

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Das Schwein als innovatives Tiermodell für Meniskusdegeneration

*Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011*

vorgelegt von Michael Kreinest,
geb. am 12.11.1980 in Speyer

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen **III**

1. Zusammenfassung **1**

Zusammenfassung – deutsch	1
Zusammenfassung – englisch	2

2. Einleitung **3**

2.1 Anatomie und Biomechanik des Kniegelenks	3
2.2 Anatomie und Histologie der Menisken	4
2.3 Biochemie und Zytologie der Menisken	7
2.4 Physiologie der Menisken	8
2.5 Pathophysiologie der Menisken	9
2.6 Hyaliner Gelenkknorpel und Gonarthrose	12
2.7 Aktueller Stand der Meniskus- und Osteoarthroseforschung	14
2.8 Tiermodelle in der Meniskus- und Osteoarthroseforschung	16
2.9 Zielsetzung dieser Arbeit	19

3. Material und Methoden **20**

3.1 Lösungen	20
3.2 Medikamente	23
3.3 Tiere, Tierhaltung, Tierversuche und Kadaversuche	26
3.4 Präparationen	28
3.5 Anästhesie und chirurgische Eingriffe	29
3.6 Kernspintomographie	31
3.7 Röntgen	33
3.8 Molekularbiologie (PCR, qPCR)	34
3.9 Elektronenmikroskopie	39
3.10 Histologie	41

3.11 Immunhistochemie	42
3.12 Auswertung der Daten	44
3.13 Fallzahlplanung und statistische Auswertung	48

4. Ergebnisse

4.1 Primäre Meniskusdegeneration im porcinen Kniegelenk	51
4.2 Expressionsprofil bei primärer Meniskusdegeneration	53
4.3 Strukturveränderung bei primärer Meniskusdegeneration	56
4.4 Kernspintomographie bei primärer Meniskusdegeneration	62
4.5 Sekundäre Meniskusdegeneration im porcinen Tiermodell	64
4.6 Expressionsprofil bei sekundärer Meniskusdegeneration	78
4.7 Strukturveränderung bei sekundärer Meniskusdegeneration	80

5. Diskussion

5.1 Die primäre Meniskusdegeneration im porcinen Kniegelenk	85
5.2 Die sekundäre Meniskusdegeneration im porcinen Kniegelenk	95
5.3 Das Schwein als Tiermodell für Meniskusdegeneration	101

6. Literaturverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

Lebenslauf

Publikationsverzeichnis

Danksagung

Abbildungen

Abb. 2.1:	Aufsichts-Schema auf das Tibiaplateau des rechten Kniegelenks	5
Abb. 4.1:	Histopathologische Analyse der primären Meniskusdegeneration	52
Abb. 4.2:	Kollagen-Immunhistochemie der primären Meniskusdegeneration	55
Abb. 4.3:	Histologische Beurteilung der primären Meniskusdegeneration	57
Abb. 4.4:	TEM der primären Meniskusdegeneration	59
Abb. 4.5:	REM der primären Meniskusdegeneration	60
Abb. 4.6:	EDS-Analyse der primären Meniskusdegeneration	61
Abb. 4.7:	Kernspintomographie der primären Meniskusdegeneration	63
Abb. 4.8:	Röntgenuntersuchung der Kniegelenke des Tiermodells	71
Abb. 4.9:	Kernspintomographie der Kniegelenke des Tiermodells	72
Abb. 4.10:	Histopathologische Analyse der sekundären Meniskusdegeneration	75
Abb. 4.11:	Kollagen-Immunhistochemie der sekundären Meniskusdegeneration	80
Abb. 4.12:	Histologische Beurteilung der sekundären Meniskusdegeneration	81
Abb. 4.13:	TEM der sekundären Meniskusdegeneration	83

Tabellen

Tab. 3.1:	Primer-Übersicht	37
Tab. 3.2:	Histopathologischer Meniskus-Degenerationsscore	44
Tab. 3.3:	Kernspintomographischer Meniskus-Degenerationsscore	46
Tab. 4.1:	Übersicht über Kadaverknie, Tiere, Tierversuche	50
Tab. 4.2:	Ergebnisse der qPCR bei primärer Meniskusdegeneration	54
Tab. 4.3:	Ergebnisse der qPCR des Vorversuchs zum Tiermodell	69
Tab. 4.4:	Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.9 (C)	73
Tab. 4.5:	Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.9 (D)	74
Tab. 4.6:	Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.10 (C)	76
Tab. 4.7:	Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.10 (D)	77
Tab. 4.8:	Ergebnisse der qPCR des Hauptversuchs zum Tiermodell	79
Tab. 4.9:	Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.13 (D)	84

1. Zusammenfassung

Beim Kniegelenk handelt es sich um das größte und wohl auch komplizierteste Gelenk des menschlichen Körpers. Bei zahlreichen Bewegungen des Alltags wirken enorme Kräfte auf die einzelnen Komponenten des Gelenks ein. Die aus Fasernknorpel bestehenden Menisken fangen einen Großteil dieser Kräfte ab und verteilen sie auf eine größere Fläche. Diese essentiellen Aufgaben können durch degenerative Veränderungen der Menisken deutlich beeinträchtigt werden. Es wird die primäre, idiopathische Meniskusdegeneration von der sekundären Meniskusdegeneration, welcher eine bekannte Ursache zu Grunde liegt, unterschieden. Die Mechanismen, welche zu primären degenerativen Veränderungen am Meniskusgewebe führen, sind noch weitestgehend unbekannt. Auch Diagnostik und Therapie von Meniskusdegenerationen sind noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Für weiterführende Studien bezüglich Ursache sowie diagnostischer und therapeutischer Ansätze bedarf es eines etablierten Tiermodells mit Meniskusdegeneration.

Das Schwein ist in der biomedizinischen Forschung als Modellorganismus verbreitet und sollte in der vorliegenden Arbeit als Tiermodell für (i) primäre und (ii) sekundäre Meniskusdegeneration beschrieben werden. Hierzu erfolgte eine umfangreiche Charakterisierung auf Genexpressions-, Protein- und Strukturebene, welche durch experimentelle, bildgebende Diagnostik ergänzt wurde.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Menisken aus adulten Zuchtschweinen zur Nahrungsgewinnung eine primäre Meniskusdegeneration aufweisen, welche sich in Veränderungen der Extrazellulärmatrix äußert. Weiterhin wurden vier Markergene für die primäre Meniskusdegeneration identifiziert. Im Göttingen Minipig konnte ein neues Tiermodell etabliert werden, welches nach der Resektion des vorderen Kreuzbandes eine sekundäre Meniskusdegeneration entwickelt. Die induzierten degenerativen Veränderungen konnten sowohl histopathologisch als auch kernspintomographisch nachgewiesen werden. Die primäre und sekundäre Meniskusdegeneration zeigten unterschiedliche Veränderungen im Genexpressionsprofil und in der Ultrastruktur.

Das Schwein kann also mit dem hier präsentierten Ansatz als Tiermodell zu weiterführenden, auch interventionellen Studien für die Charakterisierung, Diagnostik und Therapie der Meniskusdegeneration herangezogen werden.

The pig as a new animal model for meniscal degeneration

The knee joint is the largest and most complex joint of the human body. It absorbs enormous forces which affect the joint's components during daily movement and distributes them by the menisci. This essential responsibility of the two fibro-cartilaginous menisci is vastly weakened by degenerative processes of the meniscal tissue. The meniscal degeneration can either be primary (i. e. idiopathic) or secondary (i. e. as a consequence of a known reason). The pathophysiological mechanisms being involved in primary meniscal degeneration remain elusive. Diagnostics and therapy of degenerative processes of menisci are investigated currently but would greatly benefit from an established animal model.

For several reasons, the pig is a common animal model in biomedical and pharmaceutical research. The goal of the current study was thus to establish the pig as an animal model for (i) primary and (ii) secondary meniscal degeneration. Therefore, a broad characterisation of gene expression patterns, proteine expression levels and the ultrastructure of meniscal tissue was undertaken and supplemented by experimental magnetic resonance imaging.

It is shown here, that menisci from adult pigs, bred for slaughtering, developed a primary meniscal degeneration accompanied by changes in the extracellular matrix. Furthermore, four genetic markers (Collagen-1A1, Interleukin-8, Matrixmetalloproteinase-2 and -13) of primary meniscal degeneration were identified. With the Göttingen Minipig, a pig bred for research interests only, a new animal model for secondary meniscal degeneration could be described in the present study. Secondary meniscal degeneration was induced by resection of the anterior cruciate ligament. In this animal model a secondary degenerative alteration of the meniscal tissue could be verified by histopathological approaches and magnetic resonance imaging. It was shown further, that primary and secondary meniscal degeneration displayed differences in their gene expression profile and in characteristic alterations of their extracellular ultrastructure.

In conclusion, the approach introduced here can indeed serve as an porcine animal model for further investigations, including interventional studies, to address the characterisation, diagnostics and putative therapy of degenerative meniscus diseases.

2. Einleitung

2.1 Anatomie und Biomechanik des Kniegelenks

Bei jedem der bis zu vier Millionen Schritte, die ein Mensch im Jahr zurücklegt (Schmidt et al., 2007), wechseln sich Beugung (Flexion) und Streckung (Extension) im Kniegelenk ab. Allerdings erlaubt nur ein intaktes Kniegelenk Beugung und Streckung in vollem Umfang und ist somit für die Fortbewegung des Menschen essentiell. Darüber hinaus muss auch für das Einnehmen der sitzenden Haltung und das Aufstehen ein ausreichender Bewegungsumfang im Kniegelenk vorhanden sein.

Es handelt sich beim Kniegelenk um das größte und wohl auch um das komplizierteste Gelenk des menschlichen Körpers. Hier treffen zum einen Knie- scheibe (Patella) und Oberschenkelknochen (Femur) als Gelenk aufeinander, des Weiteren treffen das distale Ende des Femurs und das proximale Schienbein (Tibia) aufeinander. Ihre Gelenkflächen sind mit hyalinem Gelenkknorpel überzogen und deutlich unterschiedlich ausgeprägt. Diese Inkongruenz der femoralen und tibialen Gelenkflächen wird durch die Menisken - zwei halbmondförmige Faserknorpel zwischen Femurkondyle und Tibiaplateau - teilweise ausgeglichen. Aus dem Bereich, in welchem sich jeweils die Vorder- und die Hinterhörner der Menisken annähern, inserieren das vordere bzw. das hintere Kreuzband (Abb. 2.1). Die Kreuzbänder werden auch als Zentralpfeiler des Kniegelenks bezeichnet, was ihre hauptsächlich stabilisierende Funktion hervorhebt. Während das vordere Kreuzband hauptsächlich die Sagittalebene stabilisiert, ist das hintere Kreuzband ein Stabilisator der Sagittal- und Frontalebene (Kohn, 2000). Dementsprechend zeichnen sich beide Kreuzbänder durch Reißfestigkeit aus, die jeweils weit über 1000 N beträgt (Engebretsen et al., 1996). Weitere Stabilisatoren in der Frontalebene sind die Seitenbänder (Ligamentum collaterale mediale und laterale), welche in Knieextension angespannt sind. Zusammen mit fibrösen Anteilen bilden die genannten Bänder den Kapsel- Band-Apparat des Kniegelenks, welcher durch einstrahlende Sehnen verstärkt wird (Kohn, 2000). Diese sogenannte Gelenkkapsel wird von der Synovialmembran ausgekleidet, deren Zellen (Synoviozyten) die Gelenkflüssigkeit (Synovia) sezernieren (Norris et al., 2008). Die Synovia dient zum einen der Versorgung von

hyalinem Gelenkknorpel und den Menisken per Diffusion, zum anderen vermindert sie die Reibungskräfte im Gelenk (Aigner et al., 2008).

Zum Verständnis der Biomechanik des Kniegelenks müssen alle oben genannten Strukturen zusammen mit den beteiligten Muskeln als funktionelle Einheit betrachtet werden: Es handelt sich beim Kniegelenk um ein Drehwinkelgelenk mit zwei echten Freiheitsgraden (Flexion/Extension und Innen-/Außenrotation; Cochran, 1988) und eingeschränkter Bewegungsmöglichkeit bei Abduktion und Adduktion, sowie der anterior-posterioren Bewegung. Bei der Flexion gleiten die Femurkondylen mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,3 Meter pro Sekunde (Stachowiak et al., 2006) nach dorsal. An den jeweiligen Endpunkten geht dieses Gleiten in ein stationäres Abrollen über, weshalb man beim Kniegelenk auch von einem Roll-Gleitgelenk spricht (Ludolph et al., 1980). Während für die Flexion die ischiokrurale Muskelgruppe verantwortlich ist, ist der Musculus quadriceps femoris der einzige Extensor im Kniegelenk. Der oben beschriebene Kapsel-Bandapparat führt diese Bewegungen (Brinckmann et al., 2000) und verhindert Rotationsbewegungen in der Extensionsstellung. Die bei Beugung und Streckung auftretenden Kräfte, die von der halben Körpergewichtskraft im Stehen bis auf das Fünffache der Körpergewichtskraft beim Treppaufsteigen zunehmen (Cochran, 1988), werden von den Menisken und dem Gelenkknorpel auf die Tibia übertragen. Durch die Wechselwirkungen der Synovia mit den artikulierenden Oberflächen ist der Haftreibungskoeffizient (f) der Gelenkflächen mit Werten zwischen 0,005 und 0,02 (Brinckmann et al., 2000) äußerst gering (zum Vergleich: f von Stahl auf Eis: 0,1). Schon die hier beschriebenen engen Wechselwirkungen nur einiger Kniegelenksanteile lässt die Auswirkungen bei Störungen der Integrität dieses Organsystems vermuten.

2.2 Anatomie und Histologie der Menisken

Menisken sind intraartikuläre, aus Faserknorpel bestehende, meist scheibenförmige Strukturen und kommen außer im Kniegelenk nur in einigen wenigen weiteren Gelenken (z. B. Temporomandibulargelenk, Radioulnargelenk, Sternoclaviculargelenk, Akromioklavikulargelenk; Ahluwalia et al., 2001) vor. Die Menisken des Knie-

gelenks sind halbmondförmig (Abb. 2.1) und haben einen keilförmigen Querschnitt. Ihre femorale Oberfläche ist konkav, die tibiale Seite eher flach bis konvex geformt. Man unterscheidet Vorder- und Hinterhorn von der Pars intermedia des Meniskus. Beide Menisken sind sowohl am Vorder- als auch am Hinterhorn über ligamentäre Strukturen am Tibiaplateau befestigt (Abb. 2.1). Untereinander sind medialer und lateraler Meniskus über die Vorderhörner durch das Ligamentum transversum genus miteinander verbunden. Des Weiteren ist der mediale Meniskus mit dem Ligamentum collaterale mediale verwachsen (Abb. 2.1), was seine Beweglichkeit im Vergleich zum lateralen Meniskus deutlich einschränkt (zur Übersicht: Ricklin et al. 1980). Der laterale Meniskus ist über sein Hinterhorn und die beiden menisco-femorale Bänder (Humphrey-Band und Wrisberg-Band) am Femur befestigt (zur Übersicht: Beaufils et al., 2010). Beide Menisken gehen über die meniskopatellare Bänder auch eine Verbindung mit der Patella ein. Trotz dieser zahlreichen Bandverbindungen der Menisken sind sie transportable Gelenkflächen und verlagern sich bei allen Bewegungen im Kniegelenk: In Flexionsstellung verlagern sich die Menisken nach hinten, während sie in Extensionsstellung in die Anteriorität gehen. Auch während der Rotationsbewegung im Kniegelenk verändern die Menisken ihre Position im Vergleich zur Neutralstellung. Der mediale Meniskus ist im Durchschnitt etwa 10 mm breit und weist einen größeren Krümmungsradius auf als der laterale Meniskus. Die Basis beider Menisken ist mit etwa 7 mm gleich groß.

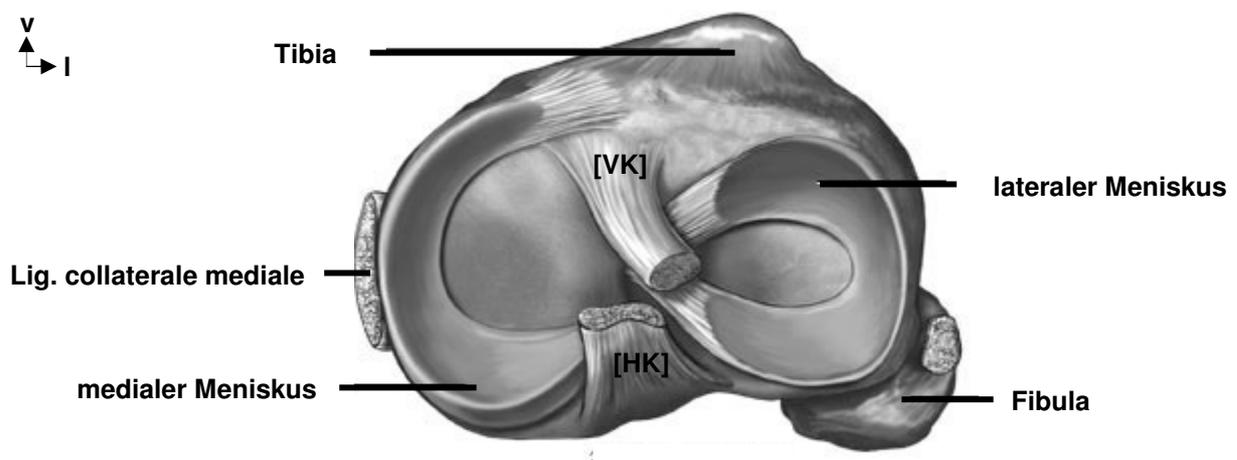


Abb. 2.1: Aufsichtsschema auf das Tibiaplateau des rechten Kniegelenks (angepasst aus Verdonk, 2006): Die halbmondförmigen Menisken sind über ligamentäre Strukturen an der Tibia befestigt. Des Weiteren sind das Wadenbein (Fibula), das vordere (VK) und das hintere Kreuzband (HK), sowie das Ligamentum collaterale mediale dargestellt (v: ventral, l: lateral).

Entwicklungsgeschichtlich entstehen die Menisken wohl aus einer im Embryonalstadium angelegten durchgehenden Scheidewand, deren mesenchymale Stammzellen aus der Gelenkoberfläche von Femur und Tibia kondensieren. Nach der Differenzierung dieser Zellen in Fibrochondroblasten wird meniskale Extrazellulärmatrix gebildet, welche die Menisken formt (zur Übersicht: Beaufils et al., 2010). Hierbei muss erwähnt werden, dass medialer und lateraler Meniskus aus unterschiedlichen Vorläuferzellen gebildet werden (Hyde et al., 2008).

Die vaskuläre Anbindung der Menisken an den Blutkreislauf erfolgt über die Arteria poplitea, welche die Arteria genus media und die paarigen Arteriae genus distales abgibt (Fairbank et al., 1951). Diese Arterien treten in die Gelenkkapsel ein und geben dort Äste zur parameniskalen Zone ab (Scapinelli, 1968). Diese Zone besteht aus lockerem Bindegewebe und gibt kleinere Arterien in die Menisken ab (zur Übersicht: Ricklin et al., 1980). Diese Kollateraläste dringen allerdings nur in die äußeren 20-50%, die sogenannte rote Zone des Meniskus ein (Shim et al., 1986; Danzig et al., 1983; Arnoczky et al., 1982). Im keilförmigen Meniskusquerschnitt unterscheidet man diese basal gelegene rote Zone von der apikal gelegenen weißen Zone, welche frei von Blutgefäßen ist und ausschließlich per Diffusion versorgt wird. Die rot-weiße Zone beschreibt die Übergangszone, in welcher die Gefäße enden. Die Pars intermedia ist stärker durchblutet als die meniskalen Vorder- und Hinterhörner, des Weiteren zeigt der laterale Meniskus eine stärkere Gefäßzeichnung als der mediale (zur Übersicht: Ricklin et al. 1980). Darüber hinaus wurden auch Lymphgefäße beschrieben, die zusammen mit den Arterien in den Meniskus ziehen (Gray, 1999).

Die nervale Innervation der Menisken scheint vor allem auf Vorder- und Hinterhorn beschränkt zu sein (Messner et al., 1998). Hier wurden hauptsächlich Mechanorezeptoren nachgewiesen (Moon et al., 1997). Aber auch in der roten Zone der Pars intermedia konnten kürzlich Nervenendigungen gezeigt werden (Welsing et al., 2008).

Im Gegensatz zu dem hyalinen Gelenkknorpel bestehen die Menisken aus Faserknorpel. Histologisch imponieren vor allem die unterschiedlich verlaufenden Kollagenfasern. Die Anordnung dieser 50-150 µm dicken Kollagenfibrillen innerhalb der aus Faserknorpel bestehenden Menisken zeigt Unterschiede zum hyalinen Gelenkknorpel. Eine Einteilung in drei histologische Zonen ist dem Gelenkknorpel

und dem Faserknorpel zwar gleich, allerdings unterscheidet sich die Orientierung der Kollagenfibrillen in den einzelnen Bereichen. Mikroskopische Studien beschreiben in den oberflächlichen Schichten die Kollagenfibrillen der Menisken als radiär angeordnet. In der dazwischen liegenden Zone findet man ein Netzwerk aus Kollagenfasern, das hauptsächlich tangential zur Oberfläche ausgerichtet ist (Fithian et al., 1990). Spätere elektronenmikroskopische Aufnahmen widersprechen diesen Befunden und zeigen eine oberflächliche Schicht dünnster Kollagenfibrillen, unter der eine zweite Schicht mit chaotisch angeordnetem Netzwerk zu finden ist, bevor die schon erwähnte Tangentialschicht beschrieben wird (Petersen et al., 1999, 1998).

2.3 Biochemie und Zytologie der Menisken

Die Menisken bestehen zu rund 70% aus Wasser. Das Trockengewicht besteht hauptsächlich (ca. 75%) aus dem Protein Kollagen (hiervon ca. 98% Kollagen-1, nur wenig Kollagen-2, -3 und -5; zur Übersicht: Wojtys et al., 2005, Fithian et al., 1990). Des Weiteren findet man in den Menisken zahlreiche Proteingruppen, die nicht den Kollagenen zugerechnet werden können: Hier sind vor allem die Proteoglykane zu nennen, welche sich aus einem Grundgerüst von Hyaluronsäure und über Link-Proteine damit verbundenen Glykosaminoglykanketten zusammensetzen (zur Übersicht: Mow et al., 1997). Die Proteoglykane sind außerdem mit dem Kollagenetzwerk verbunden. Durch ihre negativ geladenen Sulfat-Gruppen binden sie das Dipol-Molekül H_2O und tragen somit hauptsächlich zum hohen Wassergehalt des Meniskus bei. Des Weiteren ziehen sie auch Kationen an, die den osmotischen Sog von Wasser in den Meniskus begünstigen (Fithian et al., 1990).

Auf zellulärer Ebene findet man im Meniskus vorwiegend Chondrozyten. Schumacher et al. (2005) unterscheiden vier Populationen: Die Chondrozyten nahe der Oberflächen sind spindelförmig; etwas tiefer liegen die Fibroblasten-ähnlichen Zellen mit langen Zytoplasma-Ausläufern, welche über spezielle Zell-Zell-Kontakte (gap junctions) mit anderen Zellen in Verbindung treten (Verdonk, 2006). Im Innern des Meniskus liegen die klassischen Fibrochondrozyten von runder bis ovaler Form. Die letzte Untergruppe enthält Zellen, deren Morphologie zwischen Fibrochondro-

zyten und Fibroblasten liegt. Chondrozyten, Fibrochondrozyten und auch Fibroblasten bilden die Extrazellulärmatrix des Faserknorpels und können zusammen mit dieser ein Chondron bilden (zur Übersicht: Wang et al., 2009). Weitere Studien zeigten, dass Chondrozyten auch das Lubrikant Lubricin produzieren (Wimmer et al., 2007), welches im Meniskus sowohl an der femoralen und tibialen Oberfläche (Jones et al., 2007), als auch in tiefer liegenden Schichten detektiert werden konnte (Schumacher et al., 2005). Die oberflächennahen Chondrozyten wachsen in Verletzungen des Meniskus ein und sind vermutlich an der Initiierung von Heilungsprozessen beteiligt (Kambic et al., 2000).

Untersuchungen über die Eigenschaften des Meniskus unter axialer Belastung, Scherstress und Zugbelastung, wie sie im Kniegelenk vorkommen, haben gezeigt, dass die Menisken diese Kräfte weitaus besser kompensieren können als es für den hyalinen Gelenkknorpel bekannt ist. Obwohl die Menisken aus nicht komprimierbaren Bestandteilen bestehen, nämlich Wasser und Proteinen, sind sie in der Lage, Energie zu absorbieren. Dieses Phänomen, wie es auch im Faserknorpel der Bandscheiben beobachtet werden kann, wird viskoelastisches Verhalten der Kollagen-Proteoglykan-Matrix genannt (Fithian et al., 1990). Die Menisken verformen sich also unter Belastung, finden jedoch zeitabhängig, nach Ende der Belastung wieder in ihre ursprüngliche Form zurück.

2.4 Physiologie der Menisken

Aus dem oben beschriebenen anatomischen Aufbau lassen sich die wesentlichen Aufgaben der Menisken im Kniegelenk ableiten. Sie sollen Belastungsspitzen abfangen (Stoßdämpfer), die übertragene Energie absorbieren (Lastverteiler) und das Kniegelenk stabilisieren (Stabilisatoren). Bei Versuchen mit implantierten Messprothesen konnten während des Laufens im Kniegelenk auftretende Kräfte bis zur 2,5-fachen Gewichtskraft des Körpergewichts gemessen werden (D'Lima et al., 2006). Beim Treppablaufen nehmen diese Kräfte auf das 3,5-fache der Gewichtskraft des Körpergewichts zu (Heinlein et al., 2009). In Knieextension absorbieren die Menisken etwa 50% dieser Energie, bei Flexion des Knies bis zu 90% (zur Übersicht:

Lubowitz et al., 2007). Durch ihre elastischen Eigenschaften wirken die Menisken also als Stoßdämpfer.

Eine weitere wichtige Funktion der Menisken ist die Verteilung von der durch die Femurkondylen übertragenen Kraft (hauptsächlich Gewichtskraft) auf eine größere Fläche des Tibiaplateaus. Durch ihre oben beschriebene Form vergrößern die Menisken die Lastübertragungszone um das Dreifache (Walker et al., 1975). Der Druck (Kraft pro Fläche) auf das Gelenk und auf die Knorpelschicht nimmt somit ab.

Außerdem erhalten die Menisken durch ihre Form die Stabilität des Kniegelenks, da sie sich vor allem in den Endstellungen auf Grund ihrer keilförmigen Struktur zwischen Femurkondyle und Tibiaplateau schieben (Kohn, 2000). So kann der mediale Meniskus auch in einem Knie mit defektem vorderem Kreuzband zumindest teilweise die Verschiebung der Tibia nach anterior verhindern (Levy et al., 1982).

2.5 Pathophysiologie der Menisken

Die Verfügbarkeit minimalinvasiver Methoden (sogenannte Schlüsselloch-Chirurgie), wie die Arthroskopie des Kniegelenks, haben Läsionen an den Menisken einer chirurgischen Therapie deutlich zugänglicher gemacht. Über die Anzahl der durchgeführten Operationen kann deshalb annähernd auf die Häufigkeit von Meniskusläsionen zurückgeschlossen werden. Die Inzidenz liegt bei 60 Meniskusverletzungen pro 100.000 Einwohner und Jahr (Teurlings, 1999). So berichten Katz et al. (2009) über ca. 1.000.000 Eingriffe pro Jahr in den USA. Für Deutschland berichtet Krudwig (2000) über 250.000 arthroskopisch versorgte Läsionen des Innenmeniskus in den Jahren 1996 – 1997 in Deutschland. Diese epidemiologischen Zahlen zeigen die Häufigkeit von meniskalen Beschwerden. Grundsätzlich muss bei pathologischen Meniskuszeichen zwischen Verletzungen der Menisken, die auf ein akutes Trauma zurückzuführen sind, und degenerativen Veränderungen, welche durch dauerhafte Belastung und Alterung begünstigt werden, unterschieden werden. Bezüglich der akuten Meniskusverletzungen ist einleitend zu sagen, dass der mediale Meniskus rund achtmal häufiger betroffen ist als der laterale Meniskus (zur

Übersicht: Ricklin et al., 1980). Die Gründe hierfür sind vielschichtig: Zum einen hat der laterale Meniskus eine größere Bewegungsfreiheit (Vedi et al., 1999); so kann er Belastungsspitzen bei kombinierten Flexions- und Rotationsbewegungen eher ausweichen. Zum anderen gibt ihm seine konvexere Unterseite und sein größerer Krümmungsradius weniger Möglichkeiten, in die Mitte des Tibiaplateaus gezogen zu werden, wo die Gefahr, unter indirekte Zugkräfte zu geraten, am größten ist. In Extensionsstellung sind isolierte Meniskusläsionen auf Grund der Stabilität des Kniegelenks nicht möglich. Während einer Rotationsbewegung des gebeugten Knies wird allerdings vor allem der mediale Meniskus zur Mitte des Tibiaplateaus hingezogen (Schaer, 1938). Kommt es in dieser Situation zu einer Streckung des Kniegelenks befindet sich der mediale Meniskus in der Knochenzange zwischen Femur und Tibia, welche einen direkten Druck auf den Meniskus ausübt. Hierdurch kommt es zu Zugkräften in Richtung Vorder- und Hinterhorn, was einen Längsriss des medialen Meniskus zur Folge hat. Die Diagnostik solcher Risse erfolgt neben der klinischen Untersuchung hauptsächlich über die Kernspintomographie, die klinisch-relevante von nichtsignifikanten Meniskusläsionen unterscheiden kann (Crues et al., 1987). Die Selbstheilung der Menisken nach einem solchen Trauma ist gering, besonders bei Rissen mit Beteiligung der avaskulären Zone (Bray et al., 2001), weshalb oftmals ein therapeutisches Eingreifen nötig wird. Ricklin et al. (1980) diskutieren die mögliche Therapie solcher Meniskusrisse: In vergangenen Zeiten tendierte man wohl eher zur totalen Meniskektomie, obwohl Fairbank (1948) schon früh die radiologischen Veränderungen nach einer Meniskektomie beschrieb. Diese sogenannten Fairbank-Veränderungen waren zum einen die Ausbildung eines Knochenkamms auf der Femurkondyle, sowie die Abflachung derselben. Zusätzlich verringert sich auch die Breite des Gelenkspaltes im Röntgenbild. Nicht zuletzt deshalb wird heute zurückhaltender verfahren und nur der lädierte Teil des Meniskus entfernt (zur Übersicht: Messner et al., 1998; Lazovic et al., 1997). Im Tierversuch am Schaf konnte nämlich gezeigt werden, dass die Entfernung des Meniskus zur Osteoarthrose führt (Young et al., 2006). Da allerdings auch die teilweise Meniskektomie nach einiger Zeit (5 Jahre) zu Degenerationen im Kniegelenk (Williams et al., 2007) führt, kann auch durch die partielle Meniskektomie bei Tier und Mensch eine sekundäre Gonarthrose (Osteoarthrose des Kniegelenks) entstehen (Kobayashi et al., 2001; Lanzer et al., 1989). Außerdem konnten Kobayashi et al.

(2001) zeigen, dass sowohl der hyaline Gelenkknorpel als auch die Menisken nach partieller Menishektomie vermehrt Stickstoffmonoxid freisetzen, was zur Apoptose der Chondrozyten in beiden Geweben führt. Letztendlich stellen alle therapeutischen Möglichkeiten einen Eingriff in das Organsystem Kniegelenk dar und bergen somit das Risiko, die Integrität des Gelenks zu verletzen. Aber auch der nicht-behandelte, verletzte Meniskus erhöht das Arthroserisiko (Wojtys et al., 2005), indem er zum Verlust von tibialen Gelenkknorpel führt (Sharma et al., 2008). Durch die moderne Arthroskopie wird versucht, die Manipulationen an Gelenkstrukturen so gering wie möglich zu halten und dennoch eine optimale Therapie zu ermöglichen (zur Übersicht: Burger et al., 2007).

Im Gegensatz zu den akuten, traumatischen Meniskusverletzungen, muss bei der Degeneration des Meniskus zwischen der primären und der sekundären Degeneration unterschieden werden. Beide sind im morphologischen Sinn als Texturstörung des bradytrophen Gewebes definiert (Krenn et al., 2008). Während die primäre Degeneration allerdings eine das altersübliche Maß überschreitende Texturstörung ohne bekannte klinische Ursache darstellt, lassen sich der sekundären Degeneration bekannte Noxen (z. B. entzündliche oder degenerative Gelenkerkrankungen) oder Erkrankungen (wie z. B. vorausgegangene Verletzungen des Kniegelenks) als Ursache eindeutig zuordnen. Die Mechanismen, welche zur primären degenerativen Veränderung an den Menisken führen, sind noch weitestgehend unklar. Schon frühe histologische Studien zeigten Lipoideinlagerungen in den Chondrozyten und der Interzellulärsubstanz, welche bereits im zweiten Lebensjahrzehnt beobachtet wurden und als degenerative Veränderungen beschrieben wurden. Später wurden Verfettungen und mukoide Einlagerungen beobachtet (zur Übersicht: Ricklin et al., 1980), die als Risikofaktoren für Meniskusläsionen gelten. Das heutige Verständnis von Degeneration wird wohl am treffendsten durch eine Störung des anabolen und katabolen Gleichgewichts sowohl der Chondrozyten als auch der Extrazellulärmatrix beschrieben. Für den hyalinen Gelenkknorpel konnten Aigner et al. (2006b) einen Überhang kataboler Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) oder Aggrekanasen (ADAMTS) beschreiben, welche im Zustand der Degeneration (Osteoarthrose) durch katabole Zytokine (z. B. Interleukin-1 oder Tumor necrosis factor α) aktiviert werden; für das Meniskusgewebe stehen diese Untersuchungen noch aus (siehe 2.7).

2.6 Hyaliner Gelenkknorpel und Gonarthrose

Aktuelle Studien zeigen, dass es Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein einer Meniskusdegeneration und dem Auftreten einer Osteoarthrose des Kniegelenks (Gonarthrose) gibt (Katz et al., 2009). Ausgangspunkt des Krankheitsbildes der Gonarthrose sind wohl pathophysiologische Veränderungen des hyalinen Gelenkknorpels im Kniegelenk.

Der hyaline Gelenkknorpel überzieht die gelenkbildenden Oberflächen von Femur, Tibia und Patella in einer ca. 3-4 mm dicken Schicht. Es handelt sich hierbei um ein avaskuläres, von Nerven und Lymphgefäßen nicht innerviertes Gewebe (Buckwalter et al., 1997), welches ausschließlich durch Diffusion ernährt wird (Copenhaver et al., 1978). Die Zusammensetzung des hyalinen Gelenkknorpels ist den Menisken ähnlich, auch er besitzt viskoelastische Eigenschaften. Der Hauptbestandteil des Gelenkknorpels ist Wasser (80%). Der größte Teil des Trockengewichts entfällt auf das Strukturprotein Kollagen-2, welches eine sich gleichmäßig anfärbende (hyaline) Extrazellulärmatrix bildet. Dennoch ist die Kollagenkonzentration niedriger als im Meniskus (Fithian et al., 1990). Wie im Meniskus, wird diese Extrazellulärmatrix von Chondrozyten gebildet, die sich im hyalinen Gelenkknorpel zu Lakunen zusammenlagern (Copenhaver et al., 1978). Die Chondrozyten in der Superficialzone sind abgeflacht und spindelförmig. Sie synthetisieren hauptsächlich Kollagen, was dazu führt, dass der Wassergehalt in dieser oberflächlichen Schicht am größten ist (Bhosale et al., 2008). Des Weiteren sind die Chondrozyten der Superficialzone befähigt, das Lubrikant Lubricin zu synthetisieren (Schumacher et al., 1994) und in die Synovia zu sezernieren. In der Intermediärzone sind die Zellen rund und gleichmäßig verteilt, während sie in der tiefen Zone radiär angeordnet sind. Generell gilt, dass Chondrozyten eine hohe metabolische Aktivität besitzen. Auf Grund des äußerst geringen Zellanteils in Gelenkknorpel und Meniskus (1-5%) gelten beide Gewebe allerdings als bradytroph (zur Übersicht: Bhosale et al., 2008).

Die Hauptaufgabe des hyalinen Gelenkknorpels ist vor allem der Schutz des Knochens vor mechanischer Belastung, indem sich die Gelenkknorpelschicht verformt, um die Kontaktfläche zu vergrößern und die Kongruenz zu verbessern

(Mow et al., 2002). Wie der Meniskus kann auch der Gelenkknorpel Scherspannungen kompensieren und Belastungsspitzen abfangen (zur Übersicht: Lu et al., 2008). Außerdem leistet der Gelenkknorpel einen Beitrag zur Reibungsminderung im Gelenk, indem er eine reibungsarme Gleitoberfläche bereitstellt und an der Lubricin-Synthese beteiligt ist.

Die Gonarthrose führt, ausgehend vom Gelenkknorpel, oftmals zum Untergang des gesamten Organsystems Knie (Aigner et al., 2006c). Zwar tritt die Osteoarthrose auch in anderen Gelenken des Körpers auf, das Kniegelenk ist jedoch das am häufigsten von degenerativen Veränderungen betroffene Gelenk (Anderson et al., 1988; Mohing, 1966). Die Arthrose gehört heute zu den weltweit am häufigsten verbreiteten Krankheiten (Grifka, 1994), so zeigen in den USA 17% der über 60-jährigen Symptome der Arthrose (Lawrence et al., 1998). In der westlichen Welt ist die Osteoarthrose die häufigste Ursache für Bewegungseinschränkungen (Aigner et al., 2004). Analog der Einteilung der Meniskusdegeneration werden auch primäre und sekundäre Osteoarthrose unterschieden. Beiden Formen gemeinsam ist wohl ein Ungleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus im gesamten Gelenk (Dean et al., 1989). Während man bei der sekundären Gonarthrose allerdings bedeutsame krankheitsinduzierende Prozesse in der Vorgeschichte des Patienten benennen kann (z. B. entzündliche Prozesse, Normabweichungen der Beinachse, diverse metabolische Vorerkrankungen; zur Übersicht: Kohn, 2000), ist dies in der überwiegenden Zahl der Fälle (ca. 80%; Bullough et al., 1987) nicht möglich. Hier spricht man von der primären oder idiopathischen Gonarthrose, die vor allem bei über 60-jährigen zu beobachten ist. Letztendlich subsumiert der Begriff der Arthrose alle degenerativen, nicht entzündlichen Veränderungen von Gelenkknorpel und Knochen (Grifka, 1994). Initiale Veränderungen der Kniegelenksarthrose sind durch den Proteoglykanverlust im hyalinen Gelenkknorpel charakterisiert, welcher durch eine Synthesestörung der Chondrozyten bedingt ist (Sokoloff, 1982). Hierdurch kommt es zu Texturstörungen im Kollagennetzwerk (Aigner et al., 2008), was die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels verändert. Es kommt zur teilweisen Kalkeinlagerung in den Gelenkknorpel. Dieser Umbau des hyalinen Gelenkknorpels befällt auch die tieferen Schichten und zerstört auch den subchondral gelegenen Knochen (zur Übersicht: Netter, 1995). Auch die Synovialmembran, welche das gesamte Kniegelenk auskleidet, reagiert auf die

Störung der Integrität des Gelenks, wodurch es zur entzündlichen Synovitis, Ergussbildung und Zystenbildung kommen kann (zur Übersicht: Netter, 1995).

