

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow-Klinikum

**Der Effekt von lokal appliziertem thrombozytenreichem
Plasma, mesenchymalen Stromazellen und ihrer Kombination
auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse sowie
auf VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nadja Goldbach
Tierärztin aus Mittweida

Berlin 2022
Journal-Nr.: 4351

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und dem

Julius Wolff Institut

Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie

der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Virchow-Klinikum

Der Effekt von lokal appliziertem thrombozytenreichem Plasma, mesenchymalen Stromazellen und ihrer Kombination auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse sowie auf VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Nadja Goldbach

Tierärztin

aus Mittweida

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4351

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Kopf
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Meniscus (MeSH), rupture, healing, tissue repair, wounds, injection, thrombocytes, blood plasma, factor VIII, vascular endothelial growth factor a (MeSH), platelet-derived growth factor (MeSH), therapy

Tag der Promotion: 08.09.2022

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-183-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2022

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literatur	3
3 Zielsetzungen und Hypothesen	17
4 Material und Methoden	19
4.1 Tiere und Tierhaltung	19
4.2 Versuchsgruppen	20
4.3 Präoperative Vorbereitung der Versuchstiere	20
4.4 Meniskusoperation	22
4.5 Operation zur Stammzellentnahme aus dem Beckenkamm	23
4.6 Stammzellkultivierung	24
4.7 PrP-Herstellung	25
4.8 Postoperatives Vorgehen	26
4.9 Tötung und Materialgewinnung	27
4.10 Aufarbeitung der Proben	28
4.11 Übersichtsfärbungen – Hämatoxylin/Eosin und Safranin-O-Lichtgrün	29
4.12 Immunhistochemie VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII	31
4.13 Quantitative Real-Time RT-PCR	35
4.14 Statistische Analyse	38
5 Ergebnisse	41
5.1 Versuchstierparameter	41
5.2 Thrombozyten-Konzentration	41
5.3 Makroskopische Heilung	42
5.4 Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin- und Safranin-O-Lichtgrün-Färbung und histologische Auswertung	43
5.5 Immunhistochemie	46
5.5.1 <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A)	46
5.5.2 <i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF- β)	55
5.5.3 Faktor VIII	64

5.6	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	71
5.6.1	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF-A).....	71
5.6.2	<i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF- β)	72
6	Diskussion	75
7	Zusammenfassung.....	95
8	Summary	97
9	Literaturverzeichnis	99
10	Danksagung.....	135
11	Erklärung zu Interessenskonflikten und Finanzierungshilfen	136
12	Selbstständigkeitserklärung	137

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Anatomie des Kniegelenks	3
Abbildung 2: Vaskularisation des Meniskus	4
Abbildung 3: Meniskusriss-Typen	6
Abbildung 4: Meniskusnaht.....	7
Abbildung 5: Schafe im Stall der Forschungseinrichtung	19
Abbildung 6: Schaf in Rückenlage auf dem Operationstisch	21
Abbildung 7: Meniskusriss intraoperativ	23
Abbildung 8: Stammzellentnahme aus dem rechten Beckenkamm.....	24
Abbildung 9: Herstellung des <i>Platelet-rich plasma</i> (PrP).....	26
Abbildung 10: Rissverlauf und schematische Darstellung der Gewebeentnahme im Meniskus.....	27
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Meniskus mit <i>Regions of interest</i> (ROIs)....	35
Abbildung 12: Aufsicht auf den <i>Meniscus medialis</i> nach Eröffnung des Kniegelenks	42
Abbildung 13: Hämatoxylin/Eosin gefärbter Radiärschnitt.....	43
Abbildung 14: Safranin-O gefärbter Radiärschnitt	44
Abbildung 15: Nachweis des <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A)	46
Abbildung 16: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen aller <i>Regions of interest</i> (ROIs).....	47
Abbildung 17: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen in den einzelnen Regionen	48
Abbildung 18: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region $VAV_{=}V_{=}+AV_{=}$	49
Abbildung 19: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der rissnahen Region $N_{=}VN_{=}+AVN_{=}$	50
Abbildung 20: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen vaskulär rissnah ($V_{=}VN+VF$)	51
Abbildung 21: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen avaskulär rissnah ($AV_{=}AVN+AVF$)	52

Abbildung 22:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der vaskulären Region (V)	53
Abbildung 23:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der avaskulären Region (AV).....	54
Abbildung 24:	Nachweis des <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) – Immunhistochemisch gefärbter Radiärschnitt.....	55
Abbildung 25:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen aller <i>Regions of interest</i> (ROIs)	56
Abbildung 26:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen in den einzelnen Regionen.....	57
Abbildung 27:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region VAV_ _{=V_} +AV_	58
Abbildung 28:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen der rissnahen Region N_ _{=VN_} +AVN_	59
Abbildung 29:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen vaskulär rissnah (V_ _{=VN_} +VF).....	60
Abbildung 30:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen avaskulär rissnah (AV_ _{=AVN_} +AVF).....	61
Abbildung 31:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen der vaskulären Region (V).....	62
Abbildung 32:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen der avaskulären Region (AV)	63
Abbildung 33:	Nachweis des Faktor VIII	64
Abbildung 34:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen aller ROIs.....	65
Abbildung 35:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region VAV_ _{=V_} +AV_	66
Abbildung 36:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der rissnahen Region N_ _{=VN_} +AVN_	67
Abbildung 37:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulär rissnahen Region V_ _{=VN_} +VF_.....	68
Abbildung 38:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der avaskulär rissnahen Region AV_ _{=AVN_} +AVF_.....	69
Abbildung 39:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulären Region (V).....	70
Abbildung 40:	Anzahl der Einheiten mit und ohne Faktor VIII-positiver Zellen in der avaskulären Region (AV).....	71

Abbildung 41: Relative mRNA-Expression des <i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF-A)	72
Abbildung 42: Relative mRNA-Expression des <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF- β)	73

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Aufteilung der Behandlungsgruppen	20
Tabelle 2: Protokoll des Einbettungsautomats	28
Tabelle 3: Entparaffinierungs- und Rehydratationsprotokoll der Gewebeschnitte vor der Färbung	29
Tabelle 4: Protokolle für Hämatoxylin-Eosin- und Safranin-O-Färbung	29
Tabelle 5: Parameter des Meniskus-Scores	30
Tabelle 6: Immunhistochemische Färbeprotokolle	32
Tabelle 7: Primer mit Sequenzen, Produktlänge und Effizienz	38
Tabelle 8: Probenanzahl (n) pro Auswertemethode, Gruppe und Seite	38
Tabelle 9: Mediane Dauer der postoperativen Ent-, Teil- und Vollbelastung	41
Tabelle 10: Histologisches Scoring	45
Tabelle 11: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen aller <i>Regions of interest</i> (ROIs)	47
Tabelle 12: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region (VAV ₌ V ₊ AV ₋)	49
Tabelle 13: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen am Riss (N ₌ VN ₊ AVN ₋)	50
Tabelle 14: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen vaskulär rissnah vaskulär rissnah (V ₌ VN+VF)	51
Tabelle 15: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen avaskulär rissnah (AV ₌ AVN+AVF)	52
Tabelle 16: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der vaskulären Region (V)	53
Tabelle 17: Abweichung (%) der Anzahl <i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A) positiver Zellen der avaskulären Region (AV)	54
Tabelle 18: Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) aller <i>Regions of interest</i> (ROIs)	56
Tabelle 19: Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen am Riss (VAV ₌ V ₊ AV ₋)	58
Tabelle 20: Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF-β) positiver Zellen am Riss (N ₌ VN ₊ + AVN ₋)	59

Tabelle 21:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF- β) positiver Zellen vaskulär rissnah ($V_{-} = VN + VF$).....	60
Tabelle 22:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF- β) positiver Zellen avaskulär rissnah ($AV_{-} = AVN + AVF$).....	61
Tabelle 23:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF- β) positiver Zellen der vaskulären Region (V).....	62
Tabelle 24:	Abweichung (%) der Anzahl <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF- β) positiver Zellen der avaskulären Region (AV)	63
Tabelle 25:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen aller ROIs	65
Tabelle 26:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region ($VAV_{-} = V_{-} + AV_{-}$).....	66
Tabelle 27:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der rissnahen Region ($N_{-} = VN_{-} + AVN_{-}$).....	67
Tabelle 28:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulär rissnahen Region ($V_{-} = VN + VF$).....	68
Tabelle 29:	Abweichung (%) der Anzahl der VIII-positiven Zellen der avaskulär rissnahen Region ($AV_{-} = AVN + AVF$).....	69
Tabelle 30:	Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulären Region (V)	70
Tabelle 31:	Relative mRNA-Expression des <i>Vascular endothelial growth factors A</i> (VEGF-A) und des <i>Platelet-derived growth factor beta</i> (PDGF- β).....	73

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> destilliertes Wasser
BM	Knochenmark, engl. <i>bone marrow</i>
cDNA	komplementäre DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IQR	Interquartilabstand (engl. <i>interquartile range</i>)
KG	Körpergewicht
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
Lig./Ligg.	<i>Ligamentum/Ligamenta</i>
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i> (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSCs	Mesenchymale Stromazellen
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma (engl. <i>platelet-rich plasma</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)

ROI	<i>Region Of Interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Tc	Thrombozyten
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor

