3. Vorderes Insertionsband des Außenmeniskus. 4. Hinteres Insertionsband des Außenmeniskus, welches nur am Femur befestigt ist. (aus Messner, Karola; Gao, Jizong (1998): The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. In: J Anatomy 193 (2), S. 161–178).....	10
Abbildung 1.4 Morphologie der Meniskusläsionen: a: Längsriß, b: Korbhenkelriß, c: Radiärriß, d: Querriß, e: Horizontalriß (aus: Weigel B, Nerlich M. Praxisbuch Unfallchirurgie. Berlin: Springer, 2005, S. 600).....	12
Abbildung 1.5 CMI®, das gerade angenäht wird und den Meniskusdefekt auffüllt. Der Pfeil kennzeichnet die Grenze zwischen dem Biomaterial und dem nativen Meniskus. (aus: Steadman, J. Richard; Rodkey, William G. (2005): Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results. In: Arthroscopy 21 (5), S. 515–525).....	16
Abbildung 1.6 a: Arthroskopische Annäherung eines Actifit®-Scaffolds an den nativen Meniskus; b: Relook-Arthroskopie nach 24 Monaten. Man kann in das Biomaterial einwachsendes Gewebe erkennen. (Aus: Bouyarmine, H.; Beaufils, P.; Pujol, N.; Bellemans, J.; Roberts, S.; Spalding, T. et al. (2014): Polyurethane scaffold in lateral meniscus segmental defects: Clinical outcomes at 24months follow-up. In: Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 100 (1), S. 153–157).....	17
Abbildung 2.1 Die Polyurethanmatrix Actifit® ist als mediales (a) und laterales (b) Implantat erhältlich. (aus: Bouyarmine, H.; Beaufils, P.; Pujol, N.; Bellemans, J.; Roberts, S.; Spalding, T. et al. (2014): Polyurethane scaffold in lateral meniscus segmental defects: Clinical	

outcomes at 24months follow-up. In: Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 100 (1), S. 153–157).....	30
Abbildung 2.2 Fertiges Beimpfröhrchen mit aufgesetztem Sterilfilter und inliegendem Scaffold .....	37
Abbildung 2.3 Aufbau für das Befüllen von Matrices. Zu sehen sind die Vakuumpumpe mit Drehhebel zum Regulieren des Vakuums und ein angeschlossenes Beimpfröhrchen.....	38
Abbildung 2.4 Darstellung des Beckenkamms .....	45
Abbildung 2.5 Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm .....	45
Abbildung 2.6 Die entfernte native Pars intermedia des Meniskus lateralis (oben) neben dem neu eingebauten Actifit®-Keil (unten).....	46
Abbildung 2.7 Eröffnetes Kniegelenk. Nach anterior luxierter Meniskus lateralis mit Meniskusdefekt. Pfeil: in der Pars intermedia erzeugter Meniskusdefekt. ....	47
Abbildung 2.8 In den Meniskusdefekt eingenähtes Actifit®. Der Pfeil zeigt auf das Actifit®. ....	47
Abbildung 3.1 Makroskopische Oberflächenaufnahme eines Actifit®-Scaffolds.....	50
Abbildung 3.2 Darstellung der Porengeometrie eines Actifit®-Scaffolds. Schwarze Bereiche bedeuten eine Zugänglichkeit der entsprechenden Poren, weiße Bereiche zeigen nach außen abgeschlossene, unzugängliche Poren an. Balken = 1 mm .....	50
Abbildung 3.3 Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Rötlich imponierende Extrazellulärmatrix umgibt die Zellen. Das Actifit® ist porös und gräulich-weiß. Die großen Löcher im Zentrum des Schnitts sind auf Schneide- und Färbeartefakte zurückzuführen. Balken = 500 µm .....	51
Abbildung 3.4 Immunhistochemische Färbung von Kollagen I eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm .....	51
Abbildung 3.5 Immunhistochemische Färbung von Kollagen II eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm .....	51
Abbildung 3.6 Makroskopische Oberflächenaufnahme eines Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds. Balken = 1 mm .....	52

Abbildung 3.7 Darstellung der Porengeometrie eines Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds. Schwarze Bereiche bedeuten eine Zugänglichkeit der entsprechenden Poren, weiße Bereiche zeigen nach außen abgeschlossene, unzugängliche Poren an. Balken = 2 mm ..... 52

Abbildung 3.8 Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Schnitt durch den Randbereich des Scaffolds. Extrazellulärmatrix imponiert rötlich. Scaffoldmaterial imponiert bläulich. Balken = 500  $\mu\text{m}$ ..... 53

Abbildung 3.9 Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Schnitt durch den zentralen Bereich des Scaffolds mit sichtbarem Zelluntergang. Extrazellulärmatrix imponiert rötlich. Scaffoldmaterial imponiert bläulich. Balken = 500  $\mu\text{m}$  ..... 53