2.7 Aktueller Stand der Meniskus- und Osteoarthroseforschung

Auf Grund der bestehenden Korrelation zwischen Meniskektomie und der Entwicklung von Osteoarthrose ist der Ersatz von Meniskusteilen oder des ganzen Meniskus aktueller Gegenstand der Forschung (Katz et al., 2009). So konnten z. B. meniskusförmige Kollagengerüste im Rahmen einer Studie implantiert werden, welche zwar Einwachsungen von Faserknorpel zeigten (Stone et al., 1997), aber den Knorpel nicht ausreichend schützen konnten (zur Übersicht: Martinek et al., 2006). Hierauf wurden resorbierbare Kollagengerüste (Pezzin et al., 2003) entwickelt und teilweise schon in der Humanmedizin angewandt (Zaffagnini et al., 2007). Auch Trägersubstanzen aus Kunststoffen (Kon et al., 2008; Welsing et al., 2008) sind im Fokus aktueller Forschung. Zellfreien Trägergerüsten gemeinsam ist die Idee, die Integration und Differenzierung von Meniskuszellen zu ermöglichen (Tienen et al., 2003) oder kultivierte Chondrozyten in das Implantat zu überbringen (Maier et al., 2007; Yamasaki et al., 2005). Hierbei müssen die zahlreichen Wechselwirkungen, welche die Trägersubstanzen eingehen (z. B. mit der Matrix des Meniskus, dem Gelenkknorpel und der Synovialflüssigkeit), berücksichtigt werden. Die Degeneration des verletzten Kniegelenks konnte allerdings mit der Implantation solcher Trägergerüste bisher nicht verhindert werden (z. B. Tienen et al., 2003).

Der degenerierte Meniskus imponiert klinisch hauptsächlich durch Schmerzen und Bewegungseinschränkungen, eine Hyperintensität in der Kernspintomographie, sowie mukoiden Veränderungen im histologischen Bild. Arthroskopisch findet man eine Abweichung der Farbe ins gelbliche, sowie eine pathologische Form, die durch kleine Radiärrisse an der Innenseite und Lappenbildung imponiert. Wie bereits erwähnt sind die Mechanismen der Entstehung solcher Meniskusdegenerationen noch nicht vollends verstanden. Aus diesem Grund ist die Degeneration der Menisken aktueller Forschungsgegenstand: Ein erstes Ziel ist es, auf Genomebene Veränderungen im Expressionsprofil der Chondrozyten im Meniskus

zu detektieren. Die Osteoarthroseforschung konnte in zahlreichen Studien zeigen, dass sich das Expressionsprofil auf Genomebene im hyalinen Gelenkknorpel schon unter zunehmender Belastung (Aigner et al., 2002) und unter Osteoarthrose (Aigner et al., 2008) deutlich ändert. Gut analysiert sind hier vor allem die anabolen Gene der extrazellulären Matrix, wie z. B. Kollagen-1 und -2 (Aigner et al., 2006a, 2006b; Stoker et al., 2006; Lorenz et al., 2005; Kambic et al., 2005) und das Proteoglykan Aggrekan (Stoker et al., 2006; Fan et al., 2005; Lorenz et al., 2005; Melrose et al., 2005; McAlinden et al., 2001), sowie die katabolen Gene der Matrixmetalloproteinasen (Aigner et al., 2006a, 2006b; Fan et al., 2005; Hsieh et al., 2004). Eine Änderung des Expressionsmusters dieser Gene kann beim hyalinen Gelenkknorpel als früher Marker für Osteoarthrose fungieren. Beim Faserknorpel des Meniskus beschränken sich die Genomanalysen meist nur auf das Vorhandensein bestimmter Gene (Ochi et al., 2003), sodass hier nur wenige typische Marker, wie z. B. C4d (Dankhof et al., 2006) beschrieben werden konnten. Zukünftige Studien müssen deshalb das Expressionsprofil gesunder und degenerierter Menisken analysieren, ob es solche Marker-Gene für die Degeneration des Faserknorpels gibt, wie sie für die Osteoarthrose bereits beschrieben sind. Ein weiteres Ziel wäre dann zu untersuchen, ob sich auch die entsprechenden Proteine in ihrem Expressionsprofil ändern. Zwar konnte für den Meniskus bereits gezeigt werden, dass sich mit zunehmender Degeneration der Kollagen- und Glykosaminoglykan-Gehalt (Herwig et al., 1984) sowie der Gehalt an Glyko- und Mukoproteinen (Boya et al., 2004) ändern, eine umfassendere Analyse steht allerdings noch aus. Eng mit dieser Analyse vergesellschaftet ist auch eine Untersuchung der Ultrastruktur von gesunden und degenerierten Menisken. Erst hier könnte sich zeigen, welche Auswirkung eine Veränderung des Expressionsprofils auf die Protein-Ebene hat. Sowohl die Struktur des gesunden Meniskus (Merkel, 1980) mit dem Verlauf der Kollagenfasern (Petersen et al., 1998) als auch der degenerierte Meniskus (Dahmen, 1962) wurden schon früh elektronenmikroskopisch untersucht. Hier muss analysiert werden, ob es einen Zusammenhang zwischen veränderter Ultrastruktur und verändertem Expressionsprofil im Meniskus gibt. Im nächsten Schritt müssen Änderungen auf zellulärer Ebene analysiert werden. Es ist bekannt, dass die Apoptose der Chondrozyten mit dem Grad der Degeneration im Meniskus korreliert (Uysal et al., 2008). Des Weiteren ist unklar, in wie fern sich primäre und sekundäre Meniskus-

degeneration in ihrer Pathophysiologie gleichen. Um die oben beschriebenen Analysen und Studien durchführen zu können, bedarf es also zu allererst eines Tiermodells mit Meniskusdegeneration. Da eine induzierte Meniskusdegeneration immer einer sekundären Degeneration entspricht, bleibt es fraglich, wie Untersuchungen der primären Meniskusdegeneration adressiert werden können.

2.8 Tiermodelle in der Meniskus- und Osteoarthroseforschung

Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass die Art von Tiermodellen für Studien am Organsystem Knie sehr vielfältig ist (zur Übersicht: Atay et al., 2007). Dies betrifft sowohl die Spezies als auch die durchgeführten Prozeduren. Obwohl die meisten Tiermodelle für die Analyse der Osteoarthrose entwickelt wurden, gibt es auch hier eine große Variabilität. Sowohl in Kleintieren wie Ratten (Appleton et al., 2007) und Kaninchen (Chang et al., 1997), als auch bei Großtieren, wie z. B. dem Hund (Lorenz et al., 2005), wurde durch die Resektion des vorderen Kreuzbandes eine Osteoarthrose induziert. Obwohl hieraus gute Ergebnisse in der Osteoarthroseforschung gewonnen werden konnten, existieren auch Tiermodelle, bei denen zur Induktion einer Knorpeldegeneration im Kaninchen (Mchraban et al., 1997) und beim Schaf (Young et al., 2005) eine Meniskektomie durchgeführt wurde. Zusätzlich existieren Osteoarthrose-Modelle in der Ziege, wo ein Release und eine Durchtrennung des medialen Meniskus zur Knorpeldegeneration führen (Laurent et al., 2006). Auch das Schaf ist als Modelltier für Kniegenerationen bekannt, da es nach einer Meniskusnaht eine Osteoarthrose ausbildet (Burger et al., 2007). Die Wahl dieses Tiers stützt sich auf die Behauptung, dass das Knie des Schafs dem des Menschen am ähnlichsten sei (Burger et al., 2007), was leider nicht weiter begründet wird. Meinem Erachten nach zeigt das Schaf keinen Vorteil im Vergleich zu anderen Quadrupeden. Es unterscheidet sich sogar deutlicher vom Menschen durch sein Ernährungsverhalten (herbivorer Wiederkäuer) und sein Fluchtverhalten. Wohl aber scheint das Schaf ein etabliertes Tier in der Meniskuschirurgie zu sein (Lazovic et al., 1997), hier wird es z. B. als Modelltier für Meniskustransplantationen (Lazovic et al., 1997) und Meniskusersatzchirurgie (Kon et al., 2008; Kelly et al., 2006) verwendet.

Darüber hinaus wurden auch zahlreiche Studien bezüglich Meniskus-Chirurgie und Meniskus-Ersatz an der Ziege, dem Hund und dem Hasen durchgeführt (zur Übersicht: Arnoczky et al., 2009).

Ein weiteres etabliertes Tiermodell in der Osteoarthroseforschung ist das sogenannte Pond-Nuki-Modell. Das im Hund entwickelte Modell zeigt eine zuverlässige Entstehung einer Gonarthrose nach Resektion des vorderen Kreuzbandes (Pond et al., 1973). Aktuellere Studien konnten in diesem Modell mittels einer 1,0 T Kernspintomographie-Analyse eine Meniskusdegeneration 24 Wochen nach Resektion des vorderen Kreuzbandes nachweisen (Libicher et al., 2005). Da diese Beobachtung während der Osteoarthrose-Studie nur als Nebenbefund dokumentiert wurde, fehlt aber eine Validierung dieses Tiermodells für die Erzeugung einer sekundären Meniskusdegeneration. Es bleibt festzuhalten, dass bis heute kein validiertes Tiermodell mit möglichst standardisierter Meniskusdegeneration in der Literatur beschrieben ist. Da allerdings auch bei 90-98% der Patienten mit einer Insuffizienz des vorderen Kreuzbandes Meniskusschäden diagnostiziert wurden (Papageorgiou et al., 2001; Hauger et al., 2000) und solche kernspintomographischen Befunde mit der Histologie korrelieren (Nawata et al., 1999), scheint die Resektion des vorderen Kreuzbandes im Versuchstier eine hoffnungsvolle Methode zu sein, eine sekundäre Meniskusdegeneration zu induzieren. Der Mechanismus kann wie folgt beschrieben werden: Die Resektion des vorderen Kreuzbandes führt zu einer Instabilität im Kniegelenk, worauf es bei jeder Belastung (bei Quadrupeden ca. 40% des eigenen Körpergewichtes auf den hinteren Extremitäten; Bergmann, 1997) zu einer unphysiologischen Krafteinwirkung auf die Menisken kommt. Da 60-80% der Last auf das mediale Kompartiment des Kniegelenks einwirken (Cerejo et al., 2002), wird dies mit der Zeit zu einer sekundären Degeneration des medialen Meniskus führen. Dass Faserknorpel durch Kompressionsbelastungen degenerative Veränderungen aufweist, konnte auch an der Bandscheibe gezeigt werden (Guehring et al., 2005).

Aktuelle Literatur nennt das Schwein, speziell auch das Göttingen Minipig, als ein geeignetes Modelltier, da es in vielerlei Hinsicht dem menschlichen Organismus und Metabolismus ähnelt (zur Übersicht: Gotterbarm et al., 2008, Bollen et al., 1997). Seit der Entwicklung dieser Rasse in den 1960er Jahren durch Haring et al. (1963) zielt die Zucht des Göttingen Minipig auf die Entwicklung eines

adäquaten Versuchstieres ab (z. B. genetische Uniformität, freundliches Temperament, dokumentierter Gesundheitsstatus, standardisiertes, altersabhängiges Gewicht, etc.). Der genetische Hintergrund des Göttingen Minipig liegt im vietnamesischen „Potbelly Pig“ (60%), dem „Minnesota Minipig“ (33%) und der „deutschen Landrasse“ (7%, zur Übersicht: Simianer, 2009). Auch die Struktur und der Verlauf (Aspden et al., 1985) des porcinen Strukturproteins Kollagen – der Hauptbestandteil der Menisken – ist der des Menschen am ähnlichsten, was Inter-speziesvergleiche am hyalinen Gelenkknorpel zeigten (Kääb et al., 1998). Des Weiteren ist das Schwein auch auf Grund seiner Ähnlichkeit zum Menschen bzgl. der Kreislauf- und Laborparameter (Thomsen et al., 1997), sowie des Knochenbaus und des Immunsystems (zur Übersicht: Hönig et al., 1993) seit langem als Tier in der biomedizinischen Forschung etabliert. Nicht zuletzt sprechen auch ethische Gründe für das Schwein als Versuchstier, da es als Nutztier eine weitgehende Akzeptanz erfährt. Für das Zuchttier Göttingen Minipig als Versuchstier spricht darüber hinaus die standardisierte und kontrollierte Aufzucht. Im Vergleich zum herbivoren, wiederkäuenden Fluchttier Schaf handelt es sich beim Schwein um ein omnivores, wehrhaftes Tier. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass ein Göttingen Minipig mit Resektion des vorderen Kreuzbandes nach mehreren Wochen Standzeit wohl ein mögliches Tiermodell für eine sekundäre Meniskusdegeneration wäre. Zu beachten ist, eine ausreichend lange postoperative Standzeit einzuhalten, damit eine Chronifizierung der Meniskusdegeneration ermöglicht wird. Andere chronische, degenerative Erkrankungen des Kniegelenks wie z. B. die Gonarthrose sind im Zuchtschwein häufig beobachtete Phänomene (Kielstein et al., 1987). Ob diese Zuchtschweine auch eine primäre Meniskusdegeneration aufweisen, ist nicht untersucht. Durch eine entsprechende Untersuchung wäre es möglich, die Pathophysiologie einer primären Meniskusdegeneration im Zuchtschwein mit den pathophysiologischen Veränderungen der induzierten, sekundären Meniskusdegeneration aus dem porcinen Tiermodell zu vergleichen.

2.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Schwein wird in der Literatur als innovatives Tiermodell in der biomedizinischen Forschung genannt (siehe 2.8). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung eines porcinen Tiermodells für Meniskusdegeneration. Hierbei sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- (A) Stellt das Kniegelenk des adulten Zuchtschweins ein adäquates Modell für primäre Meniskusdegeneration dar?
Gibt es degenerations-induzierte Veränderungen bezüglich des molekular-biologischen Expressionsprofils? Hat das angepasste Expressionsprofil Einfluss auf die Mikro-Struktur der Menisken?
- (B) Kann ein Großtiermodell im Schwein für induzierte, sekundäre Meniskusdegeneration etabliert werden?
Gibt es degenerations-induzierte Veränderungen im molekular-biologischen Expressionsprofil oder in der Gewebestruktur?
- (C) Zeigen sich Ähnlichkeiten der degenerativen Veränderungen zwischen den Modellen der primären und sekundären Meniskusdegeneration?
Gibt es vergleichbare Veränderungen im molekular-biologischen Expressionsprofil oder in der Gewebestruktur?

Zur Beantwortung der genannten Fragen sollten mittels Kadaverknien von adulten Zuchtschweinen die Menisken bezüglich primärer Meniskusdegeneration charakterisiert werden (A). Im Anschluss sollte ein Tiermodell im Göttingen Minipig etabliert werden, welches eine sekundäre Meniskusdegeneration entwickelt (B). Alle Menisken sollten einer umfangreichen Analyse zugeführt werden: beginnend mit einer Charakterisierung auf Genexpressions- und Protein-Ebene bis hin zur Untersuchung von Gewebestrukturen. Das hierzu benötigte breite Spektrum an grundlegenden Methoden aus der biomedizinischen Forschung wurde im Sinne der translationalen Forschung um klinische Methoden aus dem Bereich der experimentellen, bildgebenden Diagnostik ergänzt. Abschließend sollte anhand der erhobenen Daten die Beurteilung beider Modelle bezüglich der Ähnlichkeit der degenerativen Veränderungen diskutiert werden (C).

3. Material und Methoden

3.1 Lösungen

Für die in alphabetischer Reihenfolge aufgelisteten Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, Chemikalien der Firma Science Services (München, Deutschland) verwendet. Falls nicht anders vermerkt wurden die Lösungen bei 4° C gelagert.

Agarose-Gel

44,5	mM	TRIS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
10	mM	EDTA (Roth)
44,5	mM	Borsäure (Roth)

Mit Hilfe von NaOH (Roth) wurde, unter Kontrolle eines pH-Meters (inoLab, WTW, Weilheim, Deutschland), der pH-Wert auf 8,3 eingestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 1% Agarose (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), welche unter Erhitzen aufgelöst wurde. Zur Interkalation in die DNA wurden 0,1% Ethidiumbromid (Roth) zugegeben.

Cacodylatpuffer

10	mM	Natriumcacodylat
----	----	------------------

Mit Hilfe von HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde der pH-Wert auf 7,4 – 7,6 eingestellt.

DNA-Ladepuffer

10	mM	TRIS-HCl (Roth)
1	mM	EDTA (Roth)
40	%	Saccharose (Roth)
0,25	%	Bromphenolblau

EM-Fixierlösung

0,9	mM	Glutaraldehyd
3,3	mM	Paraformaldehyd
10	mM	Cacodylatpuffer

Epon

116	mL	Dodecylbernsteinsäureanhydrid
89	mL	Methylnadicanhydrid
173	mL	EM bed-812
7,6	mL	Benzyldimethylamin

Gemäß den Herstellerangaben (Science Services) wurden aus den aufgeführten Bestandteilen Stammlösungen hergestellt (Lagerung bei 4° C), aus denen dann die Fertigmischungen angesetzt wurden (Lagerung bei -20° C).

Formaldehyd-Lösung

Aus einer 37%-igen Formalin-Stammlösung (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) wurde durch Zugabe von PBS-Lösung (siehe unten) eine 4%-ige gepufferte Formaldehyd-Lösung hergestellt, welche bei Raumtemperatur gelagert wurde.

PBS-Lösung

0,55	g	Natriumdihydrogenphosphat (Roth)
8,7	g	Natriumchlorid (Roth)
2,27	g	Dinatriumhydrogenphosphat (Roth)
1	L	Aqua dest.

Mit Hilfe von NaOH (Roth) wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung der PBS-Lösung erfolgte bei Raumtemperatur.

PBS-Tween-Lösung

Für bestimmte Waschschrirte während der immunhistochemischen Färbung (siehe Protokoll) wurde die PBS-Lösung mit 0,01% des Detergenz Tween20 (Roth) versetzt, um eine bessere und für die Schnitte schonendere Waschung durchführen zu können.

PCR-Master Mix

5	µL	PCR-Buffer mit MgCl ₂ (Roche, Mannheim, Deutschland)
1	µL	dNTP-Mix (peqlab, Erlangen, Deutschland)
2,5	µL	Vorwärts-Primer (siehe Tab. 3.1)
2,5	µL	Rückwärts-Primer (siehe Tab. 3.1)
33,8	µL	Aqua depc.

Der PCR-Master Mix wurde vor der Verwendung frisch angesetzt und nur wenige Minuten auf Eis gelagert. Unmittelbar vor Beginn der PCR wurden 0,2 µL Taq-Polymerase (Bioron, Ludwigshafen, Deutschland) zugegeben.

Richardson-Färbelösung

500	mg	Azur II
500	mg	Methylenblau
500	mg	Borax
50	mL	Aqua dest.

RT-PCR-Master Mix

0,5	mM	dNTP-Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland)
1	µM	Oligo-Primer (Qiagen)
10	U	RNase-Inhibitor (Qiagen)

Der RT-PCR-Master Mix wurde vor der Verwendung frisch angesetzt und nur wenige Minuten auf Eis gelagert. Unmittelbar vor Beginn der RT-PCR wurde die Reverse Transkriptase (2 µL) zugegeben.

3.2 Medikamente

Die in alphabetischer Reihenfolge nach Wirkstoff aufgelisteten Medikamente wurden, soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur gelagert und nach den Vorgaben des zuständigen Veterinärmediziners dosiert und appliziert.

Azaperon

Das sedativ wirksame Neuroleptikum Azaperon (Stresnil, Janssen, Beerse, Belgien) wurde zusammen mit dem Anästhetikum (Ketamin) und einem weiteren Sedativum (Midazolam) zur Prämedikation vor der Narkoseeinleitung in der Dosierung 4 mg/kg Körpergewicht intramuskulär appliziert.

Buprenorphin

Das halbsynthetische Opioid Buprenorphin (Temgesic, verschiedene Hersteller) diente bei Bedarf als postoperatives Analgetikum und wurde den Schweinen in der Dosierung 0,005-0,1 mg/kg Körpergewicht intramuskulär verabreicht.

Carprofen

Das nicht-steroidale Anti-Phlogistikum Carprofen (Rimadyl Rind, Pfitzer, Berlin) diente bei Bedarf als postoperatives Analgetikum und wurde den Schweinen in der Dosierung 4 mg/kg Körpergewicht intramuskulär appliziert.

Cefazolin

Das Cephalosporin der ersten Generation Cefazolin (Basocef Trockensubstanz, Deltaselect, Pfullingen, Deutschland) wurde prophylaktisch präoperativ als Kurzinfusion intravenös (2 g/Tier) appliziert.

Fentanyl

Das synthetische Opioid Fentanyl (verschiedene Hersteller) wurde direkt postoperativ, dem narkotisierten Tier zur Analgesie intravenös appliziert (0,2 mg/Tier).

Isofluran

Das Inhalationsanästhetikum Isofluran (verschiedene Hersteller) wurde zur Aufrechterhaltung der Narkose verwendet. Auf Grund seiner muskelrelaxierenden Wirkung waren für die operativen Eingriffe keine weiteren Muskelrelaxanzen nötig. Die Erhaltungsdosis lag bei ca. 1,5 Vol.-%.

Kaliumchlorid

Zur Tötung der Schweine in tiefer Narkose wurde eine selbsthergestellte gesättigte Kaliumchloridlösung verwendet. Nach der Injektion von 20 mL Kaliumchlorid in tiefer Narkose trat nach ca. 2 Sekunden der durch die Hyperkaliämie verursachte Herzstillstand ein.

Ketamin

Ketamin (Ketavet 10%, Vet Way, Elvington, Großbritannien) ist ein Anästhetikum mit analgetischer und kataleptischer Wirkung und wurde zusammen mit dem Neuroleptikum Azaperon und dem Sedativum Midazolam zur Prämedikation vor der Narkoseeinleitung in der Dosierung 10 mg/kg Körpergewicht intramuskulär appliziert.

Midazolam

Das Sedativum Midazolam (Midazolam-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) wurde zusammen mit dem Neuroleptikum Azaperon und dem Anästhetikum Ketamin vor der Narkoseeinleitung in der Dosierung 1 mg/kg Körpergewicht intramuskulär appliziert.

Pentobarbital

Das Barbiturat Pentobarbital (Narcoren, verschiedene Hersteller) diente in einer Konzentration von 160 mg/mL als Anästhetikum bei der Narkose während der Magnetresonanztomographie und während des Röntgens. Es wurde den Schweinen in einer Dosierung von 0,5-0,7 g/h mittels eines Perfusors intravenös appliziert.

Propofol

Propofol (Propofol-Lipuro, Braun, Melsungen, Deutschland) ist ein Hypnotikum, welches bei Einleitung der Intubationsnarkose mit einer Dosierung von 1-2 mg/kg Körpergewicht intravenös appliziert wurde.

3.3 Tiere, Tierhaltung, Tierversuche und Kadaverversuche

Tiere

Die durchgeführten Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (Aktenzeichen: 35-9185.81/G-186/09). Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche muskulo-skelettal ausgewachsene Schweine (Göttingen Minipigs, Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik, Department für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität-Göttingen). Alle Schweine waren älter als 24 Monate und wogen 45-55 kg.

Tierhaltung

Die Tiere wurden eine Woche vor ihrem Operationstermin direkt vom Züchter (Versuchsgut der Georg-August-Universität Göttingen) in das Zentrum für inter-fakultäre biomedizinische Forschung der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg verbracht. Dort erfolgte die Tierhaltung in Einzel- oder Gruppenhaltung, je nach Vorgaben des Züchters, welche die bisherige Haltung berücksichtigten. Bei Bedarf (Rivalitätskämpfe in den Kleingruppen) wurden die Tiere getrennt. Die Pflege und Fütterung der Tiere erfolgte durch die örtlichen Tierpfleger nach Vorgaben der betreuenden Veterinärmediziner und Tierschutzbeauftragten.

An den ersten zehn postoperativen Tagen erfolgte zweimal täglich eine Visite, bei welcher der Allgemein- und Ernährungszustand sowie vor allem das Gangbild der Tiere beurteilt wurden und entsprechende Maßnahmen durchgeführt

wurden (z. B. Analgesie bei Schonung der operierten Extremitäten). Über den gesamten Zeitraum von der Operation bis zur Tötung der Tiere wurden Stallkarten geführt, auf welcher die Visiten, die Beobachtungen an den Tieren und die ergriffenen Maßnahmen dokumentiert wurden.

Nach dem zehnten postoperativen Tag wurden die Tiere für den Rest der Standzeit auf einen vom Tierschutzbeauftragten vorgesehenen Bauernhof verbracht, der Erfahrung in der Pflege von Versuchstieren hat. Hier wurde einmal wöchentlich eine Visite durchgeführt und auf den Stallkarten dokumentiert. Bei Bedarf konnten die Tiere jederzeit wieder in das Zentrum für interfakultäre biomedizinische Forschung verbracht werden, um ihnen eine intensivere Betreuung zukommen zu lassen.

Tierversuche und Kadaversuche

Um die Tierversuche auf das absolut notwendigste Maß zu reduzieren, wurden sämtliche Vorversuche an Kadaverknien von ausgewachsenen Schweinen, welche vom Fleischgroßhandel Straub (Schlachthof Mannheim, Deutschland) bezogen wurden, durchgeführt. Diese Kadaverknien stammten von Zuchtschweinen der Deutschen Landrasse, weshalb eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf die Göttingen Minipigs nicht immer möglich war. Aus diesem Grund wurden auch Vorversuche an Kadavern von Göttingen Minipigs durchgeführt, welche im Rahmen anderer Tierversuche getötet wurden.

Sämtliche durchgeführte Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Kadaverknien und die Tierversuche.

Tiertötung

Die Tötung der Schweine erfolgte in tiefer Narkose durch die intravenöse Injektion von gesättigter Kaliumchloridlösung. Nach der Injektion von 20 mL im Schuss war nach ca. 2 Sekunden ein hypodynamer Kreislaufstillstand zu beobachten, der im Elektrokardiogramm dokumentiert wurde.

3.4 Präparationen

Präparationstechnik: Isolation der Menisken

Die Meniskus-Isolation erfolgte stets nach gleicher Präparationstechnik: Die Kniegelenke wurden klinisch auf Ergussbildung untersucht. Die Versuchstiere wurden des Weiteren auf Hinweise eines Defekts des vorderen Kreuzbandes hin untersucht. Anschließend wurde mit dem Skalpell die Haut über dem Kniegelenk großflächig entfernt und medial der Patella wurde mit der Präparation der einzelnen Schichten bis auf die Kniegelenkscapsel begonnen. Die intakte Kniegelenkscapsel wurde mit Hilfe eines Skalpells medial der Patella eröffnet. Nach Lateralisierung der Patella erfolgte die Durchtrennung des Ligamentum patellae proximal und distal der Patella. Nach der Absetzung der Patella konnte das eröffnete Kniegelenk mit Blick auf die Kreuzbänder bzw. den Stumpf des vorderen Kreuzbandes dargestellt werden. Anschließend konnte die Sehne des Musculus extensor digitorum longus, welche durch das laterale Kompartiment des Kniegelenks läuft, durchtrennt werden. Wenn noch vorhanden, wurde das vordere Kreuzband durchtrennt. Unter zunehmender Beugung im Kniegelenk wurden das mediale und laterale Seitenband dargestellt und proximal der Menisken durchtrennt. Nach Durchtrennung des hinteren Kreuzbandes konnte der nur noch durch einen Weichteilmantel fixierte Femur soweit gebeugt werden, dass beide Menisken und das Tibiaplateau optimal dargestellt waren. Nun konnte der gesamte Gelenkknorpel auf arthrotische Veränderungen hin beurteilt werden. Oberschenkel und Unterschenkel wurden anschließend voneinander getrennt. Nach Darstellung und Durchtrennung der intermeniskalen Bänder wurde der laterale Meniskus isoliert. Im Anschluss wurde der mediale Meniskus vorsichtig vom medialen Seitenband gelöst und im Gesamten isoliert. Die beschriebene Präparation erfolgte ohne Berührung der Oberflächen der Menisken oder des hyalinen Gelenkknorpels, um Kontaminationen und die Zerstörung der Oberflächenstruktur zu verhindern. Das verwendete Präparationsbesteck wurde durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid (Merck) frei von RNase gehalten (Mülhardt, 2009; Lasch et al., 2001). Während des gesamten Präparationsprozesses wurde eine umfangreiche Fotodokumentation durchgeführt.

Es folgte nun die Aufteilung der Menisken für die diversen Analysemethoden. Es wurden jeweils aus Vorderhorn, Hinterhorn und Pars intermedia Proben für die histologische und immunhistologische Auswertung (sofortige Fixierung in 4%-igem gepuffertem Formalin) sowie für die molekularbiologische Auswertung (sofortige Asservierung in flüssigem Stickstoff) genommen.

Zeitgleich wurden Teile des Gelenkknorpels und Blöcke aus den Femurkondylen und dem Tibiaplateau herausgelöst, welche sowohl die oberflächliche Schicht des hyalinen Gelenkknorpels als auch den darunter liegenden Knochen (osteocondraler Block) enthielten. Diese Proben dienten der Untersuchung der Arthrose des entsprechenden Kniegelenks (nicht Teil dieser Dissertation).

3.5 Anästhesie und chirurgische Eingriffe

Anästhesie während der chirurgischen Eingriffe

Die Prämedikation mit Azaperon, Ketamin und Midazolam erfolgte in den Boxen der Tiere in gewohnter Umgebung durch intramuskuläre Injektion. Nach ca. 10 Minuten wurde das schlafende, spontanatmende Tier von der Gruppe getrennt und in den Operationssaal verbracht. Je eine Venenverweilkanüle (G 20; verschiedene Hersteller) wurde in die Ohrvene des linken und rechten Ohres eingeführt und fixiert. Anschließend erfolgte die intravenöse Gabe von Propofol zur Einleitung der Narkose, was die endotracheale Intubation (Tubusgröße: 6,0 mit Cuff; verschiedene Hersteller) ermöglichte. Die weiteren Vorbereitungen des Tieres (Rasur und Waschung des Operationsgebiets, Lagerung) erfolgte in einer balancierten Narkose mit Isofluran, Propofol und bei Bedarf Fentanyl. Während der gesamten Narkose wurden die Vitalparameter und die Narkosetiefe überwacht und auf einem Narkose-Protokoll dokumentiert.

Für die Entfernung der Hautfäden am zehnten postoperativen Tag wurde eine Kurznarkose im Sinne der oben beschriebenen Prämedikation durchgeführt.

Anästhesie während der Kernspintomographie und des Röntgens

Das Vorgehen bis zur endotrachealen Intubation erfolgte analog dem Vorgehen der Anästhesie bei chirurgischen Eingriffen (siehe oben). Um für die komplette Untersuchungsdauer, während der das Tier mehrfach umgelagert werden musste (Transporttrage, Untersuchungstische von Kernspintomograph und Röntgen-Apparat), einen sicheren und großlumigen venösen Zugangsweg gewährleisten zu können, wurde ein zentraler Venenkatheter in der Vena jugularis platziert (Schwarz et al., 2010). Des Weiteren wurde das Tier mit einem transurethralen Blasenkateter versorgt um spontanen Urinabgang zu verhindern (Schwarz et al., 2010). Es wurde während des gesamten Untersuchungszeitraums eine rein intravenöse Anästhesie mit Pentobarbital durchgeführt. Während der Untersuchung im Kernspintomographen wurde das Tier mittels eines Beatmungsgerätes (Servo 300A, Maquet, Rastatt, Deutschland) beatmet. Die Röntgenuntersuchung wurde am spontanatmenden Tier durchgeführt.

Während der Vorbereitungen des Tieres (Katheterisierung der Blase, Katheterisierung der Vena jugularis), der Kernspintomographie und des Röntgens wurden die Vitalparameter und die Narkosetiefe überwacht und auf einem Narkose-Protokoll dokumentiert.

Operationstechnik: Resektion vorderes Kreuzband und Kontroll-Operation

In Rückenlage auf einer Vakuummatratze erfolgte das dreimalige Abwaschen (Softasept N, B.Braun, Melsungen, Deutschland) der beiden hinteren Extremitäten und deren sterile Abdeckung. Nach der intravenösen Applikation des Antibiotikums Cefazolin wurde am linken Knie ein ca. 7 cm langer Hautschnitt von der Patella zur Tuberositas tibiae durchgeführt. Die weitere Präparation folgte dem Ligamentum patellae als Leitstruktur. Das Gelenk wurde anschließend medial des Ligamentum patellae eröffnet und die Patella bei Bedarf luxiert. Nach Resektion der Plica synovialis konnte das vordere Kreuzband dargestellt werden. Anschließend wurde das vordere Kreuzband mit einer Klemme fixiert und distal mit dem Skalpell scharf

abgetrennt. Im Anschluss erfolgte die proximale Resektion mit Hilfe eines elektrischen Arthrosektors und einem Luer. Nach erfolgter Spülung mit 60 mL sterilem Wasser erfolgte der sterile Wundverschluss der Gelenkkapsel (Vicryl-Fäden der Stärke 1), des Unterhautfettgewebes (Vicryl-Fäden der Stärke 2-0) und der Haut (Ethilon-Fäden der Stärke 2-0).

Im Anschluss erfolgte die Kontroll-Operation am rechten Kniegelenk: In analogem Vorgehen erfolgte der Hautschnitt und die Darstellung des vorderen Kreuzbandes. Anschließend wurde auch das rechte Knie mit 60 mL sterilem Wasser gespült, ohne jede weitere Manipulation an Kreuzbändern, Menisken oder Gelenkknorpel. Nach schichtweisem sterilem Wundverschluss (siehe oben) erfolgte der sterile Wundverband beider Hinterläufe.

3.6 Kernspintomographie

Hochauflösende Kernspintomographie (9,4 Tesla) isolierter Menisken

Nach der Präparation des porcinen Kniegelenks wurden die medialen Menisken isoliert (siehe 3.4). Die für die kernspintomographische Untersuchung vorgesehenen Menisken wurden unmittelbar nach der Isolation in den hochauflösenden (9,4 Tesla) Kernspintomographen (BioSpec 94/20, Bruker, Ettlingen, Deutschland) verbracht und unter Verwendung eines Protonen-Volumenresonators untersucht. Zur Darstellung der intrameniskalen Strukturen wurden coronare und transversale Schnittbilder ohne Kontrastmittel mit Hilfe einer hochauflösenden Bildgebungs-Pulssequenz (FLASH = Fast Low Angle Shot) erstellt. Da die Wasserprotonen im Meniskus eine sehr geringe transversale Relaxationszeit besitzen, wurde eine kurze Echozeit mit Hilfe einer asymmetrischen Aufnahme des Gradientenechos realisiert.

Für die Coronar-Schnitte wurden folgende Pulssequenzparameter verwendet:

Repetitionszeit / Echozeit = 400 ms / 2,46 ms

Flipwinkel = 30°

Bandbreite = 71 Hz/Pixel

Echoposition bei 10% des Datenaufnahme-Intervall, Mittelungen = 6

Anzahl der Schichten = 19, Schichtdicke = 0,5 mm

Bildausschnitt (x,y) = 31 x 42 mm²

Matrixgröße = 700 x 700, Pixelgröße = 44 x 60 x 500 µm³

Gesamtmesszeit = 28 Minuten.

Für die Transversal-Schnitte wurden folgende Pulssequenzparameter verwendet:

Repetitionszeit / Echozeit = 400 ms / 2,21 ms

Flipwinkel = 30°

Bandbreite = 71 Hz/Pixel

Echoposition bei 10% des Datenaufnahme-Intervall, Mittelungen = 6

Anzahl der Schichten = 19, Schichtdicke = 0.5 mm

Bildausschnitt (x,y) = 28 x 20 mm²

Matrixgröße = 450 x 450, Pixelgröße = 40 x 44 x 500 µm³

Gesamtmesszeit = 28 Minuten.

Durch die naturgemäße leichte Variation der Größe der Menisken war es erforderlich den Bildausschnitt individuell anzupassen. Durch die Anpassung ergab sich eine geringe Variation in der Pixelgröße (< 5 µm in x-y-Richtung) und der Echozeit (< 0,2 ms).

Kernspintomographie (3 Tesla) der Versuchstiere

Vor der Tötung der Versuchstiere wurden diese in intravenöser Narkose (siehe oben) in einen Hochfeld-Kernspintomographen (3 Tesla, Magnetom Trio, Siemens, Erlangen, Deutschland) verbracht. Es wurden aus der Humanmedizin bekannte Standardsequenzen optimiert und angepasst: Nach der Durchführung einer Lokalisierungssequenz wurde der Bereich für die weiteren kernspintomographischen Untersuchungen so eingegrenzt, dass sowohl die Menisken, als auch der Gelenkknorpel von Femur und Tibia beurteilt werden konnten. Es wurde dann die sagittal und coronar angulierte protonendichte-gewichtete Sequenz „ProtonDensity fat-saturated“ mit 3 mm Schichtdicke angefertigt.

Im Anschluss erfolgte eine weitere Bildgebung mittels Sequenzen, welche eine spezifische Beurteilung des hyalinen Gelenkknorpels erlauben (nicht Teil der hier vorgestellten Ergebnisse).

3.7 Röntgen

Röntgen der Kadaverknie

Vor der Präparation (siehe 3.4) wurden alle Kadaverknie im anterior-posterioren Strahlengang mittels eines Kabinen-Röntgengerätes (43855A, faxitron x-ray Corporation, Illinois, USA) mit einer Röhrenspitzenspannung von 70 kV und einer Belichtungszeit von 3 Sekunden geröntgt. Die entstandenen Röntgenbilder wurden digitalisiert.

