

AUS DEM INSTITUT
FÜR PATHOLOGIE
LEITER: PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleich histopathologischer Scores in der Beurteilung der Meniskusdegeneration –
Ihre Rolle beim Einsatz des Tissue Engineerings

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Maria Donner

2018

AUS DEM INSTITUT
FÜR PATHOLOGIE
LEITER: PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleich histopathologischer Scores in der Beurteilung der Meniskusdegeneration –
Ihre Rolle beim Einsatz des Tissue Engineerings

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Maria Donner

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius
2. Gutachter: PD Dr. Johannes Zellner
Tag der Promotion: 14.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Morphologie des Meniskus	6
1.1.1 Anatomie und Funktion des Meniskus	6
1.1.2 Blut- und Nährstoffversorgung des Meniskus	8
1.1.3 Biochemie des Meniskus	9
1.1.4 Zellen im Meniskus.....	10
1.1.5 Regulation der Meniskusstruktur	11
1.2 Schäden am Meniskus.....	12
1.2.1 Ätiologie und Einteilung	12
1.2.2 Therapie von Meniskusschäden	13
1.3 Tissue Engineering/Gewebeersatz	14
1.3.1 Definition	14
1.3.2 Tissue Engineering beim Meniskus	14
1.4 Bewertungsscores von Meniskuläsionen	17
1.4.1 Score nach Pauli	18
1.4.2 Score nach Roth.....	20
1.4.3 Score nach Krenn.....	20
1.4.4 Score nach Mankin.....	22
2 Material und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Arbeitsgeräte	25
2.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3 Verwendete Chemikalien.....	28
2.1.4 Rezepte und Lösungen	31
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Bearbeitung der Gewebeproben.....	34
2.2.2 Histologische Färbung der Schnittpräparate	35
2.2.3 Bearbeitung von Schnittpräparaten für eine histologische Färbung	36
2.2.4 Lichtmikroskopische Analyse der gefärbten Präparate	40
2.2.5 Anwendung der Scores	40
2.2.6 Statistische Auswertung	41
2.2.7 Berechnung des Konfidenzintervalls nach Clopper-Pearson	41
2.2.8 Berechnung der Chi-Quadrat-Verteilung.....	41
2.2.9 Cohen's Kappa.....	42
3 Ergebnisse.....	43
3.1 Mikroskopische Auswertungen	43
3.1.1 Auswertungen der einzelnen Scores	48
3.1.2 Auswertung der Gegenüberstellungen der Scores.....	50
3.2 Statistische Auswertungen	55
3.2.1 Mankin und Pauli.....	55
3.2.2 Mankin und Roth	55
3.2.3 Mankin und Krenn	55
3.2.4 Roth und Krenn	56

4	Diskussion.....	57
5	Zusammenfassung.....	67
6	Anhang.....	69
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	69
6.2	Tabellenverzeichnis.....	70
7	Literaturverzeichnis	71
8	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Actifit	Polyurethane
C.I. number	Colour Index number
CMI	College Meniskus Implantat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAGs	Glykosaminoglykane
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Lsg.	Lösung
MD	Mukoide Matrixdegeneration
MRT	Magnetresonanztomographie
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
RSPO2	Roof plate-specific spondin-2
RT	Raumtemperatur (18-20° Grad Celsius)
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
SMPS	Saure Mukopolysaccharide
SPSS	Statistik- und Analyse-Software der Firma IBM
TE	Tissue Engineering
γ-PGS	γ-Polyglutaminsäure

1 Einleitung

Eine Studie aus dem Jahr 2005 zeigte auf, dass bei einem knappen Drittel der befragten Personen eine Arthrose in mindestens einer Gelenkregion bestand (1). Dabei lag die Altersspanne der befragten Personen zwischen 18 und 79 Jahren. Die Kosten für die Bundesrepublik Deutschland, die dadurch entstehen, wurden im Jahr 1998 vom Bundesministerium für Gesundheit auf 3,5 bis 5,4 Mrd. EUR pro Jahr geschätzt (2). Die vorstehend genannte Studie zeigte auch berufsbezogene Unterschiede in der Arthroserate (1). Dabei ist die Osteoarthrose im Kniegelenk mit Beteiligung des Meniskus mit 45,24 % die zweihäufigste Schmerzlokalisierung (1).

Häufig führen Meniskusverletzungen zu Operationen, bei denen Teile oder der gesamte Meniskus entfernt wird. Dies führt in vielen Fällen zu einer vorzeitigen Osteoarthrose bei den Patienten und damit zu einem unbefriedigenden Ergebnis (3,4).

Neuere Forschungen versuchen im Rahmen des sog. Tissue Engineering resorbierbares Biomaterial als Gewebeersatz zu transplantieren, welches nicht nur in der Lage ist, die entstandene Lücke zu schließen, sondern auch im Rahmen des Heilungs- und Regenerationsprozesses zu einer Regeneration von Meniskusgewebe führt und selbst resorbiert wird. Um besser beurteilen zu können, ob eine Regeneration möglich ist, sollte der Zustand des Meniskusgewebes genau bekannt sein. Daher ist eine Korrelation der potenziellen regenerativen Kapazität eine wichtige Grundlage für weitere klinische Studien.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um den Schweregrad von Verletzungen und den Grad der Degeneration am Meniskus zu erfassen. Eine Methode sind Scores, bei denen jedem untersuchten Parameter eine Punktezahl zugeordnet wird und am Ende ein Gesamtwert ermittelt wird. Anhand dieses Wertes erfolgt eine Einteilung des Schweregrades einer Verletzung oder Degeneration, aus der in der Folge eine differenzierte Therapie folgen sollte. Mittlerweile existieren neben zahlreichen klinisch erhobenen Scores auch mehrere histopathologische Scores zur Beurteilung von Meniskusgewebe, allerdings sind diese in der klinischen Praxis kaum verbreitet. Dabei bieten Scores als Mittel der Kategorisierung die Möglichkeit, eine Pathologie nach eindeutigen Kriterien zu klassifizieren, um daraus eine optimale Therapie aus dem Befund abzuleiten.

Ziel dieser Arbeit ist es, mehrere Scores miteinander zu vergleichen und zu ermitteln, ob sie bei Anwendung an ein und demselben Präparat zur gleichen Schweregradeinteilung gelangen. In einem zweiten Schritt soll betrachtet werden, ob man aus einem Vergleich der in den Scores verwendeten Parameter Schlüsse ziehen kann, bei welchem Grad Tissue Engineering-Strategien vielversprechend sein können.

1.1 Morphologie des Meniskus

1.1.1 Anatomie und Funktion des Meniskus

Am Kniegelenk befinden sich auf dem Tibiaplateau zwei Menisken um die Inkongruenz der Gelenkflächen auszugleichen (siehe dazu Abb. 1). Im Knochen der Areae intercondylares anterior und posterior sind sie an ihren Enden beide über kurze Bänder verankert (5). Man unterscheidet einen außen gelegenen Meniscus lateralis von einem innen gelegenen Meniscus medialis. Beide Menisken haben die Gestalt zweier Halbmonde. Der Meniscus medialis ist weniger beweglich, da er einerseits mit dem medialen Kollateralband verbunden ist und andererseits seine knöchernen Verankerungen weiter voneinander entfernt liegen. Im Gegensatz dazu ist der laterale Meniskus fast kreisrund und weist eine höhere Beweglichkeit auf (5,6). Das Ligamentum transversum genu verbindet ventral den medialen und lateralen Meniskus miteinander. Gelegentlich zieht ein Ligamentum meniscofemorale anterius zum vorderen Kreuzband, das Ligamentum meniscofemorale posterius verläuft vom Hinterrand des lateralen Meniskus zur Innenfläche des Condylus medialis femoris (7).

Die Funktionen der Menisken sind eine verbesserte Gewichtsverteilung aufgrund der mangelnden Kongruenz von Femurkondylen und Tibiaplateau, die Stabilisierung und Stoßdämpfung im Kniegelenk (8).

Menisken werden mit Disken und Labren als akzessorische Strukturen zusammengefasst, die die Gelenkkongruenz fördern (9). Die Grundstruktur der Lippen der Gelenkpfannen (=Labren) gleicht in ihrem Aufbau sogar dem der Menisken (9,10).

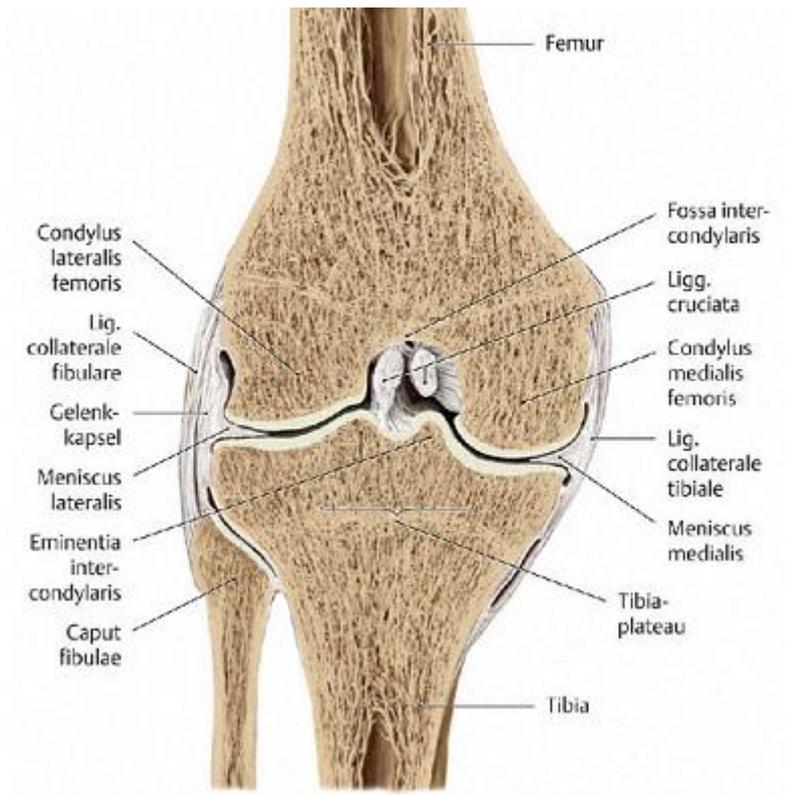


Abbildung 1: Frontaler Sägeschnitt durch das Femorotibialgelenk, rechtes Knie von vorne; aus: PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher. Thieme Verlag 2006, S. 449.

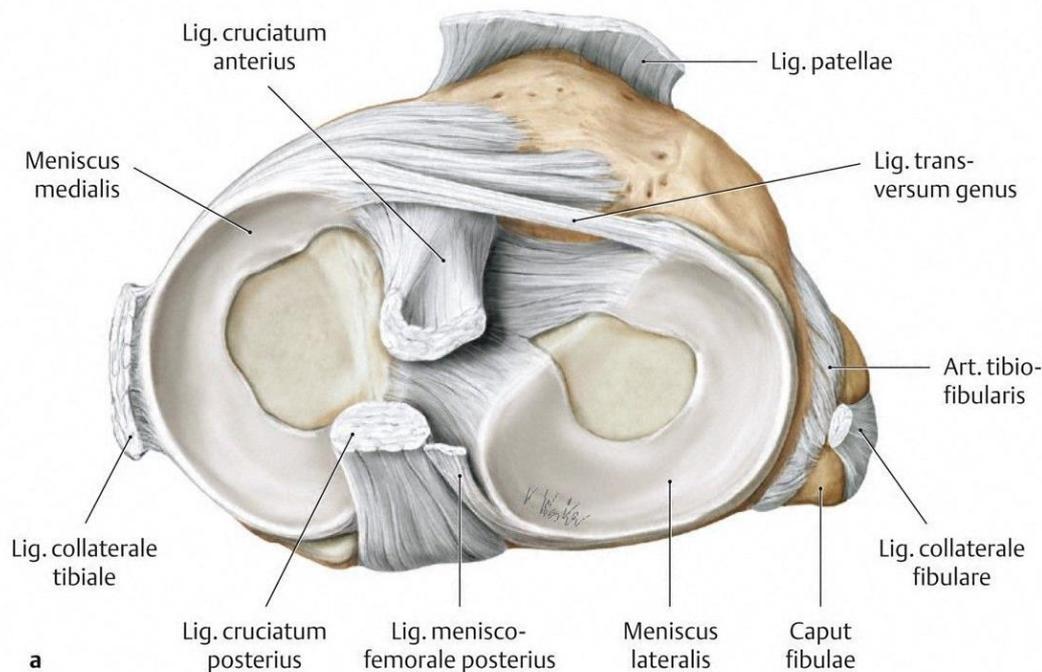


Abbildung 2: Tibiaplateau mit aufliegenden Menisken sowie Anheftungsstellen von Menisken und Kreuzbändern; aus: PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher. Thieme Verlag 2006, S. 448.

1.1.2 Blut- und Nährstoffversorgung des Meniskus

Bei der Geburt sind die Menisken noch vollständig durchblutet. Bereits mit eineinhalb Jahren kann ein erster avaskulärer Bereich in der Innenzone des Meniskus abgegrenzt werden. Dieser wird mit den Jahren in Richtung außen breiter, sodass beim Erwachsenen nur noch eine äußere Zone besteht, die vaskularisiert ist (8). Daher erfolgt die Unterteilung des Meniskus in eine sogenannte innere/weiße, mittlere/rote-weiße und eine äußere/rote Zone (8). Es wird angenommen, dass der Rückgang der Durchblutung durch die Belastungen von Körpergewicht und Bewegungen zustande kommt (11). Die bindegewebigen Anteile der Menisken im kapselnahen Bereich sind durch die Aa. articulares inferiores medialis und lateralis (aus der A. poplitea) gut durchblutet. Die zentralen inneren Anteile aus Faserknorpel sind gefäßfrei und werden ausschließlich durch Diffusion von Nährstoffen der Synovialflüssigkeit ernährt (5).

Daraus ergeben sich unterschiedliche Heilungstendenzen in den unterschiedlichen Regionen, die direkt vom Ausmaß der Blutversorgung abhängen. So ist die innere

weiße Zone deutlich anfälliger für posttraumatische und degenerative Läsionen als die äußere rote (12).

1.1.3 Biochemie des Meniskus

Der Meniskus besteht zu etwa 2/3 aus Wasser und zu 1/3 aus organischem Material, das fast ausschließlich Extrazelluläre Matrix (EZM) und Zellen beinhaltet (8). In diesem organischen Bestandteil machen Kollagene den Großteil (75 %) aus, 17 % entfallen auf Glykosaminoglykane (GAGs), 2 % auf DNA, Adhäsionsproteine und Elastin jeweils auf <1 % (13,14). Kollagen Typ I ist mit >90 % Anteil das Hauptkollagen des Meniskus (15). Die übrigen Kollagentypen II, III, V und VI sind ebenfalls vorhanden, wenn auch in deutlich geringerem Umfang (16). Allerdings ist die prozentuale Verteilung in den einzelnen Zonen unterschiedlich: So befindet sich in den äußeren zwei Dritteln der Menisken überwiegend Kollagen vom Typ I, während sich im inneren Drittel 60 % Kollagen Typ II und 40 % Typ I befinden (17). Proteoglykane machen den Großteil der EZM aus (18). Verglichen mit hyalinem Knorpel ist der Gehalt an Proteoglykanen allerdings gering (9,19). Das größte und wichtigste Proteoglykan im Meniskus ist das Aggrecan. Auch hier findet sich eine unterschiedliche Verteilung: Die inneren zwei Drittel beinhalten einen höheren Anteil an Proteoglykanen als das äußere Drittel (20). Ihre Hauptfunktion besteht in der Aufnahme von Wasser. Die resultierende Quellung ermöglicht die Abfederung von Stoßkräften (21,22).

1.1.4 Zellen im Meniskus

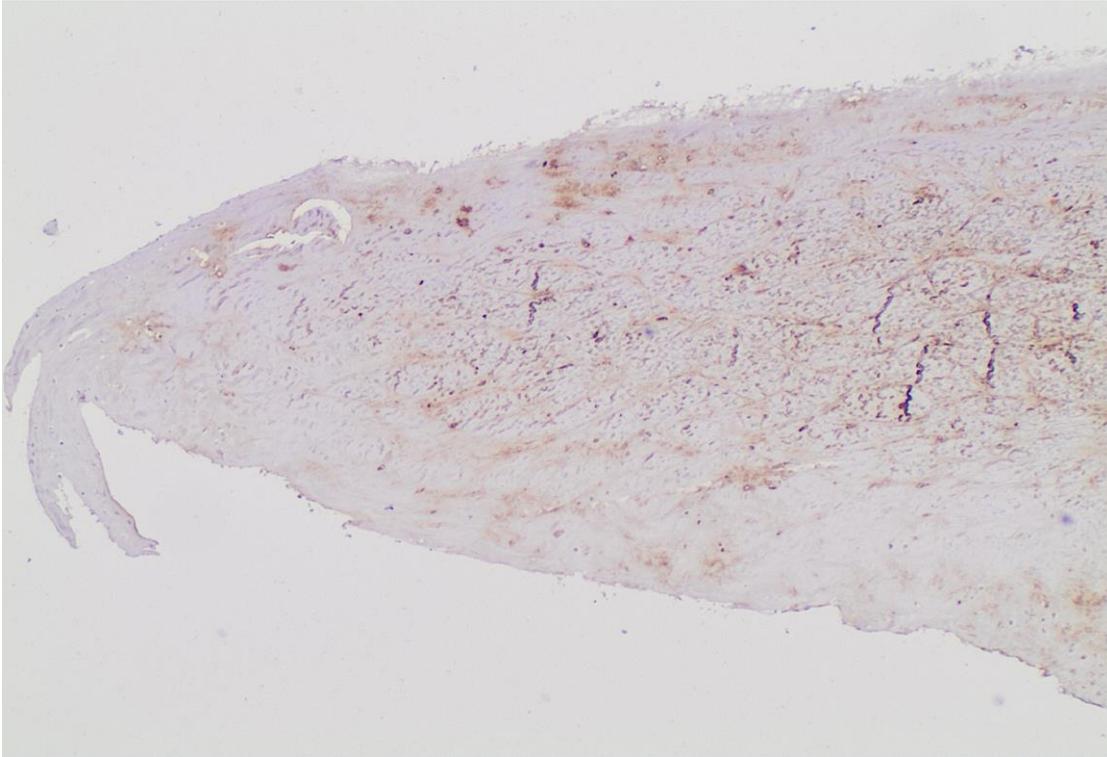


Abbildung 3: Meniskusquerschnitt

Die Zellen im Meniskus liegen in den verschiedenen Zonen in unterschiedlicher Anzahl vor (21). Gegenwärtig wird die Charakterisierung und Klassifizierung von Meniskuszellen in der Literatur kontrovers diskutiert, sodass derzeit verschiedene Termini parallel verwendet werden (21,23). Die Zellen der äußeren vaskulären Zone haben eine ovale, spindelförmige Form und zeigen ein fibroblastenähnliches Aussehen, weshalb sie auch „fibroblast-like-cells“ genannt werden. Diese Zellen können auch Verbindungen mit anderen Zellen im Sinne von Gap junctions herstellen (8,21,24). Die Zellen der inneren Zone zeigen eine runde Form, ohne Gap junctions und sind in die EZM und vermehrt in Fasern aus Kollagen Typ II eingefasst. Diese relativ hohe Menge an Kollagen Typ II, verbunden mit einer höheren Konzentration an Aggrecan in der inneren Zone der Menisken machen diese vergleichbar mit hyalinem Gelenkknorpel, sodass die Zellen in dieser Zone als Fibrochondrozyten bezeichnet werden (21,25,26). Die mittlere rot-weiße Zone enthält hauptsächlich fibroblastenähnliche Zellen, die länglich geformt sind (27).