1 Einleitung

In den vergangenen Jahren haben operative Eingriffe am Kniegelenk stetig zugenommen. Ursächlich dafür sind die zunehmende Beliebtheit von Sportarten mit einem hohen Verletzungsrisiko, wie Fußball, Abfahrtsskilauf, Handball und Bouldern (Majewski et al. 2006; Steinbrück 1999), sowie eine sich stetig verbessernde Diagnostik von Kniegelenksverletzungen. Das Kniegelenk und insbesondere die Menisken sind in steigendem Maße Belastungen und Verletzungen ausgesetzt (Ueblacker et al. 2005). Bei traumatischen intraartikulären Verletzungen ist das *Ligamentum (Lig.) cruciatum anterius* mit rund 45 % am häufigsten betroffen, gefolgt vom *Meniscus medialis* mit ca. 24 %. Der *Meniscus lateralis* wird deutlich seltener verletzt (ca. 8 %) (Majewski et al. 2006). Meniskusverletzungen belaufen sich pro Jahr in Deutschland auf ca. 1,5 Millionen Fälle (Stein et al. 2010). Die Therapie von Meniskusverletzungen ist eine Herausforderung. Verletzungen der zentralen avaskulären Zone, die ca. 70 % ausmachen (Dandy 1990), erfordern aufgrund schlechter Heilungstendenzen häufig letztlich eine partielle Meniskusresektion (Poehling et al. 1990). Aufgrund der Minderung der Pufferfunktion führt eine Meniskusresektion um 15–34 % seiner ursprünglichen Größe zu einer Kontaktdrucksteigerung auf den Gelenkknorpel um 350 % (Radin und Rose 1986). Partielle und totale Menispektomien stellen somit prä-arthrotische Veränderungen für das Kniegelenk dar (Howell und Handoll 2000; Veth 1985). Das Ziel bei der Versorgung von Meniskusläsionen sollte daher sein, möglichst viel Meniskusgewebe zu erhalten. Die Meniskusrefixation im avaskulären Teil ist jedoch aufgrund der anatomischen und vaskulären Gegebenheiten äußerst schwierig. Ein Fokus der Forschung liegt daher auf der Steigerung des Heilungspotentials der avaskulären Zone.

2 Literatur

Die beiden Menisken – der *Meniscus lateralis* und der *Meniscus medialis* – stellen mobile Oberflächen des Kniegelenks dar. Sie liegen zwischen dem korrespondierenden *Condylus femoris* und dem Tibiaplateau, das sie zu ca. 70 % bedecken (Kohn und Moreno 1995; Fukubayashi und Kurosawa 1980). Die in der Aufsicht c-förmigen und im Koronarschnitt keilförmigen Menisken besitzen eine breite periphere Basis und einen nach zentral konvexen Rand. Die der Femurkondyle zugewandte Oberfläche ist konkav, während die Unterseite dem Tibiaplateau flach aufliegt. Zwischen dem ventral/dorsal liegenden Vorder-/Hinterhorn befindet sich die *Pars intermedia* (Greis et al. 2002; Setton et al. 1999; Messner und Gao 1998). Die Menisken sind an ihren Enden bandartig am Tibiaplateau befestigt. Über diese Meniskuswurzeln werden die Menisken hauptsächlich stabilisiert. Die fakultativ angelegten *Ligamenta (Ligg.) meniscofemorale anterius (Humphrey) et posterius (Wrisberg)* stabilisieren die posterolaterale Meniskuswurzel. Anterior sind die Vorderhörner der beiden Menisken über das *Lig. transversum anterius* verbunden. Zusätzlich ist der *Meniscus medialis* über das *Lig. coronarium* vom Vorderhorn bis nach posterior zum Hinterhorn ziehend am Tibiaplateau fixiert (Abbildung 1).

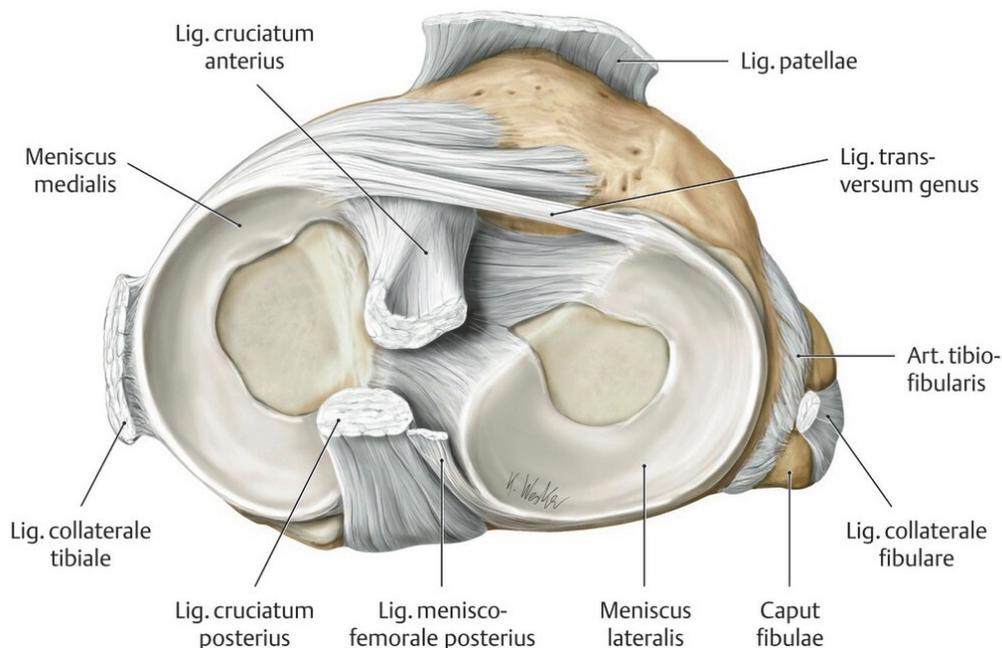


Abbildung 1: Anatomie des Kniegelenks: Ansicht auf das rechte Tibiaplateau von proximal nach Eröffnung der Kniegelenkskapsel und Durchtrennung der Kreuz- und Kollateralbänder. Das *Ligamentum (Lig.) meniscofemorale anterius* fehlt in dieser Darstellung (Schünke et al. 2018).

Die Vaskularisation der Menisken erfolgt medial über die *Arteria (A.) genū superior medialis* und über den *Ramus articularis descendens* der *A. genus descendens* sowie lateral über die *A. genū inferior lateralis*. Dabei werden vorrangig die kapselnahen peripheren Anteile der Menisken versorgt. Die zentrale Region wird *per diffusionem* über die Synovialflüssigkeit ernährt (Mow und Rattcliffe 1997). Auf der Basis der unterschiedlichen Vaskularisation und dem daraus resultierenden Heilungspotential wird der Meniskus in drei Regionen unterteilt:

- (1) das periphere, vaskularisierte Drittel mit guter Heilungstendenz (rot-rote Zone),
- (2) die variabel ausgebildete Übergangszone (rot-weiße Zone) und
- (3) das zentrale, avaskuläre Drittel mit schlechter Heilungstendenz (weiß-weiße Zone) (Abbildung 2) (Seil und Kohn 2001; Petersen und Tillmann 1999; Petersen und Tillmann 1995; Arnoczky und Warren 1983; Arnoczky und Warren 1982).

Beim Menschen deckt die Vaskularisation von peripher 10–30 % der Länge des medialen und 10–25 % des lateralen Meniskus ab (Brindle et al. 2001; Clark und Ogden 1983). Meniskusrisse im peripheren vaskularisierten Drittel werden in der Humanmedizin genäht und verheilen meist (Eggli et al. 1995; Hanks et al. 1991; Warren 1985). Meniskusrisse in den avaskulären zwei Dritteln (rot-weiße und weiß-weiße Zonen) zeigen schlechtere Heilungsraten (Heckmann et al. 2006; Ellermann et al. 2002; Laprell et al. 2002; Howell et al. 2000; Albrecht-Olsen et al. 1999; DeHaven 1999; Tenuta und Arciero 1994). Auch in Tierexperimenten wiesen Risse im avaskulären Anteil des Meniskus eine schlechte Heilungsfähigkeit auf (Sonoda et al. 2000; Roeddecker et al. 1993; Huang et al. 1991; King und Vallee 1991; Gershuni et al. 1989; Arnoczky et al. 1988). Die Heilungstendenz nahm von der Peripherie nach zentral ab (Sonoda et al. 2000; Roeddecker et al. 1993; Huang et al. 1991; King et al. 1991).