Röntgen der Versuchstiere

Nach der Kernspintomographie der Versuchstiere (siehe oben) wurden beide Kniegelenke der narkotisierten Tiere unter Verwendung eines Röntgengerätes (DigitalDiagnost, Philips, Hamburg, Deutschland) sowohl im anterior-posterioren als auch im seitlichen Strahlengang geröntgt. Der Fokus-Abstand betrug 1,3 m, die

anliegende Röntgenröhrenspannung 66 kV. Die Belichtungszeit variierte und wurde automatisiert durch das Röntgengerät festgelegt.

Die anterior-posteriore Aufnahme erfolgte unter manuellem Zug der jeweiligen Extremität.

3.8 Molekularbiologie

Isolierung der Ribonukleinsäuren

Nach der Präparation des porcinen Kniegelenks wurden die medialen Menisken isoliert (siehe 3.4). Die für die molekularbiologische Analyse vorgesehenen Menisken wurden mit Hilfe eines Skalpells mechanisch zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung der Ribonukleinsäuren wurden die gefrorenen Meniskusstücke in 2 mL/g Trizol (Invitrogen) aufgenommen und unter Kühlung mit ca. 20.000 Umdrehungen pro Minute mechanisch homogenisiert (Polytron PT 3000, Kinematica AG, Luzern, Schweiz). Nach kurzem Abzentrifugieren der Gewebereste wurde der Überstand in 200 μL /1 mL Trichlormethan (Roth) aufgenommen. Nach der Zentrifugation (15 Minuten bei 12.000 Umdrehungen/Minute, Z 233 MK, Hermle, Gosheim, Deutschland) zeigte sich die Trennung der Desoxyribonukleinsäuren von den Ribonukleinsäuren (wässrige Phase, Überstand). Zur Fällung der Ribonukleinsäuren wurde die wässrige Phase in 0,5 mL/mL 100% Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Nach zehnmünütiger Zentrifugation bei 12.000 Umdrehungen/Minute fand sich die gefällte Ribonukleinsäure im Pellet wieder. Nach Verwerfung des Überstands wurde das Pellet aus Ribonukleinsäure zur Waschung in 75% Ethanol (Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland; 1 mL/mL, Roth) aufgenommen und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 7.500 Umdrehungen pro Minute). Der ethanolhaltige Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Trocknung in 100 μL RNase-freiem Wasser (hergestellt mit Diethylpyrocarbonat, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) aufgenommen und durch dreiminütiges Trituieren bei 50°C gelöst. Alle genannten Aufbereitungsschritte wurden unter ständiger Kühlung und mit gekühlten Lösungen durchgeführt.

Aufreinigung der Ribonukleinsäuren

Die Aufreinigung der isolierten Ribonukleinsäuren erfolgte mit den Chemikalien des RNeasy Mini Kit (Qiagen) und folgte dem beiliegenden Hersteller-Protokoll: 100 µL der mRNA-Lösung wurden in 350 µL RLT-Puffer (versetzt mit β-Mercaptoethanol: 140 mM) und 250 µL 96%-igem, unvergälltem Ethanol (Roth) aufgenommen und auf die Reinigungssäule verbracht. Nach 15 Sekunden Zentrifugation (5415 D, Eppendorf, Wesseling, Deutschland) bei 10.000 Umdrehungen pro Minute befand sich die mRNA im Filter der Reinigungssäule als stationäre Phase. Es folgte die zweimalige Waschung dieser gebundenen mRNA mit 500 µL RPE-Puffer als mobile Phase für 15 bzw. 120 Sekunden (bei 10.000 Umdrehungen pro Minute). Abschließend wurde die gebundene mRNA mit 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert (60 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen pro Minute). Diese Eluierung wurde nochmals mit dem Eluat wiederholt. Alle genannten Aufbereitungsschritte wurden unter Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde eine 1:10-Verdünnung der aufgereinigten Ribonukleinsäurelösung angefertigt und die mRNA-Konzentration in der Lösung fotometrisch (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Des Weiteren wurde der Absorptionsquotient der Wellenlängen $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum für Proteine) fotometrisch bestimmt, um auf die Verunreinigung der mRNA-Lösung mit Proteinen zu schließen.

Erstellung der Standards für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Als Referenz-Standards für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) dienten mRNA-Proben von Schweinen aus den untersuchten Gruppen. Die Isolation und Aufreinigung der Ribonukleinsäuren erfolgte wie oben beschrieben.

Um die aus den Menisken isolierte und aufgereinigte mRNA in cDNA umzuschreiben und zu vervielfältigen, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Alle dazu benötigten Chemikalien sowie das Protokoll des RT-PCR-Ablaufs stammten aus dem Sensiskript RT Kit (Qiagen): Es wurde von jedem

Meniskus 100 – 400 ng mRNA eingesetzt, welche mit dem RT-PCR-Master Mix und mit 4 µL Puffer-Lösung versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µL aufgefüllt wurden. Während allen beschriebenen Vorbereitungsschritten wurden alle Chemikalien sowie die mRNA-Lösung auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die RT-PCR auf einem Heizblock (DB-3D, Techne, Staffordshire, Großbritannien) für 60 Minuten bei 37° C. Die erhaltenen DNA-Produkte dienten als Ausgangsprodukt für die folgende PCR.

Jeweils 5 µL der aus der RT-PCR gewonnenen cDNA-Lösung wurden mit dem PCR-Master Mix versetzt. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die im PCR-Master Mix verwendeten Primer. Alle zur PCR benötigten Chemikalien sowie die cDNA-Lösung wurden auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die PCR im Thermal Cycler (2720, Applied Biosystems, Lincoln, USA bzw. Dyad, Bio-Rad, München, Deutschland) nach folgendem Protokoll: Nach der initialen Denaturierung (Melting) für fünf Minuten bei 94° C folgten 40 Zyklen mit einer erneuten kurzen Denaturierung (1 Minute bei 94° C), der Primerhybridisierung (Annealing, 30 Sekunden, Annealing-Temperatur siehe Tab. 3.1) und der Elongation (Extending, 30 Sekunden bei 72° C). Nach Beendigung aller 35 Zyklen erfolgte eine Nachelongation für weitere zehn Minuten bei 72° C. Die PCR-Produkte wurden mit 2 µL Ladepuffer vermischt und gemeinsam mit 5 µL Marker (DNA-Ladder, Invitrogen) auf ein 3%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese in der Gelelektrophoresekammer (E835, Consort, Turnhout, Belgien) für 45 Minuten bei 85 V wurde die Reinheit der PCR-Produkte kontrolliert und mit Hilfe des Gel Jet Imager (INTAS, Göttingen, Deutschland) fotodokumentiert. Anschließend wurden die gen-spezifischen Banden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgetrennt und in 600 µL QG-Puffer (Qiagen) pro 100 mg Gel aufgenommen. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel wurden die Chemikalien und das Ablaufprotokoll des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) benutzt: Verflüssigung des Agarose-Gels durch zehnminütiges Erhitzen (50° C) auf dem Heizschüttler (TM 130-6, HLC, Bovenden, Deutschland), Zugabe von 100 µL Isopropanol (Roth) pro 100 mg Agarose-Gel zur Verbesserung der DNA-Ausbeute über die Reinigungssäule und anschließende Zentrifugation (eine Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute). Zugabe von 500 µL QG-Puffer (eine Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute) zum Ausspülen

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Vorwärts (V)- und Rückwärts (R)-Primer (MWG, Ebersberg, Deutschland), ihre Sequenzen (alle in 5'–3'-Richtung), die erwartete Produktgröße (PG), die Annealing-Temperatur (AT) und die dazugehörige Literatur.

Gen		Primer-Sequenz	PG	AT	Literatur
Aggrekan	Agc-1	V: TTCCCTGAGGCCGAGAAC R: GGGCGGTAATGGAACACAAC	194 bp	56° C	Zou et al., 2007
β-Actin	β-Actin	V: CAA GGA GAA GCT CTG CTA CG R: AGA GGT CCT TCC TGA TGT CC		56° C	Steck et al., 2009
Decorin	DCN	V: GCCAGAGAAAATGCCAAAAC R: GTGCCAAGTTCTACGACGAT		56° C	Jung et al., 2005
Interleukin-1β	IL-1β	V: CAGCCATGGCCATAGTACCT R: CCACGATGACAGACACCATC	216 bp	57° C	Tayade et al., 2006
Interleukin-8	IL-8	V: TGCAGCTTCATGGACCAG R: TGTTGCTTCTCAGTTCTCTTC	350 bp	52° C	Ramjeet et al., 2005
Kollagen-1	Col-1A1	V: CCAACAAGGCCAAGAAGAAG R: ATGGTACCTGAGGCCGTTCT	64 bp	54° C	Gredes, 2007
Kollagen-2	Col-2A1	V: CACGGATGGTCCCAAAGG R: ATACCAGCAGCTCCCCTC T		54° C	Steck et al., 2009
Lubricin	Prg-4	V: AGAAAACCCGATGGCTATGA R: TCGCCCATCAGTCTAAGGAC		56° C	Kamiya et al., 2010
MMP-2	MMP-2	V: GGCTTGTCACGTGGTGTCACT R: ATCCGCGGCGAGATCTTCT		58° C	Zeni et al., 2007
MMP-3	MMP-3	V: AATGATCACTTTTGCAGTTCGAGAA R: GGCATGAGCCAAAACCTTTTCC		56° C	Zeni et al., 2007
MMP-8	MMP-8	V: CTTTTGATGCAGAAGAAATATGG R: CATGAGCAGCAACAAGAAACA	70 bp	52° C	Gredes, 2007
MMP-9	MMP-9	V: GAAGCTTTAGAGCCGGTTCCA R: GGCAGCTGGCAGAGGAATATC		58° C	Zeni et al., 2007
MMP-13	MMP-13	V: TTGATGATGATGAAACCTGGA R: ACTCATGGGCAGCAACAAG	69 bp	52° C	Gredes, 2007
SOX-9	SOX-9	V: CCGGTGCGCGTCAAC R: TGCAGGTGCGGGTACTGAT	119 bp	56° C	Zou et al., 2007
VEGF	VEGF	V: GAGACCAGAAACCCACGAA R: GCACACAGGACGGCTTGAA	138 bp	57° C	Zhou et al., 2009

von Resten des Agarose-Gels. Anschließend Waschung mit 750 μL PE-Puffer (eine Minute bei 13.000 Umdrehungen pro Minute), Trocknung (Leerzentrifugation) und Eluation in 50 μL RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im Eluat fotometrisch (infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

Zur Erstellung der Standardkurven der qPCR wurden nun fünf verschiedene Verdünnungen der DNA-Produkte hergestellt (1:10-Verdünnungen von 2 $\text{pg}/\mu\text{L}$ bis 0,0002 $\text{pg}/\mu\text{L}$). Jeweils 1 μL dieser DNA-Verdünnungen wurde zusammen mit 25 μL Master-Mix (QuantiTect SYBR-Green PCR Kit, Quiagen) versetzt, welcher bereits mit dem asymmetrischen Cyanin-Farbstoff SYBR-Green I versetzt ist, welcher an der DNA interkaliert. Nach Zugabe von jeweils 1 μL Vorwärts- und Rückwärtsprimer (siehe Tab. 3.1) und 22 μL Wasser (Aqua depc.) wurden die Proben in den qPCR-Cycler (Mx3005, Stratagene, Waldbronn, Deutschland) verbracht. Die qPCR erfolgte nach folgendem Protokoll: Nach der einmaligen Foto-Aktivierung des Farbstoffs (15 Minuten bei 95°C) begannen die 40 Zyklen mit jeweils Denaturierung (15 Sekunden bei 94°C), Annealing (30 Sekunden, Annealing-Temperatur siehe Tab. 3.1) und Elongation (30 Sekunden bei 72°C).

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die zu untersuchenden mRNA-Proben wurden wie oben beschrieben gewonnen und isoliert. Anschließend erfolgte die Umschreibung in cDNA wie oben beschrieben (Primer siehe Tab. 3.1). Jeweils 2 x 100 ng dieser cDNA dienten dann als Ausgangsprodukt für die quantitative PCR (doppelter Ansatz), die nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt wurde.

Neben dem doppelten Ansatz der zu untersuchenden cDNA-Proben, wurden auch die quantitative Bestimmung des Referenzgens β -Actin in Doppelbestimmung durchgeführt. Des Weiteren erfolgten bei jeder quantitativen PCR auch Negativkontrollen durchgeführt, indem der cDNA-Anteil der entsprechenden Probe durch Wasser ersetzt wurde.

3.9 Elektronenmikroskopie

Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die hier verwendete, etablierte Prozedur der Fixierung und Einbettung der Präparate orientiert sich an der von Luft (1961) beschriebenen und von Glauert (1974) angepassten Methode der Einbettung in Epoxidharzen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung. Sämtliche Präparate zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden in der EM-Fixierlösung (siehe 3.1) für mindestens sieben Tage bei 4°C gelagert und fixiert. Anschließend wurde das Präparat drei Mal für jeweils 10 Minuten in Cacodylatpuffer gewaschen. Zur Kontrastierung wurde das Präparat nun für zwei Stunden in 2%-iger Osmiumtetroxid-Lösung (Science Services) im Dunkeln inkubiert. Nach viermaligem Waschen in destilliertem Wasser für jeweils fünf Minuten erfolgte die Entwässerung. Hierzu wurde das Präparat mit einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) für jeweils 30 Minuten behandelt. Die Trocknung des Präparats erfolgte im Anschluss mittels 100%-igem Aceton (3 x 30 Minuten). Danach wurden die Präparate in ein Aceton-Epon-Gemisch (siehe 3.1) überführt. Hierbei nahm die Epon-Konzentration ständig zu (Aceton:Epon = 3:1, 1:1, 1:3 für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur). Anschließend erfolgte die endgültige Einbettung in reinem Epon; für eine Stunde bei 40°C (zur Verdampfung des Acetons) und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Nach Überführung der eingebetteten Präparate in die Schneidformen wurden sie im Wärmeschrank (48 Stunden, 60°C) auspolymerisiert.

Von den in Epon eingebetteten und auspolymerisierten Präparaten wurden mittels eines Mikrotoms (EM UC7, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit Diamantmesser Semi-Dünnschnitte (0,5 µm) angefertigt und im Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Nach dem Verdampfen des Wassers (zehn Minuten bei 80°C) wurden die Semi-Dünnschnitte für die orientierende, lichtmikroskopische Untersuchung mittels einer Richardson-Färbelösung (Richardson, 1960) angefärbt.

Anschließend wurden wie oben beschrieben Ultra-Dünnschnitte (70 - 75 nm) angefertigt und auf Pioloform-beschichtete Kupfer-Gitter (Science Services) aufgezogen. Die Nachkontrastierung erfolgte durch Bleicitrat (Science Services).

Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie

Die Fixierung in EM-Fixierlösung und die Waschung in Cacodylatpuffer erfolgte analog der Fixierung der Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie. Die anschließende Kontrastierung des Präparats erfolgte für vier Stunden in 2%-iger Osmiumtetroxid-Lösung (Science Services). Nach viermaligem Waschen in destilliertem Wasser für jeweils fünf Minuten erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) für jeweils 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde das Präparat im Kritischen-Punkt-Trockner (CPC7501, Quorum, Kent, Großbritannien) in Aceton gegeben, welches auf ca. 8 °C abgekühlt wurde. Dann erfolgte der Austausch des Acetons durch flüssiges Kohlenstoffdioxid (CO₂) und das Erreichen des kritischen Punkts für CO₂ bei 80 bar und 37 °C, an dem das flüssige CO₂ ohne Phasenübergang in die Gasform übergeht (Verhinderung der Oberflächenspannung des Präparats). Nach der Normalisierung des Drucks auf atmosphärischen Druck wurde das Präparat mittels Leit-C (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Großbritannien) auf dem Probenhalter fixiert und auf den rotierenden Teller des Sputter Coater (SC7640, Quorum, Guelph, Kanada) überführt. Durch den Beschuss mit Argon erfolgte das Sputtern von Platinionen, welche das Präparat dann überziehen.

Elektronenmikroskope

Die beschriebenen Untersuchungen wurden zum einen mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops TECNAI BioTwin 10 (FEI, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt, welches mit der MegaView III-Kamera (Olympus, Münster, Deutschland) ausgestattet war, zum anderen mit dem Rasterelektronenmikroskop XL 30 ESEM FEG (FEI). Zusätzlich verfügt dieses Rasterelektronenmikroskop über die Technik der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDS), welche eine Analyse der Elementzusammensetzung des Präparates erlaubt, indem die element-spezifischen Röntgenstrahlen analysiert werden, welche das Präparat nach dem Beschuss durch einen Elektronenstrahl abgibt.

3.10 Histologie

Nach der Isolation der porcinen Menisken (siehe 3.4) wurde jeweils aus Vorderhorn, Pars intermedia und Hinterhorn ein ca. 5 mm breiter Block isoliert, welcher nach mindestens 72 Stunden Lagerung in Formalin (10%) in Biopsie-Einbettkassetten (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) überführt wurde. Anschließend erfolgte die automatisierte Entwässerung und Paraffin-Infiltration im Gewebefiltrationsautomat (TP1020, Leica, Wetzlar, Deutschland) nach folgendem Protokoll: Formalin 10% (2 Mal 1,5 Stunden), Alkohol (70%, 80%, 96%, jeweils 1,5 Stunden), Alkohol 100% (2 Mal 1,5 Stunden), Xylol (J. T. Baker, Deventer, Niederlande; 2 Mal 1,5 Stunden), Paraffin (3 Mal 1,5 Stunden). Anschließend erfolgte mit Hilfe einer Paraffingießstation (EG1140C, Leica) die Einbettung der mit Paraffin infiltrierten Proben in 65 °C warmem Paraffin. Nach Aushärtung der Paraffin-Blöcke wurden die Proben mit einem Rotationsmikrotom (RM2165, Leica) in 7 µm dicke Schnitte geschnitten und auf gebrauchsfertige Objektträger aufgezogen (SuperFrost Plus, R. Langenbrick, Emmendingen, Deutschland). Anschließend erfolgte die Entparaffinisierung in absteigender Alkoholreihe (Xylol 100% für 10 Minuten, Ethanol 100%, 90%, 80%, 70% für jeweils 5 Minuten, Wasser für 5 Minuten).

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Entparaffinisierung nach oben beschriebenem Protokoll und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgten in einem Färbeautomat (AutoStainerXL, Leica, Wetzlar, Deutschland). Nach der Entparaffinisierung erfolgte die Blau-Färbung der basophilen Strukturen (z. B. Zellkerne) in Mayers Hämatoxylin-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 Minuten. Nach 15-minütiger Spülung mit Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung der azidophilen Strukturen (z. B. Zellplasmaproteine, Zytoplasma, Kollagen) mit Eosin (Roth) für 3 Minuten. Anschließend erfolgte die Spülung mit Wasser (für 30 Sekunden) und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 96%, 2 Mal 100% für jeweils 2 Minuten, Xylol 100% für 5 Minuten). Die Konservierung aller histologischen Präparate erfolgte mit Hilfe des Verschlussmediums Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland).

Safranin O-Färbung

Nach der oben beschriebenen Entparaffinisierung erfolgte die Färbung der Zellkerne in Weigerts Hämatoxylin-Lösung (Roth) für 8 Minuten. Nach 10-minütiger Spülung mit Leitungswasser erfolgte eine Färbung des Gewebes mit FastGreen (Merck) für 5 Minuten und eine Differenzierung in schwacher Essigsäure (Merck; 1% für 5 Sekunden). Anschließend erfolgte die spezifische Anfärbung der Proteoglykane (Rosenberg, 1971) mit Safranin O (Sigma-Adrich; 0,1%). Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe gespült (Ethanol 70%, 80%, 90%, 2 Mal 100%, für jeweils 2 Minuten, Xylol 100% für 5 Minuten) und konserviert (Eukitt, O. Kindler GmbH).

Sirius Red-Färbung

Nach der oben beschriebenen Entparaffinisierung erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Weigerts Hämatoxylin-Lösung (Roth) für 6 Minuten. Nach 10-minütiger Spülung mit Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung der Kollagenfasern (Junqueira et al., 1979) mit Picrosiriusred (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 60 Minuten. Anschließend erfolgte die Spülung mit schwacher Essigsäure (0,5% 2 Mal für 5 Sekunden) und Alkohol (3 Mal Ethanol 100% für 3 Minuten, Xylol 100% für 5 Minuten). Die Konservierung erfolgte durch Eukitt (O. Kindler GmbH).

3.11 Immunhistochemie

Die Herstellung der für die Immunhistochemie benötigten Querschnitte aus Vorderhorn, Pars intermedia und Hinterhorn erfolgte analog zur Herstellung der Schnitte für die histologische Auswertung (siehe 3.10). Zu jedem einzelnen Meniskusquerschnitt wurde ein Kontrollschnitt in gleicher Weise mitbehandelt, ohne allerdings mit dem primären Antikörper für Kollagen-1 (Anti-Human von Maus, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) inkubiert zu werden.

Die Entparaffinisierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (2 Mal Xylol 100% für 5 Minuten, Ethanol 100%, 90%, 80%, 70%, 50% für jeweils 5 Minuten). Anschließend erfolgte die Überbringung der Objektträger in eine Dunkel- und Feuchtekammer, was sowohl das Austrocknen der Meniskusquerschnitte, als auch eine Lichteinwirkung verhindern sollte. Umrandung der Meniskusschnitte mit Liquid Blocker (Vector Laboratories, Burlington, Kanada) und eine 5-minütige Waschung mit PBS-Tween-Lösung. Anschließend erfolgte der enzymatische Andauungs-Prozess mit Hyaluronidase (30 Minuten bei 37°C; 1,5 U/mL in PBS, jeweils 100 µL pro Schnitt). Nach erneutem Waschen in mit 0,3%-igem Wasserstoffperoxid (Merck) versetztem Methanol und drei Waschgängen in PBS-Tween-Lösung (für jeweils 5 Minuten) wurde die Waschlösung abgenommen und die Schnitte mit Blockierungs-Lösung (BSA, Sigma-Aldrich) versehen (100 µL pro Schnitt, 80 Minuten). Nach Abnehmen der Blockierungs-Lösung wurde der primäre Kollagen-1-Antikörper (Verdünnung: 1:100; 100 µL pro Schnitt) zugegeben und 70 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (alternativ: 12-14 Stunden bei 4°C). Der primäre Antikörper wurde im Anschluss mit drei Waschgängen in PBS-Tween-Lösung (für jeweils 5 Minuten) ausgewaschen und mit dem biotinierten sekundären Antikörper (Vectastain, Vector Laboratories; Verdünnung: 1:100 in Tris20 gepuffertem BSA) versehen (100 µL pro Schnitt, 50 Minuten). Im Anschluss erfolgte die Auswaschung des sekundären Antikörpers in PBS-Tween-Lösung (3 Mal für jeweils 5 Minuten). Nach der 30-minütigen Inkubation der an Avidin gebundenen Peroxidase (Vectastain; 50 µL pro Schnitt) bildete sich der Avidin-Biotin-Komplex. Es folgte die zweimalig Waschung in PBS-Tween-Lösung (jeweils 5 Minuten) und eine 5-minütige Waschung in PBS-Lösung, bevor die Schnitte für 4 Minuten mit dem Chromogen Diaminobenzidin (Vector Laboratories; 100 µl pro Schnitt) inkubiert wurden. Diaminobenzidin dient als Substrat der Peroxidase, welche sich am Komplex aus primärem und sekundärem Antikörper, sowie dem Avidin-Biotin-Komplex befindet und wird von dieser oxidiert. Es bildet sich ein unlösliches, stabiles braunes Präzipitat, welches in der Durchlichtmikroskopie detektiert werden kann. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden nun für 5 Minuten unter fließendem Wasser gereinigt, bevor sie in eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 100% für jeweils 5 Minuten, Xylol 100% für 10 Minuten) überführt wurden. Abschließend erfolgte die Eindeckelung mittels des Verschlussmediums Eukitt (O. Kindler GmbH).

3.12 Auswertung der Daten

Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung sämtlicher histologischer und immunhistochemischer Präparate erfolgte verblindet. Die angefertigten histologischen Präparate wurden mittels Durchlichttechnik ausgewertet. Das verwendete Mikroskop (DMRE, Leica, Wetzlar, Deutschland) war durch eine Kamera (DFC 300 FX, Leica) mit dem Analyse-Computer (DELL, Frankfurt, Deutschland) verbunden. Mit Hilfe der verwendeten Analyse-Software QWin Standard (Leica) erfolgte die Dokumentation durch das Erstellen repräsentativer digitaler Bilder. Die zusätzliche Software QGo (Leica) erlaubt das Aufnehmen von Mosaikaufnahmen. Hierbei werden durch einen vom Computer angesteuerten motorisierten Objektisch mehrere Bilder eines Präparates angefertigt, welche dann mosaikartig zusammengesetzt werden. So konnten Übersichtsaufnahmen des gesamten Meniskusquerschnitts angefertigt werden. Zur Beurteilung der mit Sirius Red gefärbten Schnitte wurden ein Polarisator und ein Analysator (Leica) in den Strahlengang eingebracht.

Tab. 3.2: Verwendeter Histologie-basierter Meniskus-Degenerationsscore nach Krenn et al. (2010a) und Raunest et al. (1994).

Grad	Histologischer Befund (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)
0	- Chondrozyten in homogen gefärbter Matrix
1	- Geringe Reduzierung der Zellularität oder kleine Bereiche mit reduzierter Zellularität - Variable Färbungsintensität der Matrix - kleine Spalten in der Matrix oder diskrete Foci mukoider Degeneration
2	- mäßige Reduzierung der Zellularität oder große Bereiche mit reduzierter Zellularität - variables Aussehen (Größe und Form) der Chondrozyten - mäßige Spalten in der Matrix oder bandartige mukoide Degeneration
3	- starke Reduzierung der Zellularität - basophile Matrixfärbung oder mukoide Degeneration - große pseudozystische Spalten und Risse (Separation des Faserknorpels) - große Bereiche ohne Chondrozyten

Die mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbten meniskalen Querschnitte wurden zur Bestimmung des Degenerationsgrades der Menisken herangezogen. Mittels eines für den Meniskus entwickelten vierstufigen Scoring-Systems (Krenn et al., 2010a; Raunest et al., 1994) erfolgte anhand der Beurteilung der Grundsubstanz des Gewebes (Matrix), der Zellularität und der Spaltenbildung die Einteilung in den entsprechenden Degenerationsgrad (Tab. 3.2).

Die mit Safranin O gefärbten meniskalen Querschnitte dienten der Beurteilung der Verteilung der Proteoglykane im Meniskus (Rosenberg, 1971). Die für Kollagene spezifische Färbung mit Sirius Red (Junqueira et al., 1979) lässt einen Rückschluss auf die Anordnungen der intrameniskalen Kollagenfasern und deren Durchmesser zu (Kaemmer et al., 2010; Flint et al., 1984).

Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemischen Querschnittspräparate erfolgte am Durchlichtmikroskop DMRE (siehe Auswertung Histologie).

Auswertung der kernspintomographischen Darstellung

Eine Verblindung der Auswertung der kernspintomographischen Aufnahmen war nicht möglich, da auf Grund des fehlenden vorderen Kreuzbandes die operierte Seite klar zu identifizieren war. Die digital zur Verfügung stehenden kernspintomographischen Aufnahmen des porcinen Kniegelenks (3 T-Aufnahmen) wurden am Computer ausgewertet. Es wurde auf das Vorhandensein und gegebenenfalls auf die Integrität des vorderen und hinteren Kreuzbandes, sowie auf die Stellung der Tibia im Verhältnis zum Femur (Schubladenphänomen) geachtet. Die Vorder- und Hinterhörner, sowie die Pars intermedia aller Menisken wurden auf degenerative Veränderungen hin untersucht. Hierzu erfolgte eine kernspintomographisch gestützte Einteilung des Degenerationsgrades mit Hilfe der fünfstufigen Einteilung nach Raunest et al. (1994, Tab. 3.3). Die genannte Befundung wurde an Hand der protonendichte- gewichteten coronaren und sagittalen Schnittbilder durchgeführt.

Tab. 3.3: Einteilung des meniskalen Degenerationsgrades auf Grund des MRT-Befundes (nach Raunest et al., 1994)

Grad	MRT-Befund
0	homogen, schwache Signalintensität
I	lokale, punktförmige Zunahme der Signalintensität in einer Schicht, ohne Verbindung zur Meniskusoberfläche
IIa	Einige punktförmige Zunahmen der Signalintensität ohne Verbindung zur Meniskusoberfläche und ohne lineare Ausbreitung
IIb	Lineare Ausbreitung der Zunahme der Signalintensität ohne Verbindung zur Meniskusoberfläche
III	Lineare oder irreguläre Zunahme der Signalintensität mit Kontakt zur Meniskusoberfläche oder Deformation/Dislokation von Fragmenten

Die digitalen Bilder der hochauflösenden Kernspintomographie (9,4 T-Aufnahmen) der isolierten porcinen Menisken wurden einer intensiven visuellen Begutachtung unterzogen. Im Anschluss erfolgte mittels der Kernspintomographie-Analyse-Software MaZda (Version 4.6, Instytut Elektroniki, Lodsch, Polen) die Textur-Analyse der coronaren Schnittbilder (Szcypinski et al., 2009). Hier wurden Texturparameter, welche der Charakterisierung des Bildes dienen, bestimmt (Schad et al., 1993). Der Analyse-Bereich umfasste stets den gesamten Meniskus-Querschnitt.

Auswertung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

Nach der Durchführung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion im qPCR-Cycler (Mx3005, Stratagene) wurden die gewonnenen Rohdaten in die Software MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) überführt. Anhand der mitgeführten Kontrollproben (Wasser und Standard-Konzentrationen des untersuchten Gens sowie des Referenzgens β -Actin) und den einzelnen Schmelzkurven wurde die Qualität der qPCR evaluiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Standardkurve für das zu untersuchende Gen der mittlere (Doppelbestimmung) DNA-Gehalt errechnet und auf den DNA-Gehalt des Referenzgens β -Actin normalisiert.

Auswertung der Rasterelektronenmikroskopie

Die digital zur Verfügung stehenden rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden einer intensiven visuellen Begutachtung unterzogen, bei der vor allem auf Oberflächenbeschaffenheit, Oberflächenstruktur und Oberflächenauflagerungen geachtet wurde.

Auswertung der Röntgenbilder

Die digital und als Röntgenfilm zur Verfügung stehenden Röntgenbilder wurden auf typische osteoarthrotische Veränderungen (Kellgren et al., 1963) hin beurteilt: Formation von Osteophyten am gelenknahen Knochen, Bildung von Pseudozysten im subchondralen Knochen und subchondrale Sklerosierung. Die Beurteilung eines evtl. verschmälerten Kniegelenkspaltes war nicht möglich, da die Röntgenbilder unter Zug des Hinterlaufs erstellt wurden.

Auswertung der Transmissionselektronenmikroskopie

Von den erstellten Ultra-Dünnschnitten (siehe oben) wurden jeweils zwei Schnitte pro Meniskus verblindet am Transmissionselektronenmikroskop begutachtet und nach dem von Gelber et al. (2008) veröffentlichten Scoring-System beurteilt. Hier können für die Erhaltung der Periodizität und die Packungsdichte der Kollagenfasern zwischen 0 und 2 Punkten vergeben werden. Des Weiteren wird Variabilität der Fibrillengröße mit niedrig (0 Punkte) oder hoch (1 Punkt) bewertet. Auch die Entstehung eines intrafibrillären Ödems (1 Punkt) und die nicht mehr vorhandene Querstreifung der Kollagenfasern (1 Punkt) fließen in dieses Scoring-System ein. Anschließend erfolgte die graduelle Einteilung jedes einzelnen Meniskus in verschiedene Degenerationsstufen: Degeneration 1. Grades (0-2 Punkte), Degeneration 2. Grades (3-4 Punkte) und Degeneration 3. Grades (5-7 Punkte). Diese Auswertung wurde durch das Erstellen von repräsentativen digitalen Bildern dokumentiert.

3.13 Fallzahlplanung und statistische Auswertung

Fallzahlplanung

Die für den Tierversuchsantrag benötigte Fallzahlplanung wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg durchgeführt: Der mittels der kernspintomographischen Darstellung bestimmte meniskale Degenerationsgrad diente als führender Zielparameter bei den Tierversuchen. Dieser wird durch ein fünfstufiges Scoring-System ermittelt (siehe Tab. 3.3). Ab Grad IIa wird der Meniskus als degeneriert angesehen. Im Vergleich zum gesunden Meniskus (Grad 0) ergibt sich also ein Unterschied von zwei Einheiten. Um mit dieser Konstellation bei einem üblichen Signifikanzniveau von 5% (Biau et al., 2008) eine Abschätzung der Teststärke (Power) von 80% zu erhalten, wurde mittels einseitigem t-Test eine Fallzahl von $n = 8$ Tieren errechnet.

Sowohl für den Pilot- als auch für den Hauptversuch wurden Ersatztiere eingeplant, die nur dann in den Versuch eintreten, falls ein sich bereits im Versuch befindliches Tier ausscheidet. Dies kann z. B. bei akuten Erkrankungen der Fall sein, die unabhängig von dem durchgeführten Eingriff auftreten (z. B. Verletzungen, Infektionen, Tod).

Statistische Auswertung

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mit Hilfe der Software WinSTAT (Fitch Software, Staufeu, Deutschland) für MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt.

Sämtliche erhobene Messdaten waren dem Intervall- oder Verhältnisniveau zuzuordnen. Die Testung der Messdaten auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogoroff-Smirnow-Test für stetige Variablen und mittels Chiquadrat-Test für diskrete Variablen. In der deskriptiven Statistik werden die normalverteilten Messdaten durch ihren Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt

(Balkendiagramm). Die beliebig-verteilten Messdaten werden durch den Median und das 25%- sowie das 75%-Quartil dargestellt (Punktdiagramm). Für die schließende Statistik wurden alle zu vergleichenden Gruppen als unabhängig interpretiert, sodass als parametrischer Test für die normalverteilten Stichproben der t-Test nach Student herangezogen werden konnte (Zoefel, 1992). Für die beliebig verteilten Stichproben wurde der parameterfreie U-Test nach Mann und Whitney verwendet (Zoefel, 1992). Für die durchgeführten statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau ($\alpha = 5\%$) festgelegt. War der Signifikanzwert p eines statistischen Test größer α ($p > \alpha$) wurde der Unterschied der zu vergleichenden Gruppen als nicht signifikant (n. s.) gewertet.

Zur besseren Übersicht werden in den Abbildungen nur die Ergebnisse der statistischen Tests mit einem Signifikanzwert $p < \alpha$ dargestellt. Die vollständigen Ergebnisse der statistischen Tests werden nachfolgend in separaten Tabellen angegeben.

4. Ergebnisse

In der hier vorliegenden Studie zur Beurteilung eines porcinen Tiermodells für die Meniskusforschung sollten zuerst sämtliche Versuche zur grundlegenden Charakterisierung der primären Meniskusdegeneration an Kadaverknien (siehe 3.4) von Zuchtschweinen durchgeführt werden. Anschließend sollte im Tierversuch ein Tiermodell im Schwein etabliert werden, welches eine sekundäre Meniskusdegeneration entwickelt. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die verwendete Anzahl von Kadaverknien und Tieren.

Tab. 4.1: Übersicht über die Anzahl und Spezies der verwendeten Kadaverknien und Tiere sowie die durchgeführten Untersuchungen.

Präparat	Anzahl	Spezies	Untersuchung
Kadaverbein	4	Deutsche Landrasse	Entwicklung der Operationstechnik „Resektion des vorderes Kreuzbandes“
Innenmeniskus aus Kadavergelenk (juvenil)	8	Deutsche Landrasse	Charakterisierung Meniskusdegeneration
	8	Deutsche Landrasse	Kernspintomographie Meniskusdegeneration
Innenmeniskus aus Kadavergelenk (adult)	8	Deutsche Landrasse	Charakterisierung Meniskusdegeneration
	8	Deutsche Landrasse	Kernspintomographie Meniskusdegeneration
Tierversuche	3	Göttingen Minipig	Entwicklung eines Degenerationsmodells (Pilotversuch)
	8	Göttingen Minipig	Entwicklung eines Degenerationsmodells (Hauptversuch)

4.1 Primäre Meniskusdegeneration im porcinen Kniegelenk

Es sollte untersucht werden, ob Menisken aus makroskopisch degenerierten porcinen Kniegelenken Veränderungen im Sinne einer primären Meniskusdegeneration aufweisen. Hierzu wurden jeweils acht mediale Menisken von juvenilen (Alter ca. 5 Monate) und adulten (Alter ca. 5 Jahre) Kniegelenken analysiert. Die Kniegelenke stammten von Zuchtschweinen für die Nahrungsgewinnung. Ob diese Schweine, bei denen das Auftreten von Osteoarthrose wohl ein weitverbreitetes Phänomen ist (Kielstein et al., 1987), auch eine meniskale Degeneration aufweisen, sollte durch eine histopathologische Analyse untersucht werden.

Makroskopische Beurteilung der Kniegelenke

Bei der Präparation wurde auf Veränderungen der adulten Kniegelenke im Vergleich zu den juvenilen Kniegelenken geachtet. Vereinzelt fanden sich Kniegelenksergüsse bei den adulten Tieren. Bei allen Tieren aus der adulten Gruppe fanden sich Veränderungen des hyalinen Gelenkknorpels: Aufrauungen des femoralen Knorpels, teilweise fehlender Knorpel und die Bildung von Osteophyten. Diese makroskopischen Befunde lassen auf eine vorhandene primäre Kniegelenksdegeneration mit Osteoarthrose schließen.

Die Menisken der adulten Gruppe zeigten makroskopisch jedoch keine Unterschiede zu der juvenilen Kontrollgruppe. Weder Farbveränderungen, makroskopisch sichtbare mukoide Veränderungen (Ferrer-Roca et al., 1978a), noch Oberflächenartefakte konnten makroskopisch gesehen werden. Auch wurden keine Meniskusrisse beobachtet. Ob diese Menisken degenerative Veränderungen aufweisen, sollte anschließend histopathologisch untersucht werden.

Histopathologische Beurteilung des Meniskusgewebes

Mit Hilfe eines Scoring-Systems (Krenn et al., 2010a) sollten die medialen Menisken histopathologisch auf degenerative Veränderungen untersucht werden. Diese Analyse-Methode gilt als Goldstandard des Degenerationsnachweises im Meniskusgewebe. Es wurden von jeweils allen acht medialen Menisken der juvenilen Kontrollgruppe und der adulten Gruppe Querschnitte aus der Pars intermedia angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Anschließend erfolgte die Auswertung am Durchlichtmikroskop.