1.1.5 Regulation der Meniskusstruktur

Die Regulation der Meniskusstruktur ist ein sehr komplexer Prozess. Als ein wichtiger Bestandteil in der Regulation der EZM haben sich Proteine aus der Wnt-Familie herauskristallisiert (7,28). Der Begriff „Wnt“ setzt sich aus „wingless“ (w) und „Int-1“ (nt) zusammen (29). Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die als Signalmoleküle auftreten und wichtig für die Zelldifferenzierung und Genexpression sind (30). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Skelettbildung, in der Gewebeheilung und in der Selbstregulation von Gelenken (31). Die Wnt-Proteine regulieren verschiedene Signalkaskaden, unter anderem den β -catenin-Weg (sog. kanonischer Wnt-Weg), der im Knorpel die wichtigste Rolle spielt (32,33). Das β -catenin reguliert die Genaktivität. Im Ruhezustand liegt es inaktiv im Zytosol vor, was durch einen Abbaukomplex aus APC (adenomatous-polyposis-coli-protein), Axin und Glukogen-Synthase-Kinase 3 sowie eine Casein-Kinase erreicht wird (7). Die dadurch erfolgte Phosphorylierung und Ubiquitinierung des β -catenin führt zu seinem Abbau durch Proteasomen. Durch Bindung eines Wnt-Proteins an einen Frizzled-Rezeptor wird der Abbaukomplex an der Plasmamembran gebunden und inaktiviert, sodass das β -catenin akkumulieren kann und sich in den Zellkern verlagert, wo es die Gentranskription beeinflusst (7,30). Studien haben gezeigt, dass ein aktiver Wnt-Signalweg und ein damit einhergehender hoher Wert an β -catenin im Mausmodell bei Osteoarthritis hochreguliert ist und beim Menschen zusätzlich die Aktivität synovialer Fibroblasten steigert (31,34).

Der Wnt-Signalweg seinerseits wird durch verschiedene Modulatoren reguliert. Die zwei wichtigsten Modulatoren sind Roof plat-specific spondin 2 (=RSPO2) und Secreted frizzled-related protein 2 (=SFRP2). RSPO2 verstärkt die Transkription der Zielgene, während SFRP2 die Gentranskription der gleichen Zielgene hemmt (7,35,36,43).

1.2 Schäden am Meniskus

1.2.1 Ätiologie und Einteilung

Menisken gelten als anfällig gegenüber Schädigungen (9). Dies führte bereits zu der These, dass die Kollagenstruktur dem aufrechten Gang noch nicht angepasst sei. An diesem Punkt könne die Selektion noch angreifen (37).

Einige Autoren schlagen vor, Meniskuläsionen analog zu Sehnenrupturen in minore und majore Schädigungen zu unterteilen. Bei Mohr sind minore Schädigungen dabei klinisch nicht relevant und majore klinisch bedeutsam, wobei ein minorer traumatischer Schaden als Vorschaden gilt und damit als fördernder Faktor für große Kontinuitätsverletzungen zu erörtern ist (9).

Analog dazu wird grundsätzlich zwischen degenerativen und traumatischen Läsionen unterschieden (38,39). Eine Untersuchung an Leichenmenisken von 21- bis 94-Jährigen zeigte, dass an der Meniskusoberfläche und am freien inneren Rand mit steigendem Lebensalter kleine Einrisse entstehen (40,41). Dies wären Zeichen der Degeneration, was einer minoren Vorschädigung nach Mohr entspricht. Degenerative Läsionen können spontan oder durch Bagatelltraumata entstehen, während es für eine frische Meniskusruptur einer großen Kraffteinwirkung bedarf (38,39,42). Rezidivierende Rotationsbewegungen mit gleichzeitigen Flexionsbewegungen, so wie sie besonders bei Ballkontaktsportarten auftreten, erhöhen das Risiko derartiger Verletzungen (38). Daher sind junge Menschen häufiger von traumatischen und ältere Menschen häufiger von degenerativen Läsionen betroffen (38,39). Degenerative Veränderungen sind vielgestaltig. So gibt es speziell den Begriff der „fettigen Degeneration“, bei der es zu Ablagerung von Fettvakuolen im Meniskusgewebe kommt (35). Weiterhin gibt es den Begriff der mukoiden Matrixdegeneration, bei der es zur Zunahme der mukoiden Grundsubstanz kommt, die aus Glykoproteinen und Mukoproteinen besteht, und gleichzeitig ein Abbau des Faserknorpels stattfindet. Sie wird als Antwort auf mechanische Belastungen betrachtet (7,44). Ein weiteres Merkmal sind Fibrillationen. Dabei handelt es sich um eine Zerfaserung des Knorpels, bei der Kollagenfasern, die normalerweise im Lichtmikroskop nicht sichtbar sind, als Fasern sichtbar werden (45).

Die Tatsache, dass man in fast allen Altersgruppen ab dem Beginn der frühen Adoleszenz Veränderungen am Meniskus feststellen kann, lässt die Frage offen, wie genau „gesunder“ Meniskus auszusehen habe und ab wann von „degenerativen Veränderungen“ gesprochen werden sollte.

1.2.2 Therapie von Meniskusschäden

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, gibt eine gewisse Heilungstendenz von Läsionen im Bereich des vaskularisierten Bereiches des Meniskus. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der räumlichen Nähe zur Gefäßversorgung. Im avaskulären Bereich findet keine Heilung statt (11).

Der Goldstandard für behandlungsbedürftige Meniskusläsionen ist die arthroskopische Therapie (42,46). Dabei wird primär eine sog. Refixation angestrebt, die aber nur möglich ist, wenn noch keine wesentlichen Degenerationserscheinungen vorliegen und sich die Läsion in der roten oder rot-weißen Zone befindet (42,47). Zusätzlich können zur Steigerung der Erfolgsaussichten weitere Maßnahmen durchgeführt werden wie die Abrasion der perimeniskalen Synovialmembran oder das Anlegen kleiner Perforationsstellen (48). Eine genaue Angabe über die Heilungsraten der Fixationstherapie gibt es nicht, weil die dafür notwendige Rearthroskopie nur selten durchgeführt wird (42). Insgesamt geht man auch bei optimalen Bedingungen von einer Versagensrate der Therapien von etwa 30 % aus (49). Bei nicht reparablen Läsionen muss nach wie vor auf eine partielle Meniskektomie zurückgegriffen werden (38). Obwohl das Ziel ist, so viel Meniskusgewebe wie möglich zu erhalten, um die biomechanische Funktion zu erhalten, stellt bereits die partielle Meniskektomie einen großen Eingriff in die Biomechanik des Knies dar (38).

1.3 Tissue Engineering/Gewebeersatz

1.3.1 Definition

Tissue Engineering (TE) (engl. „Gewebezüchtung“) bedeutet die Bildung eines anatomisch und funktional intakten Gewebes für die therapeutische Wiederherstellung des menschlichen Körpers. TE ist ein hochkomplexes interdisziplinäres Feld, in dem Biowissenschaften und Ingenieurwissenschaften zusammenarbeiten, um neue Methoden für die klinische Anwendung zu entwickeln (50). Dabei werden bewusst und kontrolliert ausgewählte Zielzellen mit einer Kombination aus molekularbiologischen und mechanischen Signalen stimuliert (51). Beim TE spielen drei Komponenten eine Rolle: Scaffolds (Gerüste), differenzierte oder undifferenzierte Zellen sowie Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle (42,52). Dabei gibt es grundsätzlich zwei Vorgehensweisen: Man kann ein azelluläres Konstrukt implantieren, in das Zellen aus der Peripherie einwandern sollen oder man besetzt ein Konstrukt *in vitro* mit Zellen und lässt dieses zellbesiedelte Konstrukt *in vivo* reifen (42,53).

1.3.2 Tissue Engineering beim Meniskus

In der Behandlung von Meniskusrissen stellt das „Scaffold-based“ Tissue Engineering einen vielversprechenden Ansatz im Gegensatz zu klassischen chirurgischen Behandlungsmethoden dar (20,54). Ein Scaffold meint in diesem Zusammenhang ein dreidimensionales Gerüst, das Zellwachstum und eine Geweberegeneration ermöglicht (55).

Grundsätzlich wird zwischen resorbierbaren und nicht-resorbierbaren Scaffold-Materialien unterschieden. Während die resorbierbaren Materialien mit der Zeit abgebaut werden, um auf diese Weise Platz für körpereigenes Reparaturgewebe zu schaffen, sollen die nicht-resorbierbaren Materialien die Funktion des Meniskus dauerhaft übernehmen (42).

Eine der Herausforderungen hierbei ist die Wahl des Biomaterials (56). Es gibt ein großes Spektrum an natürlichen und synthetischen Materialien, die allerdings in ihrer biologischen Funktion schwierig zu handhaben sind (56,57). Das älteste Biomaterial, welches im Gebiet des Tissue Engineering verwendet wurde, ist das Kollagen Typ I (57). Kollagen Typ I ist säurelöslich und das Hydrogel ist durch pH-Wert-Kontrolle und

Temperatur einfach herzustellen. Da 90 % des Kollagens im Meniskus auf diesen Typ I entfallen, wurde es intensiv als Grundlage für einen biologischen Ersatz getestet (54,58,59). Aufgrund der geringen Festigkeit und der schnellen Degeneration bei kollagenbasierten TE-Methoden versuchen neuere Ansätze, alternative Materialien einzusetzen (54,57).

Eine weitere biologische Komponente, die aktuell experimentell getestet wird, sind pluripotente mesenchymale Stammzellen aus dem Beckenkamm, die chondrogen differenzieren können. Dabei zeigten sich im Tierversuch einzelne Heilungsbereiche, aber gleichzeitig bildete sich Narbengewebe in der Gelenkhöhle (60,61). Klinisch gab es einige Untersuchungen zur Anwendung azellulärer Scaffolds. Diese sind eine technisch einfache und kostengünstige Methode (62). Azelluläre Meniskuscaffolds werden chemisch aus Allografts gewonnen. Vorteile sind einerseits die Erhaltung der EZM, die biochemisch wichtig für die Meniskusfunktion ist, und andererseits die Reduktion der Zelltoxizität durch die Zellentfernung (63,64). Es zeigten sich dem intakten Meniskus vergleichbare Kollagenstrukturen, die auch biochemisch eine ähnlich gutes Verhalten hatten (65). Ein weiterer Vorteil waren das Ausbleiben einer autoimmunen Reaktion und das gute Einwachsen humaner Fibroblasten (63,66). Die vorherige Behandlung der Scaffolds mit lokalen Zellen zeigte eine deutliche Verbesserung in der Neubildung der EZM und der Kompressionsfestigkeit (67,68). Kollagenimplantate zeigen eine relativ gute Vaskularisation und Zellbesiedelung und dadurch die Ausbildung eines Konstruktes, das dem des Umgebungsgewebes ähnlich ist (62,63,69). Da diese Kollagenimplantate allerdings weder das dreidimensionale Grundgerüst noch die notwendigen biomechanischen Voraussetzungen zeigten, eignen sie sich derzeit nicht für den kompletten Meniskusersatz (62,63). *In vitro* zeigen Nanofasern eine recht gute Besiedelung mit nativen Meniskuszellen (62). Das Problem bei den durch Elektrosponnen erzeugten Nanofasern liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit und Anfälligkeit für Verdichtungen bei Kompression. Dadurch entstehen sehr lange Rehabilitationszeiten mit der Notwendigkeit eines sehr langsamen Belastungsaufbaus, was die Compliance der Patienten deutlich erschwert. Daher geht die präklinische Entwicklung mehr in Richtung einer Verbesserung der Scaffolds mittels Zellen und/oder Wachstumsfaktoren (52).

Weitere Ansätze sind Versuche, die Produktion der EZM im Knorpel zu unterstützen. Die EZM bestimmt die physikalischen Eigenschaften eines Gewebes. In ihr befinden

sich Fibrillen und Fasern, Hyaluronan, Proteoglykane und Adhäsionsproteine und somit eine große Zahl an form- und funktiongebenden Molekülen (68). Daher ist eine gute Produktion der EZM ein wichtiger Faktor bei der Nutzung im Tissue Engineering, um die gewünschten Effekte der Integration des TE zu begünstigen. Ein Beispiel für ein die EZM-Produktion unterstützendes Material ist γ -Polyglutaminsäure (γ -PGS) (70). Über die erfolgreiche Anwendung von γ -PGS wurde in experimentellen Studien zur Regeneration von Knochen- und Nervengewebe berichtet (71,72). Es gibt auch ein Patent auf die Injektion von γ -PGS bei degenerativen Gelenkerkrankungen (53,73). Trotzdem hat noch keine Studie das genaue Potenzial von γ -PGS in der Chondrogenese belegt (70).

Zwar gibt es bereits resorbierbare Materialien im klinischen Einsatz, wie beispielsweise Actifit® (Polyurethane) und CMI® (College Meniskus Implantat), die aktuell als sicher gelten (74), jedoch gibt es von mehreren Autoren Kritik wegen zu kleiner Fallzahlen und fehlender Vergleichsgruppen (75,76), sodass auch hier abgewartet werden muss, ob sich diese Produkte im klinischen Alltag durchsetzen werden (77). Bei den Versuchen mit nicht-resorbierbaren Materialien wie Teflon, Polyvinylalkohol-hydrogel und Dacron kann ein Knorpelverlust beim kompletten Meniskusersatz bislang nicht verhindert werden (78). Ein weiteres bereits auf dem Markt erhältliches Implantat ist das Nusurface® Meniscus Implant aus Polycarbonat-Polyurethan (79). Dieses ist das erste Implantat bei Zustand nach vollständiger Menisketktomie. Letzteres konnte im Versuch und in der Computersimulation meniskusähnliche Eigenschaften zeigen. Aber auch hier fehlen bislang Langzeitergebnisse (42,79).

Andere Ansätze wie bei van Tienen et. al (78) versuchen, in präklinischen Versuchen an Schafen synthetisches Meniskusersatzmaterial aus thermoplastischem Elastomer als Ersatz für schwer vorgeschädigte Menisken in Knien mit beginnender Osteoarthrose einzusetzen (78). Dazu wurden Ziegen in vier Gruppen eingeteilt. Einer Gruppe wurden Implantate aus Polycarbonate urethane (PCU) (Bionate® II 80A) eingesetzt, einer zweiten Allografts, die Ziegen der dritten Gruppe wurden meniskektomiert und in der vierten Gruppe wurden Scheinoperationen am Knie durchgeführt. Die letzte Gruppe diente als Kontrollgruppe. Die Implantate waren lediglich in einer einzigen Größe erhältlich, sodass die Einteilung in die Gruppen nach dem Gewicht der Tiere erfolgte. Nach 12 Monaten follow-up erfolgte die Tötung. Die Implantate zeigten nur geringe Verschleißspuren. Allerdings war das Gesamtergebnis

der Implantatgruppe unbefriedigend. Ein Implantat war vollständig ausgefallen und in der histopathologischen Untersuchung des Knorpels zeigten die übrigen Implantate vergleichbare Ergebnisse wie die Allograft- und Meniskektomiegruppen (80).

Das Problem beim TE in Anwendung beim Meniskus liegt darin, dass die bisher genannten getesteten Stoffe die komplexe Architektur nicht ausreichend nachahmen und der mechanischen Belastungen nicht dauerhaft standhalten können (70,81,82).

Es findet sich in der Literatur kaum ein Hinweis darauf, dass im Anschluss an die histopathologische Begutachtung ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Meniskusverletzungen oder -degeneration und der Anwendungsmöglichkeit von TE-Strategien hergestellt wird. Aktuell gibt es keine allgemeingültige Indikationsstellung für die Anwendungen eines Meniskustransplantats (83). Bei Actifit® ist die momentane Indikationsstellung vor allem der partielle Meniskusersatz (42,84). Das Nusurface® Meniskus Implant wird aktuell vor allem bei Patienten aus mittleren und höheren Altersgruppen zur Arthroseverzögerung eingesetzt (85). Dabei könnten die Ergebnisse der histopathologischen Begutachtung ein valider Prädiktor dafür sein, welche Erfolgsaussichten ein Tissue Engineering-Transplantat im Einzelfall haben könnte. Es gibt für die Beurteilung von Knorpelschäden allgemein und auch speziell für den Meniskus mehrere Scores, die publiziert wurden, die aber bislang noch keinen Eingang in die klinische Behandlung gefunden haben, in dem Sinne, dass die weitere Behandlung eines Patienten anhand des histopathologischen Befundes entschieden wird.

1.4 Bewertungsscores von Meniskuläsionen

Es ist schon lange üblich, makroskopische und mikroskopische Veränderungen an menschlichen Menisken zu beschreiben (86,87). Im Rahmen der ersten Studien wurden altersbedingte Veränderungen wie Risse und Degenerationen am Meniskusgewebe beschrieben (88). Um die meniskusspezifische Pathophysiologie besser zu verstehen und Befunde miteinander vergleichbar zu machen, haben sich in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene histopathologische Klassifizierungssysteme zur Beschreibung von Knorpelgewebe speziell auch am Knie etabliert. Genannt seien hier die Scores nach Mankin und der ICRS (89,90,100). Die jüngste Entwicklung ist die Entwicklung spezifischer Klassifizierungssysteme für die histopathologische Begutachtung von Menisken (7,88,101,102).

1.4.1 Score nach Pauli

Pauli teilt die Schweregrade der Meniskusschäden auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene jeweils nach verschiedenen Parametern ein. Die Auswahl der Parameter beruht auf retrospektiven Studien mit Spendergeweben, bei denen biochemische Marker und normale Altersdegeneration von Patienten verschiedener Altersklassen und Anamnesen untersucht wurden. Dabei berücksichtigt er jeweils auch die zonale Gliederung des Meniskus. Bei dem Score handelt es sich um einen Summenscore, bei dem für jeden betrachteten Parameter ein Punktwert zwischen 0 und 3 vergeben wird, sodass ein Wert zwischen 0 und 18 erreicht wird (88).

Er hat folgende Kriterien in seinen Score aufgenommen:

I Zustand Gewebeoberfläche: Punktwert

I-I Femorale Seite:

- | | |
|---|---|
| A) Glatt | 0 |
| B) geringe Fibrillationen oder geringe Wellenbildung | 1 |
| C) moderate Fibrillationen oder deutliche Wellenbildung | 2 |
| D) Schwere Fibrillationen oder Risse | 3 |

I-II Tibiale Seite:

- | | |
|---|---|
| A) Glatt | 0 |
| B) geringe Fibrillationen oder geringe Wellenbildung | 1 |
| C) moderate Fibrillationen oder deutliche Wellenbildung | 2 |
| D) Schwere Fibrillationen oder Risse | 3 |

I-III Innere Begrenzung:

- | | |
|---|---|
| A) Glatt | 0 |
| B) geringe Fibrillationen oder geringe Wellenbildung | 1 |
| C) moderate Fibrillationen oder deutliche Wellenbildung | 2 |
| D) Schwere Fibrillationen oder Risse | 3 |

II Zellularität:

A) Normal	0
B) Diffuse Hyperzellularität	1
C) Diffuse Hypo- oder Azelluläre Bereiche	2
D) Vollständige Hypozellularität (leere Lakunen)	3

III Kollagenorganisation- ausrichtung

A) Organisierte Kollagenfaser, homogene HE-Färbung der EZM	0
B Organisierte Kollagenfasern, diffuse Zentren mit MD	1
C) Kollagenfasern unorganisiert, konfluierende Zentren mit MD	2
D) Schwere Fibrillationen oder Risse	3

IV Intensität der Safranin-O-Fast-Green-Färbung:

A) Keine Anfärbung	0
B) Geringe Anfärbung	1
C) Moderate Anfärbung	2
D) Starke Anfärbung	3

Daraus ergeben sich folgende Schweregrade:

- 0–4 Punkte: Grad 1 (normales Gewebe),
- 5–9 Punkte: Grad 2 (milde Degeneration),
- 10–14 Punkte: Grad 3 (moderate Degeneration),
- 15–18 Punkte: Grad 4 (schwere Degeneration).