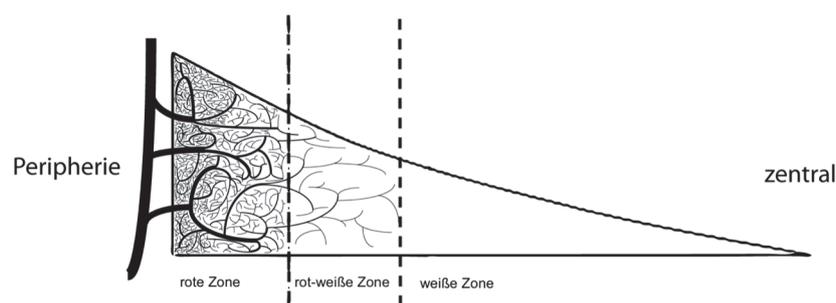


Abbildung 2: Vaskularisation des Meniskus, (mod. nach Dürselen und Freutel (2015))

Der Meniskus ist ein aus circa 75 % Wasser, 20 % Kollagen, 1 % Proteoglykanen, sowie aus nicht-kollagenen Proteinen, Lipiden, Fibrochondrozyten, Fibroblasten und Mastzellen bestehender Faserknorpel (Chevrier et al. 2009; Setton et al. 1999; McDevitt und Webber 1990; Herwig et al. 1984; McNicol und Roughley 1980). Mit 60–70 % dominiert Kollagen in der Trockenmasse. Kollagen I macht mit 90 % neben Kollagen Typ II, III, V und VI den Hauptteil des

Meniskuskollagens aus (Mow et al. 1997; McDevitt et al. 1990). Die Kollagenfasern sind in drei Schichten angeordnet:

- (I) die femorale und tibiale Oberfläche bedeckende Kollagenfibrillen,
- (II) zur femoralen und tibialen Oberfläche ziehende Lamellen und
- (III) zirkulär und radiär verlaufende Fasern im zentralen Hauptteil (Petersen und Tillmann 1998; Adams und Hukins 1992).

Die ovalen und fusiformen Zellen der peripheren Zone ähneln Fibroblasten im Aussehen und Verhalten (engl. *fibroblast-like cells*). Über lange Zellausläufer kommunizieren sie mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM besteht hauptsächlich aus Typ I Kollagen und aus geringen Anteilen von Proteoglykanen, Kollagen III und V (Melrose et al. 2005; McDevitt et al. 2002).

Funktionell spielen die Menisken bei der Lastaufnahme des tibiofemorale Drucks auf die Gelenkflächen und dessen Verteilung, beim Ausgleich von Inkongruenzen der Gelenkflächen sowie bei der Führung des Gelenkkopfes in der Gelenkpfanne eine wichtige Rolle (Greis et al. 2002; Petersen et al. 1999; Fukubayashi et al. 1980; Krause et al. 1976; Bullough et al. 1970). Der tibiofemorale Druck wird über die longitudinalen Fasern, die die anteriore und posteriore Meniskuswurzel verbinden, in Ringspannung umgewandelt. Bei einer axialen Kompression des Femurs auf die Tibia wirken die Menisken durch Verformung als Stoßdämpfer (Sanchez-Adams und Athanasiou 2009). Durch eine radiär von zentral nach peripher verlaufende Rissbildung kommt es nahezu zum vollständigen Verlust der Lastenverteilungsfunktion (Rupp et al. 2002; Kohn et al. 1993). Die Entfernung von Meniskusgewebe (partielle/komplette Meniskektomie) vermindert die Kontaktfläche und Kraftübernahme des Kniegelenks und erhöht somit den Spitzendruck der Gelenkflächen. Eine Reduktion des Meniskusgewebes um 10 % hat eine Spitzendruckerhöhung von 65 % zur Folge (Baratz et al. 1986). Die bei einer Entfernung des *Meniscus medialis* um 50–70 % reduzierte Kontaktfläche erhöht den Spitzendruck um 100 % (Walker und Erkman 1975; Kettelkamp und Jacobs 1972), was zu einer frühzeitig einsetzenden Gonarthrose führt (Roos et al. 2001; Paletta et al. 1997; Rangger et al. 1995; Weiss et al. 1989; Veth 1985; Jones et al. 1978; Fairbank 1948).

Primäre Verletzungen des Meniskus treten als Folge großer Krafteinwirkung wie Verdrehtraumata oder Bandrupturen infolge von Sportverletzungen auf. Häufiger reißen jedoch vorgeschädigte Menisken bei Bagatelltraumata (Greis et al. 2002). Meniskusverletzungen werden nach ihrer Lokalisation (Innen- oder Außenmeniskus, Vorderhorn, *Pars intermedia* oder Hinterhorn) und nach morphologischen Kriterien eingeteilt (Weigel und Nerlich 2005). Longitudinal verlaufende Meniskusrisse (vertikale Längsrisse) können komplett oder inkomplett ausgebildet sein. Inkomplette Risse haben nur Kontakt zu einer Meniskusfläche und betreffen vorrangig

das Hinterhorn. Komplette longitudinale Meniskusrupturen betreffen Unter- und Oberfläche (tibial oder femoral) des Meniskus. Eine Sonderform des vertikalen longitudinalen Risses ist der Korbhenkelriss (Greis et al. 2002). Der Meniskus wird dabei entlang seines Verlaufs längs gespalten, wobei das vordere und hintere Fragment weiter verbunden bleiben. Der zentrale Teil des Meniskus, der den stabilen Anschluss zur Meniskusbasis verloren hat, kann korbhenkelartig ins Gelenk luxieren und zu Extension- und Flexionsdefiziten führen. Radiärrisse ziehen vom zentralen Meniskusrand nach peripher Richtung Kapsel (Greis et al. 2002). Bei einem Schrägriss (Lappenriss) reißt der Meniskus quer im Vorder- oder Hinterhorn ein, wobei ein Lappen entsteht. Schräg- und Radiärrisse betreffen meist die *Pars intermedia* (Greis et al. 2002). Horizontale Läsionen bilden sich peripher nahe der Kapsel und vergrößern sich parallel zur Oberfläche bis sie den freien Meniskusrand erreichen. Eine Kombination aus mindestens zwei dieser Rissformen wird als komplexer Riss bezeichnet (Abbildung 3) (Greis et al. 2002).

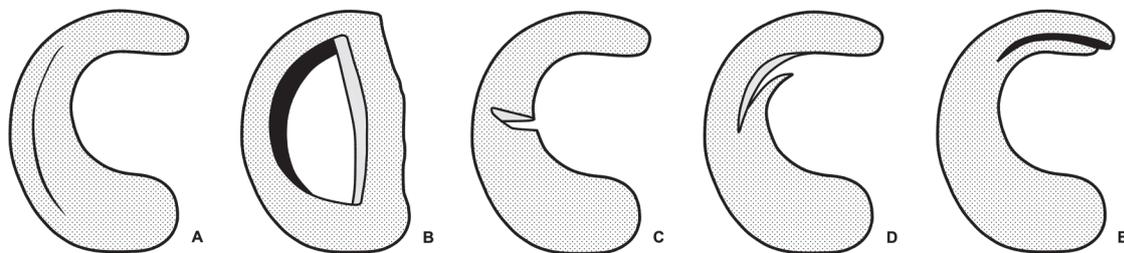


Abbildung 3: Meniskusriss-Typen. A: Längsriss, B: Korbhenkelriss, C: Radiärriss, D: Schrägriss, E: Horizontalriss, (mod. nach Dürselen und Freutel (2015))

Für klinisch relevante Meniskusrisse war in der Vergangenheit die totale oder partielle Meniskektomie das therapeutische Mittel der Wahl. Radiologische und klinische Untersuchungen belegen jedoch einen deutlichen Anstieg der Inzidenz degenerativer Gelenkschäden nach solchen Therapien (Howell et al. 2000; Veth 1985; Fairbank 1948). Das Ziel bei der Therapie von Meniskusläsionen sollte daher sein, möglichst viel Meniskusgewebe zu erhalten, um die biomechanische Integrität des Meniskus wiederherzustellen (Petersen et al. 1999). Eine Möglichkeit ist die Refixation (Naht) des Meniskusrisses (Klimkiewicz und Shaffer 2002; Laprell et al. 2002; Ochi et al. 2001; DeHaven 1999; Okuda et al. 1999; van Trommel et al. 1998; Zhang et al. 1995; Tenuta et al. 1994). Bei der Versorgung von Meniskusverletzungen werden unterschiedliche Nahttechniken (Abbildung 4) angewandt, wie die *Inside-out*-, die *Outside-in*- oder die *All-inside*-Naht. Die Techniken zeigen bei den klinischen Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede (Grant et al. 2012; Kalliakmanis et al. 2008). Laut der aktuellen Leitlinie wird die arthroskopische Nahtversorgung empfohlen (Siebert et al. 2018). Die *Inside-out*- (Horibe et al. 1996; Stone und Miller 1985) und die *Outside-in*-Technik (Rodeo und Warren 1996) werden bevorzugt bei Verletzungen im Bereich des Vorderhorns bzw. der *Pars intermedia* eingesetzt.

Verletzungen im Hinterhorn werden häufig mittels *All-inside*-Naht versorgt (Maruyama 1996; Morgan 1991).