Abbildung 3.10 Immunhistochemische Kollagen I-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. .... 53

Abbildung 3.11 Immunhistochemische Kollagen II-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Hyaluronsäureester-Kollagen-Komposit-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. .... 53

Abbildung 3.12 Makroskopische Oberflächenaufnahme eines Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds. Balken = 1 mm ..... 54

Abbildung 3.13 Darstellung der Porengeometrie eines Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds. Schwarze Bereiche bedeuten eine Zugänglichkeit der entsprechenden Poren, weiße Bereiche zeigen nach außen abgeschlossene, unzugängliche Poren an. Balken = 1 mm ..... 54

Abbildung 3.14 Wässrige DMMB-Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Extrazellulärmatrix imponiert lila, etwas dunkler imponieren die darin enthaltenen Zellen. Zentral erscheinen nekrotische Zellen als unscharfe lila Flecken. Das Scaffoldmaterial imponiert transparent-weißlich. Balken = 500  $\mu\text{m}$  ..... 55

Abbildung 3.15 Immunhistochemische Kollagen I Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro Chondrogenese. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Scaffoldmaterial imponiert transparent-weißlich. Balken = 500  $\mu\text{m}$ ..... 55

Abbildung 3.16 Immunhistochemische Kollagen II Färbung eines mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Polyurethan-Kollagenfaser-Scaffolds nach 21 Tagen in vitro

Chondrogenese. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Scaffoldmaterial imponiert transparent-weißlich. Balken = 500 µm.....	55
Abbildung 3.17 Diagramm Gesamtsoringergebnisse der getesteten Biomaterialien: Actifit® (im Diagramm blau) erreichte den höchsten Scoringwert, danach folgte die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix (im Diagramm grün). Deutlich geringere Scoringwerte erreichten die Polyurethan-Kollagenfaserscaffolds (im Diagramm rot). .....	56
Abbildung 3.18 Diagramm Scoringwerte für das Überleben und die Vitalität der Zellen in den Scaffolds. Signifikant bessere Werte für Actifit®-Scaffolds (im Diagramm blau, n=5) im Vergleich zur Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix (im Diagramm grün, n=9) nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung in vitro (*=p<0,05, Mann-Whitney-U-Test). Zum Vergleich ist ein Vertreter der deutlich schlechter abschneidenden Polyurethan-Kollagenfaserscaffolds (im Diagramm rot, n=5) mit aufgeführt. (CI = 95 % Konfidenzintervall) .....	57
Abbildung 3.19 Wässrige DMMB-Färbung: Actifit® mit Chondrozyten befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Extrazellulärmatrix imponiert lila, die darin enthaltenen Zellen in dunklerem lila. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 200 µm ....	58
Abbildung 3.20 Kollagen I immunhistochemische Färbung: Actifit® mit Chondrozyten befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 200 µm ..	58
Abbildung 3.21 Kollagen II immunhistochemische Färbung: Actifit® mit Chondrozyten befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 200 µm ..	59
Abbildung 3.22 Wässrige DMMB-Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Extrazellulärmatrix imponiert lila, die darin enthaltenen Zellen in dunklerem lila. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 500 µm.....	60
Abbildung 3.23 Wässrige DMMB-Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Extrazellulärmatrix imponiert lila, die darin enthaltenen Zellen in dunklerem lila. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 200 µm.....	60
Abbildung 3.24 Kollagen I immunhistochemische Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen I-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und grünlich-weißlich. Balken = 500 µm.....	60

Abbildung 3.25 Kollagen II immunhistochemische Färbung: Actifit® mit mesenchymalen Stammzellen befüllt, 21 Tage chondrogene Differenzierung. Kollagen II-haltige Extrazellulärmatrix imponiert schwarz. Das Actifit® erscheint porös und gräulich-weißlich. Balken = 500 µm.....	60
Abbildung 3.26 In situ: Meniskusregeneration mit einem zellfreien Actifit® Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Der Defekt ist annähernd komplett gefüllt. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. ....	61
Abbildung 3.27 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Der Defekt ist nur partiell gefüllt. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. Balken = 2 mm .....	62
Abbildung 3.28 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Balken = 2 mm.....	62
Abbildung 3.29 Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo Das Scaffold ist nur einseitig integriert. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2mm .....	62
Abbildung 3.30 Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	63
Abbildung 3.31 Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	63
Abbildung 3.32 In situ: Meniskusregeneration mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Der Defekt ist fast vollständig gefüllt. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus.....	63
Abbildung 3.33 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm.....	64
Abbildung 3.34 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Balken = 2 mm .....	64

Abbildung 3.35 Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm.....	65
Abbildung 3.36 Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	65
Abbildung 3.37 Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 6 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	65
Abbildung 3.38 In situ: Meniskusregeneration mit einem zellfreien Actifit® Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. ....	66
Abbildung 3.39 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	67
Abbildung 3.40 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus. Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Balken = 2 mm .....	67
Abbildung 3.41 Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	68
Abbildung 3.42 Entwässerte DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo, Übergang vom Reparaturgewebe mit Actifit® (linke Seite im Bild) zum nativen (rechte Seite) Meniskus. Balken = 200 µm .....	68
Abbildung 3.43 Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	68
Abbildung 3.44 Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem zellfreien Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	68