1.4.2 Score nach Roth

Roth hat seinen Score anhand von Meniskusquerschnitten erstellt. Dabei werden Intensität der Alcianblaufärbung (bei gering geschädigten Menisken starke Farbintensität, bei stark geschädigten Menisken geringe Farbintensität), Oberflächenbeschaffenheit und Zeichen der Degeneration (z. B. Vorhandensein von Zellclustern, fettige Degeneration) bewertet. Es ergeben sich vier Kriterien, von denen die ersten mit 1 bis 3 Punkten, das vierte Kriterium mit 0 oder 3 Punkten bewertet werden:

<i>Histologische Merkmale:</i>	<i>Punkte:</i>		
Intensität Alcianblaufärbung in Meniskusübersicht	3	2	1
Oberflächenbeschaffenheit samt länglicher Zellmorphologien	3	2	1
Abwesenheit typischer Zeichen der Degeneration	3	2	1
Keine Verkalkung bzw. keine Residuen einer Verkalkung	3	0	0

Hohe Punktwerte ≥ 9 sprechen für einen gering geschädigten Meniskus, eine Punktzahl < 9 beschreibt einen Meniskus mit umfangreichem Schaden (7).

Neben den unter dem Mikroskop erhobenen Bewertungen wertet Roth auch noch immunhistochemische Markierungen von *Roof plate-specific spondin 2* (RSPO2) und *Secreted frizzled-related protein 2* (SFRP2) aus. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Modulatoren des Wnt-Signalwegs (10).

1.4.3 Score nach Krenn

Krenn unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Meniskusdegeneration, wobei erstere alle Veränderungen von Zell- und Faserkomponenten beinhaltet, die umfassender sind als die erwartbaren altersbedingten Veränderungen, und letztere (sekundäre) alle degenerativen, entzündlichen posttraumatischen und metabolischen Gelenkkrankheiten (101). Bei ihm werden keine Punktwerte vergeben und addiert, sondern nach bestimmten mikroskopischen Bildern Schweregrade vergeben.

Sein Degenerationsscore umfasst:

Grad 0: normale histologische Morphologie,

Grad 1: geringe Degeneration,

Grad 2: mäßige Degeneration,

Grad 3: schwere Degeneration.

Unter normaler histologischer Morphologie wird der intakte Faserknorpel bestehend aus Chondrozyten, homogen eingefärbtem Zytoplasma und durch Kollagen verstärkte Grundsubstanz verstanden. Als „normale“ Zellgröße und -dichte wird eine fissurferne Meniskuszelle herangezogen. Die geringe Degeneration zeigt eine geringe Reduzierung der Zellularität, wobei der Begriff „gering“ nicht näher beschrieben wird, kleine Spalten in der Matrix und eine Matrix mit variabler Färbungsintensität. Die Färbung bei Krenn erfolgt in HE und zusätzlich in Ealstika-van-Gieson und Alcianblau, wobei er nicht erläutert, aus welchen Gründen er diese Färbungen gewählt hat. Auch wird der Bewertungsmaßstab, der an die verschiedenen Färbungen angesetzt wird, ausschließlich mit dem Begriff „Färbungsintensität“ beschrieben. Dazu liefert er eine Vorlage, wie die Bewertung zu erfolgen habe:

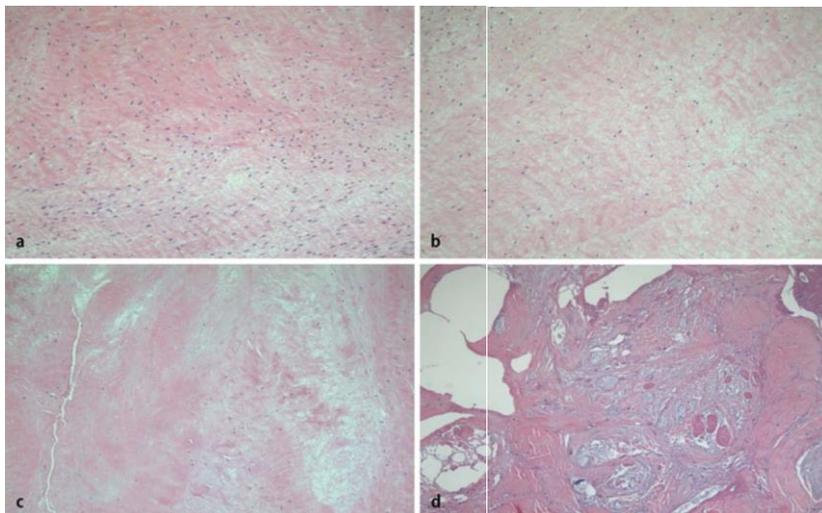


Abbildung 4: Histopathologische Kriterien für Degenerationsbewertungen nach Krenn et. al (2010). Gegenüberstellung von normalem Meniskusgewebe (a); Degenerationsgrad 1 (b), mit leicht verringerter Zellularität und variabler Einfärbungsintensität der Grundsubstanz; Degenerationsgrad 2 (c) mit mäßiger

Verringerung der Zellularität und variabler Größe der Chondrozyten und Degenerationsgrad 3 (d) mit starker Verringerung der Zellularität und mukoiden Defekten.

Eine mäßige Degeneration geht mit einer mäßigen Reduzierung der Zellularität sowie einer variablen Größe und Form der Chondrozyten und mäßigen Tiefe von Spalten in der Matrix einher. Die schwere Degeneration zeigt dann eine starke Reduzierung der Zellularität, basophile Matrixfärbungen (entspricht mukoider Degeneration) und große Bereiche mit einem vollständigen Verlust der Chondrozyten sowie eine Matrix mit großen/pseudozystischen Spalten und Rissen.

Um die Variabilität zwischen den Untersuchern zu verringern, werden die Grade 1 und 2 als „Low-grad-Degeneration“ zusammengefasst und dem Grad 3 als „High-grade Degeneration“ gegenübergestellt (101).

Zusätzlich hat Krenn die NITEGE-Expression (G1-Fragment des Proteoglykans Aggrecan) in den verschiedenen Regionen gemessen und gezeigt, dass NITEGE-positive Zellen überall dort nachzuweisen waren, wo histopathologisch reparative und regenerative Veränderungen nachweisbar waren (101,103). NITEGE ist ein regelhafter Bestandteil von Meniskusgewebe (104). Es wird in Form eines G1-Fragments als Hauptspaltprodukt bei der Spaltung von Aggrecan gebildet (101). Aggrecan gehört zur Gruppe der Proteoglykane, die in der EZM vorzufinden sind (105). Der Verlust von Aggrecan im hyalinen Knorpel ist bei durch Entzündung und Traumata ausgelösten Gelenkdegeneration ein wichtiger Marker. Dementsprechend ist die Aggrecanaseaktivität ein Marker für degenerative Veränderungen im Knorpel. An diesen Stellen der hohen Aggrecanaseaktivität sind die extrazellulären NITEGE-Ablagerungen erhöht (101,103,106).

1.4.4 Score nach Mankin

Der Score nach Mankin ist ein zur Beurteilung von Gelenkknorpeln entwickelter Score, der 1971 eingeführt wurde. Der Autor hat anhand von Femurköpfen biochemische und stoffwechselbedingte Veränderungen an femuralem Knorpelgewebe beschrieben. Dieser Score wird bis heute regelmäßig in Studien zu Schäden an Gelenkknorpeln verwendet, um Veränderungen und Schäden zu beschreiben. Der Score umfasst insgesamt vier Parameter (102).

Zunächst wird die Struktur des Knorpels beurteilt. Eine normale Struktur wird mit null Punkten bewertet. Oberflächenunregelmäßigkeiten werden mit einem Punkt bewertet, Pannus- und Oberflächenunregelmäßigkeiten mit je zwei Punkten. Die nächste Stufe sind Risse, die je nach Tiefe mit Punktwerten belegt werden. Risse in der Übergangszone erhalten drei, Risse bis in die tiefe Zone vier Punkte. Die Maximalschädigung liegt mit Rissen bis zur kalzifizierenden Zone bei fünf Punkten.

Der zweite Parameter bezieht sich auf die vorhandenen Chondrozyten. Normale Chondrozyten werden mit null bewertet, eine diffuse Hyperzellularität mit einem Punkt. Das Vorhandensein von Zellklonen wird mit zwei Punkten und Hypozellularität mit drei Punkten bewertet.

Die dritte Qualität ist die Anfärbbarkeit in der Safranin-O-Färbung. Die Safranin-O-Färbung zeigt den Proteoglykangehalt in Knorpelgeweben an, wobei eine intensive Rotfärbung normalem Knorpelgewebe entspricht und mit abnehmender Farbtintensität auch ein abnehmender Proteoglykangehalt einhergeht (107). Einer normalen Färbung werden null Punkte zugeordnet. Eine leicht reduzierte Färbung entspricht einem Punkt, eine mäßig reduzierte zwei Punkten und eine stark reduzierte drei Punkten. Wenn sich das Gewebe überhaupt nicht mehr anfärben lässt, werden vier Punkte vergeben.

Der vierte und letzte Parameter ist die Bewertung der Randzone, was der äußeren Zone des Meniskus entspricht, wobei hier zwischen intakt, was mit null, und von Gefäßen durchbrochen, was mit einem Punkt bewertet wird, unterschieden wird.

Aus den Punktwerten ergibt sich folgende Auswertung:

- Mankin 0 bis 2: normal
- Mankin 3 bis 5: Grad I Oberflächliche Fibrillierung, kein Substanzverlust
- Mankin 6 bis 7: Grad II Knorpeldefekt, der nicht die gesamte Dicke des Knorpels umfasst
- Mankin 8 bis 10: Grad III Knorpeldefekt, der die gesamte Dicke des Knorpels umfasst
- Mankin über 10: Grad IV Vollständiger Knorpelverlust.

Dieser Score wurde an Hüftgelenkknorpel entwickelt, wird aber in der Forschung nach wie vor für die Bewertung verschiedener Knorpelteile angewendet – so beispielsweise für die histologische Bewertung von Femur und Tibia (108), aber eben auch für die Bewertung von Meniskusknorpel, wie beispielsweise bei Zhang et. al in einer im Jahre 2015 veröffentlichten Untersuchung (109). Da das Labrum als Teil des Hüftgelenks in seiner Grundstruktur dem Meniskus sehr ähnlich ist (9,10), könnte dies die regelmäßige Anwendung des Scores nach Mankin plausibel erklären.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Arbeitsgeräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller	Technische Daten
Brut-/Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	Heraeus Function Line
Brut-/Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	Heraeus T6060
Eindeckautomat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland	Leica CV5030
Färbeautomat für HE	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland	Leica ST4040 Linear Stainer
Gewebeentwässerungs-Automat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	Shandon Pathcentre
Klingenhalter	PFM Medical AG, Köln, Deutschland	Trimming Blade Handle Feather 99061308
Klingen	PFM Medical AG, Köln, Deutschland	Trimming Blades Feather Types No. 130
Kühlplatte	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	Medite TKF 22Quick Cool Unit
Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz	Liebherr KBes 4260

Gerät	Hersteller	Technische Daten
Lichtmikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	Olympus CH2
Lichtmikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	Olympus BX46
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Heidolph MR 3001 K
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland	IKA RH basic 2
Mikroskopkamera	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	SC30
Objektträgerstrecktisch	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	Medite OTS 40
Paraffin-Einbettssystem	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	Medite TES 99
Paraffin-Filtrierautomat	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	Medite PLC 18
pH-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland	WTW-Series InoLab pH 720
Anatomische Pinzette	Plano GmbH, Wetzlar Deutschland	DUMONT Pinzette 24 T520
Pinzette, beheizbar	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, Deutschland	Heidelberger Pinzette

Gerät	Hersteller	Technische Daten
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Sartorius CP 2201
Rotationsmikrotom	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Deutschland	Zeiss Hyrax M55
Rüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Heidolph Unimax 2010

2.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Bestellnummer
Deckgläser 24 x 60 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland	BB024060A1
Edelstahlgießformen 10 x 10 x 5 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	6401015
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland	053700
Färbeküvetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9328
Färbeküvetten nach Hellendahl	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9310
Färbeküvetten nach Hellendahl Erweiterung	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9311

Material	Hersteller	Bestellnummer
Glasgestell für Färbeküvetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9321
Glasgestellbügel	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9329
Magnetrührstäbchen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	9197550
Messzylinder 50 ml	VWR International, Darmstadt, Deutschland	612-1534
Messzylinder 100 ml	VWR International, Darmstadt, Deutschland	612-1535
Messzylinder 250 ml	VWR International, Darmstadt, Deutschland	612-1536
Mikrotomklinge S35	PFM Medical AG, Köln, Deutschland	20750004
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland	4530679
Objektträger Superfrost	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	10149870

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Alcianblau	Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster, Deutschland	1A288

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Aqua dest.	Medizintechnik der Universitätsmedizin Mainz	-
Aluminiumsulfat	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	101102
Citronensäure-Monohydrat	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.00244.1000
Dinatriumhydrogenphosphat	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000
EDTA-Dinatrium	Gerbu Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland	1034
Entellan	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.07961.0100
Eosin Gelb	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.15935.0100
Essigsäure 100 % p.a.	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.00063.1000
Ethanol absolut	SAV Liquid Production GmbH, Flintbach, Deutschland	ETO-200L-99-3
Ethanol 96 %	SAV Liquid Production GmbH, Flintbach, Deutschland	ETO-200L-96-2

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Ethylenglycol p.a.	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.06921.2500
Fast-Green	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.04022.0025
Formaldehyd-Lösung 37 %	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.04002.9025
Hämatoxylin nach Gill II	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.05175.2500
Isopropanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintbach, Deutschland	ISOP-200L-100-2
Kaliumhydrogenphosphat	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.04873.1000
Kernechtrot	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	15939
Lichtgrün	SF Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster, Deutschland	1B211
Natriumjodat p.a.	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	65250025
Natronlauge 1N	VWR (Merck) International, Darmstadt, Deutschland	1.09137.1006

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Paraffin	Klinika Medical GmbH, Usingen, Deutschland	2501008
Safranin O	LGC Promochem GmbH, 46485 Wesel, Deutschland	GB343122N
TRIS-Puffer p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4855.2
Xylol	SAV Liquid Production GmbH, Flintbach, Deutschland	XTR-200L-97-2

2.1.4 Rezepte und Lösungen

Alle Rezepte und Lösungen wurden gemäß des Rezepthandbuchs des Instituts für Pathologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz hergestellt (110).

Tabelle 4: Rezepte und Lösungen

Alcianblaugebrauchslösung	1g Alcianblau auf 100 ml 3 %ige Essigsäure filtrieren Färbeergebnis: Kerne: hellrot Zytoplasma, Bindegewebe: rosa Säure Mukopolysaccharide: blau
Eosin	1g Eosin auf 1000 ml Aqua dest. rühren, bis es gelöst ist und erhitzen auf 100 ml Eosin jeweils ein Tropfen 96 %ige Essigsäure zusetzen
Fast-Green (Lichtgrün) 0,2 %ig	1 Liter (immer frisch ansetzen!)

	<p>2g Fast-Green + 2ml 1 %ige Essigsäure ad 1 Liter mit dest. H₂O</p> <p>jeweils vor Gebrauch filtrieren</p>
Formalin 4 %ig	<p>Anwendungsbereich: Allgemeine Histologie</p> <p>Zusammensetzung (für 10 Liter Formalin 4 %ige Lösung):</p> <p>Phosphatpuffer 2000ml</p> <p>Aqua dest. 6600ml</p> <p>37 %ige Formaldehyd-Lsg. 1400ml</p>
Hämalaun nach Gill	<p>1.Tag</p> <p>Ethylenglycol 250ml</p> <p>Aluminiumsulfat 42g</p> <p>Haematoxylin 4g</p> <p>in ca. 600ml Aqua dest. lösen, gut schütteln</p> <p>2.Tag</p> <p>Citronensäure 1,3 g zusetzen und gut schütteln</p> <p>3.Tag</p> <p>Natriumjodat 0,6 g</p> <p>alles auf 1 Liter auffüllen und gut mischen</p>
Kernechtrot-Lösung	<p>1g Kernechtrot und 50 g Aluminiumsulfat auf 1000 ml Aqua dest.</p> <p>unter Erhitzen lösen und vor Gebrauch filtrieren</p>

Phosphatpuffer	Dinatriumhydrogenphosphat 67,5 g Kaliumhydrogenphosphat 45,0 g auf 5 Liter mit Aqua dest. auffüllen auf pH 6,8 - 7,0 einstellen (mit 1N NaOH oder 1N HCL)
----------------	---

2.2 Methoden

Es handelt sich um eine Reevaluation der diagnostischen Präparate, welche im Medizinischen Versorgungszentrum (MVZ) der Universitätsmedizin Mainz GmbH untersucht wurden. Dabei handelte es sich um Patienten mit Verletzungen und Schmerzen verschiedener Genese im Bereich des Meniskus, bei denen die konservative Therapie ausgeschöpft war.

2.2.1 Bearbeitung der Gewebeproben

Die Resektate wurden nach Entnahme über Nacht in 4 %ig gepuffertem Formalin fixiert. Das Material wurde in Tangentialschnitten zugeschnitten und in Gewebekapseln eingelegt. Anschließend erfolgte die Gewebeentwässerung mittels automatisierter und standardisierter Methode über Nacht.

Tabelle 5: Ablauf der Gewebeentwässerung im Vakuum; Gerät: Shandon Pathcentre

Reagenz	Temperatur	Dauer
Formalin	(-)	00:00 Minuten
Ethanol 60 %	RT	60:00 Minuten
Ethanol 70 %	RT	50:00 Minuten
Ethanol 96 %	RT	50:00 Minuten
Ethanol 96 %	RT	60:00 Minuten
Ethanol 100 %	RT	50:00 Minuten
Ethanol 100 %	RT	80:00 Minuten
Xylol	RT	50:00 Minuten
Xylol	RT	50:00 Minuten
Xylol	RT	70:00 Minuten
Reinigungs-Xylol	RT	01:00 Minute

Reagenz	Temperatur	Dauer
Reinigungs-Isopropanol	RT	01:00 Minute
Paraffin A	60 °C	80:00 Minuten
Paraffin B	60 °C	00:50 Minuten
Paraffin C	60 °C	00:40 Minuten
Paraffin D	60 °C	60:00 Minuten

Nach der Entwässerung über 16 Stunden wurden die Resektate am nächsten Morgen in der Paraffineinbettstation zu Paraffinblöcken gegossen. Das Gewebe wurde hierzu in die passenden Metallschälchen gelegt und mit ca. 60°C heißem Paraffin übergossen. Danach erstarrten die Präparate auf einer Eisplatte zu einem festen Paraffinblock.

Mit dem Mikrotom wurden von diesen Blöckchen ca. 2µm dicke Schnitte angefertigt und im direkten Anschluss im Wasserbad gestreckt. Für die verschiedenen Färbungen wurden jeweils mehrere Schnitte auf unterschiedlichen Objektträgern aufgebracht und auf der Wärmeplatte getrocknet.