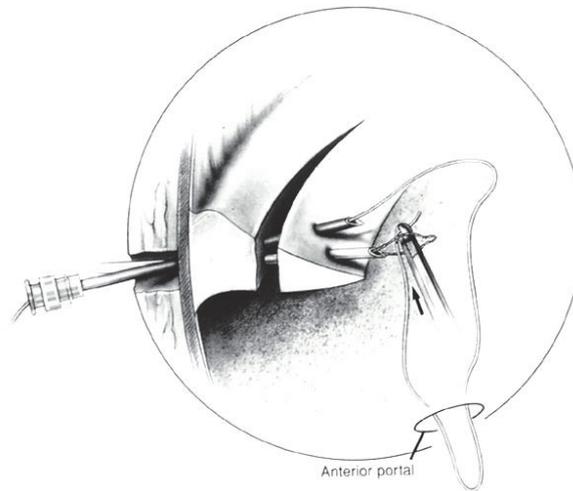


Abbildung 4: Meniskusnaht am Beispiel der *Outside-in*-Nahttechnik (Rodeo 2000)

Die Erfolgchance der Meniskusrefixation hängt unabhängig von der Versorgungstechnik maßgeblich von der Lokalisation des Risses ab. Je weiter peripher der Riss liegt, desto besser ist das Meniskusgewebe vaskularisiert und desto höher sind die Heilungschancen. Weiter zentral liegende Risse besitzen aufgrund ihrer schlechten Vaskularisation geringere Heilungschancen (Klimkiewicz et al. 2002). Die Versagensrate der Meniskusnaht liegt laut Re-Arthroskopie-Studien bei 25 % (Kopf et al. 2011). Damit führen 75 % der genähten Menisken zu einer klinischen Beschwerdefreiheit; dies schließt partiell und komplett geheilte Menisken mit ein (Kopf et al. 2011). Diese Erfolgsquote bezieht sich jedoch nur auf Risse der roten bzw. rot-weißen Zone. Die Heilungsraten von Meniskusläsionen in Kombination mit einer vorderen Kreuzbandplastik liegen im Vergleich zur isolierten Meniskusnaht höher (Haas et al. 2005). In einer Studie heilten nach einer kombinierten Versorgung von Meniskusrissen mit der *All-inside*-Technik und einer Plastik des vorderen Kreuzbandes 84 % der Menisken komplett und 12 % unvollständig aus. Auch nach inkompletter Meniskusheilung waren die Patienten teilweise beschwerdefrei, sodass die klinische Erfolgsquote bei 96 % lag (Jin Hwan et al. 2010). Vermutlich sorgt ein Hämarthros durch einströmende pluripotente Zellen und Signalmoleküle für ein heilungsförderndes Milieu (Tielinen et al. 2007). Allerdings wurden in der Studie nur Risse in der rot-roten oder der rot-weißen Zone mit einer Naht versorgt. Meniskusrisse der avaskulären weiß-weißen Zone wurden durch eine partielle Meniskektomie therapiert (Jin Hwan et al. 2010). Nahtrefixationen in diesem Bereich führten zu einer hohen Versagensrate. In einer klinischen Studie mit 91 Fällen heilten nach Versorgung avaskulärer Meniskusrisse mittels *Inside-out*-Naht nur 25 % komplett aus; 38 % wiesen eine partielle und 36 % keine Heilung auf (Rubman et al. 1998).

Daher beschäftigen sich zahlreiche Forschungsansätze mit der Identifikation von Therapieverfahren für eine Meniskusheilung in der avaskulären Zone. Dazu zählen mechanische Methoden zur Durchblutungssteigerung. Zum Einsatz kamen z. B. das sogenannte *Needling*-Verfahren, wobei mit einer Kanüle Gefäßkanäle vom vaskularisierten zum avaskulären Teil geschaffen wurden, die Trephination (Zhang et al. 1995; Fox et al. 1993) und das Anrauen der Meniskusoberfläche oder der den Meniskusriss umgebenden *Membrana synovialis* (Henning et al. 1987; Arnoczky et al. 1983).

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Heilung der avaskulären Meniskuszone ist das *Tissue engineering*. Dabei werden Zellen (z. B. mesenchymale Stromazellen (MSCs)), Strukturgerüste (*Scaffold*) und modulierende Faktoren (z. B. Wachstumsfaktoren) eingesetzt. Tierexperimentelle Studien belegen eine verbesserte Heilung von Rissen im avaskulären Teil des Meniskus durch Verwendung eines Fibrin-Koagels (Port et al. 1996; Arnoczky et al. 1988). Stanzdefekte in der avaskulären Zone von Hundemenisken heilten nach drei Monaten durch Bildung von fibrokartilaginärem Gewebe komplett aus (Arnoczky et al. 1988); makroskopisch und histologisch waren jedoch Abweichungen von normalem Meniskusgewebe erkennbar. Vermutlich wirken sich im Blut befindliche Wachstumsfaktoren, Zytokine und Matrixbestandteile positiv auf die Gewebeheilung aus.

Daher ist der Einsatz von Thrombozyten-reichem Plasma (engl. *platelet-rich plasma*, PrP) ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Gewebeheilung. Die kernlosen Thrombozyten im peripheren Blut spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase sowie bei der frühen Phase der Wundheilung und Geweberegeneration (Marx 2001). Die durch die Fragmentierung von medullären Megakaryozyten entstehenden Thrombozyten sind 2–5 μm groß (Mensch) und besitzen eine Lebensdauer von ca. 10 Tagen (Broos et al. 2011). Der Thrombozyten-(Tc)-Normwert liegt beim Menschen bei 150.000–350.000 Tc/ μl und beim Schaf bei durchschnittlich 430.000 Tc/ μl (Foley et al. 2014; Marx 2001). PrP wird definiert als Plasma mit einer Thrombozyten-Konzentration über dem Normwert. Das Thrombozyten-Konzentrat wird durch Zentrifugation aus autologem venösem Blut gewonnen, wobei sich die Thrombozyten-Konzentration um das Drei- bis Achtfache erhöht. Humanes PrP sollte mindestens 1.000.000 Tc/ μl enthalten (Christensen et al. 2006; Sarkar et al. 2006; Woodell-May et al. 2005; Weibrich et al. 2003; Marx 2001). Bei der Herstellung unterscheidet man die plasmabasierte Methode, bei der idealerweise nur Thrombozyten als Zellbestandteil isoliert werden, vom *Buffy-coat*-System, bei dem das PrP neben Thrombozyten auch Leukozyten und Erythrozyten enthält (DeLong et al. 2012). Der Einsatz von *Buffy-Coats* wird aufgrund der katabolen Wirkung der Leukozyten eher kritisch gesehen, da diese der anabolen Wirkung der Thrombozyten entgegenwirken können (Yin et al. 2016; Sundman et al. 2011). Im PrP liegen auch die von Thrombozyten sezernierten Wachstumsfaktoren in hoher Konzentration vor. Dazu gehören die drei Isomere des *Platelet*

derived growth factor (PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$, PDGF $\alpha\beta$) (Antoniades 1981), die beiden Isomere des *Transforming growth factor beta* (TGF- β 1, TGF- β 2), der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *Epidermal growth factor* (EGF), der *Insulin-like growth factor* (IGF) sowie der *Fibroblast growth factor* (FGF) (Everts et al. 2006; Weibrich et al. 2003; Weibrich et al. 2002b; Dugrillon et al. 2002; Marx et al. 1998). Neben den Wachstumsfaktoren enthält das PrP weitere bei der Wundheilung und Geweberegeneration eine Rolle spielenden Substanzen wie Histamin, Dopamin, Serotonin und Adenosin (Foster et al. 2009). Auch Adhäsionsmoleküle wie Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin-1 wurden nachgewiesen (Nurden et al. 2008; Marx 2004). Die Wachstumsfaktoren werden in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert (Furst et al. 2003; Gemmell und Park 2000). Die Thrombozyten verändern bei einer Verletzung ihre Form, aggregieren zu einem Blutkoagel (Ishii-Watabe et al. 2000) und sezernieren über eine durch Thrombin bzw. Calcium oder Kollagen aktivierte Degranulation anabole und katabole Faktoren (Lee et al. 2016; Aukhil 2000; Gawaz 1999). Laut einer *in vitro* Analyse sezernieren Thrombozyten nach Aktivierung acht Tage lang Wachstumsfaktoren (Zellner et al. 2014). Einige Wachstumsfaktoren sind nur in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren effektiv; andere wirken unabhängig. Die Interaktionen der Wachstumsfaktoren bei der Geweberegeneration und -reparation sind aktuell noch nicht vollends verstanden (Schlegel et al. 2003; Tozum und Demiralp 2003; Weibrich et al. 2002a). Studien belegen einen positiven Effekt von PrP auf die Heilung von Knochen- (de Obarrio et al. 2000; Anitua 1999) und Weichteildefekten (Sanchez et al. 2007). In der Kieferchirurgie wurde PrP schon frühzeitig zur Knochenheilung eingesetzt. Die Verwendung von PrP führte zu einer schnelleren Epithelialisierung, einer dichteren und reiferen Knochenstruktur mit besser organisierten Trabekeln und einer verbesserten Knochenregeneration (de Obarrio et al. 2000; Kassolis et al. 2000; Rosenberg und Torosian 2000; Anitua 1999; Marx et al. 1998). Auch bei Kaninchen wurde der positive Effekt von PrP auf die Knochenheilung anhand einer verbesserten Heilung von Defekten der Schädelkalotte dokumentiert (Hokugo et al. 2007). In tierexperimentellen Bohrlochmodellen des Femurs, des Radius und der Ulna zeigte PrP in einigen Studien isoliert einen positiven Effekt auf die Knochenheilung (Guzel et al. 2015; Souza et al. 2012; Gumieiro et al. 2010; Kasten et al. 2008; Simman et al. 2008), in anderen Studien dagegen nur bei der kombinierten Anwendung mit anderen Substanzen, wie Knochentransplantate (Kanthan et al. 2011; Molina-Minano et al. 2009), Apatit-Schaum (Sugimori et al. 2006), *macrophage recruiting agent* SEW2871 (Kim et al. 2014), Calcium-Sulfat (Chen et al. 2016), gefriergetrocknete Knochentransplantate (Dallari et al. 2006) sowie MSCs (Zhang et al. 2013). Insgesamt hatte PrP in 91 % der Studien einen positiven Effekt auf die Knochenheilung, in 7 % keinen Effekt und in 2 % einen negativen Effekt (Roffi et al. 2017). In einer Studie zur Weichteilregeneration zeigten Sportler nach einer PrP-Injektion im Vergleich zu Sportlern mit konservativer Behandlung nach einer Achillessehnenruptur eine kürzere Regenerationsphase (Sanchez et al. 2007).