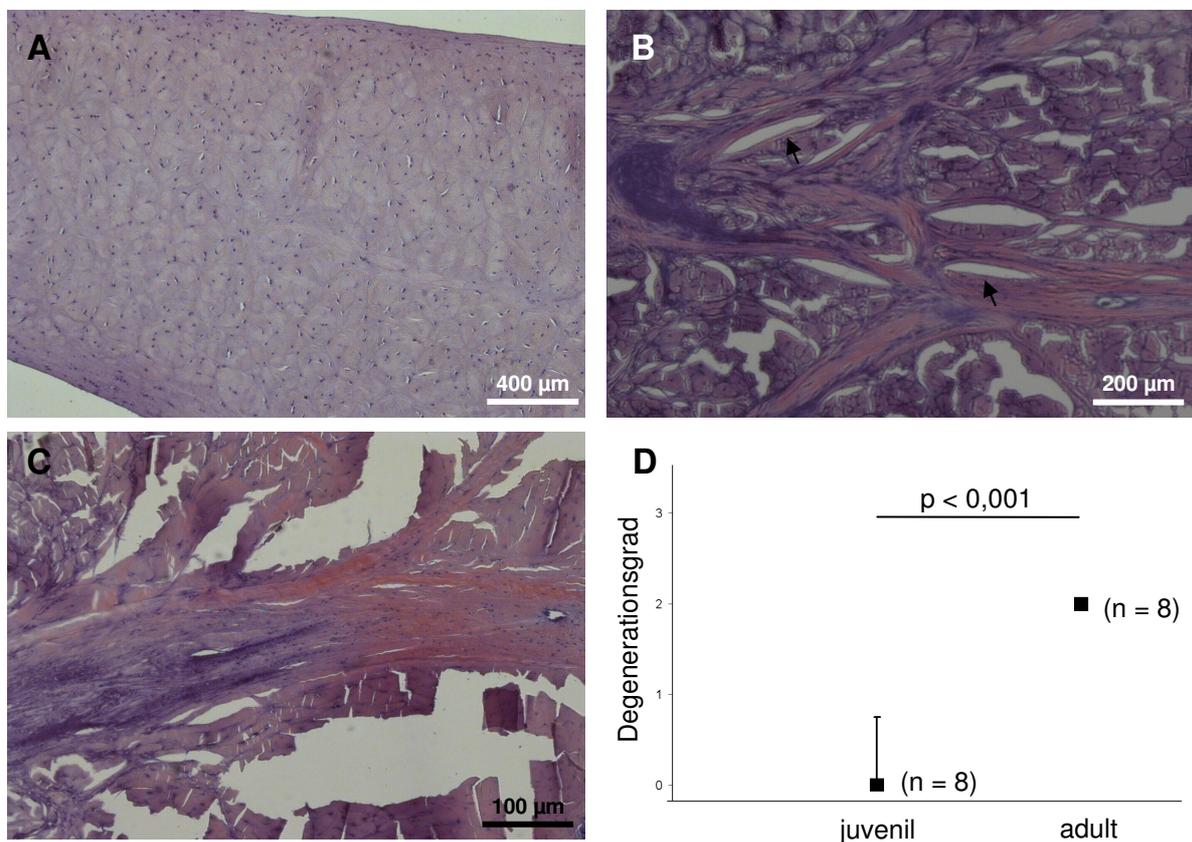


Abb. 4.1: Histopathologische Beurteilung der Degeneration von juvenilen und adulten medialen Menisken. Anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird eine vierstufige Einteilung vorgenommen. Bei homogen gefärbter Matrix mit ausgeglichener Zellverteilung (A) liegt keine Degeneration vor (Grad 0). Bei zunehmender basophiler Matrixfärbung und Spaltenbildung (Pfeile) sowie einer Reduzierung der Zellularität handelt es sich um eine Degeneration des Grades 1-2 (B). Eine weitere Zunahme dieser Phänomene steht für eine Degeneration 3. Grades (C), welche ausschließlich bei den adulten Menisken zu beobachten war (D).

Die juvenilen medialen Menisken zeigten eine homogene Färbung mit regelmäßiger Verteilung der Zellen (Abb. 4.1 A) ohne Rissbildung in der Gewebematrix. Sie konnten überwiegend dem Degenerationsgrad 0 (normale Morphologie; Median: 0,0; n = 8) zugeordnet werden (Abb. 4.1 D). Die medialen Menisken der adulten Gruppe zeigten alle deutliche Anzeichen der Degeneration: Reduzierung der Zellularität, basophile Matrixfärbung, Rissbildung der Extrazellulärmatrix (Abb. 4.1 B, C) und wurden dem Degenerationsgrad 2 (mäßige Degeneration; Median: 2,0; n = 8) zugeordnet. Nach Auswertung aller histopathologischer Schnittpräparate zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied des Degenerationsgrades zwischen den medialen Menisken der juvenilen und adulten Tiere (Abb. 4.1 D). Es wird deshalb für die weiteren Untersuchungen davon ausgegangen, dass es sich bei den acht medialen Menisken der adulten Tiere um Menisken mit deutlichen primären degenerativen Veränderungen handelt.

4.2 Expressionsprofil bei primärer Meniskusdegeneration

Eine mögliche Ursache für die in der histopathologischen Analyse nachgewiesenen primären degenerativen Veränderungen (z. B. Rissbildungen und unterschiedliche Anfärbung der Extrazellulärmatrix) könnten Änderungen der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix sein. Ob diese Veränderungen Ausdruck eines angepassten Expressionsprofils sind, sollte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion untersucht werden. Hierzu wurde die Veränderung des mRNA-Expressionsprofils ausgewählter Gene der adulten, primär degenerierten Menisken im Vergleich zur juvenilen Kontrollgruppe analysiert.

Expressionsprofil des Meniskusgewebes

Die quantitative Expression der untersuchten Gene wurde stets auf die Expression des Haushaltsgens β -Actin normalisiert (Angabe: Expression in % der β -Actin-Expression)

Von den Struktur- und Extrazellulärmatrrix-kodierenden Genprodukten (Kollagen-1 und -2, Aggrekan) zeigte sich nur bei dem Genprodukt des Hauptstruktur-Gens Kollagen-1 eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme der Expression von $22,97 \pm 16,84\%$ ($n = 8$) in der Kontrollgruppe auf $3,12 \pm 2,09\%$ ($n = 8$) in den adulten, primär degenerierten Menisken (Tab. 4.2). Die Gene Interleukin-8 und Interleukin-1 β dienen als Markergene für inflammatorische Prozesse. Während sich von Interleukin-1 β keine Genprodukte nachweisen ließen, zeigte Interleukin-8 eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Expression von $19,56 \pm 23,40\%$ auf $245 \pm 293\%$ (je $n = 8$; Tab. 4.2). Die Gengruppe der Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, -3, -8, -9 und -13) diente als Indikator für Veränderungen im katabolen Metabolismus. Zwei dieser Gene (MMP-2 und -13) zeigten signifikante Zunahmen ($p < 0,05$) der Menge an Genprodukten (Tab. 4.2). Des Weiteren wurden die Gene SOX-9, VEGF, Lubricin und Decorin auf Veränderungen der Expression untersucht. Keines dieser Gene zeigte eine signifikante Änderung in den adulten, primär degenerierten medialen Menisken im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion. Für jedes untersuchte Gen ist die normalisierte Expression von juvenilen und adulten medialen Menisken gegenübergestellt und die Expressionsänderung beschrieben.

Gen	normalisierte Expression [%]		t-Test	Expressionsänderung
	juvenil (n = 8)	adult (n= 8)		
Kollagen-1A1	$22,97 \pm 16,84$	$3,12 \pm 2,09$	$p < 0,01$	Abnahme
Kollagen 2	$0,47 \pm 0,53$	$0,84 \pm 0,94$	n. s.	Keine signifikante Änderung
Aggrekan	5813 ± 6568	3544 ± 3693	n.s.	Keine signifikante Änderung
SOX-9	$6,79 \pm 5,77$	$6,34 \pm 4,89$	n.s.	Keine signifikante Änderung
Interleukin-1 β	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	-	-
Interleukin-8	$19,56 \pm 23,40$	245 ± 293	$p < 0,05$	Zunahme
MMP-2	$20,25 \pm 10,72$	$40,44 \pm 20,15$	$p < 0,05$	Zunahme
MMP-3	$15,30 \pm 7,33$	$35,12 \pm 38,66$	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-8	$36,52 \pm 24,95$	$41,81 \pm 27,90$	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-9	$0,02 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,14$	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-13	$22,48 \pm 11,54$	$48,71 \pm 28,01$	$p < 0,05$	Zunahme
VEGF	$8,54 \pm 6,85$	$8,42 \pm 5,01$	n.s.	Keine signifikante Änderung
Lubricin	$80,61 \pm 75,85$	$40,65 \pm 18,19$	n.s.	Keine signifikante Änderung
Decorin	$92,01 \pm 62,32$	$117,19 \pm 87,49$	n.s.	Keine signifikante Änderung

Im Folgenden sollte die deutlichste Änderung, nämlich die Abnahme der mRNA-Menge des Strukturgens Kollagen-1, mittels immunhistochemischer Antikörperfärbung verifiziert werden.

Immunhistochemische Analyse des Meniskusgewebes

Um die Auswirkungen der Abnahme an Kollagen-1-Genprodukten auf Proteinebene zu untersuchen, wurde die Verteilung von Kollagen-1 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in Querschnitten aus der Pars intermedia aller untersuchten medialen Menisken der juvenilen und adulten Tiere untersucht. In allen Schnittpräparaten beider Gruppen zeigte sich im Vergleich zu den nicht-inkubierten Kontrollschnitten eine schwache Färbung (Abb. 4.2 A-C). Die auf mRNA-Ebene durch die quantitative Polymerase-Kettenreaktion beschriebene Expressionsabnahme konnte somit auf der Proteinebene nicht bestätigt werden, da sowohl die Schnitte der juvenilen Kontrollgruppe (Abb. 4.2 B) sowie die Schnitte der adulten, degenerierten Menisken (Abb. 4.2 C) ein einheitliches Färbemuster zeigten.

Um eine weitergehende Analyse, welche neben der vorhandenen Kollagen-1-Menge auch die Anordnung dieses Strukturproteins beinhaltet, wurde im Folgenden eine Strukturanalyse auf histologischer und transmissionselektronenmikroskopischer Basis durchgeführt.

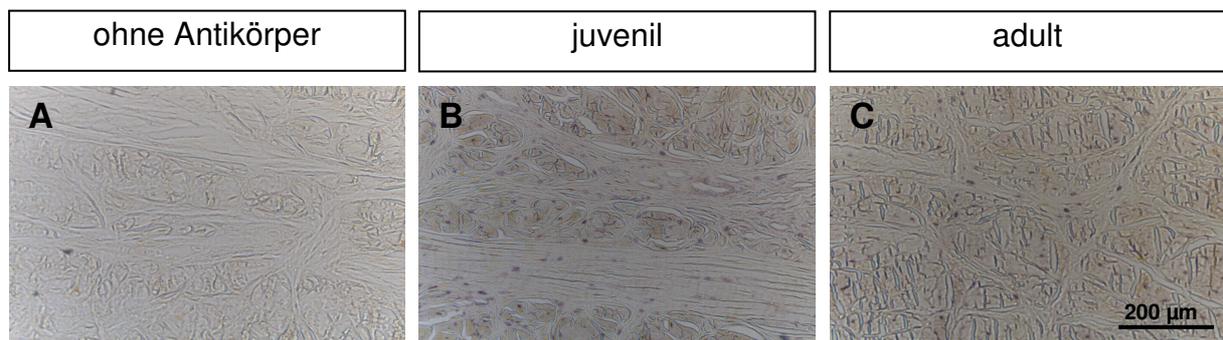


Abb. 4.2: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-1 in juvenilen und adulten medialen Menisken in der Pars intermedia. Im Vergleich zum Meniskusquerschnitt, welcher nicht mit dem Antikörper gegen Kollagen-1 behandelt wurde (A), zeigt sich bei den juvenilen (B) und adulten (C) Menisken eine homogene, mittelarke Färbung. Die vergleichende Auswertung der juvenilen und adulten medialen Menisken (je n = 8) zeigte keinen Unterschied bezüglich Färbemuster und Färbintensität.

4.3 Strukturveränderung bei primärer Meniskusdegeneration

Die unter 4.2 beschriebenen Analysen zeigten eine Abnahme des Genprodukts des Strukturproteins Kollagen-1 im Meniskusgewebe mit primärer Degeneration. Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich allerdings keine Abnahme dieses Proteins nachweisen. Den in der histopathologischen Analyse (siehe 4.1) nachgewiesenen degenerativen Veränderungen der Extrazellulärmatrix liegen also keine Änderungen der Protein-Menge von Kollagen-1 zu Grunde. Es erfolgte deshalb im Anschluss eine strukturelle Analyse des Kollagen-1-Gerüsts. Hierzu wurden spezifische histologische Färbungen, sowie transmissionselektronenmikroskopische Analysen durchgeführt.

Histologische Beurteilung des Meniskusgewebes

Durch die histologische Aufarbeitung der angefertigten Pars intermedia-Querschnitte der medialen Menisken der beiden Gruppen mit dem Kollagen-1-spezifischen Farbstoff Sirius Red sollte das Vorhandensein von Unterschieden in der Kollagen-Struktur der adulten, primär degenerierten Menisken im Vergleich zur juvenilen Kontrollgruppe geprüft werden. Durch die unterschiedliche Brechung des polarisierten Lichts werden intakte Kollagenfasern in den Farben gelb, orange und rot abgebildet. Kurze Fasern mit reduziertem Durchmesser und reduzierter Länge werden grün und blau abgebildet (Kaemmer et al., 2010; Flint et al., 1984). Die Querschnitte der Pars intermedia der medialen Menisken der juvenilen Kontrollgruppe zeigen ein Bild mit hauptsächlich rot-orangen Kollagenfasern in den Randschichten und im Meniskusinnern (Abb. 4.3 A). Die adulten, primär degenerierten Menisken zeigten nur im Bereich unterhalb der femoralen und tibialen Oberflächen rot-orangene Fasern (Abb. 4.3 B). In der Mitte der adulten Menisken zeigte sich hauptsächlich eine Grünfärbung (Abb. 4.3 B, Pfeile), was für einen erhöhten Anteil an kurzen, dünnen Kollagenfasern in diesem Bereich spricht. Auch in den oberflächen-bildenden Randschichten sind in den Menisken der Degenerationsgruppe mehr grün imponierende Fasern zu sehen (Oval in Abb. 4.3 B).

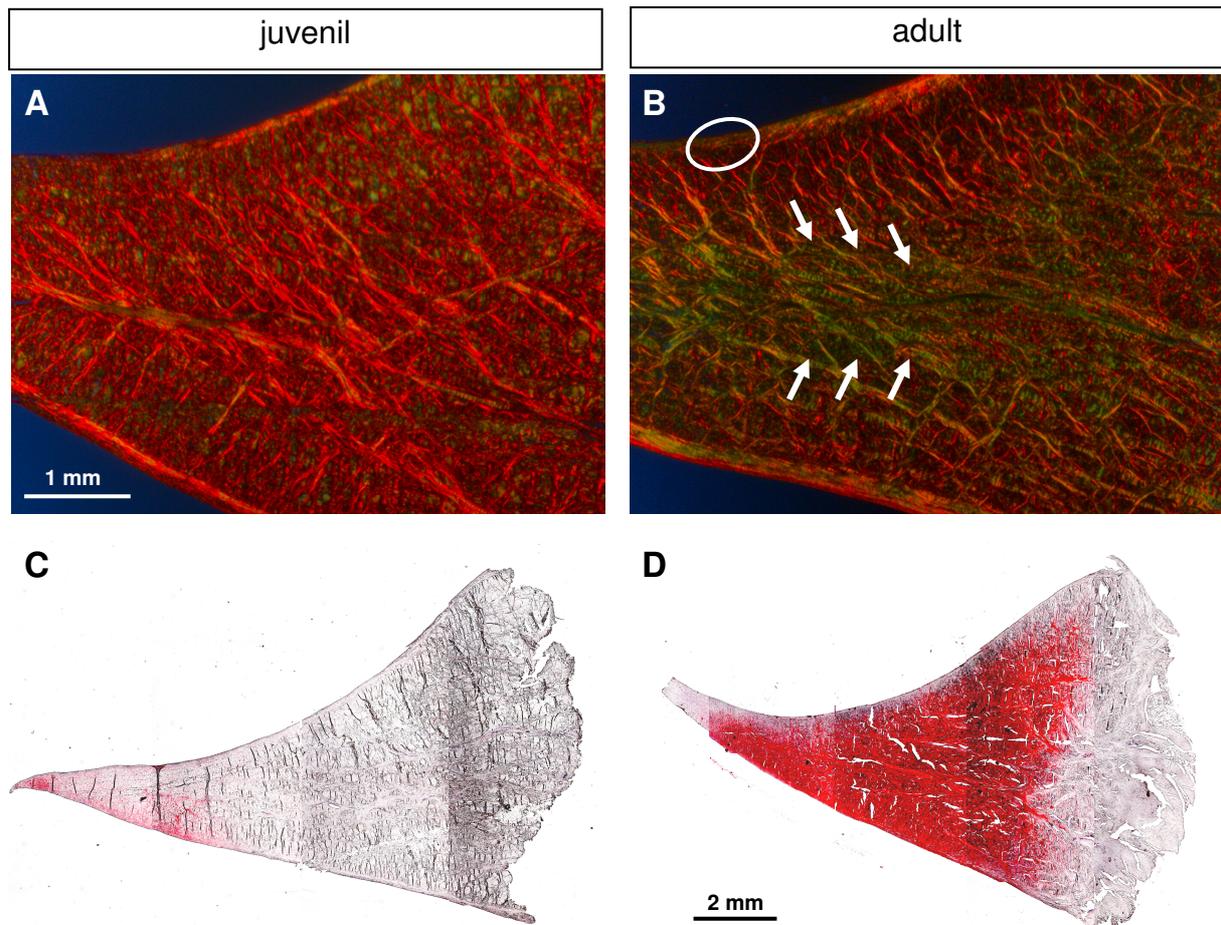


Abb. 4.3: Histologische Untersuchung des Einflusses der primären Degeneration auf die Kollagen- und Proteoglykan-Struktur. Die Sirius Red-Färbung (A, B) zeigt eine deutlich stärkere Grünfärbung (dünnere Kollagenfasern) im Zentral- (Pfeile, B) und Randbereich (Oval, B) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Proteoglykan-Verteilung beschränkt sich in der Kontrollgruppe auf die weiße Zone (C), während sich bei den primär degenerierten Menisken Proteoglykane auch in der rot-weißen Zone befinden (D), was die Safranin O-Färbung (C, D) zeigt.

Des Weiteren wurde eine histologische Analyse mit dem Proteoglykan-spezifischen Farbstoff Safranin O durchgeführt. Hier sollte die Verteilung der Proteoglykane im Querschnitt durch die Pars intermedia aller medialen Menisken dargestellt werden. Die medialen Menisken der juvenilen Kontrollgruppe zeigten eine schwache bis mittelstarke Rotfärbung, welche auf den Bereich der weißen Zone beschränkt bleibt (Abb. 4.3 C). Die Menisken der Degenerationsgruppe zeigten eine deutlich stärkere Rotfärbung, welche an der Meniskusspitze beginnt und bis zum Übergang der rot-weißen Zone in die rote Zone endet (Abb. 4.3 D).

Es zeigten sich also deutliche Unterschiede in den adulten, primär degenerierten Menisken im Vergleich zur Kontrollgruppe bezüglich der Kollagen-Struktur und der Verteilung der Proteoglykane (Abb. 4.3).

Transmissionselektronenmikroskopische Beurteilung des Meniskugewebes

Die Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion zeigten eine Abnahme der Menge an Kollagen-1-Genprodukten in den adulten Menisken mit primärer Meniskusdegeneration. Auch wenn die immunhistochemische Analyse keine Auswirkungen auf die Kollagen-1-Protein-Menge nachweisen konnte, so geben die durchgeführten histologischen Untersuchungen (Hämatoxylin-Eosin, Sirius Red, Safranin O) doch Hinweise auf Veränderungen der Extrazellulärmatrix, welche ursächlich für die in der histopathologischen Analyse beschriebenen degenerativen Veränderung der Extrazellulärmatrix sein könnten. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie im Zentralbereich der Pars intermedia (Pfeile in Abb. 4.3 B) der medialen Menisken beider Gruppen sollte eine weiterführende Analyse der Kollagen-Struktur erfolgen. Hierzu wurde das Kollagengerüst aller medialen Menisken nach einem, auf der Elektronenmikroskopie basierendem, Scoring-System (Gelber et al., 2008) bewertet.

Die juvenilen medialen Menisken zeigten hauptsächlich parallel verlaufende (Abb. 4.4 A1), dicht gepackte (Abb. 4.4 A1, B1) Kollagenfasern mit deutlicher Querstreifung und ohne intrafibrilläre Ödeme (Abb. 4.4 C1). Die Kollagenfaserstruktur der adulten, primär degenerierten Menisken war deutlich aufgelockert (Abb. 4.4 A2, B2). Die Kollagenfasern verliefen nicht mehr parallel, sondern ungeordnet (Abb. 4.4 A2) und zeigten intrafibrilläre Ödeme mit Verwischung der Querstreifung (Abb. 4.4 C2). Nach Analyse aller medialen Menisken zeigte die Kontrollgruppe eine Degeneration I. Grades (Median: 1,0; n = 8), was als normale Meniskusstruktur bewertet wird (Abb. 4.4 D). Die adulten, primär degenerierten Menisken zeigen eine signifikant ($p < 0,001$) ausgeprägtere Degeneration II.-III. Grades (moderate bis hochgradige Zerstörung des Kollagengerüsts; Median: 4,5; n = 8; Abb. 4.4 D).

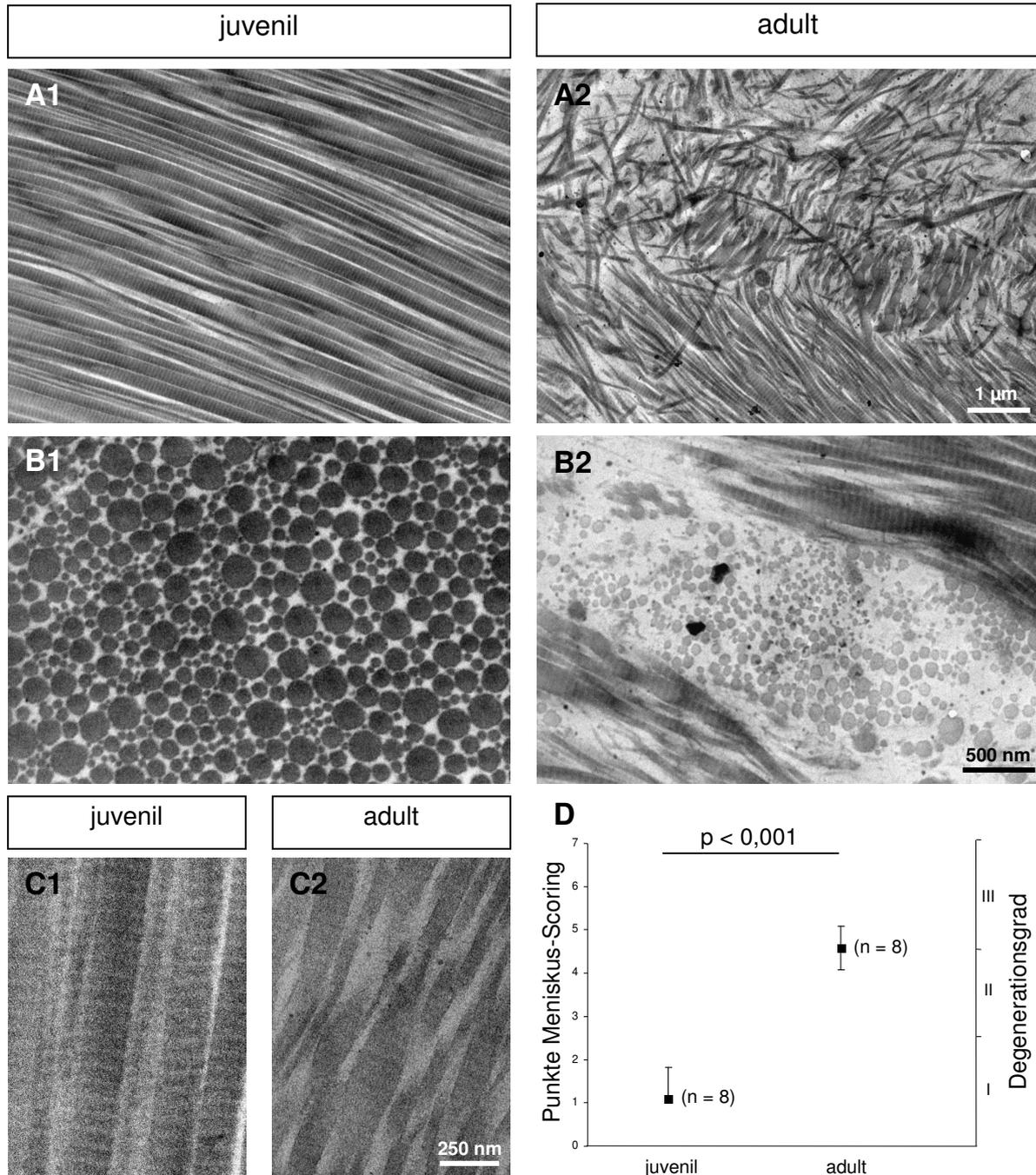


Abb. 4.4: Transmissionselektronenmikroskopische Beurteilung des meniskalen Kollagenfasengerüsts in medialen Menisken von juvenilen und adulten Schweinen. Die juvenilen Menisken zeigen homogen angeordnete (A1), dicht gepackte (B1) Kollagenfasern mit deutlicher Streifung und ohne intrafibrilläre Ödeme (C1). Im adulten Meniskus findet sich eine inhomogene (A2), deutlich aufgelockerte (B2) Anordnung von nur schwach gestreiften Kollagenfasern, welche teilweise intrafibrilläre Anschwellungen (Ödeme) zeigen (C2). Die juvenilen Menisken zeigen eine Degeneration I. Grades, während die adulten Menisken eine primäre Degeneration II. bis III. Grades aufweisen (D).

Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Meniskusoberflächen

Die Auswertung der Kollagen-spezifischen histologischen Färbungen mit Sirius Red zeigte neben dem vermehrten Auftreten von kurzen Kollagenfasern im Zentralbereich der adulten Menisken (Abb. 4.3 B, Pfeile) eine Änderung im Färbemuster in den randbildenden Schichten dieser medialen Menisken der Degenerationsgruppe (Abb. 4.3 B, Oval) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.3 A, B). Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie sollte deshalb eine weitere Analyse der femoralen Oberfläche der Pars intermedia aller medialen Menisken (je n = 8) erfolgen.

Die Rasterelektronenmikroskopie zeigte glatte, homogene Oberflächen bei den medialen Menisken der juvenilen Kontrollgruppe (Abb. 4.5 A). Die femorale Oberfläche der adulten, primär degenerierten Menisken erschien wellig, zeigte Auflagerungen und war von feinen Rissen durchzogen (Abb. 4.5 B). Durch diese Risse ziehen vereinzelt Strukturen mit Kollagen-ähnlicher Morphologie auf die meniskale Oberfläche.

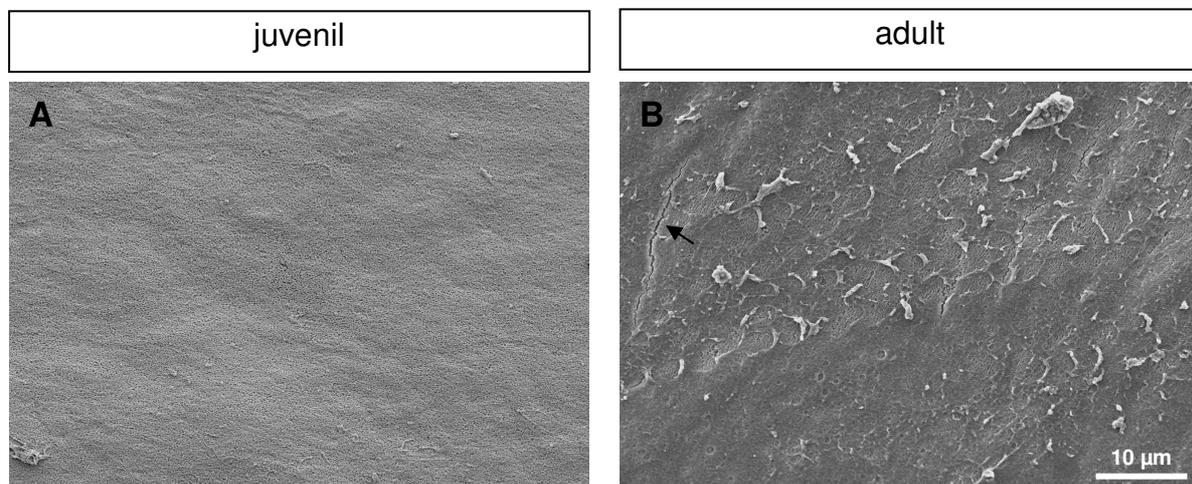


Abb. 4.5: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der femoralen Meniskusoberfläche eines juvenilen (A) und eines adulten (B) Schweins. Die inhomogene Oberfläche des adulten medialen Meniskus ist welliger und imponiert häufiger durch feine Risse (Pfeil) und zahlreiche Auflagerungen.

Die auf der femoralen Oberseite der medialen Menisken der Degenerationsgruppe gezeigten Auflagerungen sollten nun auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden. Hintergrund dieser Fragestellung ist die Ähnlichkeit dieser Auflagerungen mit in der Literatur beschriebenen Verkalkungen (Fürst et al., 2010). Durch die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDS) sollte die elementare Zusammensetzung der Meniskus-Auflagerungen in drei adulten Menisken untersucht werden und mit dem Meniskusgewebe verglichen werden. Es wurden exemplarisch drei Menisken der Degenerationsgruppe untersucht. Abbildung 4.6 A zeigt die repräsentativen Analysefenster der Auflagerungen (2) und des Meniskusgewebes (1). Die Zusammensetzung beider untersuchter Substanzen war annähernd identisch (Abb. 4.6 B). Dies zeigt, dass es sich bei den beschriebenen Auflagerungen am ehesten um Abrieb des Meniskusgewebes handelt und wohl nicht um Verkalkungen, welche einen erhöhten Anteil an Kalzium beinhalten würden.

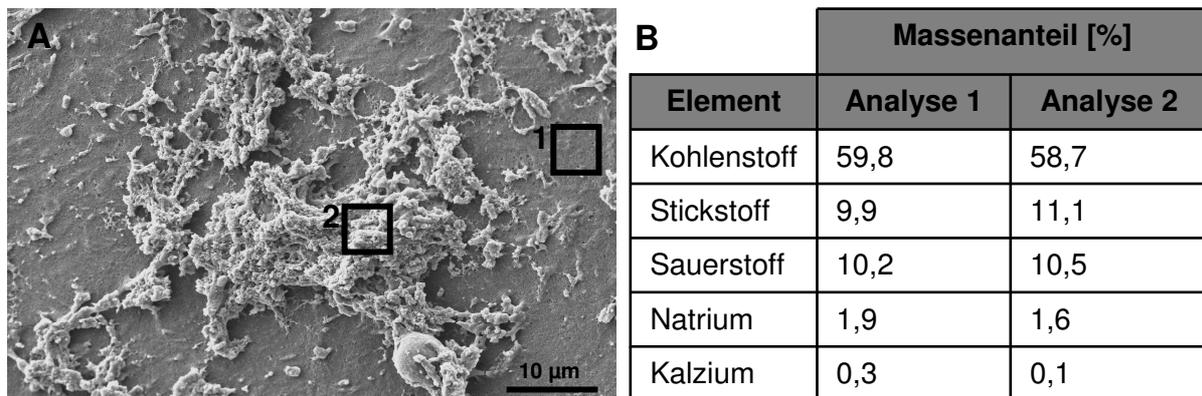


Abb. 4.6: EDS-Analyse der Auflagerungen auf der femoralen Meniskusoberfläche adulter Menisken. Die in der Rasterelektronenmikroskopie dargestellten Auflagerungen (A) wurden bezüglich ihrer elementaren Zusammensetzung analysiert (Analyse 2) und mit der Zusammensetzung des Meniskusgewebes (Analyse 1) verglichen (B).

4.4 Kernspintomographie bei primärer Meniskusdegeneration

Auf Grund der oben beschriebenen histopathologischen Analyse (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den medialen Menisken der adulten Schweine um primär degenerierte Menisken handelt. Die weiteren Untersuchungen (Sirius Res- und Safranin O-Färbungen, Transmissions-elektronenmikroskopie) zeigten, dass sich bei diesen primär degenerierten Menisken auch strukturelle Änderungen in der Extrazellulärmatrix nachweisen lassen. Es sollte nun untersucht werden, ob adulte Menisken mit primärer Meniskusdegeneration mittels hochauflösender (9,4 Tesla) Kernspintomographie von juvenilen Menisken als Kontrollgruppe unterschieden werden können. Dies würde eine frühe bildgebende, nicht-invasive Diagnostik von primären degenerativen Veränderungen im Meniskusgewebe ermöglichen. Hierzu wurden jeweils acht isolierte Menisken beider Gruppen im hochauflösenden Kernspintomographen untersucht.

Es wurden transversale (Abb. 4.7 A) und coronare (Abb. 4.7 B, C) Schnittbilder erzeugt. In den transversalen Schnittbildern (Abb. 4.7 A) zeigte sich ein deutlicher Kontrastverlust in den Bereichen des Vorder- (B1) und Hinterhorns (B3) im Vergleich zur Pars intermedia (B2). Die coronaren Schnittbilder aus diesen Bereichen (Abb. 4.7 B) bestätigten diesen Kontrastverlust. Intrameniskale Strukturen, welche sich im Bereich der Pars intermedia im coronaren Schnittbild kontrastreich darstellen lassen (Abb. 4.7 B2, Pfeil), sind im Bereich des Vorder- und Hinterhorns nicht mehr abgrenzbar (Abb. 4.7 B1, B3). Die weitere Analyse erfolgte deshalb ausschließlich an den coronaren Schnitten durch die Pars intermedia (Abb. 4.7 C). Nach eingehender visueller Begutachtung der coronaren Schnittbilder aus der Pars intermedia aller untersuchten Menisken (je $n = 8$ pro Gruppe) konnten keine Unterschiede zwischen juvenilen (Abb. 4.7 C1) und adulten (Abb. 4.7 C2) Menisken beschrieben werden.

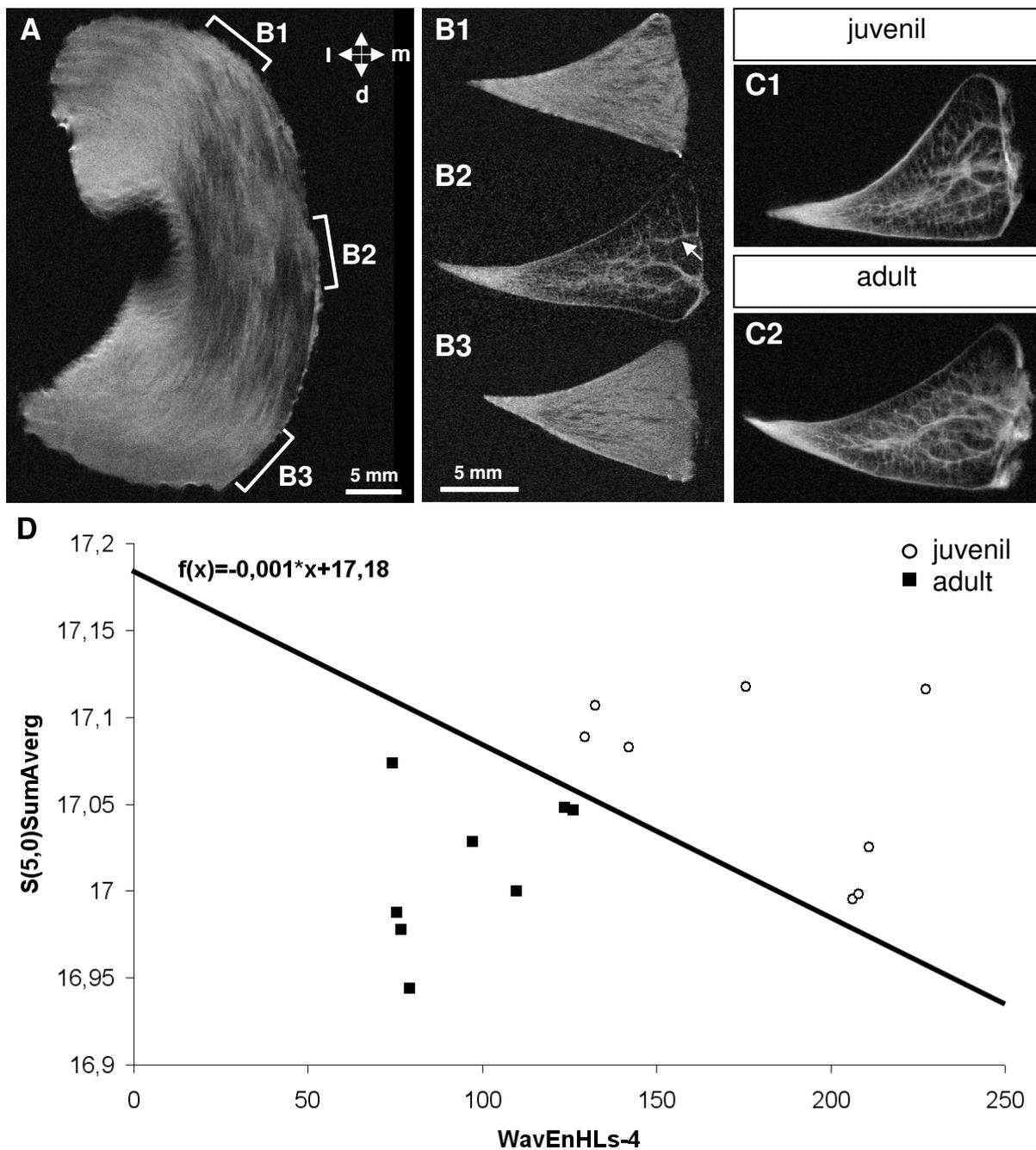


Abb. 4.7: Hochauflösende Kernspintomographie von juvenilen und adulten medialen Menisken. Im transversalen Schnittbild eines juvenilen Meniskus (A) zeigt sich ein Kontrastverlust in den Bereichen des Vorder- (B1 in A) und Hinterhorns (B3 in A) im Vergleich zur Pars intermedia (B2 in A), was durch die coronaren Schnittbilder aus diesen Bereichen bestätigt wird (B1-B3). Intrameniskale Strukturen (B2, Pfeil) können in den Schnittbildern von Vorder- (B1) und Hinterhorn (B3) nicht mehr abgegrenzt werden. Die coronaren Schnittbilder von juvenilen (C1) und adulten (C2) Menisken aus der Pars intermedia lassen sich visuell nicht differenzieren, können aber durch ihre Textur unterschieden werden (D).