2.2.2 Histologische Färbung der Schnittpräparate

Die Farbstoffe der angewendeten Färbeprozesse enthielten als Hauptkomponente Wasser. Da die Schnittpräparate in hydrophobem Paraffin eingebettet waren, mussten diese zunächst vom Paraffin befreit werden. Dies erzielte man durch Schmelzen des Paraffins. Hierzu wurden die Objektträger mit den Präparaten senkrecht bei 60°C in einen Brutschrank gestellt, bis das schmelzende Paraffin abgelaufen war. Verbliebene Paraffinrückstände wurden im Xylolbad herausgelöst. Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe wieder gewässert.

2.2.3 Bearbeitung von Schnittpräparaten für eine histologische Färbung

- I. Schmelzen des Paraffins durch Erwärmung der Präparate im Brutschrank bei 60°C,
- II. Entparaffinierung durch 3 maliges Einstellen in Xylol für jeweils 5 Minuten,
- III. Absteigende Alkoholreihe/ Rehydrierung
 - 2 x 100 %iger Ethanol für jeweils 5 Minuten,
 - 1 x 96 %iger Ethanol für 5 Minuten,
 - 1 x 70 %iger Ethanol für 5 Minuten,
 - 1 x in *Aqua dest.* spülen.

Direkt im Anschluss an die Rehydrierung wurde von jedem Schnittpräparat jeweils eine Hämatoxylin-Eosin-, eine Alcianblau-, und eine Safranin O-Färbung angefertigt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung (C.I. number 45380) gilt als Routinefärbung (111). Sie wurde standardisiert und automatisiert durchgeführt. Mit ihr kann in Knorpelpräparaten zwischen Zellen, Zellkernen und Extrazellulärmatrix unterschieden werden. Dabei werden die Zellkerne durch Hämatoxylin angefärbt und alle übrigen Komponenten erhalten ihre Färbung durch Eosin.

Das Färbeergebnis sind blaue Zellkerne (Histone) und rosa/violettes Zytoplasma und Bindegewebe. Erythrozyten erfahren in dieser Färbung eine rot-violette Anfärbung.

Tabelle 6: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	Inkubationszeit
Xylol	8 x jeweils 50 Sekunden
Isopropanol 100 %	3 x jeweils 50 Sekunden
Isopropanol 96 %	2 x jeweils 50 Sekunden
Isopropanol 70 %	2 x jeweils 50 Sekunden
Aqua dest.	1 x 50 Sekunden

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	Inkubationszeit
Hämalaun nach Gill 4 %	3-x jeweils 50 Sekunden
Hämalaun Wasser	1 x 50 Sekunden
Leitungswasser	3 x jeweils 50 Sekunden
Eosin + Essigsäure	2 x jeweils 50 Sekunden
Isopropanol 70 %	1 x 50 Sekunden
Isopropanol 96 %	1 x 50 Sekunden
Isopropanol 100 %	3 x jeweils 50 Sekunden
Xylol	2 x jeweils 50 Sekunden
Eindecken	mit Entellan

Alcianblau- Kernechtrot-Färbung

Diese Färbung wird manuell durchgeführt und ermöglicht den Nachweis saurer Mukopolysaccharide (SMPS). Das Prinzip beruht auf dem Vorhandensein von freien Valenzen der SMPS. Die Reaktion erfolgt in Form einer Ionenbindung zwischen dem basischen Farbstoff Alcianblau (C.I. number 74240) (111) und den SMPS im sauren Milieu. Nicht SMPS-haltige Strukturen erscheinen hell. Als Gegenfärbung wird zur Darstellung der Kerne eine Kernechtrot-Färbung durchgeführt. Das Färbeergebnis zeigt hellrote Kerne, rosa Zytoplasma sowie Bindegewebsfasern und blaue SMPS (s. Tab. 10).

Tabelle 7: Durchführung der Alcianblau-Kernechtrot-Färbung

Alcianblau-Färbung	Inkubationszeit
3 %ige Essigsäure	1 x 3 Minuten
Alcianblau-Gebrauchslösung	1 x 30 Minuten
Leitungswasser	1 x für 5 Minuten
Aqua dest.	1 x spülen
Kernechtrot	1 x 10 Sekunden
Aqua dest.	1 x spülen
Isopropanol 70 %	1 x 50 Sekunden
Isopropanol 96 %	1 x 50 Sekunden
Isopropanol 100 %	3 x jeweils 50 Sekunden
Xylol	2 x jeweils 50 Sekunden
Eindecken	mit Entellan

Safranin O-/Fastgreen-Färbung (SO/F)

Bei dieser Färbung wird das Schnittpräparat mit den Farbstoffen Safranin O (C.I. number 50240) und Lichtgrün (C.I. number 42053) (111) behandelt. Der Einsatz der beiden Farbstoffe ermöglicht eine gute Differenzierung zwischen Proteoglykanen und Kollagenen in der Matrix. Safranin O ist ein kationischer Farbstoff, der an die SMPS im Gewebe bindet. Kollagene werden nicht angefärbt. Die rote Farbintensität verhält sich bei der Anfärbung proportional zum Proteoglykangehalt. Dies ermöglicht eine semiquantitative Auswertung. Der anionische Farbstoff Fastgreen/Lichtgrün dient zur Gegenfärbung und färbt das Zytoplasma an. Das Färbeergebnis zeigt eine rot-orange Färbung der proteoglykanreichen Extrazellulärmatrix und eine Grünfärbung der Kollagene (s. Tab. 6).

Tabelle 8: Durchführung der Safranin O-Fastgreen-Färbung

Safranin O-Fastgreen-Färbung	Inkubationszeit
Xylol	3 mal jeweils 3 Minuten
Isopropanol 100 %	2 mal jeweils 2 Minuten
Isopropanol 96 %	2 mal jeweils 2 Minuten
Isopropanol 70 %	2 mal jeweils 2 Minuten
<i>Aqua dest.</i>	1 mal spülen
Safranin O	1 mal 5 Minuten
<i>Aqua dest.</i>	2 mal jeweils kurz schwenken
Fastgreen	1 mal 5 Minuten
<i>Aqua dest.</i>	2 mal jeweils kurz schwenken
Isopropanol 70 %	1 mal 60 Sekunden
Isopropanol 96 %	2 mal jeweils 60 Sekunden
Isopropanol 100 %	2 mal jeweils 60 Sekunden
Xylol	3 mal jeweils 3 Minuten
Eindecken	mit Entellan

Um eine wasserfreie Eindeckung zu gewährleisten, erfolgte im Anschluss an die o. g. Färbeschritte eine Dehydrierung. Diese wurde über eine aufsteigende Alkoholreihe und eine anschließende Behandlung mit Xylol durchgeführt. Die Dehydrierung erfolgte in umgekehrter Reihenfolge zur Rehydrierung, am Ende erfolgte ein erneutes Spülen in Xylol. Danach wurden die Schnitte im Eindeckautomaten eingedeckt. Das verwendete Eindeckmedium war Entellan. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur unter einem Abzug.

2.2.4 Lichtmikroskopische Analyse der gefärbten Präparate

Es wurden 68 Präparate nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, die alle von Patienten mit klinischen Beschwerden im Bereich des Meniskus stammen, in deren Behandlungsverlauf die operative (Teil-)Entfernung des Meniskus erfolgte. Bei der Auswahl der Präparate wurden keine Alters- oder Diagnoseeinschränkungen gemacht. Die Auswertung erfolgte nach den Kriterien der jeweiligen Scores, nach denen die Gradeinteilung der Schäden erfolgen sollte. Dabei wurden alle Präparate in der HE-Färbung zur Bewertung der Zellzahl, Morphologie von Chondrozyten, Fibrillenbildung, Degenerationszeichen und Verkalkungen ausgewertet. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die zellreichsten Stellen ausgesucht und in diesen wurden jeweils zehn Gesichtsfelder ausgezählt. Außerdem erfolgte die Auswertung für die Scores nach Mankin und Pauli in Safranin-O und für den Score nach Roth in Alcianblau.

Die Auswertung der Sonderfärbungen in Safranin-O und Alcianblau erfolgte als Übersichtsbeurteilung und bezog sich auf die Intensität der Anfärbung der Extrazellulärmatrix. Alle übrigen Kriterien wurden in zuvor festgelegten Gesichtsfeldern beurteilt.

2.2.5 Anwendung der Scores

Die gewonnenen Präparate wurden nach den Kriterien der in 2.4 aufgeführten Scores untersucht. So wurde jedes Präparat viermal bewertet. Da die Scores nach Roth und Krenn nur zwischen „degeneriert“ und „nicht degeneriert“ unterschieden, wurde im Vergleich zu Mankin und Pauli, die beide mehrere Kategorien umfassten, eine Zusammenfassung vorgenommen. Dabei wurden alle Präparate, die als „normal“ oder „leicht“ beurteilt waren, zu „nicht degeneriert“, und diejenigen, die als „mäßig“ oder „schwer“ beurteilt waren, zu „degeneriert“ zusammengefasst. Aufgrund der vorliegenden tangentialen Schnittweise waren die Zonen nicht beurteilbar. Um den Score nach Pauli anwenden zu können, der bei der Beschreibung von Präparaten alle drei Zonen betrachtet, wurden die ersten drei Kategorien, in denen die einzelnen Zonen bewertet werden, weggelassen und die Punktezahl entsprechend angepasst, sodass die maximale Punktezahl bei 9 lag. Da bei Pauli drei Schweregrade bestehen,

wurde der Vergleich ausschließlich mit Mankin (ebenfalls mehr Schweregrade als zwei) vorgenommen.

2.2.6 Statistische Auswertung

Für die Statistische Auswertung erfolgte eine vorherige Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programms SPSS Statistics 23.

Es erfolgte eine deskriptive Statistik der Ergebnisse. Ziel einer solchen ist die Zusammenfassung und Darstellung der einzelnen Ergebnisse, wobei die erfolgten Aussagen sich ausschließlich auf den Datensatz selbst beziehen. Die anschließende explorative Statistik dient der Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Variablen besteht oder nicht.

2.2.7 Berechnung des Konfidenzintervalls nach Clopper-Pearson

Bei einer binomial verteilten Variablen kann man die Wahrscheinlichkeit, mit der beide Scores gleich sind schätzen, in dem man die Anzahl der gleichen Ergebnisse durch die Gesamtzahl der bewerteten Präparate dividiert. Um diese geschätzte Wahrscheinlichkeit kann man das Clopper-Pearson-Intervall berechnen und damit die Sicherheit der Schätzung angeben. Das Konfidenzniveau wird dabei vorher festgelegt. Dies wurde in dieser Arbeit mit 95 % angegeben.

2.2.8 Berechnung der Chi-Quadrat-Verteilung

Mit dem Chi-Quadrat-Test lässt sich messen, ob es einen Zusammenhang zwischen zwei beobachteten Variablen gibt. Um den Chi-Quadrat-Test anwenden zu können, muss die Verteilung der Teststatistik näherungsweise Chi-Quadrat-verteilt sein. Dazu muss eine bestimmte Fallzahl vorliegen. In dieser Arbeit wurde der exakte Test nach Fisher-Yates angewendet. Bei diesem handelt es sich um einen Signifikanztest, der die Unabhängigkeit einer Kontingenztafel überprüft. Im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test gibt es keine Voraussetzungen, was den Stichprobenumfang betrifft. Die Chi-Quadratverteilung liefert entsprechend auch bei geringeren Fallzahlen anwendbare Ergebnisse.

Bei Werten im Fisher-Test, die bei einer 2-seitigen Signifikanz über 0,05 liegen, kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Umgekehrt kann die Nullhypothese bei Werten unter 0,05 verworfen werden.

2.2.9 Cohen's Kappa

Cohen's Kappa wird in erster Linie als statistisches Maß zur Schätzung der Interrater-Reliabilität verwendet, kann aber auch für die Intrarater Reliabilität angewendet werden. Stimmen die Rater in allen Urteilen überein, ist $k=1$, bei einem Wert von $k=0$ liegen die Übereinstimmungen im Bereich des Zufalls (112). Negative Werte sprechen für eine Übereinstimmung, die unwahrscheinlicher ist als eine zufällige Übereinstimmung (113,114).

3 Ergebnisse

3.1 Mikroskopische Auswertungen

Bei der Bestimmung der Zellzahl ergaben sich in den jeweils gezählten zehn Gesichtsfeldern unterschiedlich starke Schwankungen in der Zelldifferenz:

Eine Differenz in der Zellzahl zwischen den zehn Gesichtsfeldern mit Unterschieden zwischen 0 und 100 Zellen fand sich bei 6 Präparaten, eine Differenz zwischen 101 und 200 Zellen bei 26 Präparaten, eine Differenz von 201 bis 300 Zellen bei 24 Präparaten und eine Differenz von 301 bis 400 Zellen bei 6 Präparaten. Eine Differenz von 401 bis 500 Zellen gab es nicht. In der Gruppe > 500 Zellen Differenz gab es 3 Präparate und in der Gruppe über > 1000 Zellen Differenz gab es ebenfalls 3 Präparate.

Bei der mukoiden Matrixdegeneration (MD) war es so, dass diese bei keinem der betrachteten Präparate genau gleichmäßig verteilt war, sodass in dieser Arbeit Mittelwerte in Prozent je Präparat angegeben wurden (Beispiele für MD siehe Abb. 5,6). Dabei ergaben sich folgende Werte:

In 9 Präparaten zeigte sich keine MD, in 10 Präparaten eine schwache MD. Eine mäßige MD zeigte sich in 18 Präparaten und eine starke in 15 Präparaten.

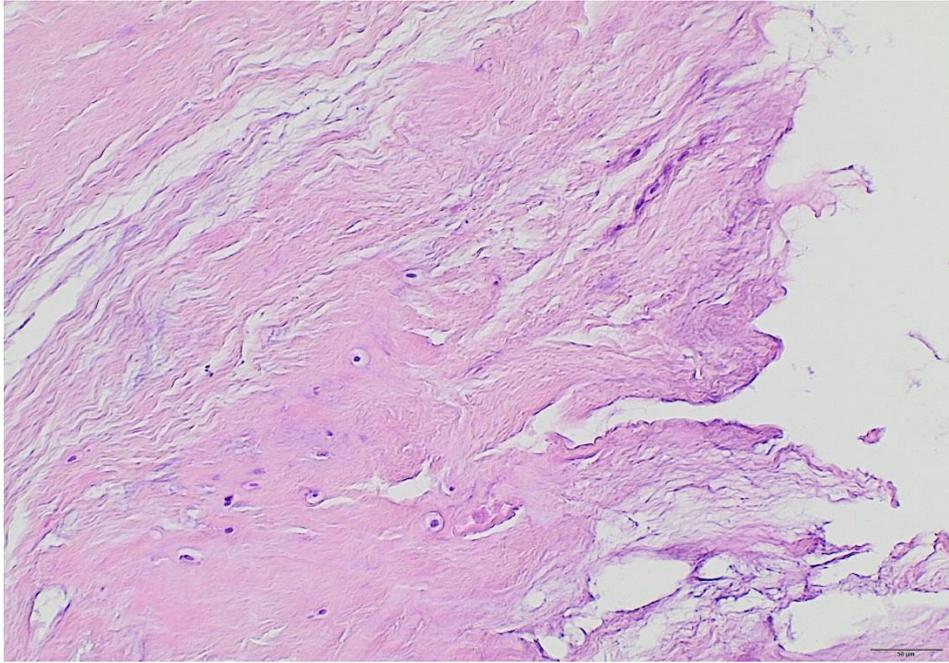


Abbildung 5: Geringe bis mäßige mukoide Matrixdegeneration – Übersicht

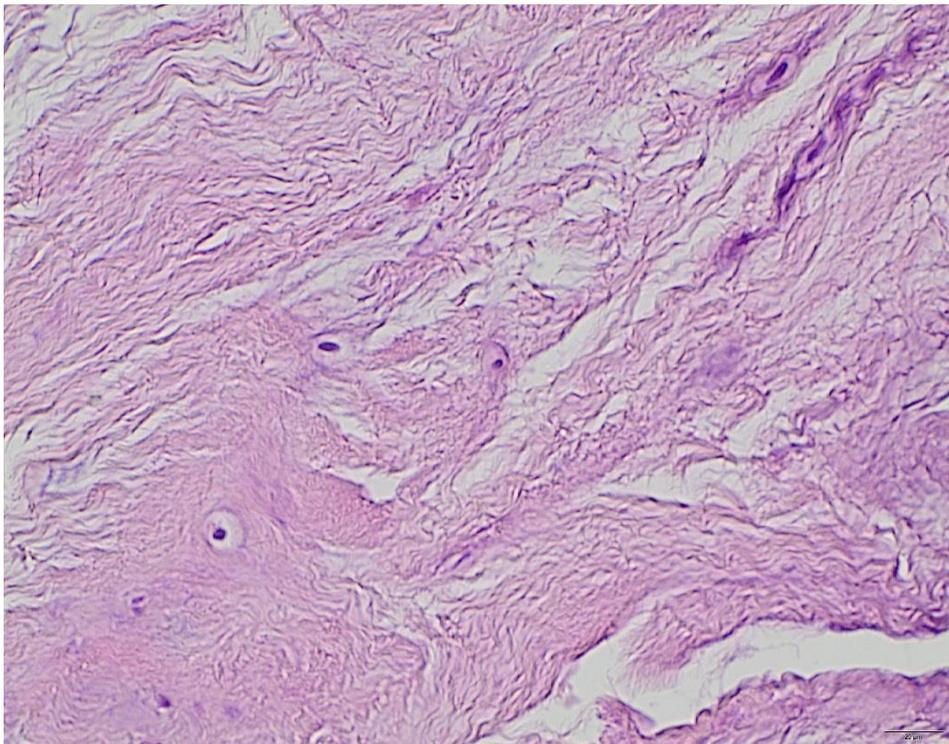


Abbildung 6: Geringe bis mäßige mukoide Matrixdegeneration

Das Vorhandensein von Fibrillationen (siehe Abb.7) wurde prozentual auf das gesamte Präparat angegeben und verteilte sich in den verschiedenen Gruppen wie folgt:

Prozent der Fibrillationen	Anzahl der Präparate
0-5 %	21
5-10 %	12
11-20 %	13
21-50%	10
>50 %	10

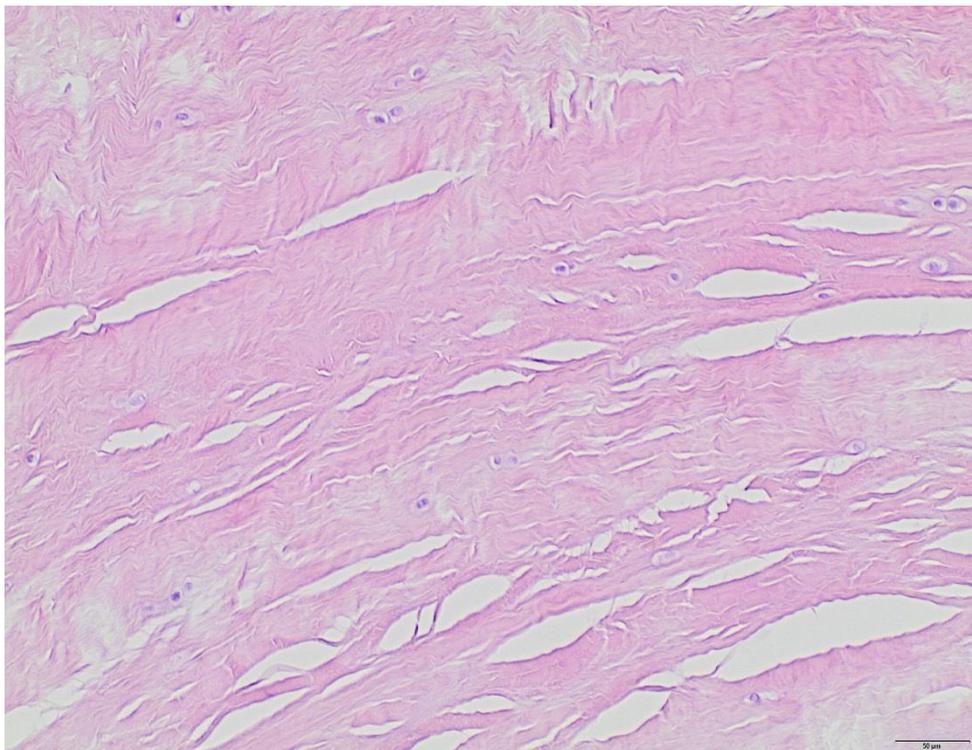


Abbildung 7: Beispiel für Fibrillationen

Die Zählung der Chondrozytenproliferationsnester (=Brutkapseln) (Beispiel siehe Abb.8,9) erfolgte, wie die Zellzählung auch, in den ausgewählten 10 Gesichtsfeldern. Dabei zeigten sich folgende Verteilungen:

Gezählte Regenerationsknoten	Anzahl der Präparate je 10 Gesichtsfelder
0	12
1-5	15
6-10	11
11-20	14
21-30	8
>30	4

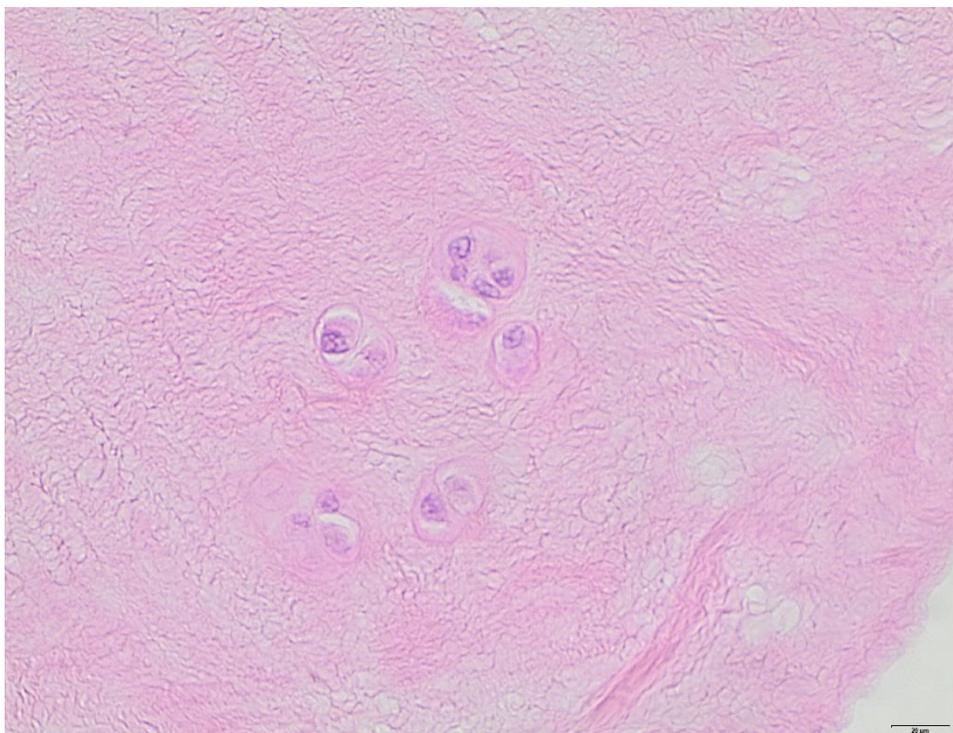


Abbildung 8: Chondrozytenproliferationsnester

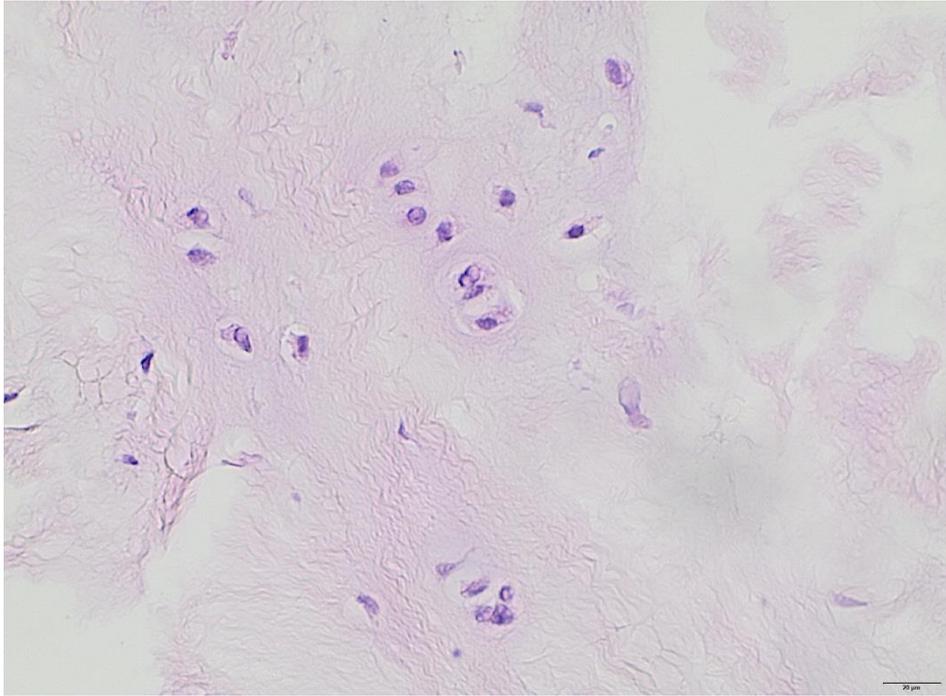


Abbildung 9: Chondrozytenproliferationsnester in schwach gefärbtem Präparat

3.1.1 Auswertungen der einzelnen Scores

Die Auswertung des Scores nach Mankin zeigte eine zahlenmäßig ähnliche Verteilung der Schweregrade zwischen Grad I mit insgesamt 18, Grad II mit insgesamt 23 und Grad III mit insgesamt 20 Fällen (Beispiele siehe Abb.10). Ein Grad IV wurde gar nicht erreicht, ein als „normal“ zu bewertender Knorpel wurde 5 Mal erreicht.



Abbildung 10: Schweregrade nach Mankin, alle Bilder in 20facher Vergrößerung.
A: HE-Färbung; Grad I entspricht geringer Degeneration; Leichte Fibrillationen, da Kollagenfasern lichtmikroskopisch erkennbar. B: HE-Färbung; Grad II entspricht einem Knorpeldefekt, der Teile des Knorpels umfasst; Hyperzellularität mit Zellklonen sichtbar. C: Alcianblaufärbung; Grad III entspricht einem Knorpeldefekt, der die gesamte Dicke des Knorpels umfasst; Knorpeldefekt, der die gesamte Dicke des Knorpels umfasst, hier Hypozellularität erkennbar, außerdem Fibrillationen.

Bei Pauli war die Verteilung der Schweregrade zwischen Grad I mit insgesamt 19, Grad II mit 39 und Grad III mit 10 Fällen weniger ausgewogen (Beispiel siehe Abb.11).



Abbildung 11: Schweregrade nach Pauli, alle Bilder in 20facher Vergrößerung.
A: HE-Färbung; Grad II entspricht milder Degeneration; Kollagenfasern organisiert, hypozelluläre Bereiche vorhanden. B: HE-Färbung; Grad III entspricht moderater Degeneration; Azelluläre Bereiche, konfluierende Zentren mit Mukoider Matrixdegeneration. C: Grad IV entspricht schwerer Degeneration; Azelluläre Bereiche, schwere Fibrillationen.

Da bei Roth ausschließlich nach den Merkmalen „stark“ und „gering“ degeneriert unterschieden wurde, ergab sich eine Aufteilung aus 43 Fällen, die „stark“ degeneriert, und 25, die „gering“ degeneriert waren (Beispiel siehe Abb.12).

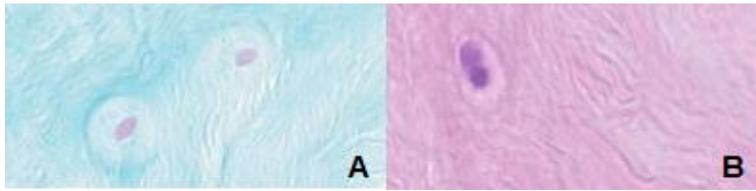


Abbildung 12: Schweregrade nach Roth, alle Bilder in 20facher Vergrößerung. A: Alcianblau-Färbung; stark degeneriert, blasser Alcianblaufärbung als Zeichen der Degeneration, veränderte Zellmorphologie. B: HE-Färbung; Keine typischen Zeichen der Degeneration, keine Verkalkung.

Beim Score nach Krenn, der ebenfalls ausschließlich nach den Merkmalen „stark“ und „gering“ degeneriert unterscheidet, ergab sich eine Aufteilung aus 13 Fällen, die „stark“ degeneriert, und 50 Fälle, die „gering“ degeneriert waren (Beispiel siehe Abb. 13).



Abbildung 13: Schweregrade nach Krenn, alle Bilder in 20facher Vergrößerung. A: Alcianblau-Färbung; schwere Degeneration, deutlich verringerte Zellularität, mukoide Defekte erkennbar. B: HE-Färbung; keine Spalten in der Matrix, variable Färbungsintensität.

Es ergaben sich zum Teil Abweichungen in der Anzahl der bewerteten Präparate (Mankin 66, Pauli 68, Roth 68, Krenn 63). Dies lag an schnittbedingten Faktoren, da es sich um eine Re-Evaluierung von Routinepräparaten handelte. Der Zustand eines Präparats hängt unter anderem ab vom Entnahmeverfahren und an der Größe des entnommenen Stücks. Häufig lagen keine ganzen Schnitte vor, so dass die durch die Scores vorgegebenen Kriterien nicht überprüft werden konnte und auf eine Bewertung verzichtet wurde.

Insgesamt war die Anzahl der übereinstimmenden Ergebnisse im Scorevergleich sehr unterschiedlich:

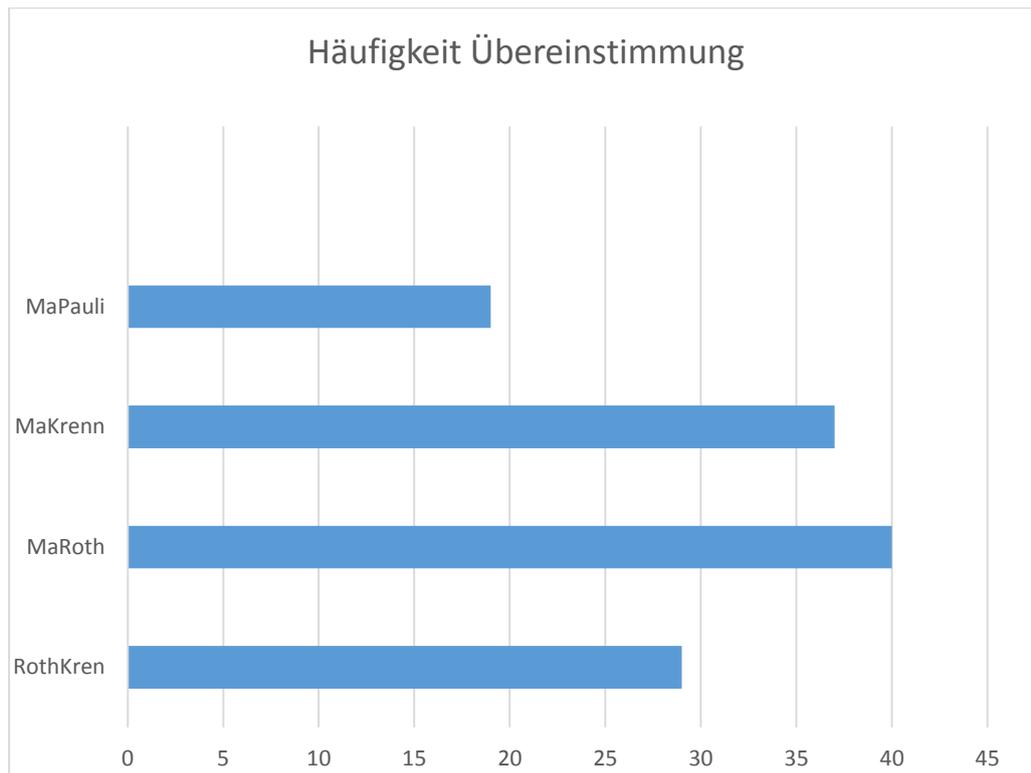


Abbildung 14: Balkendiagramm zur Übersicht der Übereinstimmungen im Scorevergleich

3.1.2 Auswertung der Gegenüberstellungen der Scores

Zunächst wurde untersucht, wie häufig eine Übereinstimmung der Schweregradeinteilungen vorlag (siehe Abb. 14). Lag eine Abweichung vor, wurde unterschieden, ob sie bei einem oder zwei Schweregraden lag. Der Vergleich der Scores von Mankin und Pauli zeigte, dass 19 (28,4 %) von 67 Präparaten zu gleichen Schweregradeinteilungen kamen, 38 (56 %) sich um einen Schweregrad unterschieden und 10 (14,9 %) sich um zwei Schweregrade unterschieden (siehe Abb.15).

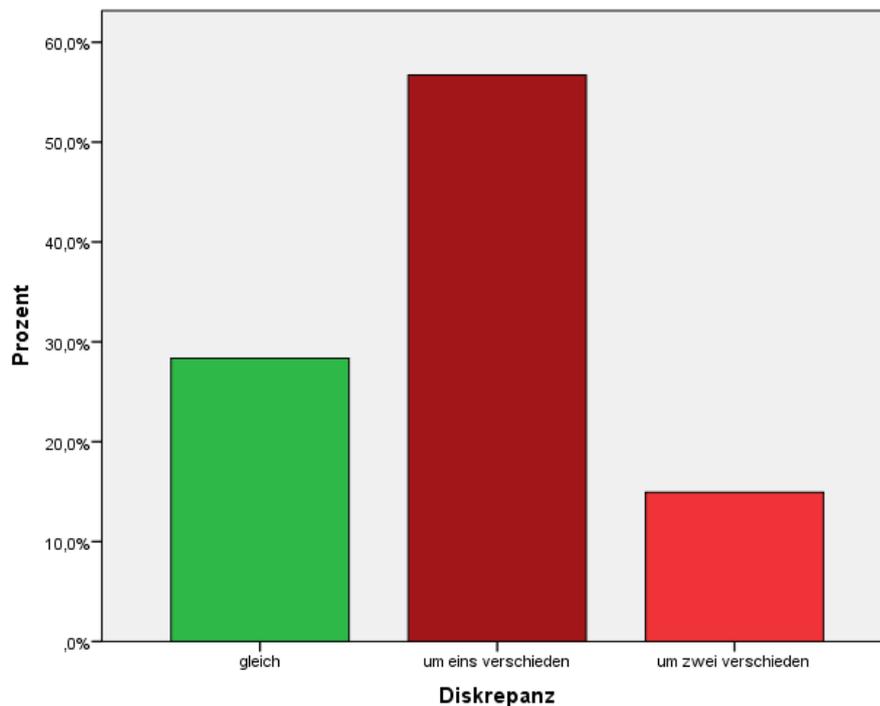


Abbildung 15: Balkendiagramm Vergleich Mankin und Pauli. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Gruppe, die x-Achse zeigt die drei Gruppen, „gleich“, „eins verschieden“, „zwei verschieden“. Gleiche Schweregradeinteilungen fanden sich bei 28,4%, 56% unterschieden sich um einen Schweregrad, bei 14,9% lag der Unterschied bei zwei Schweregraden.

Mankin bewertet die Risse nach ihrer Tiefe, sodass hier eine Schwankung in der Bewertung für diesen Parameter bei drei bis fünf Punkten liegt. Pauli bewertet das Vorhandensein allein und die Menge von Rissen unabhängig davon, in welcher Zone sie auftreten. Das bedeutet, dass beispielsweise wenige Risse an der Oberfläche bei Pauli zu einem höheren Punktwert führen und dementsprechend höherer Schweregrad bei ihm erreicht wird. Ein zweiter Unterschied ist die bei Pauli betrachtete Morphologie von Matrix und Kollagen. Er unterscheidet hyaline und mukoide Degeneration, fehlende Zellcluster und Calciumablagerungen gesondert von der Anfärbbarkeit der Safranin-O-Fast-Green-Färbung. Mankin hingegen hat keinen Parameter, der die Matrix betrachtet.

Beim Vergleich der Scores von Mankin und Roth zeigten 40 (59,7 %) von insgesamt 67 Präparaten ein übereinstimmendes Ergebnis, 27 (40,3 %) ein unterschiedliches. Übereinstimmung bedeutet in dem Fall, dass in 59,7% der Fälle die Präparate gleich schwer bewertet wurden (siehe Abb. 16).

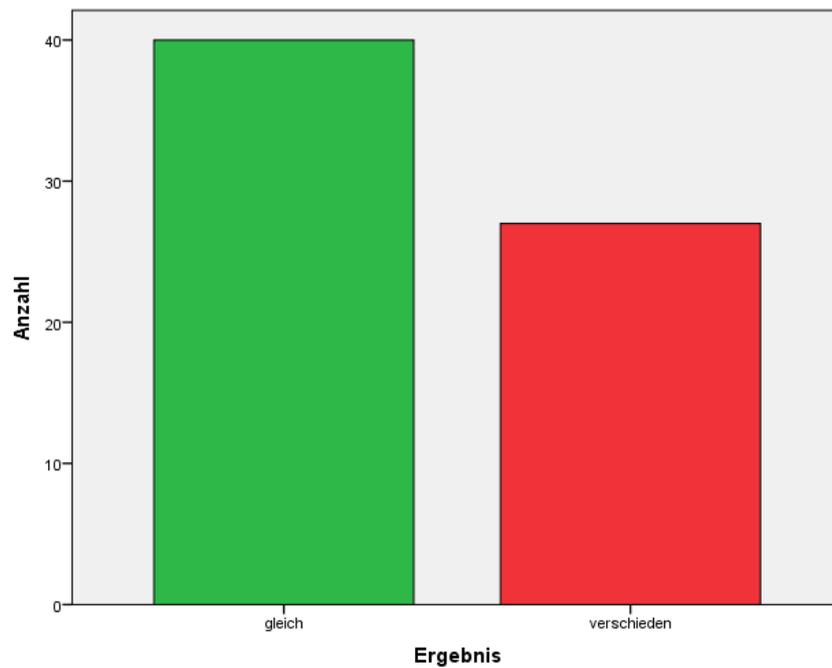


Abbildung 16: Balkendiagramm Vergleich Mankin und Roth, Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Gruppe, die x-Achse zeigt die zwei Gruppen, „gleich“ und „verschieden“. Gleiche Schweregradeinteilungen fanden sich bei 59,7% einen unterschiedlichen Schweregrad gab es bei 40,3% der Fälle.

Die Abweichungen werden vor allem auf Unterschiede in zwei Parametern zurückgeführt: Der Unterschied liegt darin, dass Roth zusätzlich Zeichen der Degeneration betrachtet (7). Diese findet sich bei Vorhandensein in der Matrix. Im Score nach Mankin findet sich kein analoger Parameter.

Der Vergleich der Beurteilung nach Mankin und Krenn zeigte bei einer Gesamtzahl von 62 Präparaten eine Übereinstimmung der Schweregrade von 37 (59,7 %) und einen unterschiedlichen Schweregrad bei 25 (40,3 %).