Chronische Tendinopathien des Ellbogens, Verletzungen der Rotatorenmanschette und der Achillessehne werden ebenfalls durch PrP positiv beeinflusst (Monto 2012; Thanasas et al. 2011; Gaweda et al. 2010; Peerbooms et al. 2010; Randelli et al. 2008; Mishra und Pavelko 2006). Aufgrund der schlechten Heilungstendenz von Meniskusdefekten der avaskulären Zone gilt PrP auch hier als vielversprechender Therapieansatz. In einer Studie wirkte sich PrP auf die Funktionsfähigkeit und Überlebensfähigkeit von Meniskuszellen (*in vitro*) sowie auf die Bildung von Fibrochondrozyten und EZM im Defekt der avaskulären Zone von Kaninchenmenisken (*in vivo*) positiv aus (Ishida et al. 2007). Auch bei Patienten verbesserte sich durch PrP die Heilungstendenz bei einer offenen Meniskusversorgung (Pujol et al. 2015). In einer weiteren Studie an Kaninchenmenisken kam es nach PrP hingegen zu einem Anstieg kataboler Moleküle (Matrixmetalloproteasen (MMPs)) (*in vitro*) und zu einer Bindegewebsproliferation, aber nicht zur Bildung von Meniskusgewebe im Defekt der avaskulären Zone (*in vivo*) (Lee et al. 2016). Daneben gibt es auch tierexperimentelle und klinische Untersuchungen, in denen ein signifikanter Unterschied bei mit und ohne PrP behandelten Menisken fehlte (Griffin et al. 2015; Shin et al. 2015). Eine retrospektive Analyse wies keinen positiven Effekt auf die Reoperationsrate und die Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit bei Meniskusnähten nach (Griffin et al. 2015).

Da der alleinige Einsatz von PrP nicht den gewünschten Erfolg zu erzielen schien, rückten die potenziell heilungsfördernden Eigenschaften von Stammzellen in den Fokus. 1968 wurden erstmals humane MSCs aus Knochenmark (*engl. bone-marrow*, BM-MSCs) isoliert (Friedenstein et al. 1968). MSCs sind pluripotente Zellen, die in verschiedenen Geweben des erwachsenen Organismus vorkommen, darunter im Knochenmark, im Synovialgewebe und im Fettgewebe. Die mesodermalen Zellen können sich osteogen, chondrogen und adipogen differenzieren (Rentsch et al. 2010; Szilvassy 2003; Pittenger et al. 1999). Diese Differenzierungseigenschaft wurde auch an ovinen Stammzellen nachgewiesen (Rentsch et al. 2010). Unter der Abkürzung MSCs werden mesenchymale Stammzellen, die nur *in vivo* auftreten, und mesenchymale Stromazellen, die *per definitionem* die Fähigkeit zur Differenzierung besitzen, *in vitro* kultiviert werden können, bestimmte Oberflächenmarker aufweisen und an Plastik adhären können, zusammengefasst (Keating 2006). In der vorliegenden Arbeit bezieht sich die Abkürzung MSCs auf mesenchymale Stromazellen. Zu den Mechanismen, die bei einer MSC-Transplantation potenziell zur Regeneration von geschädigtem Meniskusgewebe beitragen können, zählen:

- (1) die Differenzierung der MSCs zu neuem Gewebe (Ruiz-Iban et al. 2011),
- (2) die Ergänzung ortsständiger Progenitorzellen durch die MSCs (Coelho et al. 2012),

- (3) die Fusion der MSCs mit ortsständigen Zellen (Coelho et al. 2012) und
- (4) die Sekretion bzw. Aktivierung von Wachstumsfaktoren durch die MSCs (Salgado et al. 2010).

Außerdem wirken MSCs durch die Sezernierung entzündungshemmender Faktoren wie Prostaglandin E₂, *Leukemia inhibitory factor* (LIF) und Kynureninen potentiell immunsuppressiv (Najar et al. 2010; Yanez et al. 2010; Yanez et al. 2006; Puissant et al. 2005). Am Kaninchenmodell zeigten MSCs nach Meniskusteilresektion protektive Effekte auf den Gelenkknorpel (Shen et al. 2013). Auf der Basis des vermuteten Potentials von MSCs wurden weitere *in vitro* Studien durchgeführt. In einem ovinen Modell wurde zwischen zwei Lagen avaskulärem Meniskusgewebe ein Kollagen-*Scaffold* mit und ohne autologe MSCs implantiert. Die Besiedlung mit MSCs verbesserte die zelluläre Integration und Belastbarkeit (Pabbruwe et al. 2010). In einem *in vitro* Rattenmodell proliferierten MSCs in avaskulären Meniskusdefekten und induzierten die Bildung von EZM (Izuta et al. 2005). In anschließenden *in vivo* Studien führte der Einsatz eines mit MSCs beladenen Hyaluron-Kollagen-*Scaffolds* in einem Stanzdefekt am Kaninchenmeniskus zur Bildung von Faserknorpel-ähnlichem Gewebe, das sich aber nur teilweise in das native Meniskusgewebe integrierte (Zellner et al. 2010). Dieselbe Forschergruppe untersuchte später den Effekt eines mit MSCs besiedelten Hyaluron-Kollagen-*Scaffolds* auf die Heilung von Meniskusrissen der avaskulären Zone am Kaninchenmodell (Zellner et al. 2013). Hier kam es zur Bildung von Faserknorpel-ähnlichem Gewebe, einer verbesserten Integration in das native Meniskusgewebe und zu einer höheren Belastbarkeit (Zellner et al. 2013). Der Effekt einer *Scaffold*-freien Injektion von synovialen MSCs wurde in Defektmodellen am Schwein (Moriguchi et al. 2013), am Kaninchen (Shen et al. 2013) und am murinen Meniskus (Shen et al. 2014; Horie et al. 2009) untersucht. In allen Studien zeigte die MSC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe histologisch deutlich bessere Heilungstendenzen, jedoch waren die mechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Gewebes dem nativen Meniskusgewebe unterlegen (Dutton et al. 2010).

Die Migration und Proliferation der MSCs werden von den Wachstumsfaktoren des umgebenden Milieus beeinflusst. *In vitro* Experimente belegen eine vermehrte Ansiedlung von MSCs nach Gefäßverletzungen und eine Stimulation der MSC-Migration durch Thrombozyten (Langer et al. 2009). Die von den Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren FGF-2, IGF-1 und PDGF- β steigern die Proliferation, während TGF- β 1 inhibitorisch auf MSCs wirkt (McCarty et al. 2009). Weiter fördert PDGF- β *in vitro* die Migration von MSCs (Phipps et al. 2012).

Die Annahme, dass die schlechte Heilungstendenz der avaskulären Zone des Meniskus auf eine mangelhafte Gefäßversorgung zurückzuführen ist, richtete den Fokus auf die pro-angiogenetischen Eigenschaften der MSCs. Dabei spielt die Kolonialisierung neuer Gefäße eine

geringere Rolle als das parakrine Potential der MSCs (Bortolotti et al. 2015). *In vitro* steigerte die Zugabe von MSCs die Sekretion des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF und folglich die Endothelzellmigration, -proliferation und Tubulusformation (Abdeen et al. 2014; Jose et al. 2014; Pedersen et al. 2014; Kinnaird et al. 2004b; Rehman et al. 2004). Als weiterer parakrin wirkender Faktor wurde PDGF-AA im Rahmen von Herzmuskelverletzungen *in vitro* untersucht. Das von MSCs sezernierte PDGF-AA steigerte die Migration von ortsständigen kardialen Stromazellen zum Ort der Verletzung deutlich (Windmolders et al. 2014). Die Befunde lassen vermuten, dass das Wechselspiel von MSCs und Wachstumsfaktoren das heilungsfördernde Potential verstärkt.

Die Rolle der Herkunft der MSCs für die Sekretion von Wachstumsfaktoren wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. In einem murinen Ischämiemodell wurde die Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF- β , TGF- β , VEGF-A) in MSCs aus adipogenem Gewebe oder Knochenmark analysiert. BM-MSCs zeigten eine deutlich höhere Expression der Wachstumsfaktoren PDGF- β und TGF- β . Die VEGF-A-Expression war in den beiden MSC-Herkunftsgruppen dagegen nicht signifikant verschieden (Bortolotti et al. 2015). Laut einer anderen Studie zeigen dagegen MSCs aus adipogenem Gewebe ein höheres angiogenetisches und therapeutisches Potential als BM-MSCs (Kim et al. 2007).

Der Einfluss von PrP als Quelle von Wachstumsfaktoren auf das Verhalten von MSCs wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Zugabe von PrP stimulierte die Proliferation oviner und humaner MSCs (Cho et al. 2011; Goedecke et al. 2011; Drengk et al. 2009; Doucet et al. 2005) und die Migration von MSCs und Meniskuszellen (Freyman et al. 2016). Der positive Effekt von PrP auf die Proliferation und chondrogene Differenzierung humaner MSCs führte zu einer verbesserten Knorpelheilung am murinen Tiermodell (van Pham et al. 2013). Aufgrund der positiven Interaktion könnte eine Kombination von MSCs und PrP bei der Meniskusheilung einer isolierten Zugabe von PrP oder MSCs überlegen sein. In diesem Zusammenhang ist auch die Frage nach dem Einfluss von PrP und MSCs auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren interessant.