Es wurde im Anschluss eine Texturanalyse der coronaren Schnittbilder aller medialen Menisken durchgeführt. Hierzu wurden insgesamt 300 Texturparameter untersucht, welche mit Hilfe des Rangsummentests auf ihre Trennschärfe zwischen juvenilen und adulten Menisken hin untersucht wurden (Texturanalyse durchgeführt von: Dr. Frank Zöllner, Lehrstuhl für Computerunterstützte Klinische Medizin, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg). Es konnten zwei Parameter bestimmt werden, welche degenerierte von nicht-degenerierten Menisken differenzieren können:

- 1) mittlerer horizontaler Grauwertübergang mit Distanz 5 Pixel (S(5,0)SumAverg)
- 2) Energie der Waveletkoeffizienten der vierten Skala (WavEnHLs-4))

Trägt man diese beiden Texturparameter gegeneinander auf (Abb. 4.7 D) lassen sich die Menisken der juvenilen Kontrollgruppe (○) trennscharf durch die Gerade mit der Funktionsgleichung $f(x) = 0,001 \cdot x + 17,18$ von den Menisken der Degenerationsgruppe (■) differenzieren.

Diesen beiden Texturparametern konnte bisher kein biologisches Korrelat zugeordnet werden. Es handelt sich bei der Differenzierung also um einen mathematisch-basierten Algorithmus, welchem keine pathologische Veränderung zu Grunde gelegt werden kann. Dennoch scheint eine Unterscheidung von juvenilen und adulten Menisken mit einer primären Meniskusdegeneration durch eine hochauflösende kernspintomographische Analyse möglich.

4.5 Sekundäre Meniskusdegeneration im porcinen Tiermodell

Die bisher beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass sich im porcinen Kniegelenk adulter Zuchtschweine meniskale Veränderungen mit dem Charakter einer primären Meniskusdegeneration nachweisen lassen (verändertes Expressionsprofil, veränderte Kollagen-Struktur). Die bisher beschriebenen Studien wurden an Kadaverknien von Zuchtschweinen zur Lebensmittelgewinnung durchgeführt. Für jegliche Interventionen am lebenden Tier, welche zur Etablierung von Therapien unabdingbar sind, steht das bisher beschriebene Kadavermodell also nicht zur

Verfügung. Es sollte deshalb im Folgenden ein Tiermodell entwickelt werden, welches eine Meniskusdegeneration vorhält, um auch für therapeutische Studien zur Verfügung zu stehen. Hierzu wurde angenommen, dass die durchgeführte Resektion des vorderen Kreuzbandes (siehe 3.5) zu einer sekundären Meniskusdegeneration führt. Ob deren Ausprägung hinsichtlich der Änderungen des Expressionsprofils und der Extrazellulärmatrix mit der primären Meniskusdegeneration vergleichbar ist, sollte anschließend diskutiert werden.

Es wurde ein Pilotversuch mit drei Tieren und ein Hauptversuch mit acht muskulo-skelettal ausgewachsenen Göttingen Minipigs durchgeführt. Es erfolgte bei allen Tieren eine Resektion des vorderen Kreuzbandes am linken Kniegelenk (wird in den Abbildungen als „Degeneration“ bezeichnet). Das biomechanische Modell sieht vor, dass es hierdurch zu einer Instabilität des Kniegelenks kommt, was zu einer unphysiologischen Mehrbelastung des medialen Meniskus führen sollte (siehe 2.8). Ob hierdurch eine für das Modell ausreichende sekundäre Degeneration des medialen Meniskus nachzuweisen ist, sollte im Folgenden untersucht werden. Beim rechten Kniegelenk aller Tiere, wurde die Operation bis zur Darstellung des vorderen Kreuzbandes durchgeführt und nach erfolgter Spülung wieder verschlossen (Kontroll-OP).

Tier-Visiten

Eine erste Visite der Versuchstiere fand bereits eine Woche vor dem Operationstermin, am Tag der Tierlieferung, statt. Neben dem Allgemein- und Ernährungszustand wurde hierbei vor allem auf Abszesse und Verletzungen geachtet, welche ein Ausschlusskriterium für die Versuchsteilnahme bedeuten würden, da sie das Risiko einer postoperativen Infektion erhöhen. Nach Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere in den ersten 14 postoperativen Tagen zweimal täglich visitiert, danach über die gesamte Standzeit erfolgten zwei Visiten pro Woche. Die Visiten erlaubten eine engmaschige Kontrolle über das Verhalten und Befinden der Tiere und erleichterte die Führung der Versuchstiere. Bei Bedarf wurden Sondervisiten durchgeführt.

Neben der Beurteilung des Allgemein- und Ernährungszustandes der Tiere wurden alle Tiere im Rahmen der Visiten zum Laufen animiert, wodurch das Gangbild beurteilt werden konnte und eine evtl. Schonung der operierten Extremitäten erkannt wurde. Die Schonung oder das Unterstellen des linken Hinterlaufs wurde als Ausdruck von Schmerzen gedeutet und sofort durch adäquate Analgesie therapiert. Auf Grund des durch die Operation bedingten Wundschmerzes wurden an den ersten 2-3 postoperativen Tagen alle Versuchstiere analgesiert. Bereits im Laufe der zweiten postoperativen Woche begannen die Tiere beide Hinterläufe gleichmäßig zu belasten. Während der rechte Hinterlauf (Kontroll-Operation) voll belastet wurde, zeigte sich im linken Hinterlauf nach der Resektion des vorderen Kreuzbandes eine gewisse Instabilität. Hier war es nicht immer möglich, die Ursache der Schonung des linken Hinterlaufs eindeutig dem Vorliegen von Schmerzen oder dem Vorliegen der Instabilität zuzuordnen. In Zweifelsfällen wurde das Tier analgesiert. Beginnend ab der vierten postoperativen Woche wurde auch der linke Hinterlauf immer stärker, z. T. auch voll belastet.

Bei jeder Visite erfolgte die Kommunikation mit den verantwortlichen Tierpflegern, welche die Versuchstiere betreuten und bei Bedarf wurden die zuständigen Veterinärmediziner und Tierschutzbeauftragten hinzugezogen. Sämtliche Beobachtungen während der Visite und die hieraus abgeleiteten Maßnahmen wurden auf den, den einzelnen Versuchstieren zugeordneten, Stallkarten dokumentiert.

Komplikationen

Bei einem Göttingen Minipig wurde nach der Prämedikation tumoröse Schwellungen im Bereich der linken Milchleiste festgestellt, welche Aufgrund ihrer Lage bei der initialen Visite nicht gesehen wurden. Da die Ursache für diese Schwellungen nicht geklärt werden konnte und ein Abszess nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde dieses Tier nicht operiert und aus dem Versuch ausgeschlossen. Es wurde ein Ersatztier verwendet.

Dieses Ersatztier konnte wie oben beschrieben ohne erkennbare Zwischenfälle während Narkose und Operation operiert werden. Postoperativ

verweigerte es zeitweise die Nahrungsaufnahme und wurde immer liegend angetroffen. Nach Rücksprache mit den zuständigen Tierpflegern, welche das Versuchstier seit über einem Jahr betreuten, konnte diese Situation allerdings als normal bewertet werden. Bis zum fünften postoperativen Tag konnte das Versuchstier bei den Visiten jederzeit zum Aufstehen und Laufen animiert werden. Hierbei zeigte sich allerdings eine starke Schonhaltung des linken Hinterlaufs, welche durch forcierte Analgesie kompensiert werden sollte. Am sechsten und siebten postoperativen Tag war das Tier nicht mehr zum Aufstehen zu animieren und nahm nur noch geringe Mengen an Wasser auf. Klinische Untersuchungen des Tieres wurden zunehmend schwieriger, da das Versuchstier zunehmend aggressiver wurde und den linken Hinterlauf stets an den Körper anzog. Nach Rücksprache mit den zuständigen Veterinärmedizinerinnen und Tierschutzbeauftragten fiel deshalb die Entscheidung zur Durchführung einer ausführlichen klinischen und radiologischen Untersuchung in Sedierung. Die radiologische Untersuchung blieb ohne pathologischen Befund. Die klinische Untersuchung zeigte eine Schwellung des linken Kniegelenks ohne deutliche Erwärmung dieser Extremität. Auf Grund dieser Schwellung unklarer Genese wurde sich für die sofortige Operation mit Exploration des linken Kniegelenks in Narkose entschieden. Das operative Vorgehen erfolgte, wie oben beschrieben, in gleicher Weise wie die erste Operation. Die Wunde war nicht gerötet und bereits vollständig verheilt. Es zeigte sich makroskopisch kein oberflächlicher Infekt in Subkutis und Gleitschicht, was durch die mikrobiologische Untersuchung von Abstrichmaterial bestätigt wurde. Allerdings zeigte sich nach der Eröffnung der Gelenkkapsel eine große Eiteransammlung im Kniegelenk. Auf Grund des infausten Befundes einer großflächigen Eiteransammlung, die erwartungsgemäß nur schwer antibiotisch therapierbar gewesen wäre, wurde nach Rücksprache mit den zuständigen Veterinärmedizinerinnen und Tierschutzbeauftragten die sofortige Tötung dieses Versuchstieres beschlossen und durchgeführt. Nach der Tötung wurden beide Hinterläufe im Hüftgelenk exartikuliert und isoliert. Die gründliche Sektion der beiden hinteren Extremitäten des Versuchstieres zeigte das gesamte Ausmaß der Entzündung: Der Eiter breitete sich vom Kniegelenk entlang der Ursprungssehne des Musculus extensor digitorum longus in dessen Muskelloge aus. Neben diesem antero-lateralen Kompartiment war auch der dorso-mediale Bereich betroffen. Hier zeigte sich eine Infiltration der eitrigen Flüssigkeit in die Muskelloge

des Musculus gastrocnemius. Somit waren große Bereiche des Unterschenkels durch Eiter infiltriert. Das noch intakte Gewebe des Unterschenkels ließ den Schluss zu, dass es sich um einen absteigenden Kniegelenksinfekt handelte. Auch die unauffällige Untersuchung des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein im venösen Blut des Tieres (CRP < 2,9 mg/L) sprach gegen eine systemische Infektion. Die Kultivierung auf Blutagar des während der Operation gewonnenen Abstrichmaterials aus dem Kniegelenk zeigte das Bild einer Mischkultur zweier Bakterien. Nach der Erstellung von Reinkulturen konnte eine Gram-Färbung und eine biochemische Untersuchung (API-System, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) durchgeführt werden. Es konnten die Bakterienstämme *Staphylococcus intermedius* und *Staphylococcus sciuri* identifiziert werden. Als wahrscheinlichster Haupterreger muss *Staphylococcus intermedius* gewertet werden, der als Eitererreger bei Hund und Katze beschrieben ist, allerdings auch Infektionen bei anderen Spezies (z. B. Mensch) verursachen kann (Kempker et al., 2009).

Vorversuch zur Entwicklung eines Tiermodells mit Meniskusdegeneration

Der durchgeführte Pilotversuch mit drei ausgewachsenen Göttingen Minipigs (postoperative Standzeit: 2 Tiere à 6 Wochen, 1 Tier à 12 Wochen) diente der Überprüfung der Durchführbarkeit der Operationstechnik am Göttingen Minipig und der unterschiedlichen Analyse-Methoden, welche im Hauptversuch durchgeführt werden sollten.

Exemplarisch wurde im Pilotversuch das Expressionsprofil von fünf Genprodukten untersucht. Hieraus ergaben sich erste Hinweise auf eine frühe Genveränderung der medialen Menisken der Degenerationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe: Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression der Strukturgene Kollagen-1 und Aggrecan (Tab. 4.3). Das Proteoglykan Decorin zeigte eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression (Tab. 4.3). Die drei weiteren, exemplarisch untersuchten Gene (Kollagen-2, SOX-9, VEGF) zeigten keine Änderung der Menge an Genprodukten. Im Rahmen des Pilotversuches erfolgte auf Grund der kleinen Fallzahl keine statistische Auswertung.

Tab. 4.3: Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion der Vorversuche (postoperative Standzeit: 6 Wochen). Für jedes untersuchte Gen ist die normalisierte Expression von medialen Menisken der Kontrollgruppe und dem Degenerationsmodell gegenübergestellt und die Expressionsänderung beschrieben.

Gen	normalisierte Expression [%]		Expressionsänderung
	Kontrolle (n = 2)	Degeneration (n=2)	
Kollagen-1A1	0,76 ± 0,32	5,18 ± 0,85	Zunahme
Kollagen-2	0,06 ± 0,05	0,02 ± 0,01	Keine deutliche Änderung
Aggrecan	21,55 ± 6,80	32,84 ± 11,60	Zunahme
SOX-9	0,51 ± 0,09	0,39 ± 0,42	Keine deutliche Änderung
VEGF	0,44 ± 0,08	0,51 ± 0,37	Keine deutliche Änderung
Decorin	164,04 ± 56,72	84,05 ± 13,75	Abnahme

Des Weiteren wurde im Rahmen des Pilotversuchs auch auf Unterschiede der Genexpression zwischen den einzelnen Bereichen (Vorder-, Hinterhorn und Pars intermedia) des medialen und lateralen Meniskus geachtet. Es konnten allerdings keine Unterschiede der Genexpression in den verschiedenen meniskalen Bereichen gezeigt werden.

Die histopathologische Beurteilung der angefertigten Schnittpräparate zeigte weder nach einer Standzeit von 6 Wochen, noch nach einer Standzeit von 12 Wochen Hinweise auf degenerative Veränderungen des meniskalen Gewebes. Die transmissionselektronenmikroskopische Beurteilung des Kollagengerüsts zeigte ab einer Standzeit von 12 Wochen eine Degeneration 2. Grades.

Der Pilotversuch wurde des Weiteren genutzt, um eine Optimierung der kernspintomographischen Bildgebung zu erreichen und die Machbarkeit der molekularbiologischen Analysen zu untersuchen: Die Menisken des Göttingen Minipigs sind deutlich kleiner als die Menisken der Zuchtschweine der Deutschen Landrasse. Das zellarme, bradythrophe Gewebe des Faserknorpels setzt somit große Herausforderungen an die molekularbiologischen Analysemethoden.

Hauptversuch zur Entwicklung eines Tiermodells mit Meniskusdegeneration

Für den Hauptversuch musste das operative Vorgehen nicht mehr angepasst werden und konnte wie im Vorversuch durchgeführt werden. Die Standzeit wurde auf 26 Wochen festgelegt, um eine deutliche Ausprägung der sekundären Meniskusdegeneration zu erlauben. Es sollten die Bereiche des Vorder- und Hinterhorns, sowie der Pars intermedia des medialen und des lateralen Meniskus histopathologisch und transmissionselektronenmikroskopisch ausgewertet werden, um sie mit der kernspintomographischen Bildgebung vergleichen zu können.

Auf Grund der Ergebnisse der Vorversuche, bei welchen keine Unterschiede des Expressionsprofils zwischen Vorder-, Hinterhorn und Pars intermedia nachgewiesen werden konnten, erfolgte die molekularbiologische Analyse mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion nur am medialen Meniskus im Bereich der Pars intermedia. In diesem Bereich lies sich ausreichend Material für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion isolieren.

Auswertung der Röntgenaufnahmen der Kniegelenke

Die Auswertung der Röntgenaufnahmen im anterior-posterioren und seitlichen Strahlengang aller Kniegelenke der Kontroll- und Degenerationsgruppe erfolgte zusammen mit einem Facharzt für Orthopädie (Prof. Dr. M. Schwarz, Oberarzt des Orthopädisch-Unfallchirurgisches Zentrums, Universitätsmedizin Mannheim).

Die Kniegelenke der Kontrollgruppe zeigten Normalbefunde (Abb. 4.8 A) oder leichte osteoarthrotische Veränderungen. Die Kniegelenke der Degenerationsgruppe zeigten verstärkte Osteophytenbildung (Abb. 4.8 B1, schwarzer Pfeil) oder Entrundungen des gelenknahen Knochens (Abb. 4.8 B1, C1, jeweils 1). In drei Kniegelenken der Degenerationsgruppe konnte eine röntgendichte Struktur im medio-dorsalen Gelenkspalt nachgewiesen werden (Abb. 4.8 C1, C2, jeweils 3). Zur weiteren Charakterisierung dieser Struktur wurde das Gewebe histologisch untersucht (siehe 4.7)

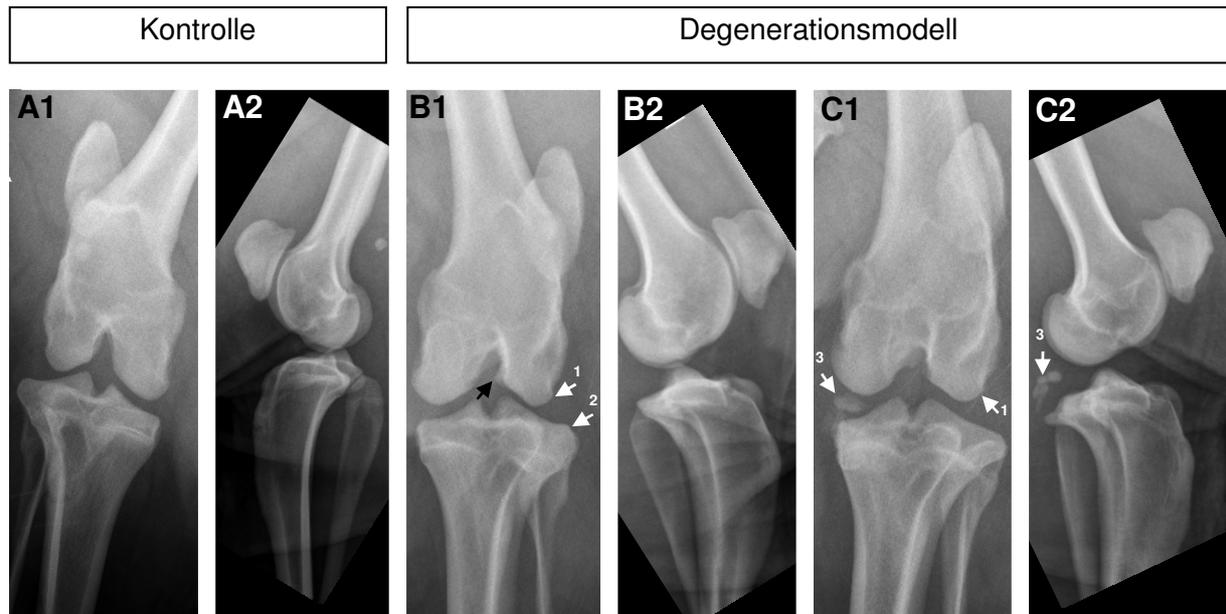


Abb. 4.8: Röntgenuntersuchung der Kniegelenke der Kontrollgruppe und des Degenerationsmodells in anterior-posteriorem (A1, B1, C1) und seitlichem (A2, B2, C2) Strahlengang. Das repräsentative Kniegelenk der Kontrollgruppe (A) zeigt einen Normalbefund. Die Kniegelenke des Degenerationsmodells (B, C) zeigen die Bildung von Osteophyten (schwarzer Pfeil in B1 und 2 in B1) und Entrundungen des gelenknahen Knochens (1 in B1, C1). In drei Kniegelenken des Degenerationsmodells konnte eine röntgendichte Struktur im medio-dorsalen Gelenkspalt (3 in C) nachgewiesen werden.

Auswertung der kernspintomographischen Bildgebung

Die Auswertung der kernspintomographischen Bildgebung zeigte, dass die Resektion des vorderen Kreuzbandes in allen linken Kniegelenken erfolgreich war. In manchen Kniegelenken der Degenerationsgruppe konnte der distale Kreuzbandstumpf noch dargestellt werden; eine Verbindung zum Rest des vorderen Kreuzbandes war in keinem Fall gegeben. In einzelnen Fällen bewirkte dies eine Verschiebung der Tibia in die Anteriorität (Phänomen der vorderen Schublade, Abb. 4.9, B1). In allen Kniegelenken beider Gruppen war das hintere Kreuzband stets intakt.

In der Kernspintomographie stellten sich die Menisken im Kniegelenk der Kontrollgruppe homogen und schwarz dar (Abb. 4.9, A), während die Menisken der Degenerationsgruppe häufig eine Zunahme der Signalintensität zeigten (Abb. 4.9, B2, Pfeile). Diese Veränderung der Signalintensität gilt als ein Zeichen der Degeneration (Raunest et al., 1994) und wurde getrennt für Vorder- und Hinterhorn,

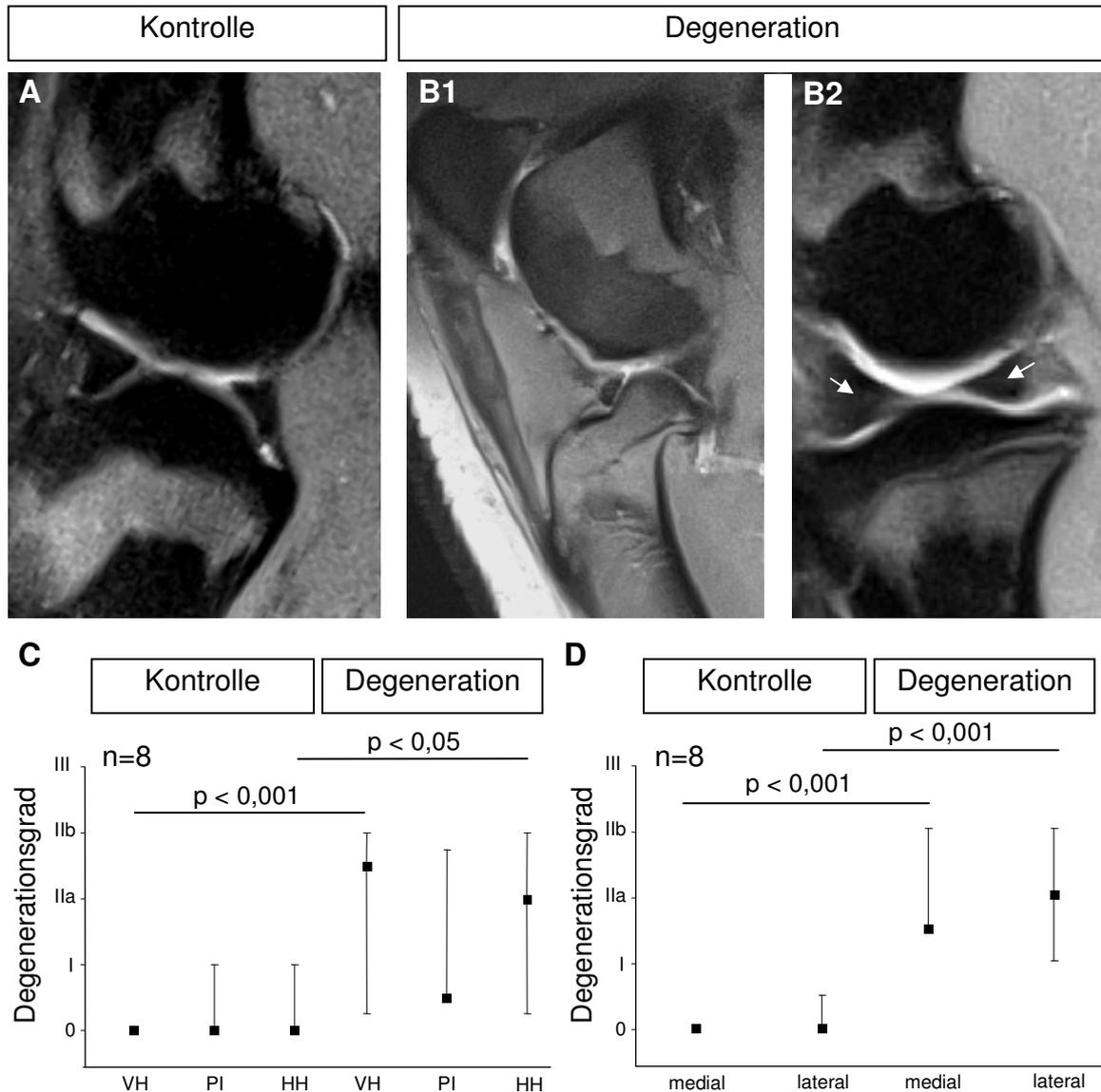


Abb. 4.9: Kernspintomographische Untersuchung und Auswertung der Kniegelenke der Kontrollgruppe und des Degenerationsmodells. Im sagittalen Schnittbild eines Kontrollknies (A) stellt sich der mediale Meniskus homogen und schwarz dar. Femur und Tibia stehen aufeinander. Im Kniegelenk des Degenerationsmodells kommt es durch das fehlende vordere Kreuzband zur Verschiebung der Tibia nach vorne (B1). Diese Kniegelenke zeigen häufig eine intrameniskale Zunahme der Signalintensität (B2, Pfeile). Durch die Änderung der Signalintensität wurde der Degenerationsgrad von Vorder-, Hinterhorn (VH, HH) und Pars intermedia (PI) aller medialen Menisken bestimmt (C). Sowohl die medialen als auch die lateralen Menisken des Degenerationsmodells zeigen eine deutliche Degeneration im MRT im Vergleich zur Kontrollgruppe (D).

sowie für die Pars intermedia für alle Menisken nach einem Scoring-System (Raunest et al., 1994) bewertet. Nach Auswertung aller medialen Menisken zeigte sich eine signifikante ($p < 0,01$) Degeneration in den Vorder- und Hinterhörnern (Abb. 4.9 C, Tab. 4.4) der Menisken des Degenerationsmodells ($n = 8$). Die Pars intermedia zeigt dagegen keine signifikante Degeneration des Meniskusgewebes (Abb. 4.9 C, Tab. 4.4). Im Gesamtvergleich aller Menisken der beiden Gruppen zeigte sich, dass auch der laterale, ebenso wie der mediale Meniskus der Degenerationsgruppe eine signifikante ($p < 0,001$; $n = 8$) Degeneration zeigten (Abb. 4.9 D, Tab. 4.5).

Tab. 4.4: Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.9 (C).

		Kontrolle			Degeneration		
		VH	PI	HH	VH	PI	HH
Kontrolle	VH	-	n. s.	n. s.	$p < 0,01$	-	-
	PI	n. s.	-	n. s.	-	n. s.	-
	HH	n. s.	n. s.	-	-	-	$p < 0,05$
Degeneration	VH	$p < 0,01$	-	-	-	n. s.	n. s.
	PI	-	n. s.	-	n. s.	-	n. s.
	HH	-	-	$p < 0,05$	n. s.	n. s.	-

Der mediale Meniskus der Degenerationsgruppe zeigte eine Degeneration im Stadium I bis IIa (Abb. 4.9, D). Der Unterschied zum lateralen Meniskus dieser Gruppe ist nicht signifikant (Tab. 4.5).

Makroskopische Befunde der Meniskuspräparation

Nach der Bildgebung mittels Kernspintomographen und Röntgen erfolgte die Tötung der Tiere in tiefer Narkose. Unmittelbar nach Todesfeststellung wurde die Stabilität beider Kniegelenke untersucht und miteinander verglichen. Alle Tiere zeigten eine ausgeprägte Instabilität auf der linken Seite, wie sie bei Verletzungen des vorderen Kreuzbandes vorkommt (Phänomen der auslösbaren vorderen Schublade). Die klinische Untersuchung zeigte bei einem Tier einen tastbaren Kniegelenkserguss. Es folgte die zügige Präparation der Kniegelenke, wobei auch die Bandstrukturen der Kniegelenke bewertet wurden: Ausnahmslos alle hinteren Kreuzbänder waren intakt. Auf der rechten Seite (Kontrolle) waren ebenfalls auch alle vorderen Kreuzbänder intakt. Im linken Kniegelenk (Degenerationsmodell) fehlten alle vorderen Kreuzbänder. Vereinzelt konnten die Stümpfe der vorderen Kreuzbänder dargestellt werden. Im Anschluss wurden die Menisken dargestellt. Bei drei von acht Tieren zeigte sich im linken Kniegelenk (Degenerationsmodell) eine am Hinterhorn des medialen Meniskus anhaftende, stark verhärtete Struktur, welche isoliert und zur weiteren histologischen Analyse (siehe 4.7) in Formalin fixiert wurde.

Tab. 4.5: Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.9 (D).

		Kontrolle		Degeneration	
		medial	lateral	medial	lateral
Kontrolle	medial	-	n. s.	p < 0,001	-
	lateral	n. s.	-	-	p < 0,001
Degeneration	medial	p < 0,001	-	-	n. s.
	lateral	-	p < 0,001	n. s.	-

Bei der Isolation der Menisken aus dem Kniegelenk und dem anschließenden Zerschneiden der Menisken, erwiesen sich die medialen Menisken des Degenerationsmodells als schwer schneidbar. Die von Ferrer-Roca et al. (1978a) beschriebenen makroskopischen mukoiden Verfärbungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Histopathologische Beurteilung des Meniskusgewebes

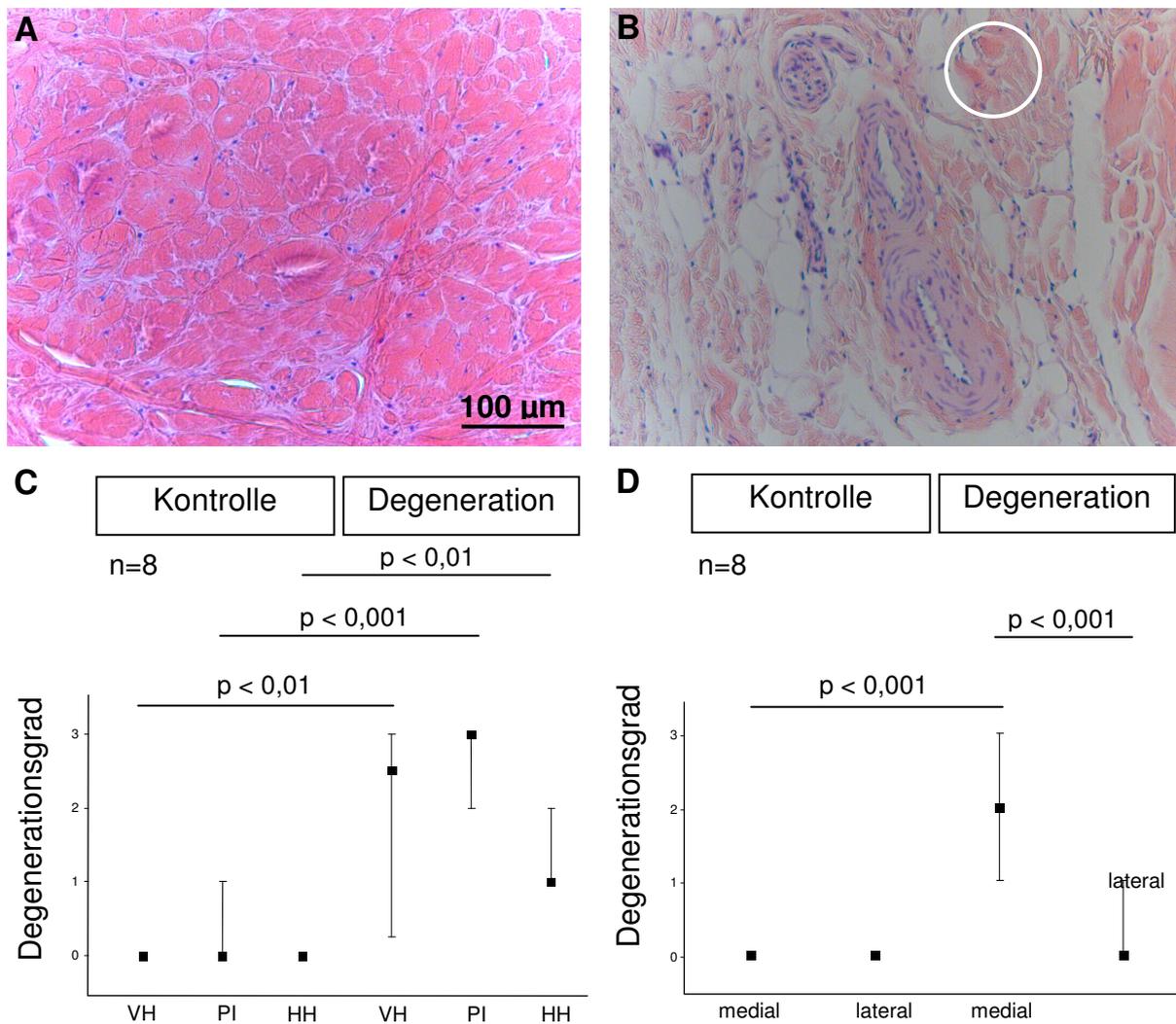


Abb. 4.10: Histologische Beurteilung der Degeneration von Menisken der Kontrollgruppe und des Degenerationsmodells. Anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird eine vierstufige Einteilung vorgenommen. Bei homogener gefärbter Matrix mit ausgeglichener Zellverteilung (A) liegt keine Degeneration vor (Grad 0). Bei schwersten degenerativen Veränderungen wie basophiler (blauer) Matrixfärbung, mukoiden Veränderungen (Kreis in B) sowie der Separation des Faserknorpels handelt es sich um eine Degeneration 3. Grades (B). Es wurde Degenerationsgrad von Vorder-, Hinterhorn (VH, HH) und Pars intermedia (PI) aller medialen Menisken bestimmt (C). Eine deutliche Degeneration ist nur in den medialen Menisken des Degenerationsmodells zu beobachten (D).

Mit Hilfe des bereits vorgestellten histopathologisch-basierten Scoring-Systems (Krenn et al., 2010a) sollten auch die Menisken der Tierversuche auf degenerative Veränderungen untersucht werden. Abbildung 4.10 A zeigt ein repräsentatives Schnittpräparat aus dem medialen Meniskus der Kontrollgruppe. Weder in Vorder- oder Hinterhorn, noch in der Pars intermedia der medialen Menisken der Kontrollgruppe konnten Zeichen einer höhergradigen Degeneration beobachtet werden (Abb. 4.10 C). Die medialen Menisken des Degenerationsmodells zeigten deutliche Zeichen einer höhergradigen Degeneration, wie z. B. die basophile Matrixfärbung (Blaufärbung des Präparates) und mukoide Veränderungen, welche sich durch über- und unterfärbte Areale (Krenn et al., 2008) auszeichnen (Kreis in Abb. 4.10 B). Teilweise fanden sich auch flächig ausgeprägte mukoide Degenerationen sowie Separationen, Riss- und Spaltbildungen des Meniskusgewebes (Abb. 4.10 B). Der laterale Meniskus des Degenerationsmodells zeigte keine solchen degenerativen Veränderungen. Der statistische Vergleich von Vorderhorn, Hinterhorn und Pars intermedia der Kontrollgruppe mit den entsprechenden anatomische Bereichen der Menisken des Degenerationsmodells zeigt stets eine signifikante Degeneration (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.10 (C).

		Kontrolle			Degeneration		
		VH	PI	HH	VH	PI	HH
Kontrolle	VH	-	n. s.	n. s.	p < 0,01	-	-
	PI	n. s.	-	n. s.	-	p < 0,001	-
	HH	n. s.	n. s.	-	-	-	p < 0,01
Degeneration	VH	p < 0,01	-	-	-	n. s.	n. s.
	PI	-	p < 0,001	-	n. s.	-	p < 0,05
	HH	-	-	p < 0,01	n. s.	p < 0,05	-

Im Gesamtvergleich der Menisken, in welchen für jeden Meniskus die Werte aus Vorder- und Hinterhorn sowie der Pars intermedia eingingen, zeigte sich, dass nur der mediale Meniskus des Degenerationsmodells eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme auf eine Degeneration 2. Grades aufwies (Abb. 4.10 D, Tab. 4.7).

Zusammenfassend zeigte sich, dass nur der mediale Meniskus des Degenerationsmodell eine deutliche Degeneration nach einer postoperativen Standzeit von 26 Wochen aufwies (Abb. 4.10 D). Innerhalb dieser medialen Menisken zeigte sich die deutlichste Degeneration in der Pars intermedia und im meniskalen Vorderhorn. Es muss diskutiert werden, warum die Ergebnisse der histopathologischen Analyse teilweise nicht mit den Ergebnissen der kernspintomographischen Bildgebung übereinstimmen.

Tab. 4.7: Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.10 (D).

		Kontrolle		Degeneration	
		medial	lateral	medial	lateral
Kontrolle	medial	-	n. s.	$p < 0,001$	-
	lateral	n. s.	-	-	n. s.
Degeneration	medial	$p < 0,001$	-	-	$p < 0,001$
	lateral	-	n. s.	$p < 0,001$	-

4.6 Expressionsprofil bei sekundärer Meniskusdegeneration

Auf Grund der Ergebnisse der histopathologischen Auswertung (Goldstandard der Charakterisierung der Degeneration), welche die stärkste Degeneration in der Pars intermedia der medialen Menisken des Degenerationsmodells zeigen konnten, wurden für die Analyse des Expressionsprofils jeweils die Pars intermedia der medialen Menisken beider Gruppen miteinander verglichen.

Expressionsprofil des Meniskusgewebes

Analog zur Analyse des veränderten Expressionsprofils bei primärer Meniskusdegeneration in den Kadaverkniegelenken von adulten Zuchtschweinen wurde die Untersuchung des Expressionsprofils des Meniskusgewebes aus dem Tiermodell für sekundäre Meniskusdegeneration durchgeführt.

Von den untersuchten Struktur-bildenden Genen Kollagen-1 und -2, sowie Aggrekan und Decorin zeigte sich nur bei Kollagen-1 eine signifikante ($p < 0,05$) Mengenänderung des Genprodukts (Tab. 4.8). Die normalisierte Expression nimmt von $0,48 \pm 0,28\%$ ($n = 8$) in der Kontrollgruppe auf $1,21 \pm 0,82\%$ ($n = 8$) in den degenerierten medialen Menisken zu (Tab. 4.8). Die verbleibenden Strukturproteine zeigen, wie auch die untersuchten katabolen Matrixmetalloproteinasen, keine signifikante Änderung der Genexpression (Tab. 4.8). Das als Entzündungsmediator bekannte Interleukin-1 β konnte weder in den medialen Menisken der Kontrollgruppe noch im Degenerationsmodell nachgewiesen werden (Tab. 4.8). Auch Interleukin-8 zeigte in beiden Gruppen nur eine sehr schwache Expression, welche sich durch die Degeneration auch nicht änderte. Eine Genexpression des Lubrikants Lubricin konnte nur in 6 Tieren der untersuchten 16 Göttingen Minipigs nachgewiesen werden (Tab. 4.8). Auf Grund der reduzierten Anzahl lässt sich deshalb keine statistisch valide Aussage über eine Änderung der Genexpression treffen (siehe 3.13). Die Expression des Gens VEGF zeigte keine signifikante Änderung im Vergleich der beiden Gruppen (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion. Für jedes untersuchte Gen ist die normalisierte Expression von medialen Menisken der Kontrollgruppe (rechtes Knie) und der degenerierten Seite gegenübergestellt und die Expressionsänderung beschrieben.