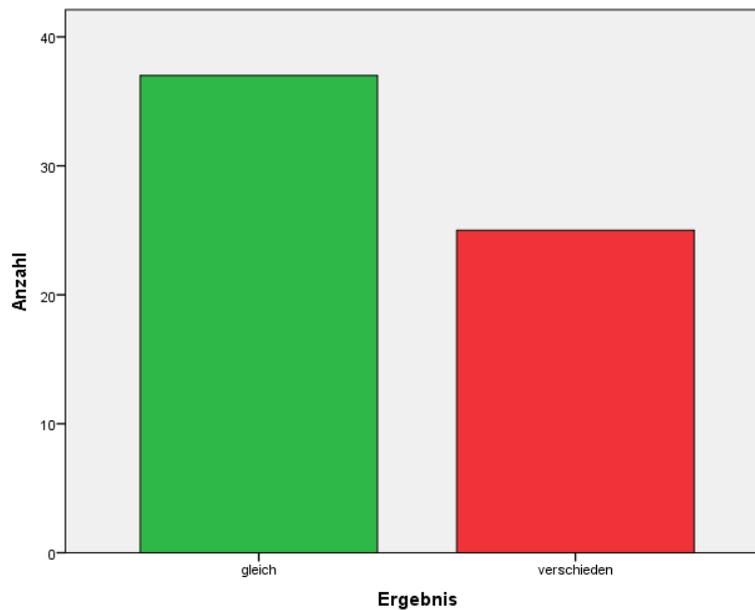


Abbildung 17: Balkendiagramm Vergleich Mankin und Krenn. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Gruppe, die x-Achse zeigt die zwei Gruppen, „gleich“ und „verschieden“. Gleiche Schweregradeinteilungen fanden sich bei 59,7 % einen unterschiedlichen Schweregrad gab es bei 40,3 % der Fälle.

Krenn verteilt für die einzelnen Parameter keine einzelnen Punktwerte, sondern klassifiziert die Präparate nach einem Gesamtbild in die Kategorien normale Morphologie bis schwere Degeneration. Die Kategorien „gering“ und „mäßig“ fasst er zu „Low-Grade“ zusammen, das von „High-Grade“ abgegrenzt werden soll. Da Mankin für die einzelnen Parameter verschiedene Punktwerte vergibt, ist die hohe Zahl an unterschiedlichen Schweregradeinteilungen wenig überraschend. Unter der Prämisse, dass man die Einteilung nach Krenn in „gering“ und „mäßig“ wieder in drei Schweregrade aufteilt, wäre die Übereinstimmung der Schweregradeinteilungen höher.

Der Vergleich der Analyse gemäß der Scores nach Roth und Krenn zeigte bei insgesamt 68 Präparaten eine Übereinstimmung bei 30 (44,1 %) Präparaten und eine Verschiedenheit bei 38 (55,9 %) (siehe Abb.17).

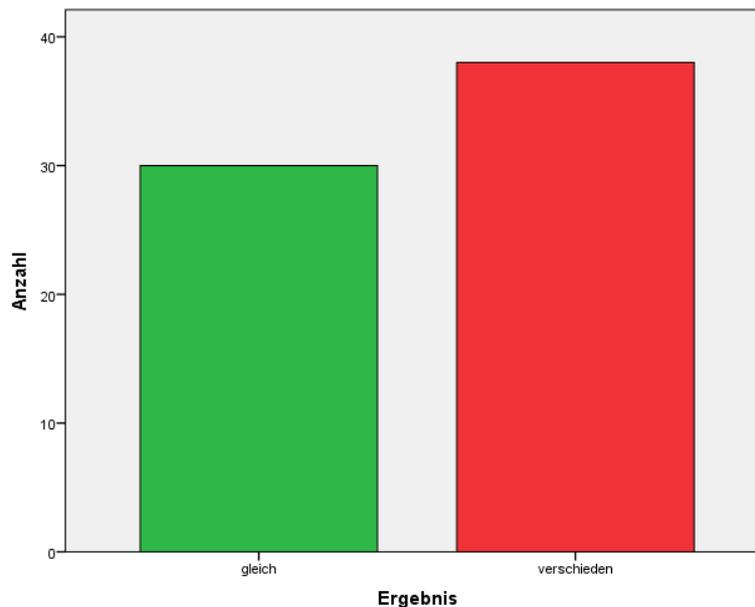


Abbildung 18: Balkendiagramm Vergleich Roth und Krenn. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Gruppe, die x-Achse zeigt die zwei Gruppen „gleich“ und „verschieden“. Gleiche Schweregradeinteilungen fanden sich bei 44,1 %, einen unterschiedlichen Schweregrad gab es bei 55,9 % der Fälle.

Dies ist der einzige Vergleich, bei dem die Anzahl der unterschiedlichen Ergebnisse die der gleichen übersteigt (siehe Abb.18). Dies ist am ehesten auf das Fehlen einer Färbeintensität bei Krenn zurückzuführen. Krenn geht nicht auf Unterschiede der Färbeintensität ein und verzichtet damit auf einen Aspekt der Matrixbeurteilung, den alle anderen Autoren mit einbeziehen. Alcian- und Safranin-O-Färbung sind beide ein Maß für den Gehalt an Proteoglykanen in der Matrix und in allen anderen getesteten Scores kommt eine Bewertung der Färbeintensität vor. Da Roth insgesamt nur vier Parameter in seinen Score einfließen lässt, kommt diesen eine höhere Bedeutung bei, sodass sich dieser hohe Anteil an Abweichungen erklären ließe.

3.2 Statistische Auswertungen

3.2.1 Mankin und Pauli

Im Vergleich von Mankin und Pauli liegt p bei 0,28 für den Gesamtvergleich. Dabei lagen das untere Konfidenzintervall bei 0,18 und das obere bei 0,41. Das bedeutet, dass die Beurteilung der beiden Scores mit einer Wahrscheinlichkeit von 28 % miteinander übereinstimmen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 57% liegt der Score nach Mankin um einen Schweregrad höher, mit 10 % Wahrscheinlichkeit liegt er zwei Schweregrade höher.

Für Mankin und Pauli liegt bei der zweiseitigen Testung im Exakten Fisher-Test der Wert für die exakte Signifikanz bei 0,478, womit die Nullhypothese, dass kein Zusammenhang besteht, nicht verworfen werden konnte. Pathologisch bedeutet das, dass die beiden Scores sich sehr unterscheiden.

Für Mankin und Pauli liegt der Kappa-Wert bei -0,06, was dafür spricht, dass beide Scores bei der Bewertung der Schweregrade nicht vergleichbar sind.

3.2.2 Mankin und Roth

Im Vergleich von Mankin und Roth stimmen die Schweregrade mit einer Wahrscheinlichkeit von 60 % der Fälle überein. Das untere Konfidenzintervall lag bei 0,47 das obere bei 0,71.

Der Wert für die zweiseitig getestete exakte Signifikanz nach Fisher lag bei 0,009, womit die Nullhypothese, dass kein Zusammenhang zwischen beiden Scores besteht verworfen werden konnte. Das heißt, dass statistisch Gemeinsamkeiten bestehen.

Der Kappa-Wert lag bei 0,252. Dieser Wert sollte kritisch gesehen werden und spricht für eine eingeschränkte Gemeinsamkeit der Schweregradergebnisse.

3.2.3 Mankin und Krenn

Bei der Analyse nach den Scores von Mankin und Krenn lag die Wahrscheinlichkeit, dass die Schweregrade übereinstimmen ebenfalls bei 60 %, die untere Grenze des Konfidenzintervall lag bei 0,46 und die obere bei 0,72. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 54% stimmen die Werte überein. Das liegt nur knapp über der zufälligen

Wahrscheinlichkeit von 50%, die beim Vergleich von zwei Scoringsystemen möglich ist.

Der Vergleich der Scores von Mankin und Krenn zeigte einen Wert für die exakte Signifikanz von 1,0. Das bedeutet, dass zu wenige Informationen bzw. Fallzahlen vorliegen, um eine Aussage darüber zu machen, ob die Nullhypothese verworfen werden kann oder angenommen werden muss.

Der Kappa-Wert lag bei 0,001 was eine schlechte Übereinstimmung zeigt.

3.2.4 Roth und Krenn

Bei Roth und Krenn lag diese Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung bei 46 %, wobei das untere Konfidenzintervall bei 0,33 und das obere bei 0,59 lagen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 67% stimmen die Werte nicht überein und mit einer Wahrscheinlichkeit von 41 % stimmen sie überein.

Bei Roth und Krenn lag das Ergebnis des Fishertests bei 0,515 womit die Nullhypothese ebenfalls nicht verworfen werden konnte.

Der Kappa-Wert lag bei 0,053 was bedeutet, dass eine moderate Übereinstimmung im Vergleich der Schweregrade vorlag.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass man alle Scores anwenden müsste, um ein möglichst „echtes“ Ergebnis zu erhalten.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene histopathologische Scores für Meniskus- und Gelenkknorpel in Anwendung auf den Meniskus miteinander zu vergleichen und zu prüfen, ob sie an jeweils einem Präparat zu gleichen Schweregradeinteilungen kommen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Frage, ob sich Merkmale herauskristallisieren, die für die mögliche Anwendung des Tissue Engineering im Meniskus eine Rolle spielen.

Der Vergleich der unterschiedlichen Scores hat gezeigt, dass sie mehrheitlich nicht zu einheitlichen Ergebnissen in der Schweregradeinteilung kommen. Dabei ergaben sich zum Teil stark voneinander abweichende Ergebnisse. So stimmte der ermittelte Schweregrad im Vergleich von Mankin und Pauli nur in 28% der Fälle überein. Immerhin betrug die Abweichung in 57% der Fälle nur einen Schweregrad und lediglich in 10% der Fälle zwei Schweregradeinteilungen. Dabei lag Pauli in 36,8% der Fälle niedriger als Mankin und in 23,5% höher. Das könnte zum einen daran liegen, dass sie wie bei Mankin an einem anderen Material als dem Meniskus oder wie bei Pauli und Roth an triangulären Schnitten entwickelt wurden. Daraus ergibt sich bei überwiegender Anwendung an Teilresektaten ein verzerrtes Bild. Auch ist die Beurteilung regenerativer Aktivitäten im Gesamtmeniskus erschwert, weil einerseits richtige Teilresektate, andererseits nur einzelne gerupfte Einzelteile des Meniskusgewebes vorlagen. Da die Scores überwiegend an entnommenen Menisken entwickelt wurden, bei denen alle drei Zonen sichtbar waren, ist die Anwendung an Teilresektaten oder sogar noch kleineren Stücken des Gewebes erschwert und partiell ungenau. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Betrachtung der Extrazellulären Matrix und ihrer Bestandteile. Diese wird bei Mankin nur indirekt durch die Intensität der Anfärbung beurteilt. Bei allen anderen Scores wird die Anfärbung zusätzlich zur Extrazellulären Matrix betrachtet.

Bei Mankin und Roth lag die Quote an übereinstimmenden Ergebnissen bei 60% der Fälle. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass bei Roth nur zwei Kategorien, nämlich „gering“ und „stark“ vorgesehen sind, so dass die Schweregradeinteilungen bei Mankin zusammengefasst werden mussten: Die Schweregrade „normal“ oder „leicht“ nach Mankin wurde unter „nicht degeneriert“ und die, welche als „mäßig“ oder

„schwer“ beurteilt waren, zu „degeneriert“ zusammengefasst. Daraus ergeben sich statistische Ungenauigkeiten.

Mankin und Krenn zeigten eine Übereinstimmung von 60 %. Allerdings zeigten sowohl die Größe des Konfidenzintervalls als auch der Wert für die exakte Signifikanz, dass die Fallzahlen im Vergleich dieser beiden Scores zu gering waren, um eine sichere Aussage über die tatsächliche Übereinstimmung treffen zu können. Auch im Vergleich mit Krenn musste die Schweregradeinteilung nach Mankin angepasst werden, so dass Grad 1 und 2 nach Mankin zu „gering degeneriert“ und Grad 3 und 4 zu „stark degeneriert“ zusammengefasst wurden. Ähnlich wie beim Vergleich mit dem Score nach Roth entstehen an dieser Stelle Ungenauigkeiten, die das Ergebnis verzerren.

Im Vergleich von Roth und Krenn lag die Übereinstimmung der Schweregradeinteilung bei 46%. Dies ist zunächst überraschend, weil beide lediglich die Kategorien „gering degeneriert“ und „stark degeneriert“ in ihren Scores aufweisen. Allerdings ermöglicht der Score nach Roth eine genauere Anwendung der Parameter: Bei ihm werden genaue Punktwerte für die Ausprägungsintensität der einzelnen Parameter vergeben und am Ende ein Gesamtpunktwert errechnet. Bei Krenn wird das Gesamtbild nach bestimmten Kriterien beurteilt, so dass es eine größere Ungenauigkeit in der Bewertung geben kann. Zwar betont Krenn, dass die Reproduzierbarkeit unter verschiedenen Untersuchern bei befriedigend bis gut liege (103), dennoch ist genau dieser Punkt ein Unsicherheitsfaktor. Letztlich muss ein Score so genau funktionieren, dass auch ein weniger erfahrener Untersucher bei der Anwendung eben dieses Scores zu einem reproduzierbaren Ergebnis kommt.

Mankin, dessen Score an hyalinem Femurknorpel entwickelt wurde, wurde mit allen anderen Scores verglichen, die ausschließlich für den Meniskusknorpel entwickelt wurden. Es stellt sich die berechtigte Frage, ob das sinnvoll ist, weil sich der Meniskusknorpel in mehreren Eigenschaften von hyalinem Knorpel unterscheidet. Hyaliner Knorpel besteht zum Großteil aus Typ II-Kollagen (115), während im Meniskus zu über 90% Typ I-Kollagen dominiert (15). Der Meniskusknorpel wird in drei Zonen eingeteilt und die Verteilung der Zellen innerhalb dieser Zonen ist sehr unterschiedlich (21). Bei hyalinem Knorpel bilden die Chondrozyten sogenannte Territorien, die untereinander durch Interterritorien voneinander getrennt sind (116).

Eine wichtige Gemeinsamkeit ist allerdings, dass bei beiden Knorpeltypen die Extrazelluläre Matrix Aggrecan als Hauptproteoglykan enthält (20,116).

Pathologische Veränderungen beim hyalinen Knorpel gehen, ähnlich wie beim Meniskus, mit einem verringerten Gehalt an Proteoglykanen einher (117). Es werden Kollagenfibrillen sichtbar, die sonst maskiert sind. Außerdem kommt es zu metabolischen Veränderungen der vorhandenen Chondrozyten, was sich histopathologisch je nach Stadium sowohl in Hyper- als auch Hypozellularität zeigen kann (118). Ebenfalls können sich als altersbedingte Veränderungen Verkalkungen zeigen (7,116). In Anbetracht der vergleichbaren Veränderungen, die lichtmikroskopisch sowohl beim hyalinen wie beim Meniskusknorpel beobachtet werden können, ist die Anwendung des Scores nach Mankin durchaus zu rechtfertigen. Die Tatsache, dass zahlreiche Autoren dies auch tun spricht dafür, dass eine Mehrheit der Autoren diese Ansicht teilt (108,109).

Es besteht größtenteils Konsens darüber, welche Veränderungen am Meniskus als pathologisch zu betrachten sind. Ob diese Veränderungen aber primär degenerative oder traumatische Ursachen haben ist weiterhin strittig. Der Beginn degenerativer Veränderungen scheint Ursachen in einer Veränderung der Biochemie zu haben (119), wobei aber noch kontrovers diskutiert wird, ob diese veränderte Biochemie Ursache endogener Defekte oder exogener Verletzungen ist (103,120). Die viel zitierte mukoide Matrixdegeneration ist im Frühstadium der Degeneration besonders stark ausgeprägt und kann im Verlauf durch Verlust von Proteoglykanen zu einem vollständigen Matrixverlust führen, was sich in einem sehr blassen Färbeverhalten widerspiegelt (7). In der frühen Phase sind die mukoide Matrixdegeneration und die Zellaktivität noch stark ausgeprägt, weil eine hohe Reparationsaktivität vorliegt (103). Diese lässt mit zunehmender Degeneration nach, was auf den Verlust von Meniskuszellen im Stadium der starken Degeneration zurückzuführen ist (103,121). Dieser Verlust lässt sich darauf zurückführen, dass es am Anfang, vor allem nach traumatischen Ereignissen, zu einer Veränderung der biochemischen Zusammensetzung der Synovia kommt. In Synoviaprobe aus verletzten Meniskusgeweben konnte eine signifikant erhöhte Aktivität an pro-inflammatorischen Mediatoren nachgewiesen werden. Diese schädigen die Extrazelluläre Matrix und können zu einer dauerhaften Degeneration mit den oben beschriebenen Veränderungen einhergehen, die dann zu einer Osteoarthrose führen können (122).

Von mehreren Autoren wird die Oberflächenbeschaffenheit als wichtiges Kriterium für die Einschätzung des Meniskuszustands herangezogen. Dabei wird bewertet, ob die Oberfläche gleichmäßig und intakt ist oder, ob diese pathologische Veränderungen zeigt. Die Veränderungen, die als pathologisch eingestuft werden, sind Fibrillationen und Risse, wobei einige Autoren auch besonders die Länge der Risse bewerten (10,88,102). Zusätzlich wird bei einigen noch auf das Vorhandensein von Zellen geschaut, so dass beispielsweise bei einer glatten, kontinuierlichen und mit einzelnen länglichen Zellen versehenen Oberfläche, von einem geringen Meniskusschaden ausgegangen werden kann (7,88). Rein altersbedingte Veränderungen in diesem Bereich zeigen sich in Form von aufgerauten Arealen mit kleinen Rissen und einer Veränderung der Zellzahl. Pauli beschreibt als Hauptveränderung im altersveränderten Meniskusgewebe die verstärkte Anfärbbarkeit der avaskulären Zone in der Safranin-O-Färbung, bei gleichzeitiger Reduktion der Zelldichte. Dies geht zusätzlich mit einer verminderten Kollagenmaskierung einher, so dass dieses auch im Lichtmikroskop erkennbar ist. Als letzten Parameter der altersbedingten Veränderung beschreibt Pauli Zellaggregate, die sich aber von den typischen Zellclustern bei Osteoarthrose unterscheiden (88). Im Fall der Osteoarthrose zeigen die Zellen Vergrößerungen (7,123,124). Zusätzlich kommt es im degenerierten Meniskus zu Kalziumablagerungen, was auch auf die veränderte Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix zurückgeführt wird (88,125). Ein weiteres, häufig genanntes Merkmal im traumatisch geschädigten Meniskus, ist die Bildung sog. Regenerationsknoten, auch Zellcluster genannt (126). Trotzdem werden die Veränderungen in den verschiedenen Scores unterschiedlich gewichtet bzw. unterschiedliche Kriterien herangezogen. Bei allen Autoren werden Veränderungen der Zellmorphologie und -anzahl berücksichtigt und die Stärke der mukoiden Matrixdegeneration mit einbezogen. Dies erscheint sinnvoll, da die Aktivität und Funktion für die Anwendung des Tissue Engineerings eine wichtige Rolle spielen. Einige der Tissue Engineering-Ansätze versuchen, die im Meniskusgewebe vorhandenen Zellen zum Einwandern in das Transplantat anzuregen, so dass bei der Beantwortung der Frage nach Erfolgsaussichten eines solchen Verfahrens der Zustand der Zellen von entscheidender Bedeutung ist (52,67).