Für die Geweberegeneration sind Wachstumsfaktoren unverzichtbar. Sie gelangen durch einströmendes Blut in den Defekt oder werden von lokalen Zellen sezerniert. Im PrP wurden deutlich höhere Konzentrationen als im Plasma nachgewiesen (Cho et al. 2011; Sundman et al. 2011; Kon et al. 2010b; Eppley et al. 2004). Wachstumsfaktoren interagieren mit Entzündungszellen und den umliegenden Stromazellen. Insbesondere VEGF und PDGF spielen dabei eine zentrale Rolle (Yamazaki und Morita 2006; Holmes und Zachary 2005; Betsholtz 2004; Hoch und Soriano 2003).

VEGF ist der bedeutendste angiogenetische Faktor (Ferrara und Keyt 1997; Leung et al. 1989; Plouet et al. 1989). Als VEGF (synonym: vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF)) (Senger et al. 1983) wird eine Gruppe von Proteinen bezeichnet, die neben VEGF-A, auch VEGF-B, -C, -D, -E und bei Säugetieren den *Placenta growth factor* (PGF) umfasst (Tammela et al. 2005; Ferrara et al. 2003; Neufeld et al. 1999). Bis zur Entdeckung der anderen Subtypen wurde VEGF-A als VEGF bezeichnet und teilweise auch heute noch als Synonym verwendet. VEGF-A spielt bei der Angiogenese eine zentrale Rolle. Als selektives Endothelzell-Mitogen verursacht VEGF-A eine mikrovaskuläre Hyperpermeabilität für zirkulierende Makromoleküle, wirkt chemotaktisch auf Monozyten (Koch et al. 1994; Clauss et al. 1990) und pro-koagulatorisch (Clauss et al. 1996). Durch alternatives *Splicing* des *VEGF-A*-Gens entstehen multiple Isoformen (Kowanetz und Ferrara 2006; Robinson und Stringer 2001; Lei et al. 1998). Diese Isoformen unterscheiden sich in ihrer Heparin-Bindfähigkeit und folglich in ihrer Bioverfügbarkeit und Rolle bei der Angiogenese (Red-Horse et al. 2007). VEGF-A wirkt auf Zielzellen, die die Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1, *Fms-like tyrosine kinase-1*) und VEGFR-2 (KDR, *kinase domain region*) exprimieren (Terman et al. 1992; Terman et al. 1991). In gesundem Gewebe wird VEGF während der Embryogenese (Barleon et al. 1997; Dumont et al. 1995; Peters et al. 1993; Breier et al. 1992), in der Epiphyse während des skelettalen Wachstums (Gerber et al. 1999) und bei Adulten bei der Entstehung neuer Blutgefäße z. B. im *Corpus luteum* und im Endometrium exprimiert (Clauss et al. 1996). Im Rahmen pathologischer Entwicklungen wurde VEGF in synovialen Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Pufe et al. 2001c; Fava et al. 1994; Koch et al. 1994), in osteoarthrotischem Knorpel (Jansen et al. 2012; Pufe et al. 2001a), in degeneriertem Bändergewebe (Pufe et al. 2001b) während Wundheilungsprozessen (Ferrara 1999; Frank et al. 1995) und bei der Entwicklung von Tumoren (Ferrara 2002; Ferrara et al. 1997; Shweiki et al. 1992) nachgewiesen. Das angiogenetische Potential von VEGF-A ist in zahlreichen *in vitro* Studien dokumentiert. VEGF-A fördert die Einwanderung endothelialer Zellen in Kollagen-Gele, die Entwicklung kapillarähnlicher Strukturen und die Sprossung neu gebildeter Endothelien aus Aortengewebe (Nicosia et al. 1994; Pepper et al. 1994; Pepper et al. 1992). *In vivo* führt hochkonzentriertes rekombinantes VEGF₁₆₅ in der avaskulären Kornea zur Bildung neuer Blutgefäße (Phillips et al. 1994) sowie zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität in ischämischen Kaninchengliedmaßen (Bauters et al. 1995) und porcinen Koronararterien (Harada et al. 1996). Die Bedeutung von VEGF belegen *Knock-out*-Mäuse, bei denen der Verlust eines *VEGF*-Allels zu hochgradigen Störungen der embryonalen Gefäßbildung führt (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996) und das Fehlen der VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2) zum embryonalen Tod (Fong et al. 1995; Shalaby et al. 1995).

Als Mediator der Angiogenese wurde VEGF-A auch im Rahmen von Heilungsprozessen des avaskulären Meniskusgewebes untersucht. VEGF-A erhöhe in Meniskuszellkulturen die Kollagen-1-Bildung signifikant (Esparza et al. 2012). Die Vermutung, dass das schlechtere Heilungspotential der avaskulären im Vergleich zur vaskulären Zone auf einem VEGF-Mangel beruht, wird durch höhere VEGF-Konzentrationen in der vaskulären Zone von humanen und Kaninchenmenisken unterstützt (Becker et al. 2004). Im rupturierten Meniskus wurden im Vergleich zum gesunden Meniskus fünf und zehn Wochen postoperativ deutlich höhere VEGF-Konzentrationen nachgewiesen (Becker et al. 2004). Trotz der erhöhten VEGF-Konzentration blieb jedoch die Heilung des Meniskusgewebes in der avaskulären Zone aus. Der Versuch, einen Defekt im avaskulären Teil des Schafsmenisikus mit einem mit VEGF beschichteten Nahtmaterial über eine Induktion der Angiogenese zu therapieren, gelang jedoch nicht (Petersen et al. 2007); die Kontrollgruppen zeigten sogar bessere Ergebnisse. Das vermehrte Auftreten von Faktor VIII-positiven Zellen in der VEGF-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen war auf ein erhöhtes Vorkommen von Endothelzellen zurückzuführen (Petersen et al. 2007).

Die proliferative (Wang et al. 2006) und chemotaktische Wirkung (Pons et al. 2008; Ball et al. 2007a) von VEGF-A auf MSCs wurde mehrfach gezeigt. In porcinen MSCs wurde sowohl endogen als auch exogen sezerniertes VEGF nachgewiesen (Wang et al. 2006). Auch humane MSCs exprimieren VEGF (Beckermann et al. 2008). MSCs, die keine VEGF-Rezeptoren exprimieren, werden über die Bindung von VEGF an PDGF-Rezeptoren zur Proliferation und Migration angeregt (Ball et al. 2007b). VEGF-A führte in *in vitro* und *in vivo* Studien zur Differenzierung von BM-MSCs zu Endothelzellen (Wu et al. 2005; Oswald et al. 2004; Al-Khaldi et al. 2003). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Applikation von MSCs auch *in vivo* bei der Heilung avaskulärer Meniskusrisse einen positiven Einfluss hat und ob dieser Effekt durch die Zugabe von PrP gesteigert werden kann.

Neben VEGF spielt PDGF eine wichtige Rolle im Wundheilungsprozess. Die PDGF-Familie umfasst fünf Isoformen: PDGF-AA (PDGF- α), PDGF-BB (PDGF- β), PDGF-AB, PDGF-CC und PDGF-DD (Reigstad et al. 2005; Fredriksson et al. 2004). Dabei handelt es sich über Disulfidbrücken verbundene Homodimere bzw. um Heterodimere aus PDGF-A und PDGF-B (PDGF-AB) (Hollinger et al. 2008). PDGF wirkt auf Zellen, die die Tyrosinkinase-Rezeptoren PDGF-Rezeptor alpha (PDGFR- α) und beta (PDGFR- β) exprimieren. PDGF- β gilt als universelle Isoform von PDGF, da es an alle bisher bekannten PDGF-Rezeptoren bindet (Hollinger et al. 2008).

PDGF wird von Zellen der glatten Muskulatur, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen gebildet und in Thrombozyten gespeichert (Lee 2000). Hohe PDGF-Konzentrationen treten in Wundflüssigkeiten während des frühen Stadiums der Wundheilung auf (Spindler et al. 1995).