Gen	normalisierte Expression [%]		t-Test	Expressionsänderung
	Kontrolle (n = 8)	Degeneration (n= 8)		
Kollagen-1A1	0,48 ± 0,28	1,21 ± 0,82	p < 0,05	Zunahme
Kollagen 2	0,80 ± 0,82	0,44 ± 0,23	n. s.	Keine signifikante Änderung
Aggrekan	40,72 ± 59,54	17,39 ± 11,74	n.s.	Keine signifikante Änderung
SOX-9	0,04 ± 0,03	0,47 ± 0,95	n.s.	Keine signifikante Änderung
Interleukin-1β	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	-	-
Interleukin-8	0,08 ± 0,14	0,03 ± 0,02	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-2	2,65 ± 1,15	4,12 ± 1,88	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-3	5,67 ± 4,04	6,41 ± 4,36	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-8	0,49 ± 0,22	0,68 ± 0,78	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-9	0,08 ± 0,21	0,01 ± 0,02	n.s.	Keine signifikante Änderung
MMP-13	3,39 ± 6,61	3,11 ± 5,61	n.s.	Keine signifikante Änderung
VEGF	1,04 ± 0,80	0,76 ± 0,59	n.s.	Keine signifikante Änderung
Lubricin	1,42 ± 1,25 *	0,56 ± 0,70 *	-	- *
Decorin	76,95 ± 21,54	161,85 ± 148,87	n.s.	Keine signifikante Änderung

* Lubricin war nur bei n = 6 von 16 Tieren nachzuweisen

Immunhistochemische Analyse des Meniskusgewebes

Die angefertigten Querschnitte aus der Pars intermedia der medialen Menisken beider Gruppen wurden mit einem Antikörper gegen Kollagen-1 behandelt, um die Zunahme des Kollagen-1-Genprodukts auf Proteinebene zu verifizieren.

Die Schnittpräparate der juvenilen Kontrollgruppe zeigten eine schwache bis mittestärke Färbung (Abb. 4.11 B). Die Färbung der Schnittpräparate des Degenerationsmodells zeigten eine deutlich stärkere Färbung (Abb. 4.11 C). Die durch die quantitative Polymerase-Kettenreaktion beschriebene Zunahme des Genprodukts an Kollagen-1 (Tab. 4.8) könnte als Ursache für die Zunahme der Proteinmenge angesehen werden.

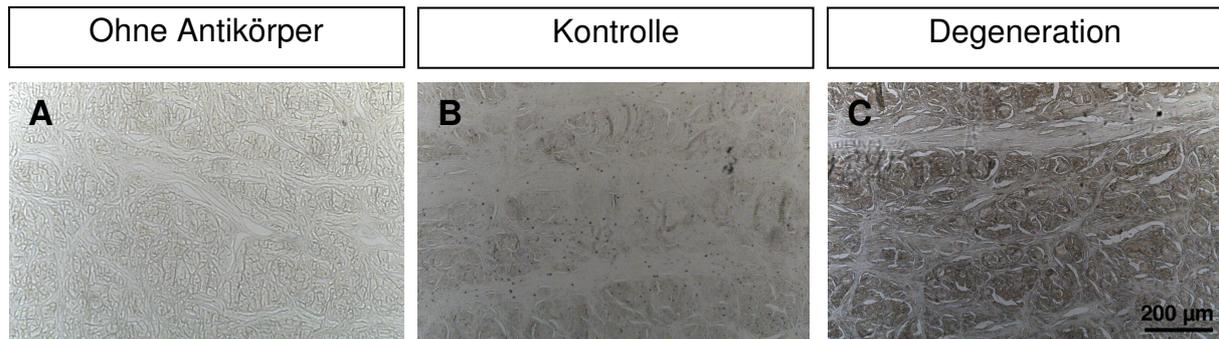


Abb. 4.11: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-1 in der Pars intermedia der medialen Menisken der Kontrollgruppe und des Degenerationsmodells. Im Vergleich zum Meniskusquerschnitt, welcher nicht mit dem Antikörper gegen Kollagen-1 behandelt wurde (A) zeigt sich bei den der Kontrollgruppe eine schwache Färbung des Schnittpräparates (B). Die Menisken des Degenerationsmodells zeigen dagegen eine deutlich stärkere Färbung (C).

4.7 Strukturveränderungen bei sekundärer Meniskusdegeneration

Histologische Beurteilung des Meniskusgewebes

Analog dem Vorgehen bei der Analyse der primären Meniskusdegeneration im Kadaverknie von adulten Zuchtschweinen wurde im Folgenden eine weitergehende histologische Analyse der Menisken aus dem Tiermodell mit sekundärer Meniskusdegeneration durchgeführt. Diese sollte mögliche Veränderungen in der Struktur der Kollagenfasern und der Verteilung der Proteoglykane darstellen. Hierzu wurden Schnittpräparate aus Vorder- und Hinterhorn sowie der Pars intermedia aller medialer und lateraler Menisken gefärbt und ausgewertet. Des Weiteren wurden nach einer Entkalkung in Osteodec (Bio-Optica, Mailand, Italien) Schnittpräparate aus den oben beschriebenen Anhaftungen an drei medialen Menisken der Degenerationsgruppe hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Querschnitte der Menisken beider Gruppen zeigten ein Bild mit überwiegender Grünfärbung im meniskalen Zentralbereich und einer rot-orangen Färbung an den femoralen und tibialen Grenzflächen der Menisken (Abb. 4.12 A, B). Dies spricht für einen hohen Anteil an kurzen Kollagenfasern mit geringem Durchmesser im Meniskusinnern beider Gruppen. Die femorale Oberfläche der

Schnittpräparate einzelner Menisken der Degenerationsgruppe zeigte an der Meniskusspitze eine schwächere rot-orange Färbung als die übrigen Randbereiche (Abb. 4.12 B, Pfeile). In der Kontrollgruppe konnte dieses Phänomen nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.12 A).

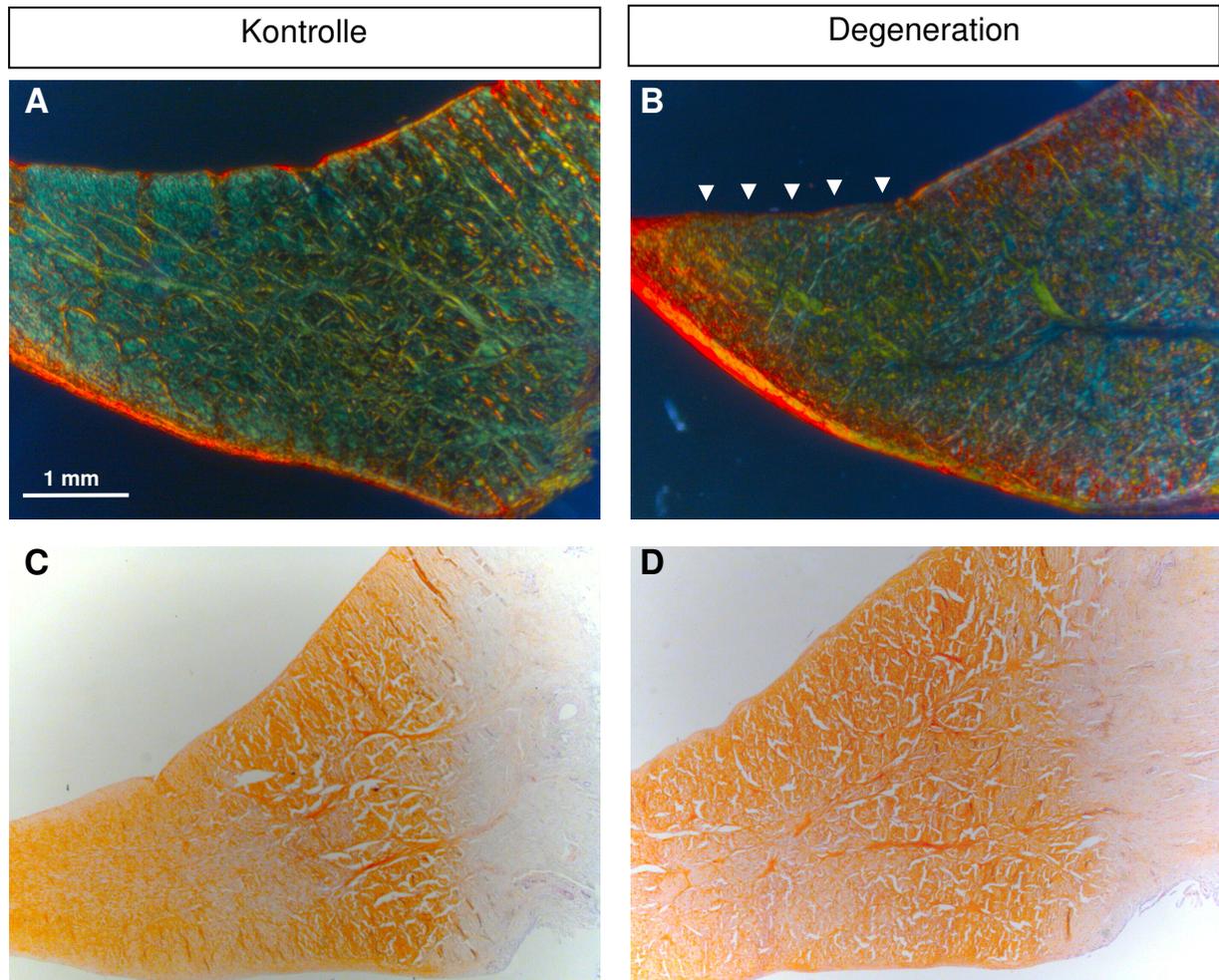


Abb. 4.12: Histologische Untersuchung der Menisken aus der Kontrollgruppe und aus dem Degenerationsmodell bezüglich ihrer Kollagen- und Proteoglykan-Struktur. Die Sirius Red-Färbung (A, B) zeigt keine deutlichen Unterschiede im Färbemuster im Vergleich zwischen den beiden Gruppen. Einige Menisken des Degenerationsmodells zeigen eine verdünnte femorale Oberfläche im Bereich der weißen Zone (Pfeile in B). Auch die Proteoglykan-Verteilung zeigt keine Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen: Die homogene Safranin O-Färbung (C, D) beginnt an der Meniskusspitze und endet am Übergang zur roten Zone.

Die Proteoglykan-spezifische Färbung mit Safranin O zeigt ebenfalls keine Unterschiede in den zu vergleichenden beiden Gruppen: Sowohl die Menisken der Kontrollgruppe (Abb. 4.12 C), als auch die Menisken des Degenerationsmodells (Abb. 4.12 D) zeigen ein homogenes mittelstarkes Färbemuster, welches an der Meniskusspitze beginnt und erst am Übergang der rot-weißen zur roten Zone endet.

Wie bereits oben beschrieben, zeigten sich an drei von acht medialen Menisken der Degenerationsgruppe eine röntgendichte Struktur im dorso-medialen Gelenkspalt (Abb. 4.8 C, 3). Dieses Gewebe wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histopathologisch untersucht. Es kann in allen drei Fällen als fasriges Bindegewebe mit zum Teil zahlreichen Chondrozyten beschrieben werden. Auf Grund des histologischen Präparates kann das röntgendichte Gewebe am ehesten als verändertes Meniskusgewebe interpretiert werden.

Transmissionselektronenmikroskopische Beurteilung des Meniskusgewebes

Wie auch bei den Menisken mit primärer Meniskusdegeneration konnte bei den Menisken des Tiermodells histopathologisch eine Degeneration der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden (siehe 4.1 und 4.5). Die weitere histologische Auswertung (Sirius Red und Safranin O-Färbungen) zeigten allerdings unterschiedliche Ergebnisse: Während sich bei der primären Meniskusdegeneration deutliche Unterschiede bezüglich des Kollagengerüsts und der Proteoglykan-Verteilung zeigten, konnten bei den Menisken mit sekundärer Meniskusdegeneration nur vereinzelt Veränderungen an der Meniskusspitze beschrieben werden.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie an der Spitze des meniskalen Vorderhorns aller Menisken der Kontroll- und Degenerationsgruppe (je $n = 8$) sollte eine weiterführende Analyse der Kollagen-Struktur erfolgen. Das Kollagengerüst aller Menisken wurde nach dem bereits vorgestellten, auf der Transmissionselektronenmikroskopie basierenden, Scoring-System (Gelber et al. 2008) bewertet.

Sowohl die medialen als auch die lateralen Menisken der Kontrollgruppe zeigten überwiegend ein intaktes Kollagengerüst des Vorderhorns mit parallel an-

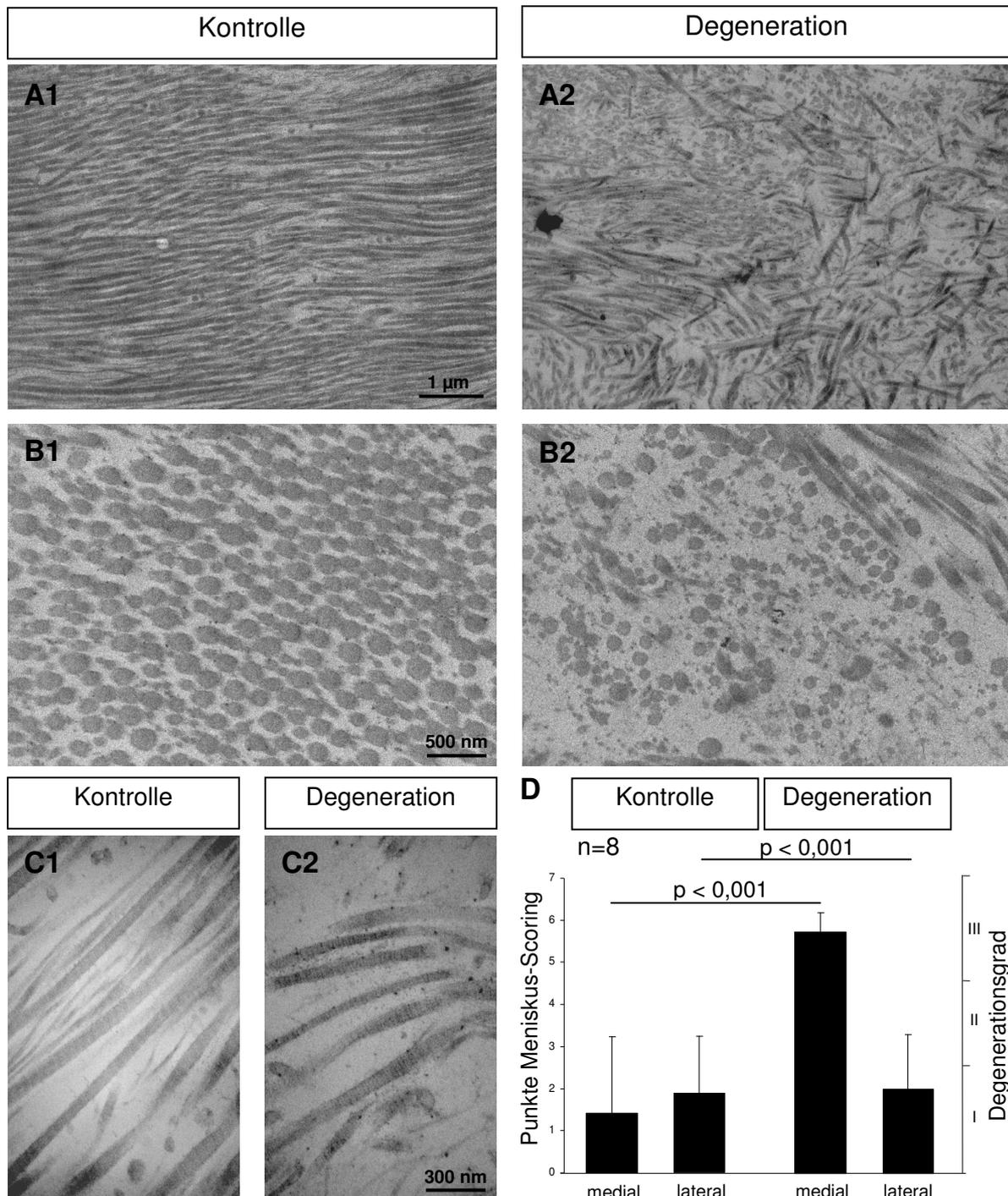


Abb. 4.13: Transmissionselektronenmikroskopische Beurteilung des meniskalen Kollagenfasergerüsts. Anhand der Struktur des Kollagenfasergerüsts wird der meniskale Degenerationsgrad eingeteilt. Parallel angeordnete (A1), dicht gepackte (B1) Kollagenfasern mit deutlicher Streifung (C1) sprechen für eine Degeneration I. Grades. Eine inhomogene (A2), deutlich aufgelockerte (B2) Anordnung von nur schwach gestreiften (C2) Kollagenfasern stehen für eine höhergradige Degeneration. Alle Menisken der Kontrollgruppe sowie die lateralen Menisken des Degenerationsmodells sind nur wenig degeneriert (D), während der mediale Meniskus des Degenerationsmodells eine hochgradige Degeneration aufweist (D).

geordneten (Abb. 4.13 A1), dicht gepackten (Abb. 4.13 B1) Kollagenfasern mit kontrastreich dargestellter Querstreifung (Abb. 4.13 C1). Auch die Vorderhörner der lateralen Menisken des Degenerationsmodells zeigten einen ähnlichen Zustand des Kollagenfasergerüsts (Abb. 4.13 D). Im Gegensatz hierzu zeigte sich das Kollagenfasergerüst der Vorderhörner der medialen Menisken des Degenerationsmodells eher aufgelockert (Abb. 4.13 A2) und weniger dicht gepackt (Abb. 4.13 B2). Die Kollagenfasern waren teilweise zerstört und eine Querstreifung war weniger ausgeprägt (Abb. 4.13 C2).

Nach Analyse aller meniskalen Vorderhörner der beiden Gruppen zeigten die medialen und lateralen Vorderhörner der Kontrollgruppe sowie die lateralen Vorderhörner der Menisken des Degenerationsmodells eine Degeneration I. Grades (normaler Meniskus, Abb. 4.13 D). Die Vorderhörner der medialen Menisken ($n = 8$) des Degenerationsmodells zeigten eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Degeneration auf eine Degeneration III. Grades (Abb. 4.13, Tab. 4.9).

Tab. 4.9: Ergebnisse der statistischen Analyse von Abb. 4.13 (D).

		Kontrolle		Degeneration	
		medial	lateral	medial	lateral
Kontrolle	medial	-	n. s.	$p < 0,001$	-
	lateral	n. s.	-	-	n. s.
Degeneration	medial	$p < 0,001$	-	-	$p < 0,001$
	lateral	-	n. s.	$p < 0,001$	-

5. Diskussion

Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind (1) die Analyse der primären degenerativen Veränderungen im porcinen Meniskus bezüglich des genetischen Expressionsprofils und der Kollagenstruktur. Des Weiteren konnte (2) ein Tiermodell beschrieben werden, welches eine induzierte, sekundäre Meniskusdegeneration zeigt, welche ebenfalls bezüglich Änderungen des Expressionsprofils und der Struktur der Extrazellulärmatrix untersucht wurde. Es muss diskutiert werden, ob die degenerativen Veränderungen im Meniskusgewebe des Tiermodells eine ausreichende Ähnlichkeit mit der primären Meniskusdegeneration besitzen, um evtl. auch mit Hilfe des Tiermodells grundlegende Fragestellungen bezüglich der Meniskusdegeneration im Allgemeinen adressieren zu können.

5.1 Die primäre Meniskusdegeneration im porcinen Kniegelenk

Primäre Meniskusdegeneration im Kadaverknie des Zuchtschweins

Die Entwicklung eines Tiermodells für Meniskusdegeneration ist immer auf die sekundäre Meniskusdegeneration limitiert, da jede Manipulation am Kniegelenk (operativ, medikamentös, etc.) ursächlich für die entstehende Meniskusdegeneration sein kann, auch wenn es sich um eine indirekte Manipulation handelt, welche nicht direkt die Menisken betrifft, sondern andere Strukturen wie z. B. Band- oder Knorpelstrukturen. In der vorliegenden Arbeit sollte ein initialer Versuch unternommen werden, die primäre Meniskusdegeneration zu charakterisieren. Hierzu wurden Menisken aus adulten Zuchtschweinen untersucht, welche makroskopische Zeichen der Kniegelenksdegeneration aufwiesen (siehe 4.1). Es ist bekannt, dass für die hier verwendeten Zuchtschweine zur Nahrungsgewinnung auf Grund der Haltungsbedingungen ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von chronischen degenerativen Kniegelenkserkrankungen, wie Gonarthrose, besteht (Kielstein et al., 1987). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Menisken der adulten Zuchtschweine zeigten histopathologisch gesicherte Anzeichen einer Degeneration 2. Grades (Abb.

4.1). Nach wie vor gilt die hier durchgeführte histopathologische Beurteilung als sensitivste Befundung von degenerativ verändertem Gewebe (Raunest et al., 1994). Es muss allerdings diskutiert werden, ob es sich im Sinne der Definition um eine primäre Meniskusdegeneration handelt: Die makroskopische Begutachtung der Kniegelenke ergab keine Hinweise auf ein stattgehabtes Kniegelenkstrauma (Bandstrukturen intakt, keine Meniskusrisse, etc.). Allerdings konnten in allen adulten Kniegelenken positive Anzeichen einer Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels nachgewiesen werden. Letztendlich lässt sich nicht ausschließen, dass diese degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels zur Entstehung der nachgewiesenen Meniskusdegeneration beitrugen. Wahrscheinlicher scheint allerdings, dass die Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels bereits eine Folge der Meniskusdegeneration ist. Aktuelle Studien konnten meniskale Veränderungen als Risikofaktor der Gonarthrose eindeutig identifizieren (Katz et al., 2009). Darüber hinaus muss diskutiert werden, welchen Einfluss meniskale Alterungsprozesse auf die in dieser Arbeit erhobenen Daten haben, da zwischen der juvenilen Kontrollgruppe und den adulten Menisken einen Altersunterschied von viereinhalb Jahren besteht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass degenerative Veränderungen, wie die Entstehung mukoider Veränderungen oder Mengenänderungen der Proteoglykane nicht allein durch das Altern des Gewebes hervorgerufen werden (Boya et al., 2004; Herwig et al., 1984).

Zusammenfassend kann also im Fall der in dieser Arbeit verwendeten adulten Menisken der Zuchtschweine vom Vorliegen einer primären Meniskusdegeneration ausgegangen werden, welche nachfolgend charakterisiert werden sollte.

Markergene der primären Meniskusdegeneration

Die primär degenerierten Menisken wurden im Anschluss an die histopathologische Begutachtung auf Veränderungen des Genexpressionsprofils untersucht. Die Auswahl der untersuchten Gene stützte sich vor allem auf die in der Literatur beschriebenen Markergene für die degenerative Veränderung des hyalinen Gelenkknorpels (Aigner et al., 2008; Aigner et al., 2006a, 2006b; Stoker et al. 2006;

Hsieh et al., 2004). Es wurde versucht, die verschiedenen Einflüsse der Degeneration abzubilden: Neben den Strukturproteinen Kollagen-1, -2, Aggrecan und Decorin wurden vor allem Gene des katabolen Metabolismus, wie z. B. die Matrixmetalloproteinasen untersucht. Auch deren Gegenspieler, wie das Gen SOX-9, welches die Stabilität des Chondrozyten-Metabolismus stärkt (Ochi et al., 2003), wurden in die Analyse eingeschlossen. Um die Beteiligung inflammatorischer Prozesse beschreiben zu können, wurden für Interleukine kodierende Genprodukte analysiert. Der Fokus dieser molekularbiologischen Analyse wurde auf die Pars intermedia des medialen Meniskus gelegt. Vorhergehende Studien am humanen Meniskus haben gezeigt, dass weder in gesunden, noch in degenerierten Menisken ein signifikanter Unterschied zwischen der Genexpression in Vorder- und Hinterhorn besteht (Reisig et al., 2010). Auch die Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Pilotversuchs zur Entwicklung eines porcinen Tiermodells mit sekundärer Meniskusdegeneration, in welchem die Genexpression repräsentativer Gene verglichen wurde, zeigte keinen Unterschied zwischen den drei meniskalen Bereichen Vorder-, Hinterhorn und Pars intermedia (siehe 4.5). Die Beschränkung auf den medialen Meniskus ist durch die Biomechanik des Kniegelenks begründet: 60-80% der einwirkenden Kräfte wirken auf das mediale Kompartiment des Kniegelenks ein (Cerejo et al., 2002), denen der mediale Meniskus auf Grund seiner ligamentären Fixierung deutlich schlechter ausweichen kann als der laterale Meniskus (Vedi et al., 1999).

Die Genexpression des Haupt-Strukturproteins des Meniskusgewebes, Kollagen-1, nahm in den primär degenerierten Menisken signifikant ab (Tab. 4.2). Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen aus dem hyalinen Gelenkknorpel, wo die Menge an Genprodukten von Kollagen-2 (der Hauptkomponente des Gelenkknorpels) zunimmt (Lorenz et al., 2005). Diese, beim Gelenkknorpel beschriebene Zunahme des Strukturproteins Kollagen-2 könnte in einer Gegenregulation zum katabolen Stoffwechsel sein. So konnte eine Zunahme der Genexpression von Kollagen-2 im Gelenkknorpel unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren wie den Interleukinen beobachtet werden (Fan et al., 2005). Das für die Chondrozyten bedeutendste Interleukin, Interleukin-1 β (Fan et al., 2006), konnte in den hier untersuchten Menisken nicht nachgewiesen werden, was die Abnahme des Genprodukts an Kollagen-1 erklären könnte. Dennoch kann eine inflammatorische

Beteiligung an der primären Meniskusdegeneration nicht ausgeschlossen werden, da die untersuchten Menisken eine Zunahme der Genexpression von Interleukin-8 zeigten, was für eine Beteiligung eines inflammatorischen Prozesses sprechen könnte. Interleukin-8 ist am degenerativen Umbau von Knorpel- und Knochengewebe beteiligt (Aida et al., 2006) und könnte so auch die degenerativen Veränderungen im Meniskusgewebe begünstigen.

Weitere Hochregulierungen zeigten die Matrixmetalloproteinasen-2 und -13, welche als Mediatoren des katabolen Stoffwechsels beschrieben sind (Aigner et al., 2006a, 2006b; Fan et al., 2005; Hsieh et al., 2004). Eine Zunahme der Genprodukte dieser Gene gilt beim hyalinen Gelenkknorpel als Zeichen einer Verschiebung des Gleichgewichts vom anabolen hin zum katabolen Metabolismus und somit zur Degeneration (Aigner et al., 2006b). Das Lubrikant Lubricin, welches von Chondrozyten und Synoviozyten produziert wird (zur Übersicht: Niikura et al., 2007) und auch im Meniskus vorhanden ist (Lee et al., 2008; Jones et al., 2007; Schumacher et al., 2005), scheint sehr empfindlich auf Veränderungen im Organsystem Knie zu reagieren: eine Hochregulierung der Expression ist sowohl bei akuten Verletzungen des Gelenkknorpels (Jones et al., 2009), als auch bei isolierten Scherbelastungen zu beobachten (Nugent et al., 2006). Bei Osteoarthrose (Jones et al., 2007), bei Kompression (Wang et al., 2009) und bei Verletzungen des vorderen Kreuzbandes (Elsaid et al., 2008) zeigte sich allerdings eine Abnahme der Expression des Lubrikants in den Chondrozyten des hyalinen Knorpels. Im Gegensatz zum hyalinen Gelenkknorpel wurde Lubricin auch in den tieferen Schichten des Meniskus nachgewiesen (Schumacher et al., 2005), was auf eine weitere Funktion über die des Lubrikants hinaus hindeuten könnte. In der hier vorliegenden Studie zeigt Lubricin allerdings keine signifikante Änderung der Genexpression (Tab. 4.2) und kann somit nicht als Markergen für die meniskale Degeneration dienen.

Zu diskutieren bleibt die Validität der durchgeführten quantitativen Polymerase-Kettenreaktion: Alle untersuchten Gene zeigten eine große Standardabweichung (Tab. 4.2), was die interindividuelle Streuung indiziert. Die Gründe hierfür können vielschichtig sein: So ist bekannt, dass die Zellen des Meniskus keineswegs als einheitlich zu betrachten sind (Schumacher et al., 2005), was auch durch in vitro-Studien gezeigt werden konnte: Hier zeigen meniskale Zellkulturen unterschiedliche Änderungen ihres Genexpressionsprofils unter hypoxischen

Bedingungen (Adesida et al., 2007). Dies könnte zu einer Zunahme der inter-individuellen Unterschiede führen. Des Weiteren muss bei Untersuchungen von Genprodukten immer die Qualität der messenger-Ribonukleinsäuren hinterfragt werden. Die Hydrolyse und somit die Zerstörung dieser Genprodukte beginnt unmittelbar nach dem Tod des Individuums (Nunley et al., 1972). Für bradytrophe Gewebe konnte allerdings gezeigt werden, dass bei ununterbrochener Kühlung der Proben auf 4 °C die Überlebensdauer der Ribonukleinsäuren ca. 96 Stunden beträgt (Marchuk et al., 1998). Zusätzlich wurde versucht unterschiedlich lange Transport- und Präparationszeiten zu minimieren. Letztendlich hat auch die Wahl des Referenzgens deutlichen Einfluss auf die Aussagekraft der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (Ferguson et al., 2010). Das hier ausgewählte Haushaltsgen β -Actin ist allerdings für das Schwein als sehr stabil exprimiertes Gen beschrieben (Ferguson et al., 2010). Um Fehler bei der Durchführung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion zu minimieren wurden jede Probe im doppelten Ansatz untersucht (Dupletten) und die üblichen Kontrollen (siehe 3.8) durchgeführt.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit vier Gene (Kollagen-1A1, Interleukin-8, Matrixmetalloproteinase-2 und -13) mit signifikant geänderter Genexpression bei primärer Meniskusdegeneration identifiziert werden. Weitere Studien müssen die Sensitivität der Expressionsänderung untersuchen und zeigen, ob diese Gene, zusammen mit anderen kürzlich identifizierten Genen (Krenn et al., 2010a), auch als Markergene der primären humanen Meniskusdegeneration dienen können.

Gewebestruktur bei primärer Meniskusdegeneration

Die Abnahme der Genexpression des Strukturproteins Kollagen-1 in den Menisken mit primärer Meniskusdegeneration (Tab. 4.2) scheint nicht zu einer Abnahme der Protein-Menge von Kollagen-1 zu führen, was durch die Anfärbung mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte (Abb. 4.2). Die folgenden Untersuchungen zeigten allerdings, dass sich die Struktur des Kollagengerüsts im primär degenerierten Meniskusgewebe ändert. Die spezifische Kollagen-Färbung mittels Sirius Red zeigte einen zunehmenden Anteil an kurzen, dünnen Kollagen-Fasern im

Zentrum des Meniskus (Abb. 4.3). Hier könnte es sich um zerstörte Kollagenfasern handeln, was durch die transmissionselektronenmikroskopische Analyse in diesem Bereich bestätigt werden konnte (Abb. 4.4). Das Kollagenfasengerüst dünnt aus und verliert seine ursprüngliche Form, so dass von einer deutlichen Degeneration des Kollagenfasengerüsts gesprochen werden kann (Abb. 4.4 D). Letztlich sind wahrscheinlich diese Zerstörungen der Ultrastruktur der meniskalen Extrazellulärmatrix die Ursache für die in der histopathologischen Analyse detektierten Veränderungen, wie z. B. die Rissbildung. Diese Veränderungen des Kollagengerüsts sind typisch für Meniskusdegenerationen und sind wohl keine Folge des Altersunterschiedes der Zuchtschweine, da im humanen Meniskus gezeigt werden konnte, dass das Kollagenfasengerüst mit zunehmendem Alter dichter wird (Merkel, 1980). Darüber hinaus konnten sowohl beim Menschen (Dahmen et al., 1962), als auch im Tiermodell am Hund (Stockwell et al., 1984) solche Zerstörungen der Extrazellulärmatrix als Folge der Degeneration elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Das beschriebene Modell der adulten, primär degenerierten porcinen Kniegelenke scheint bezüglich der Zerstörung der Struktur der Kollagenfasern die primäre Meniskusdegeneration ausreichend gut darzustellen.

Die Proteoglykan-spezifische Färbung mit Safranin O (Rosenberg et al., 1971) zeigt eine Zunahme dieser wasserbindenden Proteine (Fithian et al., 1990) bei dem primär degenerierten Meniskusgewebe (Abb. 4.3). Dies stimmt mit den Daten von Brandt et al. (1991) überein, welche eine Zunahme des Proteoglykan-Gehalts von degeneriertem Gelenkknorpel im Hund beobachteten. Bei dieser Studie handelt es sich allerdings um eine induzierte, also sekundäre Degeneration des Knorpels. Für die primäre Knorpeldegeneration ist die Abnahme des Proteoglykan-Gehalts im Rinderknorpel beschrieben. Diese Reduktion beruht auf einer Zerstörung der Tertiärstruktur dieser Proteine (Aigner et al., 2004). Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung des primär degenerierten Meniskusgewebes (siehe 4.3) konnten solche Veränderungen an der Proteinstruktur der Proteoglykane nicht nachgewiesen werden. Es muss allerdings bedacht werden, dass die beobachtete Zunahme der Proteoglykane auch durch das unterschiedliche Alter der Zuchtschweine der beiden Gruppen bedingt sein könnte. Für das Schaf konnte gezeigt werden, dass bei neu geborenen Tieren (Alter: 2 Tage) nur in der Meniskusspitze Proteoglykane nachgewiesen werden konnten. Beim

adulten Schaf (Alter: 10 Jahre), aber auch schon im Alter von 19 Monaten, zeigt sich eine homogene Safranin O-Färbung über dem gesamten ovinen Meniskusquerschnitt (Melrose et al., 2005).

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich auch die Oberflächenbeschaffenheiten der primär degenerierten Menisken ändern. Bereits die kollagen-spezifische Färbung mit Sirius Red zeigte erste Hinweise auf Strukturveränderungen in der meniskalen Grenzschicht der Menisken mit primärer Meniskusdegeneration. So zeigte sowohl die tibiale als auch die femorale Randschicht vermehrt die Einlagerung kurzer Kollagenfasern (Abb. 4.3). Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse konnte zeigen, dass es durch das Ausdünnen der Kollagenfasern in ihrer Länge oder ihrem Durchmesser zu einer reduzierten Packungsdichte dieser Proteine kommt (Abb. 4.4). Es folgte deshalb die rasterelektronenmikroskopische Analyse der femoralen Oberfläche der Menisken mit primärer Meniskusdegeneration. Im Unterschied zu den juvenilen Menisken, welche eine glatte und homogene Oberfläche präsentierten (Abb. 4.5 A), imponierten die primär degenerierten Menisken mit einer welligen, von Rissen durchzogenen Oberfläche (Abb. 4.5 B). Die beschriebenen Risse der Oberfläche kommen wohl am ehesten durch die reduzierte Packungsdichte der Kollagenfasern zustande. Dies konnte bereits für degenerativ veränderte humane Menisken gezeigt werden (Refior et al., 1974).

Des Weiteren zeigte die rasterelektronenmikroskopische Analyse zahlreiche Auflagerungen auf der Oberfläche der Menisken mit primärer Meniskusdegeneration (Abb. 4.5 B). Aktuelle Studien (Fürst et al., 2010) beschreiben morphologisch ähnliche Auflagerungen als Kalziumkristalle. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine kalzifizierende Degeneration des Gewebes sein. Es handelt sich hierbei um eine spezielle Form der Meniskusdegeneration, welche als kalzinöse Degeneration beschrieben wird (Krenn et al., 2010b). Die von Fürst et al. (2010) beschriebenen Kalziumkristalle fanden sich allerdings auf dem hyalinen Gelenkknorpel, wo Kalzifizierungsprozesse unter Osteoarthrose beschrieben sind (Ea et al., 2011). Als Ursache der Kalzifizierung wird ein multifaktorielles Einwirken von u. a. genetischen Faktoren, dem Alter und Veränderungen der Extrazellulärmatrix beschrieben (Fukai et al., 2010; Pendleton et al., 2002). Solche Veränderungen der Extrazellulärmatrix, wie die Zerstörung des Kollagengerüsts konnten auch in den Menisken des

Degenerationsmodells nachgewiesen werden (siehe oben) und könnten mit zur Entstehung einer kalzinösen Degeneration beitragen. Es sollte deshalb die elementare Zusammensetzung der Auflagerungen auf der Meniskusoberfläche der primär degenerierten Menisken analysiert werden. Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie zeigte, dass die Auflagerungen keinen Kalzium-Anteil enthalten (Abb. 4.6 B), was gegen eine Kalzifizierung spricht. Vielmehr scheint es sich um Abrieb des Meniskugewebes zu handeln, da die Auflagerungen eine ähnliche Zusammensetzung wie das Meniskugewebe besitzt (Abb. 4.6 B). Das Abreiben von oberflächlichem Meniskugewebe führt selbst zu Änderungen des Genexpressionsprofils (Ochi et al., 2001) und könnte als Degenerationszeichen interpretiert werden. Weitere Studien müssen zeigen, ob die beschriebenen Auflagerungen wirklich meniskalen Ursprungs sind, oder z. B. Abrieb des korrespondierenden femoralen Gelenkknorpels.

Abschließend muss kritisch hinterfragt werden, inwiefern die oben beschriebenen Veränderungen des Kollagengerüsts die Funktion der Menisken beeinflussen. Hier wäre denkbar, isolierte porcine Menisken mit primärer Meniskusdegeneration mittels tribologischer Prüfstände zu testen, um so die mechanischen Eigenschaften des Faserknorpels unter Degeneration zu testen und mit denen gesunder Menisken zu vergleichen. Auch hier wurde für den hyalinen Gelenkknorpel Vorarbeit geleistet. Zahlreiche tribologische Prüfstände sind in der Lage den Reibungskoeffizient von Knorpel zu analysieren. Ein Nachteil der meisten Prüfstände ist die Testung der Reibungskräfte von Knorpel gegen ein nicht körpereigenes Material, wie z. B. Glas (Basalo et al., 2007; Gleghorn et al., 2007; Krishnan et al., 2005), Stahl (Morita et al., 2006), Zirconium (Patel et al., 1997) oder Aluminium (Wimmer et al., 2004). Um den physiologischen Gegebenheiten näher zu kommen, wurden für die tribologische Untersuchung von hyalinem Gelenkknorpel Prüfstände entwickelt, welche die Reibung von Knorpel gegen Knorpel analysieren können (Katta et al., 2008; Teeple et al., 2007a, 2007b). Hiermit konnte für den Gelenkknorpel gezeigt werden, dass unter Osteoarthrose der Reibekoeffizient zunimmt (Teeple et al., 2007a, 2007b). Für den Meniskus mit seiner speziellen, oben beschriebenen Form (siehe 2.2) ist kein tribologischer Prüfstand bekannt. Bei dessen Entwicklung sollte man auf die Möglichkeit der Nachahmung einer möglichst physiologischen Belastung achten. Ob der porcine Meniskus für diese tribologischen

Analysen geeignet ist, wird auf Grund seiner Kompressionseigenschaften noch kritisch diskutiert (Sweigart et al., 2004).