Auch bei den verwendeten Färbemethoden unterscheiden sich die Scoringssysteme: So bewertet Krenn die Veränderungen in der HE- und Alcianblaufärbung, Roth die

Alcianblaufärbung und bei Mankin und Pauli wird die Intensität der Safranin-O-Färbung in die Bewertung mit einbezogen. Allerdings unterscheidet sich die Aussagekraft der verschiedenen Färbemethoden: Die HE-Färbung ist eine Standardfärbung, die routinemäßig durchgeführt wird. Die Bewertung von HE-gefärbten Präparaten ist eine Standardaufgabe in der Pathologie, so dass man beobachterunabhängig von einer hohen Expertise in der Bewertung dieser Präparate ausgehen kann. In der HE-Färbung kann man in Knorpelpräparaten Zellen, Zellkerne und Extrazelluläre Matrix unterscheiden. Das ermöglicht zwar eine gute Differenzierung zwischen den einzelnen Knorpelbestandteilen, erlaubt aber nur ungenaue Aussagen bezüglich des Zustands der Extrazellulären Matrix. Nähere Gründe für die Verwendung der HE-Färbung in seinem Degenerationsscore nennt Krenn nicht. Die Alcianblaufärbung macht den Nachweis saurer Mukopolysaccharide (auch als Glykosaminoglykane bezeichnet) möglich, die die größte Proteingruppe innerhalb der Extrazellulären Matrix von Menisken darstellen (15). Daher ist ihre quantitative Bestimmung ein wichtiger Parameter für die Beurteilung des Zustands von Meniskusgewebe, denn die Extrazelluläre Matrix hat sich bei verschiedenen Versuchen zum Tissue Engineering als ein sehr wichtiger Bestandteil des Meniskusgewebes herauskristallisiert (68,70,71,72). Mankin und Pauli verwenden beide die Beurteilung der Safranin-O-Färbung. Diese Färbemethode ermöglicht die Sichtbarmachung von Proteoglykanen und Kollagenen. Bei Proteoglykanen handelt es sich um Proteine mit kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen (127). Diese speichern Wasser, was wichtig für die stoßdämpfende Wirkung des Meniskus ist (21,22). Die Betrachtung der Kollagene scheint als Parameter für den Zustand von Meniskusgewebe zusätzlich sinnvoll, da ihr Sichtbarwerden im Lichtmikroskop als ein Zeichen der altersbedingten Degeneration betrachtet werden kann (45). Daher kommt beiden Färbemethoden, sowohl der Alcianblau- als auch der Safranin-O-Färbung offensichtlich eine wichtige Rolle in der histopathologischen Beurteilung von Meniskusgewebe zu. Weiterhin ist die Bewertung des Zustands des Meniskus anhand der ermittelten Kriterien sehr unterschiedlich:

Krenn beschränkt sich auf die Zusammenfassung als „Low-grade-Degeneration“ und „High-grade-Degeneration“. Er hat überprüft, ob die ermittelten Degenerationsgrade den tatsächlichen Matrixschaden erfassen, in dem er immunhistochemisch den NITEGE-Gehalt der mikroskopischen Bewertung gegenübergestellt hat (103). Allerdings lag die Sensitivität bei nur 52%. Krenn führt dies darauf zurück, dass bei

starker Degeneration keine Reparatur mehr erfolgt und dementsprechend auch kein NITEGE, als Folge des Untergangs von Meniskuszellen, mehr gebildet wird. Dies entspricht auch einer Beschreibung des Funktionsverlustes von hyalinem Knorpel nach Aigner (103,121). Roth beschränkt sich sogar auf die Einteilung in „nicht degeneriert“ und „degeneriert“. Ob nun Patienten mit der Diagnose „degeneriert“ oder „Low-grade-Degeneration“ einer Behandlung bedürfen, sich beispielsweise für eine Behandlung mit einem Tissue Engineering-Transplantat anbieten würden, oder welche andere Konsequenz aus der Diagnose zu folgen hat, wird bei beiden nicht näher beschrieben. Zusätzlich hat Roth bei seinen Präparaten auch die immunhistochemischen Markierungen von *Roof plate-specific spondin 2* (RSPO2) und *Secreted frizzled-related protein 2* (SFRP2) ausgewertet. Er konnte nachweisen, dass die Expression von SFRP2 die an RSPO2 überwog. Welche Rolle genau die beiden Proteine bei der Meniskusdegeneration oder bei der Arthroseentstehung im Kniegelenk spielen bleibt bei ihm offen (7). Pauli entwickelte seinen Score, um möglichst genaue, für den speziellen Meniskusknorpel zutreffende Parameter zu finden. Diese sollten es ermöglichen, altersbedingte und degenerative Veränderungen besser zu unterscheiden, eine nach den verschiedenen Zonen genaue Beschreibung mikroskopischer Veränderungen zu geben und Zusammenhänge zwischen altersbedingten Vorschäden im Hinblick auf die Entwicklung einer Osteoarthrose aufzuzeigen (88).

Obwohl mittlerweile zahlreiche histopathologische Merkmale degenerativer und traumatischer Veränderungen bekannt sind und es, wie beschrieben, verschiedene Scores zur Einteilung dieser gibt, finden diese Scores derzeit praktisch keine Anwendung im klinischen Alltag. Autoren wie beispielsweise Pauli (88) oder Roth (7) machen in ihren Studien Vorschläge, welche Veränderungen im Rahmen der Meniskuspathologien auf welchen Schweregrad einer Degeneration hinweisen, machen aber keine Vorschläge, wie Anwendung oder ein Nutzen ihrer Erkenntnisse aussehen könnte. Dabei zeigt besonders Pauli wie groß die Übereinstimmung bei seinem Score in der Bewertung durch verschiedene Untersucher ist (88). Gerade dieser Aspekt würde für den Anspruch einer klinischen Anwendung sprechen.

Eine Kritik an der Arbeit könnte sein, dass die Scores an keiner Kontrollgruppe angewendet wurden. Die Anwendung der Scores erfolgte ausschließlich an Präparaten, die von Patienten stammten, bei denen eine operative Behandlung in

Form einer Meniskus(teil-)resektion erfolgt war. Ein Hauptproblem ergibt sich daraus, dass es keine einheitliche Definition darüber gibt, was ein „normaler“, im Sinne eines „gesunden“, Meniskusknorpels ist. Im höheren Lebensalter zeigen sich Veränderungen im Knorpel, wobei Uneinigkeit darüber herrscht, welche Prozesse rein altersbedingt und welche eine Folge traumatischer Ereignisse sind. Ob und wie sich beispielsweise die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix während des Alterungsprozesses verändert ist nicht genau bekannt (7). Im Jahr 2009 fand die Arbeitsgruppe um Englund et.al. in einer MRT-Studie heraus, dass Patienten bereits ab dem mittleren Alter asymptomatische Meniskusrisse zeigten ohne zu benennen, ob diese nun im Rahmen eines degenerativen Geschehens oder als Folgeerscheinung einer traumatischen Degeneration aufgetreten waren (128). Eine mögliche Frage wäre, ob man traumatische Degeneration überhaupt verhindern kann. Man könnte eine Vergleichsstudie durchführen, in der die Menisken von durchschnittlich aktiven Patienten mit denen von bewegungseingeschränkten Patienten (z.B. durch langjährige Paresen in der unteren Extremität) angeschaut werden. Natürlich werden durch bestimmte Belastungen wie rezidivierende Rotationsbewegungen in Kombination mit Flexionsbewegungen Verletzungen des Meniskus häufiger bedingt. Diese entstehen häufig bei Ballkontaktsportarten, die meistens von Menschen im jüngeren Alter ausgeübt werden (38). Das zeigt, dass Veränderungen und Schäden auch schon bei jüngeren Patienten auftreten. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass eine Kombination aus Patientenalter und Beanspruchung der Menisken eine sinnvolle Kategorie bei der Einteilung bzw. als Parameter eines Scores darstellen könnten.

Ein weiterer Punkt ist, dass der Meniskus ein biphasisches Gewebe darstellt. Während der Kern einem hyalinen Knorpel gleicht, stellt Faserknorpel die peripheren Anteile dar (9). Der optimale Score muss diesen Aspekt berücksichtigen, da hyaliner Knorpel und Faserknorpel eine unterschiedliche Struktur und Biochemie aufweisen. Der Faserknorpel besteht zu 2/3 aus Wasser und 1/3 organischen Anteilen. Im Bereich der organischen Anteile entfallen 75% auf Kollagen. Im meniskalen Faserknorpel ist das Hauptkollagen Kollagen vom Typ I. Die vorhandenen Zellen liegen überwiegend vereinzelt vor und in den unterschiedlichen Zonen unterscheiden sie sich in der Morphologie. Im hyalinen Knorpel dominiert Kollagen Typ II. Die Zellen lagern sich in Gruppen zu sogenannten Territorien zusammen. Darüber hinaus hängt der Erfolg eines Tissue Engineering-Transplantats entscheidend davon ab, in welche Umgebung

es implantiert wird. Das hängt mit dem Umstand zusammen, dass sich der Meniskus in drei Zonen einteilen lässt. Er besteht aus einer sogenannten inneren/weißen, einer mittleren/rot-weißen und einer äußeren/roten Zone (8). In diesen drei Zonen unterscheidet sich die Aktivität der einzelnen Komponenten bestehend aus Extrazellulärer Matrix und Zellen. Die äußere/rote Zone wird noch direkt durch die knienahen Arterien aus der A. poplitea versorgt, während die anderen beiden Zonen lediglich durch Umspülung der synovialen Flüssigkeit mit Nährstoffen versorgt werden (5,129). Umgekehrt müsste in der Entwicklung der Tissue Engineering-Transplantate berücksichtigt werden, dass die Anforderungen an unterschiedliche Einsatzstellen angepasst sein müssen. Das könnte heißen, dass es verschiedene Typen Transplantat für die Einsätze in den unterschiedlichen Zonen des Meniskus gibt.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob sich die Scores für eine Prognose über die Erfolgsaussichten einer TE-Behandlung eignen. Langfristig sollte das Ziel darin liegen, von der Histologie auf die Arthroskopie schließen zu können. Dazu werden künftig noch weitere Untersuchungen in größerem Umfang notwendig sein. Dies ist vor dem Hintergrund zu sehen, dass besonders im Rahmen von Teilresektionen stehengebliebene Gewebereste eine histologisch-klinische Korrelation herbeiführen könnten. Wenn es klare Kriterien gibt, die eine realistische Prognose für die Erfolgsaussichten eines TE-Transplantats ermöglichen wäre im Rahmen einer Arthroskopie eine intraoperative Entscheidung für oder gegen ein TE-Transplantat möglich. Aktuell liegt die Versagerrate nach einem TE-Transplantat bei 24% (137). Verzichtet man aber auf ein TE-Transplantat besteht ein hohes Risiko, dass der Patient an den negativen Auswirkungen seiner Meniskusresektion leiden wird. Diese sind vor allem die vorzeitige Osteoarthritis (83,84). Aktuell liegt die große Schwierigkeit in der Entwicklung verbindlicher Kriterien darin, dass die Beurteilung der Veränderungen im Meniskus offen ist. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wider. Für den Operateur, der im klinischen Alltag damit konfrontiert ist, stellt sich die berechtigte Frage, ob bis zur Entwicklung einer einheitlichen Bewertung der Histopathologie ein zweizeitiges Vorgehen angestrebt werden soll. Das würde bedeuten, dass dem Patienten der degenerierte Meniskus entfernt wird, dieses entnommene Stück vom Pathologen histopathologisch begutachtet wird und danach eine Entscheidung getroffen wird, ob die weitere Behandlung beispielsweise mit einem Tissue Engineering-Verfahren erfolgen soll.

Dann müsste sich der Patient jedoch einer zweiten Operation unterziehen, was insofern ungünstig wäre, als dass der Patient sich ein zweites Mal den Risiken einer Operation unterziehen müsste. Diese Risiken sind Infektionen, Blutungen oder auch die Folgen, die eine Anästhesie mit sich bringen kann. Demgegenüber steht das bereits genannte hohe Risiko einer vorzeitigen Osteoarthrose, so dass das zweizeitige Vorgehen bis zum Vorliegen einer einheitlichen Bewertung vertretbar erscheint.

Eine weitere Richtung, in die die Forschung gehen sollte, ist die, in welche Englund et al. mit ihrer MRT-Studie bereits gegangen sind (70). Anhand von bildgebender Diagnostik sollte eine Einteilung nach Schweregrad der Schädigung erfolgen können, aufgrund derer eine möglichst valide Entscheidung über den weiteren Behandlungsverlauf getroffen werden kann. Dafür könnte man die Bildgebung vor einer Meniskusresektion mit dem histopathologischen Befund vergleichen und im Follow-up den Erfolg der gewählten Behandlung beobachten. Dazu sind prospektive Langzeitstudien notwendig, die viele Ressourcen kosten werden. Andererseits sollte man sich vergegenwärtigen, welche Kosten durch die Folgeerkrankungen nach Meniskus(-teil) resektionen entstehen, wenn die Patienten nach wenigen Jahren eine schmerzhaft Osteoarthrose entwickeln. Besonders mit Blick auf die fallzahlenmäßig nicht zu unterschätzende Gruppe von jüngeren Patienten, die infolge von Sportverletzungen von Meniskusschäden betroffen sind und für die eine langfristige Behandlung gefunden werden sollte, die mehrere schmerzfreie Jahrzehnte ermöglicht.

Die Forschung zu der Frage, ob die Transplantate die Funktion möglichst gut ersetzen oder resorbiert und so irgendwann Teil der physiologischen Meniskusumgebung (Matrix) werden sollen ist noch offen. Daher ist das Anforderungsprofil an die Eigenschaften eines geeigneten Materials für das Tissue Engineering beim Meniskus sehr hoch: Für einige der Autoren ist eine hohe Biokompatibilität, eine anatomische Form, eine offenporöse Struktur, eine initial vorhandene mechanische Stabilität für das Transplantat und eine Permeabilität für Makromoleküle eine wichtige Voraussetzung (71). Ebenso wird die Fähigkeit zur Zelladhäsion genannt, um mit der Umgebung verschmelzen zu können (72). Achatz hat ein Scoringsystem entwickelt, das die Testeigenschaften überprüfen soll. Durch dieses System soll es möglich werden vielversprechende Scaffolds durch in vitro Tests auszuwählen. Dies soll auch dazu führen, dass die Anzahl der Tierversuche reduziert werden könnte, was neben ethischen Aspekten auch eine Schonung von Ressourcen ermöglichen könnte (42).

Achatz hat einen Score angewandt, der in Tierversuchen den Erfolg der Reparaturergebnisse im Defektmodell des Meniskus bestimmt (125). Das Scoringsystem ist bisher ausschließlich für die Analyse des Heilungserfolgs nach Verwendung verschiedener Scaffolds angewendet worden, so dass er in dieser Arbeit nicht als Vergleichsscore angewendet wurde. Achatz schlägt vor, den eigenen Score, der die biomechanischen Eigenschaften unberücksichtigt lässt, mit dem von Maher et al. zu kombinieren, um eine umfassende präklinische Testplattform zu erhalten (130,131). Es gibt bereits Transplantate auf dem Markt. Eines davon, das bisher gute Ergebnisse erzielt hat, ist beispielsweise das Nusurface® Meniscus Implant aus Polycarbonat-Polyurethan (79). Dieses wird bei vollständiger Meniskektomie eingesetzt und konnte meniskusähnliche Eigenschaften zeigen (42,79). Weitere bereits etablierte Transplantate sind Actifit® (Polyurethane) und CMI® (College Meniscus Implantat). Actifit® zeigt eine gute Biokompatibilität und bei Achatz wurden durchweg positive Eigenschaften nachgewiesen, was die Kollagen- und Proteoglykanbildung betrifft und ebenso auch die Bildung der Extrazellulären Matrix (42,132). Das CMI® ist von den bereits klinisch angewendeten Materialien das, welches am längsten im Einsatz ist. Es zeigte in verschiedenen Studien radiologisch gute Ergebnisse, ebenso konnte eine verminderte Rate von Osteoarthrose und ein gutes Einwachsen des implantierten Gewebes nachgewiesen werden (42,133,134,135). Diese Studien wurden mehrfach kritisiert, weil sie zu einem großen Teil von den Erfindern des Implantats durchgeführt wurden und sich nach mehreren Jahren eine Implantatschrumpfung zeigte (78,133,136).

Die Erweiterung dieser Testplattform um eine genaue Langzeitbeobachtung der Patienten, bei denen eine Anwendung der getesteten Scaffolds erfolgt ist, könnte einen Anfang in ein umfassendes Behandlungsvorgehen darstellen, das eine patientenorientierte und gleichzeitig ökonomisch sinnvolle Behandlung ermöglicht. Man wird nicht umhinkommen, einen Abgleich von vorangehender Bildgebung und dem Outcome nach einer erfolgten Behandlung zu machen. Die diagnostische Brücke zwischen Bildgebung und Behandlungsplan stellt die histopathologische Begutachtung dar. Durch sie können die Merkmale, z.B. in Form von Scoringsystemen, die in der Bildgebung zu sehen sind, objektiviert und genau zugeordnet werden. Auf dieser Grundlage könnte die Versorgung von Patienten mit Meniskusrissen und -beschwerden zukünftig deutlich verbessert werden.

5 Zusammenfassung

Nach wie vor führen Meniskusverletzungen häufig zu Operationen, bei denen Teile oder der gesamte Meniskus entfernt werden. Dies führt durch den Verlust von funktionalem Gewebe in vielen Fällen zu einer vorzeitigen Osteoarthrose. Daher sollen Tissue Engineering-Strategien eine Verbesserung in der Langzeitprognose nach Meniskusschäden erreichen. Vor dem Hintergrund von Transplantatversagern soll untersucht werden, ob die Beurteilung des resezierten Meniskusgewebes als eine Beschreibung des Transplantatbettes Aussagen über die Performance eines Transplantates erlaubt.

In dieser Arbeit wurden 68 Präparate nach verschiedenen Scores klassifiziert. Die Scores nach Pauli, Roth und Krenn wurden speziell für den Meniskusknorpel entwickelt, der Score nach Mankin wurde an Femurköpfen entwickelt, wird aber auch für die Schweregradbestimmung an Knorpel verwendet. Ziel war die Überprüfung, ob diese Scores an den gleichen Präparaten auch zu übereinstimmenden Schweregradeinteilungen kommen. Ein Vergleich der verwendeten Parameter sollte Rückschlüsse auf geeignete Kriterien für die Erfolgsaussichten eines Tissue-Engineering-Transplantats ermöglichen.

Die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die Scores mehrheitlich nicht zu übereinstimmenden Schweregradeinteilungen kommen. Bei den Scores nach Mankin und Pauli, die mehr als zwei Schweregrade unterscheiden, sind die Abweichungen erheblich: So lag im direkten Vergleich der beiden nur in 28% der Fälle eine übereinstimmende Schweregradeinteilung vor. Bei den Scores, die ausschließlich die Kategorien „gering geschädigt“ und „schwer geschädigt“ unterscheiden lag die Zahl der übereinstimmenden Schweregradeinteilungen bei 60%.