Als Wachstumsfaktor mit hohem mitogenen und chemotaktischen Potential beeinflusst PDGF die Migration, Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten (Schmidt et al. 2006; Heldin und Westermark 1999; Kirchberg et al. 1995; Lynch et al. 1987; Grotendorst et al. 1985). PDGF fördert die Matrix-Synthese (Fibronectin, Proteoglykan, Hyaluronsäure, Kollagen) sowie die Produktion und Sekretion von Fibroblasten-Kollagenasen (Rodrigues et al. 2010; Schmidt et al. 2006). Der Einfluss von PDGF auf die Heilung diverser Gewebe wie Bänder, Sehnen, Knorpel und Haut ist gut dokumentiert (Allen et al. 2014; Lohmann et al. 2000; Batten et al. 1996; Schmidt et al. 1995). In einer *in vitro* Studie am Kaninchenkreuzband wurde eine nahezu achtfach erhöhte Fibroblasten-Proliferation unter dem Einfluss von PDGF im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Schmidt et al. 1995). Ein positiver Effekt von PDGF auf die Sehnenheilung beim Kaninchen ließ sich auch in einer *in vitro* Studie anhand der Desoxyribonukleinsäure- (engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA) und Matrixsynthese nachweisen (Yoshikawa und Abrahamsson 2001). Weitere *in vivo* Studien am *Lig. collaterale mediale* von Ratten und Kaninchen belegen eine verbesserte Heilungstendenz durch PDGF in biomechanischen und histologischen Untersuchungen (Hildebrand et al. 1998; Batten et al. 1996; Letson und Dahners 1994). Der positive Effekt von PDGF auf den Heilungsprozess wurde auch am Meniskusgewebe dokumentiert. Bei *in vitro* Untersuchungen am Schafsmeniskus reagierten Fibrochondrozyten mit einer gesteigerten Mitoserate auf eine PDGF-Stimulation (Spindler et al. 1995). Es bestanden aber deutliche regionale Unterschiede. Nur in der äußeren Zone, nicht aber in der zentralen Zone kam es zu einer dosisabhängigen Steigerung. Dagegen fand eine vergleichbare Studie am bovinen Meniskus in allen drei Zonen eine dosisabhängige gesteigerte Proliferation und Migration der Fibrochondrozyten (Bhargava et al. 1999). Dabei schienen hohe PDGF-Konzentrationen (100 ng/ml) die Migrationsrate aber zu hemmen. *In vivo* erhöhte ein PDGF-beschichteter dezellularisierter Meniskus-*Scaffold* in der avaskulären Zone von bovinen Meniskus-Explantaten die Zellproliferation und -migration in das Defektgewebe (Lee et al. 2018). Weiter verbesserte die PDGF-Beschichtung die Integration des *Scaffolds* in den Meniskus und die Zugfestigkeit des Gewebes (Lee et al. 2018). Da PDGF als Modell-Zytokin für die Migration gilt (Deuel et al. 1991), untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen seinen Einfluss auf die Migration von MSCs. Dabei konnten sie einen positiven Effekt auf die Rekrutierung von MSCs beobachten (von der Burchard 2015; Mishima und Lotz 2008; Ponte et al. 2007). Einschränkend ist anzumerken, dass die positiven Ergebnisse häufig dosis- und/oder zeitabhängig waren und erst bei höheren PDGF-Konzentrationen oder nur zu bestimmten Zeitpunkten eintraten. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, welche Rolle PDGF bei der Applikation von MSCs und PrP im Heilungsprozess avaskulärer Meniskusrisse spielt.

Aufgrund des Einflusses der Angiogenese auf die Wundheilung ist die Darstellung von Gefäßen bzw. Endothelzellen bei der Beurteilung von Heilungsprozessen von großer Bedeutung. Meist dient der Faktor VIII als Nachweis von Endothelzellen (Des Guetz et al. 2006; Petersen et al. 2005). Faktor VIII ist ein hauptsächlich von Hepatozyten, aber auch von Nieren-, Endothel- und lymphatischen Zellen synthetisiertes Glykoprotein (Mazurkiewicz-Pisarek et al. 2016). Immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen der Tumorforschung wiesen Mikrogefäße über das Faktor VIII-Antigen nach (Weidner et al. 1991). Auch in der vorliegenden Studie wurde eine Faktor VIII-Färbung zum Nachweis der Angiogenese genutzt.

Die derzeitige Studienlage zu den positiven Effekten von MSCs und PrP auf die Meniskusheilung wirft die Frage auf, ob eine Kombination beider Komponenten die Heilung des avaskulären Meniskusgewebes weiter verbessert und ob ein potenzieller Effekt auf die VEGF-A- und PDGF- β -Expression die Angiogenese fördert.

Zur möglichst genauen Abbildung der anatomischen Gegebenheiten im Menschen sollte ein Großtiermodell verwendet werden. Bei orthopädischen Forschungsfragen hat sich das Schafmodell aufgrund der Ähnlichkeit in Bezug auf Gewicht, Größe, Gelenkanatomie und Regenerationsprozesse von Knochen und Knorpel etabliert (McCarty et al. 2009). Für die vorliegende Studie sind die Parallelen zwischen der humanen und ovinen Knieanatomie und Meniskusstruktur von besonderer Bedeutung (Osterhoff et al. 2011; Chevrier et al. 2009).

3 Zielsetzungen und Hypothesen

Ziel dieser Studie ist die Analyse des Einflusses der kombinierten lokalen Applikation von PrP und MSCs auf die Heilung von Meniskusrissen in der avaskulären Zone. Dazu soll der Effekt unterschiedlicher Therapien – isolierte Naht, Naht und Carrier, die alleinigen Gabe von PrP oder MSCs sowie die kombinierte Gabe von PrP und MSCs – auf die makroskopische Heilung und auf die Anzahl VEGF-A-, PDGF- β - und Faktor VIII-positiver Zellen verglichen werden.

Folgende Hypothesen sollten überprüft werden:

- 1) Die kombinierte lokale Applikation von PrP und MSCs ist den anderen Therapieformen hinsichtlich der Verbesserung der makroskopischen Heilung avaskulärer Meniskusrisse nach acht Wochen überlegen.
- 2) Die kombinierte lokale Applikation von PrP und MSCs ist den anderen Therapieformen hinsichtlich der Erhöhung der Anzahl VEGF-A-, PDGF- β - und Faktor VIII-exprimierender Zellen in den operierten Menisken nach acht Wochen überlegen.
- 3) Die kombinierte lokale Applikation von PrP und MSCs führt als Zeichen der Neoangiogenese verglichen mit den anderen Therapieformen zu einer höheren Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen im rissnahen Bereich der operierten Menisken.

4 Material und Methoden

4.1 Tiere und Tierhaltung

Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Vorgangsnummer G0063/12 genehmigt und nach den Maßgaben des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Bei den 30 Versuchstieren handelte es sich um weibliche, ca. drei Jahre alte Merinomix-Schafe mit einem Durchschnittsgewicht von $63,3 \pm 5,2$ kg. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in die Versuchstierhaltung der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin verbracht (Abbildung 5). Über eine Einstellungsuntersuchung wurde der einwandfreie Gesundheits- und Pflegezustand der Tiere sichergestellt. Untersucht wurde das Allgemeinbefinden, der Atmungsapparat, das kardiovaskuläre System, die rektale Körpertemperatur sowie der Zustand von Klauen und Gelenken. Die Tiere wurden mit individuellen Kunststoffohrmarken gekennzeichnet. Die Unterbringung der Schafe erfolgte präoperativ bis zehn Tage postoperativ in Ställen mit Stroheinstreu, Selbsttränken und täglicher Heufütterung. Es wurde ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten. Die Raumtemperatur betrug 20°C und die Luftfeuchtigkeit 65 %. Ab dem zehnten postoperativen Tag bis zur Euthanasie wurden die Tiere auf der Weide gehalten.



Abbildung 5: Schafe im Stall der Forschungseinrichtung

4.2 Versuchsgruppen

Die 30 Schafe wurden zufällig in fünf Gruppen zu jeweils sechs Tieren eingeteilt. Die Standzeit betrug durchschnittlich 56 Tage.

In den drei Versuchsgruppen wurde der Einfluss von PrP, MSCs bzw. die Kombination beider Komponenten untersucht. Für die PrP- und MSC-Implantation wurde ein *Scaffold* (*Optimaix 3D Collagen Sponges*, Matricel®, Herzogenrath, Deutschland) als Trägermaterial verwendet. Als Kontrollgruppen dienten:

- (I) eine Gruppe, in der die Meniskusrisse nur mittels Naht versorgt wurden,
- (II) eine Gruppe, die mit einer Naht und einem *Scaffold* versorgt wurde, und
- (III) eine Gruppe, in der die kontralateralen Menisken analysiert wurden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Aufteilung der Behandlungsgruppen – K = Kontrollgruppe, V = Versuchsgruppe, KL = kontralateraler Meniskus, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSCs = mesenchymale Stromazellen

Gruppe	Gruppenname	Anzahl der Schafe	Therapie
1 (K)	Naht	6	Meniskusnaht
2 (K)	Carrier	6	Meniskusnaht + <i>Scaffold</i>
3 (V)	PrP	6	Meniskusnaht + <i>Scaffold</i> + PrP
4 (V)	MSC	6	Meniskusnaht + <i>Scaffold</i> + MSCs
5 (V)	PrP+MSC	6	Meniskusnaht + <i>Scaffold</i> + PrP + MSCs
6 (K)	KL	30	Keine (kontralaterale gesunde Menisken)

4.3 Präoperative Vorbereitung der Versuchstiere

Der Operation (OP) ging eine 12-stündige Fastenzeit mit Wasser *ad libitum* voraus. Die Narkose wurde über einen Venenverweilkatheter (Vasofix® Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in der *Vena cephalica antebrachii* nach Spülen des Katheters mit 10 ml steriler Natriumchlorid-(NaCl)-Lösung durch intravenöse Gabe von 15 mg/kg Körpergewicht (KG) Thiopental (Trapanal® 2,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) eingeleitet. Die Tiere wurden mittels eines Laryngoskops mit langem Spatel (Modell Foregger, 30 cm für Tiere, RGQ, Tuttlingen, Deutschland) und einem Tubus (Mallinckrodt Hi-Contour *Oral/Nasal Tracheal Tube Cuffed*, Murphy Eye, 9,0 mm, Covidien llc, Nansfield, USA) intubiert. Zum Schutz vor Aspiration wurde der Tubus mit 16–18 ml Luft geblockt und mit Hilfe eines Klebebandes (Leukoplast® 1,25 cm Breite, BSN medical GmbH, Hamburg Deutschland) im

Maulwinkel des Tieres fixiert. Für die Vertiefung der Narkose wurden die Schafe an ein Inhalationsnarkosegerät angeschlossen (Sulla 800V, Capnolog, Ventilog, Isofluran Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Deutschland) und mit einem Sauerstoff/Distickstoffmonoxid-Gemisch (Verhältnis 3:1) mit 2 % Isofluran (Forene®, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bis zu einem expiratorischen Isofluran-Gehalt von 1,7 % beatmet. Die weitere Beatmung und Aufrechterhaltung der Narkose während der OP erfolgte bei einer Frequenz von 12–20 Atemzügen/min und einem Minutenvolumen von 10–15 ml/kg KG. Eine Magensonde (Durchmesser 14 mm, Willy Rüscher AG, Deutschland) verhinderte eine Pansenaufgasung während der Narkose (Abbildung 6). Intraoperativ wurde die Sauerstoffsättigung per Infrarotsonde am Ohr, die Herzfrequenz per Elektrokardiografie (EKG) und der Blutdruck durch eine Blutdruckmanschette am Vorderbein gemessen. Der Gehalt an Sauerstoff, Lachgas, Isofluran und Kohlenstoffdioxid in der inspiratorischen und expiratorischen Atemluft wurde überwacht.