Zusammenfassend konnten bei den adulten Menisken von Zuchtschweinen primär degenerative Veränderungen in der Ultrastruktur der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden. Die Ursachen für diese Strukturveränderungen liegen in einem zerstörten Kollagen-Netzwerk begründet. Weiterführende Studien müssen die Auswirkungen dieser primären degenerativen Veränderungen auf die Biomechanik des Kniegelenks überprüfen.

Hochauflösende Kernspintomographie bei primärer Meniskusdegeneration

Die bisher diskutierten Ergebnisse konnten also eine Änderung der Kollagenstruktur in den Menisken mit primärer Meniskusdegeneration zeigen. Es sollte nun untersucht werden, ob diese strukturellen Veränderungen der Extrazellulärmatrix kernspintomographisch zu detektieren sind. Die kernspintomographische Bildgebung versucht mit immer größeren Magnetfeldstärken (aktuell bis 7,0 Tesla; Kraff et al., 2007) den Meniskus deutlicher darzustellen. Es sollen so Verfahren entwickelt werden, welche eine frühzeitige und nicht-invasive Beurteilung von beginnender Meniskusdegeneration ermöglichen. Die Detektion von degenerativen Prozessen im Meniskusgewebe ist aktueller Gegenstand der Forschung und erfolgt stets indirekt, z. B. über die Änderung der Relaxationszeit im degenerierten Gewebe (Zarins et al., 2010, Rauscher et al., 2008). Intrameniskale Strukturen konnten bisher allerdings ausschließlich an isolierten porcinen Menisken im hochauflösenden Kernspintomographen dargestellt werden (Kreinst et al., 2010). Es wurden hauptsächlich fasrige Strukturen dargestellt (siehe Abb. 4.7, B2, Pfeil), welchen das histologische Korrelat der radiären Kollagenfaserbündel (Fink 2001; Skaggs et al., 1994), zugeordnet werden konnte. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass für die primäre Degeneration hauptsächlich Veränderungen am Kollagengerüst charakteristisch sind. Es sollte hier also erstmals untersucht werden, ob eine direkte Detektion von Zeichen der primären Degeneration möglich ist. Hierzu wurden isolierte porcine Menisken aus primär degenerierten Kniegelenken von Zuchtschweinen mit Hilfe eines hochauflösenden Kernspintomographen untersucht. Zur weiteren Analyse

konnten nur die coronaren kernspintomographischen Schnittbilder der Pars intermedia herangezogen werden, da eine Zunahme der Signalintensität im Vorder- und Hinterhorn eine Darstellung intrameniskaler Strukturen verhinderte (Abb. 4.7 A-C). Begründet liegt diese Hyperintensität in den Randbereichen der Menisken im Phänomen des Magic Angle (Peterfy et al., 1994). Die Ursache dieses Phänomens ist eine Signalzunahme, wenn die Hauptverlaufsrichtung der Kollagenfasern mit dem Magnetfeld des Kernspintomographen einen Winkel von 54° einschließt (Fullerton et al., 2007). Es konnten allerdings kontrastreiche Schnittbilder der Pars intermedia von juvenilen und primär degenerierten Menisken erstellt werden (Abb. 4.7 C). Nach ausführlicher visueller Begutachtung dieser Schnittbilder konnten keine Unterschiede der beiden Gruppen benannt werden. Es scheint also keine visuell wahrnehmbaren Anzeichen der primären Degeneration zu existieren. In einem weiterführenden Ansatz wurden die erstellten Schnittbilder mittels texturanalytischer Verfahren ausgewertet. Es konnten zwei Texturparameter benannt werden, welche die primär degenerierten Menisken trennscharf von den juvenilen Menisken unterscheiden (Abb. 4.7 D). Bei diesen Texturparametern (siehe 4.4) handelt es sich um Ergebnisse abstrakter Analysen (Haralick et al., 1973; Arivazhagan et al., 2003), denen kein anatomisches oder biologisches Korrelat zugeordnet werden kann. Weitere Studien müssen zeigen, ob auf Grund der abnehmenden Mittelwerte beider Texturparameter in der Gruppe der primär degenerierten Menisken auf einen Verlust von Strukturinformation geschlossen werden kann, welcher mit dem Vorhandensein einer Degeneration korreliert und z. B. in der beschriebenen Zerstörung des Kollagengerüsts begründet sein könnte. Dies könnte durch einen direkten Vergleich von histopathologisch aufgearbeiteten Proben mit der zuvor stattgefunden kernspintomographischen Bildgebung des identischen Bereiches durchgeführt werden. Weiterhin muss untersucht werden, ob die Texturanalyse ein valides Detektionsmittel von Anzeichen degenerativer Veränderungen sein kann, da sie bei Änderungen an der Aufnahmesequenz oder dem Kernspintomographen als nicht reproduzierbar gilt (Schad et al., 2006).

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit Texturparameter ermittelt werden, welche einen Hinweis auf eine vorliegende primäre Meniskusdegeneration geben könnten. Weiterführende Studien müssen Spezifität und Sensitivität dieser Texturparameter weiter untersuchen.

5.2 Die sekundäre Meniskusdegeneration im porcinen Kniegelenk

Sekundäre Meniskusdegeneration im Tiermodell

Um therapeutische Optionen der Meniskusdegeneration in vivo zu etablieren, ist ein Tiermodell mit adäquater Meniskusdegeneration unabdingbar (Arnoczky et al., 2009). Auch können nur in einem solchen Modell mit adäquater Kontrollgruppe (operiertes Gelenk und schein-operiertes Gelenk) eindeutige, valide Aussagen über Therapieerfolge degenerativer Veränderungen zugelassen werden. Die Suche nach einem geeigneten Tiermodell für die Meniskusdegenerationsforschung ist Gegenstand aktueller Studien. So finden immer wieder Interspeziesvergleiche von Meniskusgewebe statt, um ein adäquates Tiermodell zu beschreiben (Chevrier et al., 2009). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete, angepasste Pond-Nuki-Modell, welches die alleinige Resektion des vorderen Kreuzbandes vorsieht führt im Hund nach einer postoperativen Standzeit der Tiere von 24 Wochen zu einer sekundären Meniskusdegeneration (Libicher et al., 2005). Auch in der Humanmedizin ist bekannt, dass eine Insuffizienz des vorderen Kreuzbandes zu Meniskusschäden führt (Papageorgiou et al., 2001; Hauger et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die vollständige Resektion des vorderen Kreuzbandes eine sekundäre Meniskusdegeneration verursacht werden, welche sowohl kernspintomographisch (Abb. 4.9) als auch histopathologisch (Abb. 4.10) nachgewiesen werden konnte. Hierbei führt das Fehlen des vorderen Kreuzbandes, welches als Stützfeiler des Kniegelenks agiert (Kohn, 2000), zu einer Kniegelenksinstabilität, die durch klinische Untersuchung bei allen Schweinen nachgewiesen werden konnte (siehe 4.5). Dies führt zu einer erhöhten Lastverteilung auf das mediale Kniegelenkskompartiment (Cerejo et al., 2002), welche wohl ursächlich für die entstandene sekundäre Degeneration des Meniskusgewebes ist.

Die initiale Bildgebung mittels Kernspintomographie zeigte eine sekundäre Meniskusdegeneration in beiden Menisken des operierten Kniegelenks (Abb. 4.9 D) nach einer postoperativen Standzeit von 26 Wochen. Beim Hund konnten nach Kreuzbandresektion und einer postoperativen Standzeit von 24 Wochen nur degenerative Veränderungen am medialen Meniskus nachgewiesen werden

(Libicher et al., 2005). Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte histopathologische Beurteilung der Meniskusdegeneration zeigte nur im medialen Meniskus deutliche degenerative Veränderungen (Abb. 4.10 D). Hier muss diskutiert werden, warum die Ergebnisse der kernspintomographischen Bildgebung dem Goldstandard der histopathologischen Analyse widersprechen: Die Auswertung der kernspintomographischen Darstellung ergab keinen Anhalt auf eine schlechtere Beurteilbarkeit des lateralen Meniskus im Vergleich zum medialen Meniskus. Studien, welche die Sensitivität der Detektion von Meniskusschäden mittels Kernspintomographie und Histopathologie vergleichen, bescheinigen der Bildgebung ein ähnlich gutes Beurteilungsergebnis (Nawata et al., 1999). Meist wird hierbei allerdings nur die Detektion von Meniskusläsionen beurteilt (Engelhardt et al., 2008) und nicht die Detektion von degenerativen Veränderungen. Die kernspintomographische Detektion von isolierter Meniskusdegeneration ist experimentell und erfolgt meist indirekt (Zarins et al., 2010). Dass es, wie in der hier vorliegenden Arbeit, zu falsch negativen und falsch positiven kernspintomographischen Befunden von Meniskusdegenerationen kommen kann, ist in der Literatur zwar beschrieben (Raunest et al., 1994), erklärt aber nicht abschließend die im Vergleich zur Histopathologie entstandenen falsch positiven Bewertungen der Kernspintomographie in der vorliegenden Arbeit. Eine denkbare Ursache für Fehlinterpretationen der kernspintomographischen Bildgebung könnte im Phänomen des Magic Angle begründet liegen. In der vorliegenden Arbeit konnte bei der hochauflösenden Kernspintomographie isolierter Menisken von Zuchtschweinen eine deutliche Kontrastabnahme im Gebiet des Magic Angle nachgewiesen werden (siehe 4.4 und 5.1). Auch bei der Kernspintomographie nicht isolierter Menisken ist dieses zu Artefakten führende Phänomen des Magic Angle bekannt (Bydder et al., 2007). Hier könnte die Entwicklung innovativer kernspintomographischer Messequenzen eine objektivere Auswertung ermöglichen. Zur Klärung der Diskrepanz zwischen den histopathologischen und kernspintomographischen Befunden der vorliegenden Arbeit, sollten die Daten erfahrenen Radiologen bzw. Pathologen zur Auswertung vorgelegt werden.

Um Aufschluss über die Lokalisation der sekundären Meniskusdegeneration innerhalb der Menisken zu erlangen, wurden Vorder-, Hinterhorn und Pars intermedia getrennt beurteilt. Die großen interindividuellen Unterschiede zwischen

den Menisken spiegeln sich in den großen Quantil-Abweichungen bei kernspintomographischer (Abb. 4.9 C) und histopathologischer (Abb. 4.10 C) Beurteilung wieder. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Regionen der Menisken nachgewiesen werden (Tab. 4.4 und 4.5). In der Humanmedizin (Zarins et al., 2010) und im Tiermodell am Hund (Libicher et al., 2005) fanden sich kernspintomographisch vor allem am meniskalen Hinterhorn die zahlenmäßig häufigsten Anzeichen von degenerativen Veränderungen. Dies konnte in der vorliegenden Studie auch histopathologisch nicht bestätigt werden (Abb. 4.10 C).

Zusammenfassend konnte ein neues porcines Tiermodell mit signifikanter, sekundärer Meniskusdegeneration des medialen Meniskus beschrieben werden, welche sich sowohl kernspintomographisch als auch histopathologisch mit etablierten Scoring-Systemen nachweisen lässt.

Markergene der sekundären Meniskusdegeneration

Wie bereits bei der Analyse von Markergenen der primären Meniskusdegeneration, bezog sich die Analyse der Markergene der sekundären Meniskusdegeneration auch ausschließlich auf die Pars intermedia der medialen Menisken der Kontroll- und Degenerationsgruppe. Im durchgeführten Vorversuch zur Entwicklung des Tiermodells zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Genexpressionsprofils in Abhängigkeit von der intrameniskalen Lokalisation (siehe 4.5). Auch andere Studien am humanen Meniskus konnten zeigen, dass es weder bei gesunden noch kranken Menisken Unterschiede des Genexpressionsprofils zwischen Vorder- und Hinterhorn gibt (Reisig et al., 2010). Zwar gibt es Hinweise, dass es Unterschiede in der Genexpression von weißer und roter Zone gibt (Upton et al., 2006), eine Unterscheidung in diese Bereiche erschien für die vorliegende Arbeit allerdings nicht zielführend.

Es wurden die Genprodukte der Gene, welche bereits bei den Menisken mit primärer Meniskusdegeneration untersucht wurden, analysiert, um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Degenerationsarten zu erlauben. Alle Gene sind als Markergene für die Degeneration im hyalinen Gelenkknorpel beschrieben (Aigner et

al., 2008; Aigner et al., 2006a, 2006b; Stoker et al., 2006; Hsieh et al., 2004) und konnten im Meniskus nachgewiesen werden (Ochi et al., 2003).

Es zeigte sich für die meisten untersuchten Gene eine schwache Expression im Vergleich zum Haushaltsgen β -Actin (meist 0-10% normalisierte Expression; Tab. 4.8). Die für die Proteoglykane Aggrecan und Decorin kodierenden Gene zeigten allerdings in beiden untersuchten Gruppen eine hohe Genexpression. Einen signifikanten Unterschied an Genprodukten zeigte aber nur das Strukturprotein Kollagen-1 (Tab. 4.8), wie es bereits für das vergleichbare Tiermodell im Hund beschrieben wurde (Willey et al., 2001). Diese Zunahme der Genexpression scheint zu einer Mengenzunahme des Proteins Kollagen-1 im Meniskusgewebe der Degenerationsgruppe zu führen, was die immunhistochemische Analyse indiziert (Abb. 4.11). Auf die Struktur des Kollagen-Gerüsts scheint die Zunahme an Kollagen-1 allerdings keinen Einfluss zu haben, was die kollagen-spezifische Färbung mit Sirius Red zeigt und im Anschluss diskutiert werden soll.

Die übrigen untersuchten Gene, kodierend für Strukturproteine, Matrix-metalloproteinasen oder Entzündungsmediatoren, zeigten keine signifikante Änderung der Genexpression. Wie bereits bei der Untersuchung der Menisken mit primärer Meniskusdegeneration beschrieben, zeigte sich auch im Tierversuch zur Entwicklung einer induzierten, sekundären Meniskusdegeneration eine große Standardabweichung bei den analysierten Genen. Zwar ist bekannt, dass es in Chondrozyten aus degenerativ veränderten Menisken große Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen gibt (Sun et al., 2010a) und dass sogar Chondrozyten in Zellkultur ihr Expressionsprofil ständig ändern (Lin et al., 2008), dennoch muss dies dazu führen, die Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion kritisch zu interpretieren, da auf Grund der großen Streuung der Daten vor allem falsch negative Aussagen getroffen werden könnten. Die generell vorhandene Heterogenität der Chondrozyten (Schumacher et al., 2005) kann mit zu dieser hohen interindividuellen Variabilität beitragen. Weiterhin ist bekannt, dass es zumindest im humanen Gelenkknorpel zu stark variierenden Erneuerungsraten von Markerproteinen kommen kann, die auch altersabhängig sind (McAlinden et al., 2001). Würde dies in ähnlichem Maße auch für den porcinen Meniskus gelten, könnte auch dies zur interindividuellen Streuung beitragen.

Weitere Studien müssen zeigen, ob Kollagen-1 als ein Markergen für die Meniskusdegeneration dienen kann. Besonders muss untersucht werden, ob die Art der Expressionsänderung mit der Ursache der Degeneration korreliert. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Abnahme des Kollagen-1-Genproduktes unter der primären Meniskusdegeneration und eine Zunahme bei der sekundären Meniskusdegeneration.

Gewebestruktur der sekundären Meniskusdegeneration

Die beschriebene Änderung des Kollagen-1-Expressionsprofils (Tab. 4.8) und das veränderte Färbemuster der Kollagen-1-Immunhistochemie (Abb. 4.11) geben Hinweise auf Veränderungen der Kollagen-Struktur. Um diese ersten Hinweise zu verifizieren wurde eine kollagen-spezifische Färbung mit Sirius Red durchgeführt: Beide untersuchten Gruppen zeigten ein vergleichbares Färbemuster im meniskalen Zentralbereich mit hauptsächlich grün und blau gefärbten Fasern (Abb. 4.12). Dies spricht für das Vorhandensein von kurzen Kollagen-Fasern mit dünnem Durchmesser (Junqueira et al., 1979) sowohl in den Menisken der Kontrollgruppe, als auch in den Menisken mit sekundärer Meniskusdegeneration. Dies spricht gegen eine weitere starke Zerstörung der Kollagenfasern in der Degenerationsgruppe. Eine weitere zielführende Analyse der Kollagenfaserstruktur kann durch die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgen. Diese wurde an dem apikalen Meniskus durchgeführt, wo die Ergebnisse der Sirius Red-Färbung bei einzelnen Menisken eine Zerstörung der randständigen Kollagenfaserstruktur zeigten (Abb. 4.12 B, Pfeile). Nach transmissionselektronenmikroskopischer Beurteilung aller Menisken nach dem oben beschriebenen Scoring-System (Gelber et al., 2008) zeigte sich in den medialen Menisken eine signifikante Degeneration III. Grades (Abb. 4.13 D). Bei der Interpretation elektronenmikroskopischer Ergebnisse muss allerdings immer bedacht werden, dass nur ein kleiner Teil des Meniskusgewebes untersucht wurde (ca. 100 μm^2). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bereiche des Vorderhorns stehen auf Grund ihrer Nähe zum Ligamentum transversum genus unter besonderer Zugspannung (siehe 2.2), was eine Zerstörung des Kollagengerüsts begünstigen könnte. Die gewonnenen Erkenntnisse der transmissionselektronenmikroskopischen

Auswertung sollten deshalb nicht auf den gesamten Meniskus übertragen werden. Dennoch können sie als Resultate des degenerativen Prozesses im Meniskus gewertet werden, was auch beim Mensch (Dahmen et al., 1962) und im Tiermodell am Hund (Stockwell et al., 1984) mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden konnte. Die Zunahme der Genexpression von Kollagen-1 kann als eine metabolische Reaktion auf die beginnende Zerstörung der Extrazellulärmatrix gedeutet werden.

Die Proteoglykan-spezifische Färbung mit Safranin O (Rosenberg et al., 1971) zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Menisken der Kontrollgruppe und den Menisken mit sekundärer Meniskusdegeneration. Vergleichbare Untersuchungen im Meniskus sind nicht beschrieben. Bezüglich des Gelenkknorpels konnte im Tiermodell der Ziege eine Abnahme des Proteoglykan-Gehalts nach 14 Wochen im hyalinen Gelenkknorpel gezeigt werden (Laurent et al., 2006), wohingegen im vergleichbaren Tiermodell im Hund eine Zunahme des Proteoglykan-Gehalts nach 3-4 Jahren beschrieben wird (Brandt et al., 1991).

Veränderungen des Kollagen-Strukturgerüsts der Menisken mit sekundärer Meniskusdegeneration waren also nur in der Transmissionselektronenmikroskopie nachweisbar. Es muss diskutiert werden, ob solche ultrastrukturellen Änderungen Auswirkungen auf die Funktion der Menisken haben können. Die Versuchstiere belasteten beide hinteren Extremitäten gleich stark, sodass stärkere Schmerzen im Bereich des Kniegelenks unwahrscheinlich erscheinen. Eine objektive Einschätzung über veränderte Teilfunktionen des Meniskus könnte auch hier wieder die bereits diskutierte Testung mittels tribologischer Prüfstände gewährleisten. Speziell für den Meniskus entwickelte Prüfstände sind in der Literatur noch nicht beschrieben.

Zusammenfassend konnten nur lokal begrenzte Veränderungen des Kollagenfasergerüsts detektiert werden, welche aber ausreichen, um das Meniskusgewebe degenerativ zu verändern.

5.3 Das Schwein als Tiermodell für Meniskusdegeneration

Validierung des Tiermodells für sekundäre Meniskusdegeneration

Zur initialen Validierung dieses Tiermodells mit standardisierter sekundärer Meniskusdegeneration sollte ein klinisch-etablierter Beurteilungsalgorithmus herangezogen werden. Es existieren zwar zahlreiche Scoring-Systeme im klinischen Alltag, wie z. B. der Whole-Organ-Knie-Score (Hunter et al., 2005) oder der WORMS-Score (Peterfy et al., 2004), allerdings scheinen diese Scoring-Systeme nicht ausreichend genau für eine Klassifizierung der Meniskusdegeneration zu sein, da sie sich auf das gesamte Organsystem Knie beziehen oder für osteoarthrotische Veränderungen ausgelegt sind. Des Weiteren kann natürlich im Tierversuch nicht auf ein Scoring-System zurückgegriffen werden, welches die Kommunikation mit dem Patienten voraussetzt. Von den zahlreichen Scores zur Bewertung von Knorpelgewebe sind die meisten für die Beurteilung von hyalinem Gelenkknorpel ausgelegt und nur schwer auf Faserknorpel zu übertragen (zur Übersicht: Eckstein et al., 2007). Viele auf den Meniskus abgestimmte Scoring-Systeme beschreiben den diskoiden Meniskus (Hamada et al., 1994) oder sind auf das Beschreiben von Meniskusrissen beschränkt (Reicher et al., 1986). Für das oben beschriebene Tiermodell mit sekundärer Meniskusdegeneration ist es allerdings essentiell, gerade diese degenerativen Veränderungen wie z. B. mukoide Verdichtungen (zur Übersicht: Ferrer-Roca et al., 1978a, 1978b) zu detektieren. Copenhaver et al. (1978) haben ein histopathologisch basiertes Scoring-System speziell für die Degeneration des Meniskusgewebes vorgeschlagen, das sowohl die zelluläre (reduzierte Zelldichte) als auch die azelluläre Komponente (Homogenität der Anfärbbarkeit, Defekte) des bradytrophen Gewebes berücksichtigt. Zwischenzeitig konnte die Zweckmäßigkeit dieser Einteilung gezeigt und das Scoring-System angepasst werden (Krenn et al., 2010a). Die Ergebnisse der Beurteilung nach diesem Scoring-System scheinen mit den durch bildgebende Verfahren gewonnenen Befunden, wie die Kernspintomographie-basierte Analyse hyperintenser Strukturen, und auch mit den Ergebnissen der Arthroskopie weitestgehend übereinzustimmen (Raunest et al., 1994). Mit den in der vorliegenden Arbeit benutzten, seit Jahren klinisch etablierten

Scoring-Systemen basierend auf Histopathologie und Kernspintomographie sollte deshalb eine Validierung des Tiermodells mit sekundärer Meniskusdegeneration nach Resektion des vorderen Kreuzbandes durchgeführt werden.

Die oben beschriebenen und bereits diskutierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich in den Menisken der Kniegelenke mit reseziertem vorderen Kreuzband Veränderungen nachweisen lassen, welche einen degenerativen Charakter besitzen. Auch wenn die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden nicht übereinstimmen (Kernspintomographie, Histopathologie), zeigen sie doch Veränderungen im Vergleich der beiden Gruppen auf. Dies gilt auch für die Beurteilung der Röntgenbilder der Kniegelenke. Hier kann keine direkte Beurteilung der Menisken erfolgen, da der Faserknorpel im Röntgenbild nicht abgebildet wird. Allerdings lassen sich in den Kniegelenken des Degenerationsmodells vermehrt radiologische Anzeichen von Degeneration beschreiben (Abb. 4.8). Es handelt sich hierbei um Hinweise auf eine Kniegelenksarthrose (Kellgren et al., 1963). Des Weiteren konnten bei drei der acht Tiere des Hauptversuchs (Standzeit: 26 Wochen) röntgendichte Strukturen im medio-dorsalen Gelenkspalt nachgewiesen werden (Abb. 4.8 C). Die makroskopische Begutachtung bestätigte eine verhärtete Struktur, welche mit dem Hinterhorn des medialen Meniskus fest verbunden war. Es handelt sich hier am ehesten um kalzifiziertes meniskales Bindegewebe, welches teilweise reich an Chondrozyten ist (siehe 4.7). Solche kalzinösen Meniskusdegeneration (Krenn et al., 2010b) in osteoarthrotischen Knien sind in der Literatur beschrieben und aktueller Gegenstand der Forschung (Sun et al., 2010b). Der genaue Mechanismus der Entstehung dieser speziellen Degenerationsform ist weder beim hyalinen Gelenkknorpel noch beim Meniskus beschrieben, allerdings konnten in aktuellen Studien Gene identifiziert werden, welche bei Kalzifizierungsprozessen Einfluss zu nehmen scheinen: So konnte z. B. das für eine intrazelluläre Kinase kodierende Gen Akt1 kürzlich als Promotor der Kalzifizierung im Gelenkknorpel identifiziert werden (Fukai et al., 2010). Mutationen im ANKH-Gen bewirken beim Menschen und in der Maus eine hereditäre Kalzifizierung des Gelenkknorpels (Pendleton et al., 2002). Der mutierte, durch das ANKH-Gen kodierte Membrantransporter für Phosphate konnte auch bei der Kalzifizierung des Meniskus identifiziert werden (Sun et al., 2010b). Ob das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Tiermodell mit induzierter Meniskusdegeneration im Göttingen Minipig ein mögliches

Modell für die kalzinöse Meniskusdegeneration darstellt und der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet genügt, müssten weiterführende Untersuchungen zeigen. Hierbei müsste z. B. eine gezielte Auswertung der Histologie und des Expressionsprofils auf Nachweise von Verkalkungen erfolgen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit also ein Tiermodell mit einer induzierten, sekundären Meniskusdegeneration etabliert werden. Die degenerativen Veränderungen des Meniskusgewebes können histopathologisch gesichert werden. Auch die Bildgebung konnte Hinweise auf meniskale degenerative Prozesse nachweisen. Somit könnte das Tiermodell in der Meniskusdegenerationsforschung eingesetzt werden. Da die Unterschiede zwischen Degenerationsmodell und Kontrolle signifikant sind, könnten auch Therapieoptionen der Meniskusdegeneration am beschriebenen Tiermodell getestet werden. Denkbar wären hier direkte Injektionen ins porcine Kniegelenk oder oral applizierte medikamentöse Therapien. Ob das beschriebene Tiermodell auch Anteile einer kalzinösen Meniskusdegeneration besitzt, müssen weiterführende Studien klären. Des Weiteren konnten erste radiologische Hinweise auf das Vorhandensein einer Gonarthrose (Abb. 4.8) nachgewiesen werden, sodass das vorgestellte Modell auch als Osteoarthrosemodell dienen könnte, was derzeit untersucht wird und nicht Teil der vorliegenden Arbeit ist.

Primäre und sekundäre Meniskusdegeneration im Schwein

Tiermodelle mit induzierter Meniskusdegeneration können definitionsgemäß nur sekundäre Meniskusdegenerationen zur Verfügung stellen, da jegliche Manipulation an Strukturen des Kniegelenks als ursächlich für die entstehende Degeneration angesehen werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung von primär degenerierten Menisken von Zuchtschweinen die primäre Meniskusdegeneration charakterisiert werden. Es konnten vier Markergene, Kollagen-1, Interleukin-8, Matrixmetalloproteinase-2 und -13, identifiziert werden (Tab. 4.2). Des Weiteren konnten degenerative Veränderungen der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden. Es soll nun diskutiert werden, ob das anschließend beschriebene Tiermodell mit sekundärer Meniskusdegeneration ähnliche Merkmale der Degeneration bereitstellt, um damit grundlegende Fragen zur Meniskusdegeneration

adressieren zu können, welche sowohl die primäre als auch die sekundäre Meniskusdegeneration betreffen. Auch für die sekundäre Meniskusdegeneration konnte das Genprodukt von Kollagen-1 als Markergen identifiziert werden. Während bei der primären Meniskusdegeneration eine Abnahme des Strukturproteins nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei der sekundären Meniskusdegeneration allerdings eine Zunahme des Kollagen-1-Genprodukts. Hier zeichnet sich also ein Unterschied der beiden Degenerationsarten des Meniskusgewebes ab. Gleiches gilt für die drei weiteren genannten Markergene der primären Meniskusdegeneration, welche keine signifikanten Änderungen der Genexpression unter sekundärer Meniskusdegeneration zeigten.

Auch die degenerativen Veränderungen der meniskalen Extrazellulärmatrix zeigten unterschiedliche Ausprägungen bei primärer und sekundärer Meniskusdegeneration: Während bei den primär degenerierten Menisken die Sirius Red-Färbung auf eine Abnahme des Durchmessers und der Länge der Kollagenfasern im Zentralbereich des Meniskus zeigen konnte (Abb. 4.3), zeigten sich keine Unterschiede bei den Menisken mit sekundärer Meniskusdegeneration (Abb. 4.12). Gleiches gilt für die Verteilung der Proteoglykane, welche mittels der spezifischen Safranin O-Färbung untersucht wurde: Eine deutliche Zunahme unter primärer Meniskusdegeneration (Abb. 4.3) steht einem unveränderten Färbemuster bei sekundärer Meniskusdegeneration gegenüber (Abb. 4.12). Die Zerstörung der Ultrastruktur der Extrazellulärmatrix der degenerierten Menisken, welche bei beiden Degenerationsarten mittels transmissionselektronenmikroskopischer Analyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.4 und 4.13) lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen. Die hier untersuchten Proben stammen aus unterschiedlichen Bereichen des Meniskus: während bei den Menisken mit primärer Meniskusdegeneration die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung im Zentralbereich (rot-weiße Zone der Pars intermedia) stattfand, wurden die Menisken mit sekundärer Meniskusdegeneration am apikalen (weiße Zone) Vorderhorn analysiert. Die unterschiedlichen Lokalisationen ergaben sich zum einen aus den erwarteten degenerativen Veränderungen in diesen Bereichen, wofür es in den Sirius Red-Färbungen erste Hinweise gab, zum anderen aus der Notwendigkeit, das wenige Material der kleinen Menisken der Göttingen Minipigs aus dem Tierversuch sinnvoll aufzuteilen.

Zusammenfassend muss das in der vorliegenden Arbeit etablierte Tiermodell als Tiermodell für die Forschung an der sekundären Meniskusdegeneration beschrieben werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede auf den untersuchten Ebenen der Genexpression und der Extrazellulärmatrix zur primären Meniskusdegeneration. Eine Übertragbarkeit der am Tiermodell erhobenen Ergebnisse auf die primäre Meniskusdegeneration ist nach aktuellem Stand der Forschung nicht möglich.

Besonderheiten des porcinen Tiermodells und seine Übertragbarkeit

Generell gilt das Zuchtschwein für Forschungszwecke, das Göttingen Minipig, auf Grund der Ähnlichkeit seines Metabolismus zum humanen Stoffwechsel als geeignetes Modelltier in der biomedizinischen Forschung (Ruehe et al., 2009; Gotterbarm et al., 2008; Bollen et al., 1997). Zusammen mit der aktuellen Erkenntnis, dass auch die Proliferation der porcinen Chondrozyten der des Menschen am ähnlichsten ist (Schulze-Tanzil, et al., 2009), sind dies die Gründe, weshalb das Schwein häufig als Versuchstier in der osteochondralen Transplantation eingesetzt wird (Jung et al., 2009; Steck et al., 2009; Baumbach et al., 2007; Jung et al., 2005; Gotterbarm et al., 2003). In der Meniskusdegenerationsforschung ist weder das Schwein, noch das Göttingen Minipig bisher beschrieben. Um eine Übertragbarkeit der im Versuchstier Schwein erhobenen Daten auf den Menschen zuzulassen, muss auch die Biomechanik der Kniegelenke beider Spezies diskutiert werden: Die meisten oben genannten Eigenschaften des humanen Kniegelenks bezüglich Anatomie und Biomechanik (siehe 2) scheinen für das porcine Kniegelenk in gleichem Maße gültig zu sein. Dennoch muss beachtet werden, dass sich bei Quadrupeden nur ca. 40% des Körpergewichts auf die hinteren Extremitäten und somit auch auf die Menisken verlagern (Bergmann, 1997). Dieses Problem wird sich wohl nicht beheben lassen, da die biomedizinische Forschung an bipeden Versuchstieren nicht etabliert ist. Des Weiteren muss erwähnt werden, dass Femur und Tibia nicht – wie etwa beim Menschen – gerade aufeinander stehen, sondern einen Winkel von ca. 80° einschließen. Dieser Winkel kommt durch die dauerhafte Beugung des porcinen Kniegelenks in der Grundstellung zustande, was einen Unterschied in der Lastenverteilung im Vergleich zum humanen Kniegelenk zur Folge hat. Eine weitere

Besonderheit ist die Ursprungssehne des *Musculus extensor digitorum longus*, welche von ihrem Ursprung der Fossa extensoria am lateralen Femurkondyl durch das porcine Kniegelenk zieht und zentral vor der lateralen Femurkondyle zum Liegen kommt (Nickel et al., 2004). Beim Menschen entspringt dieser Muskel distal des Kniegelenks an der vorderen Schienbeinkante, weshalb seine Ursprungssehne nicht durch das Kniegelenk zieht. Es muss vermutet werden, dass diese starke Muskelsehne eine zusätzliche Stabilität in das laterale Kompartiment des porcinen Kniegelenks bringt.

In der vorliegenden Arbeit konnte also ein neues porcines Tiermodell für die sekundäre Meniskusdegeneration beschrieben werden, welches weitere interventionelle Studien zu Diagnostik und Therapie der Meniskusdegeneration erlaubt. Des Weiteren konnte mit der Verwendung von Kniegelenken von Zuchtschweinen zur Nahrungsgewinnung eine Möglichkeit für Untersuchungen der primären Meniskusdegeneration etabliert werden. Hierbei handelt es sich um ein gut verfügbares, preiswertes Modell, welches allerdings nicht für interventionelle Studien herangezogen werden kann. Das Schwein kann somit als innovatives Tiermodell für die Meniskusdegenerationsforschung angesehen werden. Mit der Wahl der Spezies wurde versucht, eine Übertragung aller zukünftig an diesem Modell erhobenen Daten in die Humanmedizin zu ermöglichen. Hierbei müssen allerdings die Besonderheiten des porcinen Kniegelenks beachtet werden.