Ein Grund für die große Diskrepanz der Ergebnisse könnte die Schwierigkeit sein festzulegen, was genau als pathologisch veränderter und was als unauffälliger Meniskus zu bewerten ist, weil der Meniskus sich beginnend ab der Geburt in einem steten Wandel befindet. Obwohl es einige übereinstimmende Parameter gibt, welche Veränderungen am Meniskus als pathologisch zu bewerten sind, ist die Gewichtung der einzelnen Parameter durchaus unterschiedlich in den getesteten Scores. Auch macht keiner der Autoren einen Vorschlag, welche Behandlung oder sonstige

Konsequenz aufgrund des erfolgten Scorings erfolgen sollte oder könnte. Dabei könnten sie in Verbindung mit bildgebenden Verfahren eine gute Grundlage bieten, um eine Prognose über die Erfolgsaussichten eines Tissue Engineering-Transplantats zu machen. Daher ist eine weitere Erforschung der Grundlagen für die Weiterentwicklung des Tissue Engineering notwendig und wünschenswert.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Frontaler Sägeschnitt durch das Femorotibialgelenk, rechtes Knie von vorne.	7
Abbildung 2: Tibiaplateau mit aufliegenden Menisken sowie Anheftungsstellen von Menisken und Kreuzbändern.....	8
Abbildung 3: Meniskusquerschnitt	10
Abbildung 4: Histopathologische Kriterien für Degenerationsbewertungen nach Krenn et. al (2010).	21
Abbildung 5: Geringe bis mäßige mukoide Matrixdegeneration – Übersicht	44
Abbildung 6: Geringe bis mäßige mukoide Matrixdegeneration	44
Abbildung 7: Beispiel für Fibrillationen.....	45
Abbildung 8: Chondrozytenproliferationsnester	46
Abbildung 9: Chondrozytenproliferationsnester in schwach gefärbtem Präparat.....	47
Abbildung 10: Score nach Mankin im histologischen Bild.....	47
Abbildung 11: Score nach Pauli im histologischen Bild.....	47
Abbildung 12: Score nach Roth im histologischen Bild.....	48
Abbildung 13: Score nach Krenn im histologischen Bild.....	48
Abbildung 14: Balkendiagramm Übereinstimmungen im Scorevergleich.....	49
Abbildung 15: Balkendiagramm Vergleich Mankin und Pauli	51
Abbildung 16: Balkendiagramm Vergleich Mankin und Roth	52
Abbildung 17: Balkendiagramm Vergleich Mankin und Krenn	53
Abbildung 18: Balkendiagramm Vergleich Roth und Krenn.....	54

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	25
Tabelle 2: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	28
Tabelle 4: Rezepte und Lösungen.....	31
Tabelle 5: Ablauf der Gewebeentwässerung im Vakuum; Gerät: Shandon Pathcentre	34
Tabelle 6: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	36
Tabelle 7: Durchführung der Alcianblau-Kernechtrot-Färbung	38
Tabelle 8: Durchführung der Safranin O-Fastgreen-Färbung	39

7 Literaturverzeichnis

1. Schneider S, Schmitt G, Mau H. Prävalenz und Korrelate der Osteoarthrose in der BRD. *Der Orthopäde*. 2005;34:782–790.
2. Statistisches Bundesamt: Gesundheitsbericht für Deutschland: Gesundheitsberichtserstattung des Bundes. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. 1998.
3. Di Matteo B, Moran CJ, Tarabella V, et al. A history of meniscal surgery: from ancient times to the twenty-first century. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016;24:1510–1518.
4. Doral M., Bilge O., Huri G. Turhan E. et al. Modern treatment of meniscal tears, *Efort Open Rev*. 2018;3(5): 260–280.
5. Kapandji A. Funktionelle Anatomie der Gelenke. Schematisierte und kommentierte Zeichnungen zur menschlichen Biomechanik. Stuttgart: Thieme Verlag; 2009.
6. Bommas-Ebert, Teubner. Kurzlehrbuch Anatomie. Stuttgart: Thieme Verlag; 2006.
7. Roth M. Histologische Klassifikation für degenerativ geschädigte Menisken – die Wnt-Signalwegsmolekulen RSPO2 und SFRP 2 in humanem Meniskusgewebe. Medizinische Dissertation. Göttingen; 2013.
8. Petersen W, Tillmann B. Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand*. 1995;66:308–312.
9. Mohr W. Gelenkpathologie: Historische Grundlagen, Ursachen und Entwicklungen von Gelenkleiden und ihre Pathomorphologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2000.
10. Cooper DE, Arnoczky SP, O'Brien, Warren RF. Anatomy, histology, and vascularity of the glenoid labrum. *J Bone Joint Surg [Am]*. 1992;74:46–52.
11. Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*. 1992;10:90–95.
12. Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis*. 1984;43:635–640.
13. Proctor CS, Schmidt MB, Whipple RR, Kelly MA, Mow VC. Material properties of the normal medial bovine meniscus, *J Orthop Res*. 1989;7:771–782.

14. Eyre DR, and Wu JJ. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett.* 1983;158:265.
15. McDevitt CA, and Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin. Orthop.* 1990;252:8–18.
16. Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect. Tissue Res.* 1987;16:343.
17. Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn.* 1993;43:283–93.
18. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials.* 2011;32:7411-7431.
19. McNicol D., Roughley PJ. Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *The Biochemical Journal.* 1980;185-3:705–713.
20. Moran CJ, Busilacchi A, et al. Biological augmentation and tissue engineering approaches in meniscus surgery. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association.* 2015;31-5:944–955.
21. Adams ME, Muir H. The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem J.* 1981;197:385–9.
22. Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, et al. Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:208–18.
23. McCormick F, Harris JD, Abrams GD, Hussey KE, Wilson H, Frank R, et al. Survival and reoperation rates after meniscal allograft transplantation: analysis of failures for 172 consecutive transplants at a minimum 2-year follow-up. *The American Journal of Sports Medicine.* 2014;42-4:892–897.
24. Melrose J, Smith S, Cake M, Read R, Whitelock J. Comparative spatial and temporal localization of perlecan, aggrecan and type I, II and IV collagen in the ovine meniscus: an ageing study. *Histochem Cell Biol.* 2005;124:225–35.
25. Hellio Le Graverand MP, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hart D, Natsume T, et al. The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat.* 2001;198:525–35.
26. Van der Bracht RV, Verbruggen H, Elewaut G, Verdonk D, Ashammakhi P, Reis N. Cell-based meniscus tissue engineering. *Topics in Tissue Engineering.* 2007.
27. Baek J, Chen X, et al. Meniscus tissue engineering using a novel combination of electrospun scaffolds and human meniscus cells embedded within an

- extracellular matrix hydrogel. In: *Journal of Ortho-paedic Research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2015;33-4:572–583.
28. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003; 423:448–452.
 29. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 1991;64(2):231.
 30. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Signaling pathways dependent on regulated proteolysis of latent gene regulatory proteins. *Molecular biology of the cell*, Fifth Edition, hrsg. v. Garland Science, New York. 2008;946–954.
 31. Lietman C, Wu B, Lechner S, Shinar A, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling ameliorates osteoarthritis in a murine model of experimental osteoarthritis. *JCI Insight*. 2018;8(3).
 32. Kurimoto S, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling cascade after traumatic nerve injury. *Neuroscience*. 2015;294:101–108.
 33. Xiao L, et al. Sustained activation of Wnt/ β -catenin signaling drives AKI to CKD progression. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(6):1727–1740.
 34. Fernández-Martos CM, González-Fernández C, González P, Maqueda A, Arenas E, Rodríguez FJ. Differential expression of Wnts after spinal cord contusion injury in adult rats. *PLoS One*. 2011;6(11).
 35. Hegedus EJ, Cook C, Hasselblad V, et al. Physical examination test for assessing a torn meniscus in the knee: a systematic review with meta-analysis. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2007;37:541–549.
 36. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192–1205.
 37. Reinbach, W. Die kollagenen Fibrillen in den Kniegelenkmeniscen; die Ursachen ihrer Entstehung und Anordnung; In: *Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie*. 1954;46(5):485–498.
 38. Grifka J, Kuster M. *Orthopädie und Unfallchirurgie: Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung*. SpringerLink : Bücher. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
 39. Weigel B, Nerlich ML. *Praxisbuch Unfallchirurgie*. Springer: Bücher. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.

40. Meachim, G. The state of knee meniscal fibrocartilage in Liverpool necropsies. *The Journal of Pathology*. 1976;119(3):167–173.
41. Slany, A. Autoptische Reihenuntersuchungen an Kniegelenken mit besonderer Berücksichtigung der Meniscuspathologie. *Arch Ortho Unfall-Chir*. 1941;41:256–286.
42. Achatz F, Kujat R, Pfeifer C, Koch M, et al. In vitro testing of scaffolds for mesenchymal stem cell-based meniscus tissue engineering-introducing a new biocompatibility scoring system. *Materials*. 2016;9(4):276.
43. Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S, Gros D, Korver W, Yonkovich S, Tomasevic N. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell*. 2008;19:2588–2596.
44. Ferrer-Roca O, Vilalta C. Lesions of the meniscus. Part I: Macroscopic and histologic findings. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;146:289–300.
45. Hannink G, van Tienen T, 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(3):441–451.
46. Boesmueller S, Aldrian S, Schurz M, Heinz T. Refixation after lateral meniscus tear followed by complete luxation in an 11-year-old. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, official journal of the ESSKA*. 2012;(20):304–307.
47. Fink C. Meniskusrefixation – Anatomische und biologische Grundlagen. *Arthroskopie*. 2001;14:248–53.
48. Agneskirchner JD, Loebenhoffer P. Arthroskopische Meniskus Chirurgie. *Der Unfallchirurg*. 2004;107:783–794.
49. Maak T, Fabricant P, Wickiewicz T. Indications for meniscus repair. *Clinics in Sports Medicine*. 2012;31(1):1–14.
50. Brochhausen C, Kirkpatrick C. An evolutionary view on guided tissue engineering—from the replacement to the regeneration of damaged tissue. *Journal Tissue Science Engineering*. 2012;33.
51. Williams D. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009;30:5897–5909.
52. Pereira H, Frias A, Oliveira J, Espregueira-Mendes J, Reis R. Tissue engineering and regenerative medicine strategies in meniscus lesions. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy. (1)Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2011;2712:1706–1719.

53. Lindl T, Gstraunthaler G. Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akad. Verlag; 2008.
54. Heo J, Koh R, Shim W, KimH, YH, Hwang N. Riboflavin-induced photocrosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug delivery and translational research*. 2016;6-2:148–158.
55. La Puente P, Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Experimental cell research*. 2014;322(1):1–11.
56. Alekseeva T, Unger R, Brochhausen C, Brown R, Kirkpatrick. Engineering a microvascular capillary bed in a tissue-like collagen construct. *Tissue Engineering*. 2014; 20(A):2656–2665.
57. Grillo HC, Gross J. Thermal reconstitution of collagen from solution and the response to its heterologous implantation. *The Journal of Surgical Research*. 1962;2:69–82.
58. Mueller S, Shortkroff S, Schneider T, Breinan H, Yannas I, Spector M. Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro. *Biomaterials*. 1999;20(8):701–709.
59. Gruber HE, Mauerhan D, Chow Y, Ingram JA, Norton HJ, Hanley EN, et al. Three-dimensional culture of human meniscal cells: extracellular matrix and proteoglycan production. *BMC Biotechnol*. 2008;8:54.
60. Pittenger MF. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–47.
61. 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.
62. Ionescu L, Mauck R. Porosity an Cell Preseeding Influence Electrospun Scaffold Maturation and Meniscus Integratoin *In Vitro*. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(3-4): 538–547.
63. Petersen W, Imhoff A.B. Meniskus Tissue Engineering. *Arthroskopie* 2011;24:57–61.
64. Stabile KJ, Odom D, Smith TL. An acellular, allograft-derived meniscus scaffold in an ovine model. *Arthroscopy*. 2010;26:936–948.
65. Maier D, Braeun K, Steinhauser E. In vitro analysis of an allogenic scaffold for tissue-engineered meniscus replacement. *J Orthop Res*. 2007;25:1598–1608.

66. Stapleton TW, Ingram J, Fisher J. Investigation of the regenerative capacity of an acellular porcine medial meniscus for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A*. 2010 [Epub ahead of print].
67. Nerurkar NL, Han W, Mauck RL, Elliott DM. Homologous structure and function relationships between native fibrocartilage and tissue engineered from MSC-seeded nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2010;32:461.
68. Zellner J, Mueller M, Berner A. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94:1150–1161.
69. Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery WH, Baker CL, Beck C, Hormel S, et al. Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90:1413.
70. Antunes C, Tsaryk R, Brochhausen C, et al. Poly(γ -glutamic acid) as an exogenous promoter of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem/stromal cells. *Tissue Engineering*. 2015;21(A):1869–1885.
71. Miyazaki T, Kuramoto A, Hirakawa A, Shirosaki Y, Ohtsuki C. Biomineralization on chemically synthesized collagen containing immobilized poly- γ -glutamic acid. *Dental Materials Journal*. 2013;32(4):544–549.
72. Kuo Y, Chung C. TATVHL peptide-grafted alginate/poly (γ -glutamic acid) scaffolds with inverted colloidal crystal topology for neuronal differentiation of iPS cells. *Biomaterials*. 2012;3 (35):8955–8966.
73. Patentschrift Prescott AG. Methods for treating joint pain using poly- γ -glutamic acid. Veröffentlichungsnr: US 2006/0234192 A1.
74. Hasan J, Fisher J, Ingham E. Current strategies in meniscal regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater*. 2013.
75. Buma P, van Tienen T, Veth R. The collagen meniscus implant. *Expert Rev Med Devices*. 2007;4:507–16.
76. 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.
77. Papalia R, Francesch, F, Diaz B, D'Adamio S, Maffulli N, Denaro V. Scaffolds for partial meniscal replacement: an updated systematic review. *British Medical Bulletin*. 2013;107:19–40.
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 et al. Viscoelastic properties of a synthetic meniscus implant, *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;29:42–55.
80. Vrancken A, Hannink G, Madej W, van Tienen T. In Vivo Performance of a Novel, Anatomically Shaped, Total Meniscal Prosthesis Made of Polycarbonate Urethane. *Am J. Sports Med.* 2017;45(12):2824–2834.
81. Kobayashi M, Chang YS, Oka M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials.* 2005; 26:3243–3248.
82. Sweigart MA, Athanasiou KA. Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng.* 2001; 7:111–129.
83. Conrades V. Matrixproteine im tissue engineerten Meniskus, Dissertationsschrift, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar; 2006.
84. Barber FA. Editorial Commentary: Polyurethane Meniscal Scaffold: A Perfect Fit or Flop? *Arthroscopy.* 2018;34(5):1628–1630.
85. Sun J, Vijayavenkataraman S, Liu H. An Overview of Scaffold Design and Fabrication Technology for Engineered Knee Meniscus. *Materials (Basel).* 2017;10(1).
86. Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness IG, Hart DA. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: part I: cellular and matrix alterations. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:56e64.
87. Gigante A, Specchia N, Greco F. Age-related distribution of elastic fibers in the rabbit knee. *Clin Orthop Relat Res* 199433e42.
88. Pauli C. et.al. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(9):1132–41.
89. Copenhaver W, Kelley D, Wood R. *Bailey's Textbook of Histology.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1978.
90. 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):1071e82.
100. Verdonk PC, Forsyth RG, Wang J, Almqvist KF, Verdonk R, Veys EM, et al. Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:548e60.
101. Krenn V, Knöss P, et al. Meniskusdegenerationsscore und NITEGE-Expression. Immunhistochemischer NITEGE-Nachweis in der schwergradigen Meniskusdegeneration. *Der Orthopäde.* 2010;39(5):475–485.

102. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *The Journal of bone and joint surgery. American Volume*. 1971;53(3):523–537.
103. Krenn V, Kurz B, et al. Histopathologischer Degenerations-Score des Faserknorpels. Low-grade- und High-grade-Meniskusdegeneration. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2010;69(7):644–652.
104. Sandy JD, Plaas AH, Koob TJ. Pathways of aggrecan processing in joint tissues. Implications for disease mechanism and monitoring. *Acta Orthop*. 1995;266:26–32.
105. Hoberg M, Uzunmehmetoglu G, et. al. Characterisation of human meniscus cells. *Orthop Ihre Grenzgeb*. 2006;144(2):172–178.
106. Lark MW, Bayne EK. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal osteoarthritic and rheumatoid joints. *Clin Invest*. 1997;100:93–106.
107. Camplejohn K L, Allard SA. Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 1988;89(2):185–188.
108. Patel M, Merriam A, Culp B, Gatt C, Dunn M. One-year outcomes of total meniscus reconstruction using a novel fiber-reinforced scaffold in an ovine model. *The American Journal of Sports Medicine*. 2016;44(4):898–907.
109. Zhang J, Song G, Chen X, Li Y, Zhou J. Macroscopic and histological evaluations of meniscal allograft transplantation using gamma irradiated meniscus: a comparative in vivo animal study. *Chinese Medical Journal*. 2015;128(10):1370–1375.
110. Verfahrensweisung, Rezepturhandbuch, Anlage Nr. 8, Institut für Pathologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz vom 08.02.2010.
111. Colour Index published by the British Society of Dyers and Colourists and the American Association of Textile Chemists and Colorists. 1971 Lund Humphries. Bradford & London. 3. Aufl.
112. Kilem L. Intrarater Reliability. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials*. John Wiley & Sons. 2008.
113. Bortz J, Lienert GA, Boehnke K. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Berlin: Springer; 1990.
114. Bortz J. Statistik für Sozialwissenschaftler. Berlin: Springer; 1999.

115. Welsch U, Kummer W, Deller Th. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch / U. Welsch (Hrsg), W. Kummer (Hrsg), Thomas Deller, 5. Auflage, München: Elsevier; 2018.
116. Poole AR. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci.* 1999;15:D662–70.
117. Rakhra K, Cárdenas-Blanco A, Melkus G, Schweitzer M, et al. Is the T1p MRI Profile of Hyaline Cartilage in the Normal Hip Uniform? *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(4):1325–1332.
118. Dijkgraaf L, Bont L, et al. The Structure, Biochemistry, and Metabolism of Osteoarthritic Cartilage: A Review of the Literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53:1182–1192a.
119. Meister K, Indelicato PA, Spanier S, Franklin J, Batts J. Histology of the torn meniscus: a comparison of histologic differences in meniscal tissue between tears in anterior cruciate ligament-intact and anterior cruciate ligament-deficient knees. *Am J Sports Med.* 2004;32:1479e83.
120. Smillie I. Injuries of the knee joint. Chirchill Livingstone. 1978;83–111.
121. Aigner T, McKenna I. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci.* 2002;1:5–18.
122. Liu B, Goode A, Carter T. Matrix Metalloproteinase Activity and Prostaglandin E2 are Elevated in the Synovial Fluid of Meniscus Tear Patients. *Connect Tissue Res.* 2017;58(3-4):305–316.
123. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy.* 2009;11(3):224.
124. Houg, AJ, Webber RJ. Pathology of the meniscus. *Clinical orthopaedics and related research.* 1990;252:32–40.
125. Zellner J. Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen. Medizinische Dissertation. Regensburg; 2006.
126. Goldring, Mary B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease.* 2012;4(4):269–285.
127. Iozzo R, Schaefer L, Proteoglycans form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2015;42:11–55.
128. Englund M. The role of the meniscus in osteoarthritis genesis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008;34:573–579.

129. Noble J. Lesions of the menisci. Autopsy incidence in adults less than fifty-five years old. *J Bone Joint Surg Am.* 1977;59:480–3.
130. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (NY).* 1994;12:689–93.
131. 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.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. Angele P, Kujat R, Zellner J: Role of mesenchymal stem cells in meniscal repair. *J Exp Orthop.* 2014;1(1):12.

8 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius für die Überlassung dieses spannenden Themas und die gute Betreuung der Arbeit.

Ohne die großzügige Unterstützung und zeitliche Freistellung seitens meines Vorgesetzten Univ.-Prof. Dr. Erik Schulte wäre die Fertigstellung nur schwer möglich gewesen, daher bedanke ich mich auch bei ihm sehr herzlich.

Meinen Eltern danke ich für die schier unermüdliche Unterstützung während meines gesamten Studiums und darüber hinaus auch im Anschluss bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne sie wäre das nicht möglich gewesen.