Abbildung 3.45 In situ: Meniskusregeneration mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit® Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. ....	69
Abbildung 3.46 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus, vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	70
Abbildung 3.47 Makroskopische Aufnahme Außenmeniskus: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Balken = 2 mm .....	70
Abbildung 3.48 Wässrige DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm.....	70
Abbildung 3.49 Entwässerte DMMB-Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo, Übergang vom Reparaturgewebe mit Actifit® (linke Bildseite) zum nativen (rechte Bildseite) Meniskus. Balken = 200 µm .....	70
Abbildung 3.50 Kollagen I Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen I stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	71
Abbildung 3.51 Kollagen II Immunhistochemische Färbung: Meniskusreparatur mit einem mit mesenchymalen Stammzellen befüllten Actifit®-Scaffold nach 12 Wochen in vivo. Bereiche mit Kollagen II stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus, avaskulärer Bereich. Pfeil c: nativer Meniskus vaskulärer Bereich. Balken = 2 mm .....	71
Abbildung 3.52 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI), Gesamtscoreergebnisse nach 6 Wochen. Statistisch signifikant (t-Test, * = $p < 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds. ....	72
Abbildung 3.53 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI), Gesamtscoreergebnisse nach 12 Wochen. Statistisch nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds. ....	73

## Anhang

Abbildung 3.54 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI) Scoring für den Proteoglykangehalt. Statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $*=p < 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds nach 6 Wochen. ....	74
Abbildung 3.55 Balkendiagramm mit 95 % Konfidenzintervall (CI) Scoring für die Integration in den nativen Meniskus. Statistisch signifikant (t-Test, $*=p < 0,05$ ) höherer Scoringwert der mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) befüllten Scaffolds im Vergleich zu den zellfreien Kontroll-Scaffolds nach 6 Wochen. ....	75
Abbildung 3.56 Immunhistochemische CD31-Färbung zur Darstellung der Gefäßarchitektur. Gefäßendothelzellen stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: nativer Meniskus. Pfeil c: Beispiel für ein Gefäß. Balken = 500 $\mu\text{m}$ .....	76
Abbildung 3.57 Immunhistochemische CD31-Färbung zur Darstellung der Gefäßarchitektur. Gefäßendothelzellen stellen sich schwarz dar. Pfeil a: Actifit®. Pfeil b: exemplarisches Gefäß. Balken = 200 $\mu\text{m}$ .....	76

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Scoringsystem für den Biomaterialvergleich .....	41
Tabelle 2 Scoringsystem für die in vivo Analyse. Ursprünglich publiziert von Zellner et al. [8] .....	49

### 7.3 Lebenslauf

29.11.1989	Als zweites Kind von Sieglinde Achatz, geb. Bayerl, und Friedrich Achatz in Bogen geboren
1996 – 2000	Besuch der Grundschule Schwarzach
2000 – 2009	Besuch des Veit-Höser-Gymnasiums in Bogen
2009 – 2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2011	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2014	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2014 - 2015	Halbjähriger Forschungsaufenthalt an der University of California San Diego, USA
2015 – 2016	Praktisches Jahr, Universitätsklinikum Regensburg und Universidad de Cantabria, Spanien
2016	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Danksagung

## **7.4 Danksagung**

Mein persönlicher Dank gilt Herrn PD Dr. J. Zellner für die großartige Betreuung dieser Arbeit, sein unermüdliches Engagement und seine stetige Hilfsbereitschaft. Seine Ideen, seine Expertise und sein exzellentes chirurgisches Handwerk bei den Tier-Operationen machten diese Doktorarbeit überhaupt erst möglich.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Angele für die freundliche Überlassung des spannenden Themas. Seine herausragende Kompetenz auf dem Gebiet des Tissue Engineerings war unabdinglich für das Gelingen dieses Projekts.

Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Nerlich, für die Einladungen zu den spannenden und lehrreichen Forschungswochenenden und die Überlassung dieser Doktorarbeit.

Bei Herrn Dr. R. Kujat möchte ich mich herzlich für sein großes Interesse an der Arbeit und die freundliche Unterstützung bedanken. Sein akribisches und präzises wissenschaftliches Schaffen war eine große Bereicherung für diese Dissertation. Vielen Dank auch für die Mithilfe bei den Tieroperationen.

Vielen Dank an Herrn F. Zeman für die Überprüfung des Scoringsystems für den Biomaterialtest.

Vielen Dank an Frau D. Drenkard für die freundliche und kompetente Unterstützung bei der Laborarbeit weit über die normalen Dienstzeiten hinaus.

## **7.5 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.