6. Literaturverzeichnis

- Adesida AB, Grady LM, Khan WS, Milward-Sadler SJ, Salter DM, Hardingham TE (2007) Human meniscus cells express hypoxia inducible factor-1 α and increased SOX9 in response to low oxygen tension in cress aggregate culture. *Arthritis Res Ther* 9: R69
- Ahluwalia S, Fehm M, Murray MM, Martin SD, Spector M (2001) Distribution of smooth muscle actin-containing cells in the human meniscus. *J Orthop Res* 19: 659-664
- Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Namba A, Motohashi M, Matsumoto M, Makimura M, Matsumura H (2006) The effect of IL-1 β on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. *Life Sciences* 79: 764-771
- Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L (2002) Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 14: 578-584
- Aigner T, Rose J, Martin J, Buckwalter J (2004) Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res* 7: 134-145
- Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E (2006a) Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 54: 3533-3544
- Aigner T, Soeder S, Haag J (2006b) IL-1 β and BMPs-interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater* 12: 49-56
- Aigner T, Söder S (2006c) Histopathologische Begutachtung der Gelenkdegeneration. *Pathologe* 27: 431-438
- Aigner T, Söder S (2008) Typisierung, Graduierung und Stadieneinteilung der Osteoarthrose. *Z Rheumatol* 67: 32-40
- Anderson J, Felson DT (1988) Factors associated with osteoarthritis of the knee in the First National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiology* 128: 179-189
- Appleton CTG, Pitelka V, Henry J, Beier F (2007) Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1854-1868
- Arnoczky SP, Warren RF (1982) Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 10(2): 90-95
- Arnoczky SP, Cook JL, Carter T, Turner S (2009) Translational models for studying meniscal repair and replacement: What they can and cannot tell us. *Tissue Eng Part B* 16:31-39
- Arivazhagan S, Ganesan L (2003) Texture classification using wavelet transform. *Pattern Recognit Lett* 24:1513-1521
- Aspden RM, Yarker Ye, Hukins DWL (1985) Collagen orientations in the meniscus of the knee joint. *J Anat* 140: 371-380
- Atay OA, Pekmezci M, Doral MN, Sargon MF, Ayvaz M, Johnson DL (2007) An ultrastructural study with transmission electron microscopy. *Am J Sports Med* 35: 475-478

- Basalo IM, Chahine NO, Kaplun M, chen FH, Hung CT, Ateshian GA (2007) Chondroitin sulfate reduces the friction coefficient of articular cartilage. *J Biomech* 40: 1847-1854
- Baumbach K, Petersen JP, Ueblacker P, Schröder J, Göpfert C, Stork A, Rueger JM, Amling M, Meenen NM (2007) The fate of osteochondral grafts after autologous osteochondral transplantation: a one-year follow-up study in a minipig model. *Arch Orthop Trauma Surg* 128: 1255-1263
- Beaufils P, Verdonk R (2010) *The Meniscus*. Springer Verlag, Heidelberg
- Bergmann G (1997) *In vivo Messungen der Belastung von Hüftimplantaten*. Köster Verlag, Berlin
- Bhosale AM, Richardson JB (2008) Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87: 77-95
- Biau DJ, Kernéis S, Porcher R. (2008) Statistics in brief: the importance of sample size in the planning and interpretation of medical research. *Clin Orthop Relat Res* 466: 2282-2288
- Bollen P, Ellegaard L (1997) The Göttingen minipig in pharmacology and toxicology. *Pharmacol Toxicol* 80: 3-4
- Boya H, Pinar H, Gülay Z, Oktay G, Özer E (2004) Clinical and arthroscopic features of meniscal tears and a search for the role of infection in histologically confirmed meniscal mucoid degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 12: 294-299
- Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M (1991) Anterior cranial cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *Rheumatology* 18: 436-446
- Bray RC, Smith JA, Eng MK, Leonard CA, Sutherland CA, Salo PT (2001) Vascular response of the meniscus to injury: effects of immobilization. *J Orthop Res* 19: 384-390
- Brinckmann P, Frobin W, Leivseth G (2000) *Orthopädische Biomechanik*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Articular cartilage: Part I: tissue design and chondrocytes matrix interactions. *J Bone Joint Surg* 79: 600-611
- Bullough PG, Vigorita VJ (1987) *Orthopädische Krankheitsbilder*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Burger C, Mueller M, Wlodarczyk P, Goost H, Tolba RH, Rannger C, Kabir K, Weber O (2007) The sheep as a knee osteoarthritis model: early cartilage changes after meniscus injury and repair. *Lab Animals* 41: 420-431
- Bydder M, Rahal A, Fullerton GD, Bydder GM (2007) The magic angle effect: a source of artifact, determinant of image contrast, and technique for imaging. *J Magn Reson Imaging* 25: 290-300
- Cerejo R, Dunlop DD, Cahue S, Channin D, Song J, Sharma L (2002) The influence of alignment on risk of knee osteoarthritis progression according to baseline stage of disease. *Arthritis Rheum* 46: 2632-2636

- Chang DG, Iverson EP, Schinagl RM, Sonoda M, Amiel D, Coutts RD, Sah RL (1997) Quantitation and localization of cartilage degeneration following the induction of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 5: 357-372
- Chevrier A, Nelea M, Hurtig MB, Hoemann CD, Buschmann MD (2009) Meniscus structure in human, sheep and rabbit for animal models of meniscus repair. *J Orthop Res* 27: 1197-1203
- Cochran GVB (1988) Orthopädische Biomechanik. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Copenhaver WM, Kelly DR, Wood RL (1978) Bailey's textbook of histology. Williams & Wilkins Verlag, Baltimore
- Crues JV, Mink J, Levy TL, Lotysch M, Stoller DW (1987) Meniscal tears of the knee: accuracy of MR imaging. *Radiology* 164: 445-448
- Dahmen G (1962) Elektronenmikroskopische Befunde bei Meniskusdegenerationen. *Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie* 53: 620-632
- Dankof A, Krenn V (2006) C4d deposits mark sites of meniscal tissue disintegration. *Virchows Arch* 449: 230-233
- Danzig L, Resnick D, Gonsalves M, Akeson WH (1983) Blood supply to the normal and abnormal menisci of the human knee. *Clin Ortho Rel Res* 172: 271-276
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Howell Ds, Woessner JF (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84: 678-685
- D'Lima DD, Patil S, Steklov N, Slamin JE, Colwell CW (2006) Tibial forces measured in vivo after total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 21: 255-262
- DuRaine G, Neu CP, Chan SM, Komvopoulos K, June RK, Reddi AH (2009) Regulation of the friction coefficient of articular cartilage by TGF-beta1 and IL-1beta. *J Orthop Res* 27: 249-256
- Ea HK, Nguyen C, Bazin D, Bianchi A, Guicheux J, Beboul P, Daudon M, Liote F (2011) Articular cartilage calcification in osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* 63: 10-18
- Eckstein F, Mosher T, Hunter D (2007) Imaging of knee osteoarthritis: data beyond the beauty. *Curr Opin Rheumatol* 19: 435-443
- Elsaid KA, Fleming BC, Oksendahl HL, Machan JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, Shalvoy R, Jay GD (2008) Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 58: 1707-1715
- Engelbrechtsen L, Lewis JL (1996) Graft selection and biomechanical considerations in ACL reconstruction. *Sports Med Arthroscopy Rev* 4: 336-341
- Engelhardt LV, Schmitz A, Pennekamp PH, Schild HH, Wirtz DC, Falkenhausen F (2008) Diagnostics of degenerative meniscal tears at 3-Tesla MRI compared to arthroscopy as reference standard. *Arch Orthop Trauma Surg* 128: 451-456

- Fairbank TJ (1948) Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* 30: 664-670
- Fairbank TJ, Jamieson ES (1951) A complication of lateral meniscectomy. *J Bone Joint Surg* 33: 567-570
- Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T (2005) Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1 β . *Arthritis Rheum* 52: 136-143
- Fan Z, Yang H, Bau B, Söder S, Aigner T (2006) Role of mitogen-activated protein kinases and NF κ B on IL-1 β -induced effects on collagen type II, MMP-1 and -13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int* 26: 900-903
- Ferguson BS, Nam H, Hopkins RG, Morrison RF (2010) Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes. *PLoS One* 5: e15208
- Ferrer-Roca O, Vilalta C (1978a) Lesions of the meniscus. Part I: macroscopic and histologic findings. *Clin Orthop Rel Res* 146: 289-300
- Ferrer-Roca O, Vilalta C (1978b) Lesions of the meniscus. Part II: horizontal cleavages and lateral cysts. *Clin Orthop Rel Res* 146: 301-307
- Fink C (2001) Meniskusrefixation – Anatomische und biologische Grundlagen. *Arthroskopie* 14: 248-253
- Fithian DC, Kelly MA, Mow VC (1990) Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Ortho Rel Res* 252: 19-31
- Flint FO, Pichering K (1984) Demonstration of collagen in meat products by an improved picro-sirius red polarisation method. *Analyst* 109: 1505-1509
- Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa A, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H (2010) Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis & Rheum* 62: 826-836
- Fullerton GD, Rahal A (2007) Collagen structure: the molecular source of the tendon magic angle effect. *J Magn Reson Imaging* 25: 345-361
- Fürst M, Lammers L, Schäfer F, Niggemeyer O, Steinhagen J, Lohmann CH, Rütger W (2010) Investigation of calcium crystals in OA knees. *Rheumatol Int* 30: 623-631
- Gelber PE, Gonzalez G, Lloreta JL, Reina F, Caceres E, Monllau JC (2008) Freezing causes changes in the meniscus collagen net: a new ultrastructural meniscus disarray scale. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16: 353-359
- Glauert AM (1974) The high voltage electron microscope in biology. *J Cell Biol* 63: 717-748
- Gleghorn JP, Jones ARC, Flannery CR, Bonassar LJ (2009) Alteration of articular cartilage frictional properties by transforming growth factor β , interleukin-1 β and oncostatin M. *Arthritis Rheum* 60: 440-449

- Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, Jung M (2008) The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Animals* 42: 71-82
- Gotterbarm T, Reitzel T, Schneider U, Voß HJ, Stoff E, Breusch SJ (2003) Einwachsverhalten von periost-gedeckten Knochendübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen. *Orthopäde* 32: 65-73
- Gray JC (2005) Neural and vascular anatomy of the menisci of the human knee joint. *J Orthop Sports Phys Ther* 29: 23-30
- Gredes T (2007) Untersuchung der Genaktivität im Kiefergelenkknorpel des Schweins (*Sus scrofa domesticus*) nach Vorverlagerung des Unterkiefers. Dissertation der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
- Grifka J (1994) Kniegelenksarthrose. Thieme Verlag, Stuttgart
- Guehring T, Omlor GW, Lorenz H, Bertram H, Steck E, Richter W, Carstens C, Kroeber M (2005) Stimulation of gene expression and loss of anular architecture cause by experimental disc degeneration. *Spine* 30: 2510-2515
- Hamada M, Shino K, Kawano K, Araki Y, Matsui Y, Doi T (1994) Usefulness of magnetic resonance imaging for detectin intrasubstande tear and/or degeneration of lateral discoid meniscus. *Arthroscopy* 10: 645-653
- Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I (1973) Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 3:610-621
- Haring F, Gruhn R, Smidt D, Scheven B (1963): Breeding of a miniature swine as an experimental and laboratory animal. *Zentralbl Bakteriol Orig* 189: 521-37.
- Hauger O, Frank LR, Boutin RD, Lektrakul N, Chung CB, Haghighi P, Resnick D (2000) Characterization of the red zone of knee meniscus: MR imaging and histologic correlation. *Radiology* 217: 193-200
- Heinlein B, Kutzner I, Graichen F, Bender A, Rohlmann A, Halder AM, Beier A, Bergmann G (2009) Complete data of total knee replacement loading for level walking and stair climbing measured in vivo with a follow-up of 6-10 months. *Clin Biomech* 24: 315-326
- Herwig J, Egner E, Buddecke E (1984) Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 43: 635-640
- Hönig JF, Merten HA (1993) Das Göttiger Miniaturschwein als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Hefte zur Unfallheilkunde* 212: 479-488
- Hsieh YS, Yang SF, Chu SC, Chen PN, Chou MC, Hsu MC, Lu KH (2004) Expression changes of gelatinases in human osteoarthritic knees and arthroscopic debridement. *Arthroscopy* 20: 482-488
- Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Tu X, Amin S, Goggins J, Lavalley M, Guermazi A, Gale D, Felson DT (2005) Structural factors associated with malalignment in knee osteoarthritis: the boston osteoarthritis knee study. *J Rheumatol* 32: 2192-2199

- Hyde G, Boot-Handford RP, Wallis GA (2008) Col2a1 lineage tracing reveals that the meniscus of the knee joint has a complex cellular origin. *J Anat* 213: 531-538
- Jones ARC, Flannery CR (2007) Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines. *Eur Cell Mater* 13: 40-45
- Jones ARC, Chen S, Chai DH, Stevens AL, Gleghorn JP, Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Flannery CR (2009) Modulation of lubricin biosynthesis and tissue surface properties following cartilage mechanical injury. *Arthritis Rheum* 60: 133-142
- Jung M, Breusch S, Daecke W, Gotterbarm T (2009) The effect of defect localization on spontaneous repair of osteochondral defects in a Göttingen minipig model: a retrospective analysis of the medial patellar groove versus the medial femoral condyle. *Lab Animal* 43: 191-197
- Jung M, Gotterbarm T, Gruettgen A, Vilei SB, Breusch S, Richter W (2005) Molecular characterization of spontaneous and growth-factor-augmented chondrogenesis in periosteum-bone tissue transferred into a joint. *Histochem Cell Biol* 123: 447-456
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11: 447-455
- Kaemmer D, Bozkurt A, Otto J, Junge K, Klink C, Weis J, Sellhaus B, O'Dey DM, Pallua N, Jansen M, Schumpelick V, Klinge U (2010) Evaluation of tissue components in the peripheral nervous system using Sirius Red staining and immunohistochemistry: a comparative study. *J Neurosci Methods* 190: 112-116
- Kambic HE, Futani H, McDevitt CA (2000) Cell, matrix changes and alpha-smooth muscle actin expression in repair of the canine meniscus. *Wound Repair Regen* 8: 554-561
- Kambic HE, McDevitt CA (2005) Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus. *J Orthop Res* 23: 142-149
- Kamiya T, Tanimoto K, Tann Y, Lin YY, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K (2010) Effects of mechanical stimuli on the synthesis of superficial zone protein in chondrocytes. *J Biomed Mater Res A* 92: 801-805
- Kääb MJ, Gwynn IAP, Nötzli HP (1998) Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat* 193: 23-34
- Katta J, Stapleton T, Ingham E, Jin ZM, Fisher J (2008) The effect of glycosaminoglycan depletion on the friction and deformation of articular cartilage. *Proc Ing Mech Eng* 222: 1-11
- Katz JN, Martin SD (2009) Meniscus - friend or foe: epidemiologic observations and surgical implications. *Arthritis Rheum* 60: 633-635
- Kellgren JH, Lawrence JS (1963) Atlas of standard radiographs of arthritis. Blackwell Verlag, Berlin
- Kelly BT, Potter HC, Deng XH, Pearle AD, Turner AS, Warren RF, Rodeo SA (2006) Meniscal allograft transplantation in the sheep knee. *Am J Sports Med* 34: 1464-1477

- Kempker R, Magalat D, Kongphet-Tran Z, Eaton M (2009) Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. *Am J Med Sci* 338: 425-427
- Kielstein P, Wohlfarth E (1987) Schweinekrankheiten. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Kobayashi K, Mishima H, Hashimoto S, Goomer RS, Harwood FL, Lotz M, Moriya H, Amiel D (2001) Chondrocyte apoptosis and regional differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy. *J Ortho Res* 19: 802-808
- Kohn D (2000) Das Knie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Kon E, Chiari C, Marcacci M, Delcogliano M, Salter DM, Martin I, Ambrosio L, Fini M, Tschon M, Tognana E, Plasenzotti R, Nehrer S (2008) Tissue engineering for total meniscal substitution: animal study in sheep model. *Tissue Eng Part A* 14: 1067-1080
- Kraff O, Theysohn JM, Maderwald S, Saylor C, Ladd SC, Ladd ME, Barkhausen J (2007) MRT of the knee at 7.0 Tesla. *Fortschr Röntgenstr* 179: 1231-1235
- Kreinst M, Zemelka S, Reisig G, Zöllner FG, Kirsch S, Schwarz ML (2010) Darstellung von isolierten porcinen Menisken im hochauflösenden Kernspintomographen – eine Studie am nativen Meniskus und an einem neuen in vitro-Degenerationsmodell für Menisken. *Ger Med Sci EF17-974*
- Krenn V, Berger I, Kriegsmann J, Otto M (2008) Rheuma / Gelenkpathologie / Infektionsdiagnostik. Lehrserie Nr. 169, Deutschen Abteilung der Internationalen Akademie für Pathologie
- Krenn V, Knöß P, Rütther W, Jakobs M, Otto M, Krukenmeyer mg, Heine A, Möllenhoff G, Kurz B (2010a) Meniskusdegenerationsscore und NITEGE-Expression. *Orthopäde* 39: 475-485
- Krenn V, Kurz B, Krukenmeyer MG, Knoess P, Jakobs M, Poremba C, Möllenhoff G (2010b) Histopathologischer Degenerations-Score des Faserknorpels. *Z Rheumatol* 69:644-652
- Krishnan R, Mariner EN, Ateshian GA (2005) Effect of dynamic loading on the frictional response of bovine articular cartilage. *J Biomech* 1665-1673
- Krudwig WK (2000) Situation der Arthroscopie in Deutschland. *Arthroscopie* 13: 191–193
- Lanzer W, Komenda G (1989) Changes in articular cartilage after meniscectomy. *Clin Ortho Rel Res* 252: 41-48
- Lasch P, Petras T, Ullrich O, Backmann J, Naumann D, Grune T (2001) Hydrogen peroxide-induced structural alterations of Rnase A. *J Biol Chem* 276: 9492-9502
- Laurent D, O'Byrne E, Wasvary J, Pellas TC (2006) In vivo MRI of cartilage pathogenesis in surgical models of osteoarthritis. *Skeletal Radiol* 35: 555-564
- Laurent D, O'Byrne E, Wasvary J, Pellas TC (2006) In vivo MRI of cartilage pathogenesis in surgical models of osteoarthritis. *Skeletal Radiol* 35: 555-564

Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hockberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Stehens VD, Wolfe F (1998) Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 41: 778-799

Lazovic D, Wirth CJ, Sieg A, Gosse F, Maschek HG (1997) Der Einfluss der Operationstechnik auf Meniskustransplantate. *Unfallchirurg* 100: 541-546

Lee SY, Niikura T, Reddi AH (2008) Superficial zone protein in the different tissue compartments of the knee joint: modulation by transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta. *Tissue Eng Part A* 14: 1799-1808

Levy IM, Torzilli PA, Warren RF (1982) The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 64: 883-888

Libicher M, Ivancic M, Hoffmann V, Wenz W (2005) Early changes in experimental osteoarthritis using the Pond-Nuki dog model: technical procedure and initial results of in vivo MR imaging. *Eur Radiol* 15: 390-394

Lin Z, Fitzgerald JB, Xu J, Willers C, Wood D, Grodzinsky AJ, Zheng MH (2008) Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res* 26: 1230-1237

Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W (2005) Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 7:156-165

Lu XL, Mow VC (2008) Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc* 40: 193-199

Lubowitz JH, Verdonk PCM, Reid III JB, Verdonk R (2007) Meniscus allograft transplantation: a current concepts review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15: 476-492

Ludolph E, Hierholzer G (1980) Anatomie und Biomechanik des Kapsel-Bandapparates am Kniegelenk. *Unfallchirurgie* 6: 79-85

Luft JH (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414

MacMullan PA, McCarthy GM (2010) The meniscus, calcification and osteoarthritis: a pathologic team. *Arthritis Res Ther* 12: 116-117

Maier D, Braeun K, Steinhauser E, Ueblacker P, Oberst M, Kreuz PC, Roos N, Martinek V, Imhoff AB (2007) In vitro analysis of an allogenic scaffold for tissue-engineered meniscus replacement. *J Orthop Res* 25:1598-1608

Marchuk L, Sciore P, Reno C, Frank CB, Hart DA (1998) Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1379: 171-177

- Martinek V, Ueblacker P, Bräun K, Nitschke S, Mannhardt R, Specht K, Gansbacher B, Imhoff AB (2006) Second generation of meniscus transplantation: in-vivo study with tissue engineered meniscus replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 126: 228-234
- McAlinden A, Didiha J, Bolton MC, Lorenzo P, Heinegard D, Bayliss MT (2001) Age-related changes in the synthesis and mRNA expression of decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 33-41
- Mchraban F, Tindal MH, Proffitt mm, Moskowitz RW (1997) Temporal pattern of cysteine endopeptidase expression in cartilage and synovium from rabbit knees with experimental osteoarthritis: gene expression in chondrocytes in response to interleukin-1 and matrix depletion. *Ann Rheum Dis* 56: 108-115
- Melrose J, Smith S, Cake M, Read R, Whitelock J (2005) Comparative spatial and temporal localisation of perlecan, aggrecan and type I, II and IV collagen in the ovine meniscus: an ageing study. *Histochem Cell Biol* 124: 225-235
- Merkel KHH (1980) The surface of human menisci and its aging alterations during age. *Arch Orthop Traumat Surg* 97: 185-191
- Messner K, Gao J (1998) The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 193: 161-178
- Mohing W (1966) Die Arthrosis deformans des Kniegelenkes. Springer Verlag, Berlin
- Moon MS, Kim YS (1997) Collagen fibres and mechanoreceptors in regenerated menisci of rabbits. *Int Orthop* 21: 239-242
- Morita Y, Tomita N, Aoki H, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y, Suguro T, Ikeuchi K (2006) Frictional properties of regenerated cartilage in vitro. *J Biomech* 39: 103-109
- Mow VC, Hayes WC (1997) Basic orthopaedic biomechanics. 1. Auflage, Lippincott-Raven Verlag, Philadelphia
- Mow VC, Guo XE (2002) Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng* 4: 175-209
- Mülhardt C (2009) Der Experimentator – Molekularbiologie/Genomics. Springer Verlag, Heidelberg
- Nawata K, Teshima R, Enokida M, Suzuki T, Yamagata T (1999) Magnetic resonance imaging of meniscal degeneration in torn menisci: a comparison between anterior cruciate ligament deficient knees and stable knees. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 7: 274-277
- Netter FH (1992) Bewegungsapparat I – Anatomie, Embryologie, Physiologie und Stoffwechselkrankheiten. Thieme Verlag, Stuttgart
- Netter FH (1995) Bewegungsapparat II – Fehlbildungen und angeborene Erkrankungen, Tumoren, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und endoprothetischer Gelenkersatz. Thieme Verlag, Stuttgart
- Nickel R, Schummer A, Siferle E (2004) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Parey Verlag, Stuttgart

- Niikura T, Redid AH (2007) Differential regulation of Lubricin by transforming growth factor β /bone morphogenetic protein superfamily members in articular chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 56: 2312-2321
- Norris JA, Stabile KJ, Hinnah RH (2008) An introduction to tribology. *J Surg Orthop Adv* 17: 2-5
- Nugent GE, Aneloski NM, Schmidt TA, Schumacher BL, Voegtline MS, Sah RL (2006) Dynamic shear stimulation of bovine cartilage biosynthesis of proteoglycan-4. *Arthritis Rheum* 54: 1888-1896
- Nunley WC, Schuit KE, Dickie MW, Kinlaw JB (1972) Delayed, in vivo hepatic post-mortem autolysis. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath* 11: 289-302
- Ochi M, Uchio Y, Okuda K, Shu N, Yamaguchi H, Sakai Y (2001) Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing. *Arthroscopy* 17: 724-731
- Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Tsunoda T, Toyama Y, Matsumoto H, Nakamura Y (2003) Expression profiles of two types of human knee-joint cartilage. *J Hum Genet* 48: 177-182
- Papageorgiou CD, Gil JE, Kanamori A, Fenwick JA, Woo SLY, Fu FH (2001) The biomechanical interdependence between the anterior cruciate ligament replacement graft and the medial meniscus. *Am J Sports Med* 29: 226-231
- Patel AM, Spector M (1997) Tribological evaluation of oxidized zirconium using an articular cartilage counterface: a novel material for potential use in hemiarthroplasty. *Biomaterials* 18: 441-447
- Pendleton A, Johnson MD, Hughes A, Gurley KA, Ho AM, Doherty M, Dicey J, Gillet P, Loeuille D, McGrath R, Reginato A, Shiang R, Wright G, Netter P, Williams C, Kingsley DM (2002) Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis. *Am J Hum Genet* 71: 933-940
- Peterfy CG, Janzen DL, Tirman PFJ, van Dijke CF, Pollack M, Genant HK (1994) Magic-Angle-Phenomenon. *AJR* 163: 149-154
- Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, Tirman PFJ, Miaux Y, White D, Kothari M, Lu Ym, Fye K, Zhao S, Genant HK (2004) Whole-organ magnetic resonance imaging score of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 177-190
- Petersen W, Tillmann B (1998) Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol* 197: 317-324
- Petersen W, Tillmann B (1999) Struktur und Blutgefäßversorgung der Kniegelenksmenisken. *Z Orthop* 137: 31-37
- Pezzin APT, Cardoso TP, Rincon MCA, Zagaglia CAC, Duek EAR (2003) Bioreabsorbable polymer scaffold as temporary meniscal prosthesis. *Artif Organs* 27: 428-431
- Pond MJ, Nuki G (1973) Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-388

- Ramjeet M, Deslandes V, St. Michael F, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, Jacques M (2005) Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 280: 39104-39114
- Raunest J, Hötzing H, Bürrig KF (1994) Magnetic resonance imaging and arthroscopy in the detection of meniscal degenerations: correlation of arthroscopy and MRI with histology findings. *Arthroscopy* 10: 634-640
- Rauscher I, Stahl R, Cheng J, Li X, Huber MB, Luke A, Majumdar S, Link TM (2008) Meniscal measurements of T1 and T2 at MR imaging in healthy subject and patients with osteoarthritis. *Radiology* 249: 591-600
- Refior HJ, Fischer H (1974) Vergleichende mikrostrukturelle Untersuchungen zur Degeneration der Kniegelenksmenisken. *Z Orthop* 112: 128-133
- Reicher MA, Hartzman S, Dickwiler GR, Bassett LW, Anderson LJ, Gold RH (1986) Meniscal injuries: detection using MR imaging. *Radiology* 159: 753-757
- Reisig G, Schneider-Wald B, Kreinest M, Schwarz ML, Sticht C, Büttner A, Kessler O, Fickert S (2010) Analysis of gene expression profiles of healthy and diseased human menisci. *Abstractband des Kongresses der European Orthopaedic Research Society, T230*
- Richardson KC (1960) Studies on the structure of autonomic nerves in the small intestine, correlating the silver-impregnated image in light microscopy with the permanganate-fixed ultrastructure in electron microscopy. *J Anat* 94: 457-472
- Ricklin P, Rüttimann A, Del Buono MS (1980) Die Meniskusläsion. 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Rosenberg L (1971) Chemical basis for the histological use of Safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 53: 69-82
- Ruehe B, Niehues S, Heberer S, Nelson K (2009) Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108: 699-706
- Scapinelli R (1968) Studies on the vasculature of the human knee joint. *Acta anat* 70: 305-331
- Schad LR, Blüml S, Zuna I (1993) MR tissue characterization of intracranial tumors by means of texture analysis. *Magn Reson Imaging* 11: 889-896
- Schad LR, Londervold A (2006) Influence of resolution and signal to noise ratio on MR image texture. Texture analysis for magnetic resonance imaging. 129-149
- Schaer H (1938) Der Meniskusschaden, Thieme Verlag, Stuttgart
- Schmidt TA, Sah RL (2007) Effect of synovial fluid on boundary lubrication of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 35-47

- Schulze-Tanzil G, Müller RD, Kohl B, Schneider N, Ertel W, Ipaktchi K, Hünigen H, Gemeinhardt O, Stark R, John T (2009) Differing in vitro biology of equine, ovine, porcine and human articular chondrocytes derived from the knee joint: an immunomorphological study. *Histochem Cell Biol* 131: 219-229
- Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE (1994) A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 311: 144-152
- Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL (2005) Proteoglykan 4 synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res* 23: 562-568
- Schwarz ML, Seidling R, Mauermann E, Werner A, Steil V, Forsch E, Obertacke U, Becker K, Lehmann L (2010) Scintigraphic evaluation of bone formation in Göttingen minipigs. *Scand J Lab Anim Sci* 37: 13-18
- Sharma L, Eckstein F, Song J, Guermazi A, Prasad P, Kapoor D, Cahue S, Marshall M, Hudelmaier M, Dunlop D (2008) Relationship of meniscal damage, meniscal extrusion, malalignment, and joint laxity to subsequent cartilage loss in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 58: 1716-1726
- Shim SS, Leung G (1986) Blood supply of the knee joint. *Clin Ortho Rel Res* 208: 119-125
- Simianer H (2009) Breeding history and genetic management of the Goettingen minipig. Abstract, Minipig-Symposium, 12.06.2009, Dalmose, Dänemark
- Skaggs DL, Warden WH, Mow VC (1994) Radioactive tie fibers influence the tensile properties of the bovine medial meniscus. *J Orthop Res* 12: 176-185
- Sokoloff L (1982) The remodelling of articular cartilage. *Rheumatology* 7: 11-18
- Stachowiak GP, Stachowiak GW, Podsiadlo P (2006) Automated classification of articular cartilage surfaces based on surface texture. *Proc Inst Mech Eng H* 220: 831-843
- Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W (2009) Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev* 18: 969-978
- Stockwell RA, Billingham MEJ (1984) Early response of cartilage to abnormal factors as seen in the meniscus of the dog knee after cruciate ligament section. *Acta Biol Hung* 35: 281-291
- Stoker AM, Cook JL, Kuroki K, Fox DB (2006) Site-specific analysis of gene expression in early osteoarthritis using the Pond-Nuki model in dogs. *J Orthop Surg Res* 1
- Stone KR, Rodkey WG, Li ST (1997) Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. *J Bone Joint Surg Am* 79:1770-1777
- Sun Y, Mauerhan DR, Hoeycott PR, Kneisl JS, Norton JH, Hanley EN, Gruber HE (2010a) Analysis of meniscal degeneration and meniscal gene expression. *BMC Musculoskelet Disord* bisher nur elektronische Publikation

- Sun Y, Mauerhan DR, Honeycutt PR, Kneisl JS, Norton HJ, Zinchenko N, Hanley EN, Gruber HE (2010b) Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture. *Arthritis Res Ther* 12: R56
- Sweigart MA, Zhu CF, Burt DM, de Holl PD, Agrawal CM, Clanton TO, Athanasiou KA (2004) Intraspecies and interspecies comparison of the compressive properties of the medial meniscus. *Ann Biomed Eng* 32: 1569-1579
- Szczypiński PM, Strzelecki M, Materka A, Klepaczko A (2009) MaZda – a software package for image texture analysis. *Comput Methods Programs Biomed* 94: 66-76
- Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA (2006) Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J Immunol* 176: 148-156
- Teeple E, Fleming BC, Mechrefe AP, Crisco JJ, Brady MF, Jay GD (2007a) Frictional properties of hartley guinea pig knees with and without proteolytic disruption of the articular surfaces. *Osteoarthritis Cartilage* 1583: 309-315
- Teeple E, Elsaid KA, Fleming BC, Jay GD, Aslani K, Crisco JJ, mechrefe AP (2007b) Coefficients of friction , lubricin and cartilage damage in the anterior cruciat ligament-deficient guinea pig knee. *J Orthop Res* 26: 231-237
- Thomsen M, Strachwitz B, Loew M, Cotta H, Kirsch S, Schunk O, Kubein-Meesenburg D (1997) Das Göttinger Minipig als Tiermodell in der Hüftendoprothetik. *Z Orthop* 135: 58-62
- Tienen TG, Heijkants RG, Buma P, De Groot JH, Pennings AJ, Veth RP (2003) A porous polymer scaffold for meniscal lesion repair – a study in dogs. *Biomaterials* 24: 2541-2548
- Teurlings L (1999) Meniscal injuries. *Orthopaedic knowledge update* 349-353
- Uysal M, Akpınar S, Bolat F, Cekin N, Cinar M, Cesur N (2008) Apoptosis in the traumatic and degenerative tears of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16: 666-669
- Vedi V, Williams A, Tennant SJ, Spouse E, Hunt DM, Gedroyc WMW (1999) Meniscal Movements. An in vivo study using dynamic MRI. *J Bone Joint Surg* 81: 37-41
- Verdonk P (2006) The human meniscus: transplantation, characterisation & tissue engineering. Dissertation der Universität Gent, Belgien
- Walker P, Erkman M (1975) The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop* 109: 184 - 192
- Wang QG, Magnay JL, Nguyen B, Thomas CR, Zhang Z, El Haj AJ, Kuiper NJ (2009) Gene expression profiles of dynamically compressed single chondrocytes and chondrons. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 738-742
- Welsing RTC, van Tienen TG, Ramrattan N, Heijkants R, Schouten AJ, Veth RPH, Buma P (2008) Effect on tissue differentiation and articular cartilage degradation of a polymer meniscus implant. *Am J Sports Med* 36: 1978-1989

- Willey GM, Billetz AC, Matyas JR, Adams ME, McDevitt CA (2001) Absolute concentrations of mRNA for type I and type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay. *J Ortho Res* 19: 650-658
- Williams RJ, Warner KK, Petrigliano FA, Potter HG, Hatch J, Cordasco FA (2007) MRI evaluation of isolated arthroscopic partial meniscectomy patients at a minimum five-year follow up. *HSSJ* 3: 35-43
- Wimmer MA, Grad S, Kaup T, Hänni M, Schneider E, Gogolewski S, Alini M (2004) Tribology approach to the engineering and study of articular cartilage. *Tissue Eng* 10: 1436-1445
- Wimmer MA, Schmid TM, Jacobs JJ (2007) Tribology: a portal to understand joint failure. *Arthritis Rheum* 56: 3511-3513
- Wojtys EM, Chan DB (2005) Meniscus structure and function. *Instr Course Lect* 54: 323-330
- Yamasaki T, Deie M, Shinomiya R, Izuta Y, Yasunaga Y, Yanada S, Sharman P, Ochi M (2005) Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *J Biomed Mater Res* 75: 23-30
- Young AA, Smith mm, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA, Melrose J, Sonnabend DH, Roughley PJ and Little CB (2005) Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 7: 852-861
- Young AA, McLennan S, Smith mm, Smith SM, Cake MA, Read RA, Melrose J, Sonnabend DH, Flannery CR, Little CB (2006) Proteoglycan 4 downregulation in a sheep meniscectomy model of early osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 8: 41-47
- Zaffagnini S, Giordano G, Vascellari A, Bruni D, Neri MP, Iacono F, Kon E, Presti ML, Marcacci M (2007) Arthroscopic collagen meniscus implant results at 6 to 8 years follow up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15: 175-183
- Zarins ZA, Bolbos RI, Plalat JB, Link TM, Li X, Souza RB, Majumdar S (2010) Cartilage and meniscus assessment using T1rho and T2 measurements in healthy subjects and patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1408-1416
- Zeni P, Doepker E, Schulze-Topphoff U, Huewel S, Tenenbaum T, Galla HJ (2007) MMPs contribute to TNF-alpha-induced alteration of the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: 855-864
- Zhou QY, Fang MD, Huang TH, Li CC, Yu M, Zhao SH (2009) Detection of differentially expressed genes between erhualian and large White placentas on day 75 and 90 of gestation. *BMC Genomics* 10: 337-349
- Zoefel P (1992) Statistik in der Praxis. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart
- Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, Bünger C (2008) Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J Orthop Res* 26: 56-64

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAMTS	Aggrecanasen
Agc-1	Aggrecan
BMP	Bone Morphogenetic Proteine
bp	Basenpaare
C	Celsius
c	Centi-
cDNA	copy-DNA
Col-1A1	Kollagen-1
Col-2A1	Kollagen-2
COMP	Cartilage oligomeric matrix proteine
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
d	dorsal
DCN	Decorin
depc.	Diethylpyrocarbonat = zerstört RNAsen
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDS	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ESEM	Environmental Scanning Electron microscope
f	Haftreibungskoeffizient
FLASH	Fast Low Angle Shot
g	Gramm
HC gp	Human Cartilage Glycoproteine
HCl	Chlorwasserstoff = Salzsäure
HH	Hinterhorn
H ₂ O	Wasser
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INOS	inducible NO-synthase

k	Kilo-
l	lateral
L	Liter
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Lig.	Ligamentum
m	(1) Milli- (2) medial
M	Mol Molar = Mol/Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MRI	magnetic resonance imaging = MRT
MRT	Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie
N	Newton
NaOH	Natriumhydroxid
n	Nano
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
p	(1) Piko- (2) P-Wert, Signifikanzwert
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Produktgröße
PI	Pars intermedia
Prg-4	Lubricin = Proteoglykan-4
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Enzym, welches RNA abbaut
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SOX	SRY-type high mobility group box
SRY	Sex Determining Region Y
T	Tesla
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TGF	Tumor Growth Factor

TIMP	Tissue Inhibitor of mmP
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trisaminomethan
U	Unit(s)
v	ventral
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelien Growth Factor
VH	Vorderhorn
WORMS	Whole-Organ MRI Score
α	Signifikanzniveau (5%)
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
\circ	Grad

Lebenslauf

entfällt bei der Online-Version

Publikationsverzeichnis

Diplomarbeit

- Kreinst M (2005) Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses von Adenosintriphosphat auf die Spontanaktivität in der Lateralen Superioren Olive der Ratte. *Diplomarbeit des Fachbereichs Biologie, Technische Universität Kaiserslautern*

Promotion

- Kreinst M (2008) Kalzium-fluorimetrische Untersuchung des Einflusses von minimal- und maximal-hypoxischer Zellisolation auf die hormonelle Stimulation von Kardiomyozyten der Maus. *Medizinische Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes*

Poster

- Lührke S, Kreinst M, Friauf E (2006) Modulation of spontaneous activity by P2 receptors in the rat lateral superior olive. *FENS Abstr 3: A186.9*
- Schütte A, Heute S, Reisig G, Kreinst M, Pott P, Schwarz M (2009) Ein Prüfstand zur tribologischen Testung von Knorpelgewebe. *Abstractband der 6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomechanik, PA45: 105*
- Kreinst M, Zhang Y, Lipp P, Kaestner L (2010) Influence of the anesthetic carbondioxide on hormone-induced effects on isolated murine cardiomyocytes. *Acta Physiol 198 (677): P-TUE-20*
- Kreinst M, Zemelka S, Kirsch S, Reisig G, Zöllner FG, Brade J, Schad LR, Fickert S, Schwarz ML (2010) Imaging of isolated native, formalin-embedded and degenerated porcine menisci by high-resolution nuclear magnetic resonance. *Abstractband des Kongresses der European Orhtopaedic Research Society, P064*
- Kreinst M, Schneider-Wald B, Reisig G, Schwarz ML, Sticht C, Büttner A, Kessler O, Fickert S (2010) Analysis of gene expression profiles of healthy and diseased human menisci. *Abstractband des UGR-Netzwerktreffen "Experimentelle und Klinische Orthopädie", Homburg/Saar*

Kongressvorträge

- Reisig G, Schneider-Wald B, Kreinst M, Schwarz ML, Sticht C, Büttner A, Kessler O, Fickert S (2010) Analysis of gene expression profiles of healthy and diseased human menisci. *Abstractband des Kongresses der European Orhtopaedic Research Society, T230*
- Kreinst M, Zemelka S, Reisig G, Zöllner FG, Kirsch S, Schwarz ML (2010) Darstellung von isolierten porcinen Menisken im hochauflösenden Kernspintomographen – eine Studie am nativen Meniskus und an einem neuen *in vitro*-Degenerationsmodell für Menisken. *Ger Med Sci EF17-974*

Originalarbeiten

- Kreinst M, Müller B, Winkelhoff J, Friauf E, Lührke S (2009) Miniature EPSCs in the lateral superior olive before hearing onset: Regional and cell-type-specific differences and heterogeneous neuromodulatory effects of ATP. *Brain Res 1295: 21-36*

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken, speziell bei ...

- Prof. Dr. Peter Lipp und Prof. Dr. Hanns-Peter Scharf für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Bereitschaft, meine Promotion an zwei Standorten zu unterstützen und zu begleiten.
- Prof. Dr. Markus Schwarz für die Betreuung und die wissenschaftlichen Diskussionen.
- Gregor Reisig für die Unterstützung im Labor und die gute Zusammenarbeit.
- Dr. Stefan Fickert für die wissenschaftliche Hilfestellung zum Thema Meniskus zu Beginn meiner Arbeit.
- Michael Merscher und Andy Schütte für die Hilfe bei Computerproblemen.
- Prof. Dr. Henner Simianer, Christian Gärke und Arne Oppermann für die Kooperation und die Bereitstellung der Versuchstiere.
- Dr. Kristianna Becker, Dr. Susanne Bog, Theo Huber und Kai Lorenz sowie Familie Bühler für die Betreuung der Versuchstiere.
- Elmar Forsch, Manuel Lingner und Dr. Barbara Schneider-Wald für ihr Engagement und ihre helfenden Hände bei den Tierversuchen.
- Prof. Dr. Stefan Schönberg, PD Dr. Henrik Michaely, PD Dr. Dietmar Dinter, Susanne Lattenkamp, Kerstin Görlitz und Katrin Koziel für die Kooperation und die gute Zusammenarbeit am MRT.
- Cornelia Patschull und Ariane Planer für die Hilfe beim Röntgen der Versuchstiere.
- Prof. Dr. Lothar Schad, Dr. Stefan Kirsch und Dr. Frank Zöllner für die Möglichkeit, am hochauflösenden MRT zu arbeiten und für ihre Hilfe bei Gewinnung und Auswertung der MRT-Bilder.
- Prof. Dr. Gunther Wennemuth, Birgit Leis und Norbert Pütz für die Kooperation und die Unterstützung an den Elektronenmikroskopen.
- Rudolf Jung für die Hilfe bei den histologischen und immunhistologischen Färbungen
- Elisabeth Seelinger, Petra Schwarz und Petra Menge für die Hilfe bei den histologischen Färbungen.
- Niko Schneider für die Botendienste zwischen den Standorten Mannheim und Homburg.
- Dr. Joachim Brade für die Hilfe bei Fragen zur Statistik.
- Dr. Peter Pott, Ralph Gundling, Dieter Schleich, Tobias Sorg, Susanne Zemelka und Roland Seidling sowie den bisher genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit, die meist illustren Diskussionen und die Hilfestellung bei zahlreichen Problemen.
- Meiner Frau Sabine Kreinest sowie meinen Eltern Christa und Hans Kreinest für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei meinen beruflichen Entscheidungen und für ihre moralische und finanzielle Unterstützung während meines Studiums.