Abbildung 6: Schaf in Rückenlage auf dem Operationstisch mit Pansensonde, Beatmungsschlauch, Blutdruckmanschette und Sauerstoffsättigungsmesssonde

Das rechte Knie und dessen Umgebung wurden geschoren und rasiert. Bei den Schafen der PrP- und PrP+MSC-Gruppe wurde für die PrP-Herstellung zusätzlich der Bereich der *Vena jugularis* geschoren. Das OP-Gebiet wurde gründlich mit Seife (Lifosan®, B. Braun Melsungen AG) gereinigt, erneut mit einem Einmalrasierer (Wilkinsons Sword, Solingen, Deutschland) rasiert und mit einer Jodlösung (Braunoderm®, Braun Melsungen AG) desinfiziert. Die Klauen wurden aus hygienischen Gründen mit einem Schutzverband versehen. Als Analgesie erhielten die Tiere eine subkutane Injektion von 4 mg/kg KG des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, Berlin, Deutschland), die transkutane Gabe von Fentanyl über

ein Pflaster für drei Tage (Durogesic® SMAT 50 µg/h transdermales Pflaster, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), einen intravenösen Fentanyl-Bolus 5 min vor dem Hautschnitt und bei Anstieg der Herzfrequenz im Abstand von 30–45 min (Fentanyl®, Janssen 0,5 mg, Janssen-Cilag). Direkt postoperativ und in den drei folgenden Tagen wurde den Schafen zusätzlich eine subkutane Injektion von 1,5 mg/kg KG Flunixin-Meglumin (Finadyne®, RPS 83 mg/ml, Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verabreicht. Um Wundinfektionen vorzubeugen, wurden die Schafe antibiotisch mittels intravenöser Applikation von 3 g Ampicillin-Natrium und Sulbactam-Natrium (Unacid® 3 g, Pfizer Pharma GmbH) vorbehandelt. Während der Stammzellentnahme wurden zusätzlich einmalig 5 mg/kg KG Enrofloxacin subkutan (Baytril®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) als Infektionsprophylaxe verabreicht. Nach dem Durchlauf des Antibiotikums erhielten die Tiere 1000–2000 ml einer Vollelektrolytlösung (Jonosteril® 1000 ml, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) als Dauertropfinfusion zur Stabilisierung des Kreislaufs und zum Ausgleich des Flüssigkeitshaushaltes.

4.4 Meniskusoperation

Das Schaf wurde in Rückenlage verbracht. Anschließend wurde das rechte Knie dreimal mit Braunoderm® desinfiziert und steril abgedeckt. Der Zugang zum Kniegelenk erfolgte parapatellar von medial durch eine ca. 10 cm lange longitudinale Inzision proximal mittig der Patella bis distal auf Höhe der *Tuberositas tibiae*. Nach Präparation der subkutanen Fettschicht wurde die *Bursa infrapatellaris subcutanea* scharf durchtrennt mit anschließender sehniger Abtrennung des *Musculus vastus medialis* von der Patella. Anschließend wurde die *Capsula articularis genu* medial der Patella und der Patellarsehne von proximal nach distal longitudinal gespalten. Der Hoffa-Fettkörper wurde sorgfältig präpariert und nach lateral abgedrängt. Im Anschluss wurde das *Lig. collaterale tibiale* ossär vom *Epicondylus medialis femoris* abgesetzt und mit nicht-resorbierbaren Fäden der Stärke 2 (Ethibond®; Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) angeschlungen. Die Patella wurde nach lateral luxiert und der *Meniscus medialis* durch Außenrotation und Flexion des Unterschenkels im Kniegelenk exponiert. Im anteriorem Drittel des *Meniscus medialis* wurde ein ca. 15 mm langer longitudinaler, vertikal transmuraler Schnitt im Bereich der avaskulären Zone mit einem Skalpell (Feather, Osaka, Japan) Nr. 15 gesetzt. Zur Kontrolle der kompletten Durchtrennung des Meniskus in kраниokaudaler Richtung wurde der Schnitt mit einer stumpfen, gebogenen Klemme gespreizt (Abbildung 7). In Abhängigkeit von der Gruppe wurden anschließend MSCs + *Scaffold*, PrP + *Scaffold*, MSCs + PrP + *Scaffold* oder nur das *Scaffold* in den Riss gegeben. Der Riss wurde in allen Gruppen in einer *Outside-in* Technik mit zwei Polydioxanon (PDS®)-Fäden der Stärke 3-0 (Ethicon GmbH) vernäht, die jeweils mit fünf Kreuzknoten verschlossen wurden. Im Anschluss wurde das *Lig. collaterale tibiale* transossär am *Epicondylus medialis femoris* mit zwei Ethibond®-2-

Fäden wieder refixiert. Die *Capsula articularis genu* und der *Musculus vastus medialis* wurden mit Vicryl®-0 (Ethicon GmbH) durch Einzelknopfnähte versorgt. Die *Bursa infrapatellaris subcutanea* und die *Subcutis* wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl®-2-0, Ethicon GmbH) und die Haut mit Rückstichnaht nach Donati mit nicht-resorbierbaren Fäden (Ethilon®, Ethicon GmbH) verschlossen. Anschließend wurde die Wunde mit Braunoderm® desinfiziert, mit einem Aluminium-Spray (MeproVet®, mepro, Vechta, Deutschland) und flüssigem Pflaster (Opsite® Spray, Smith & Nephew, Marl, Deutschland) sowie einem Baumwollverband abgedeckt. Alle OPs erfolgten unter sterilen Kautelen.

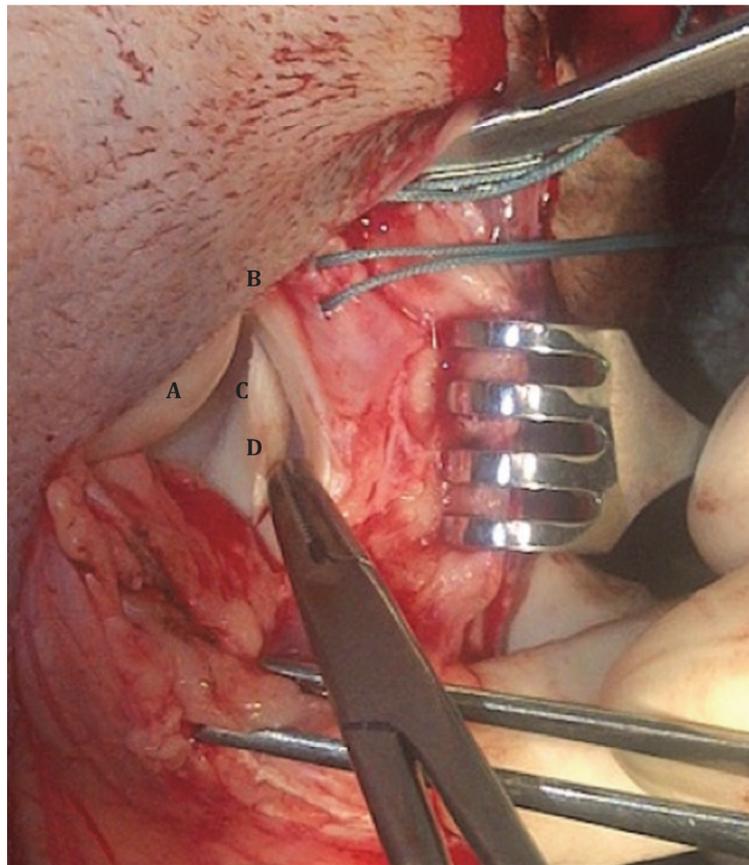


Abbildung 7: Meniskusriss intraoperativ. A = Epicondylus medialis femoris, B = Ligamentum collaterale tibiale (angeschlungen), C = Meniscus medialis, D = Applizierter Schnitt

4.5 Operation zur Stammzellentnahme aus dem Beckenkamm

Die Entnahme des Knochenmarkspirats zur Gewinnung der Stammzellen erfolgte vier Wochen vor der Meniskus-OP. Das Schaf wurde in Bauchlage verbracht, der linke Beckenkamm rasiert, dreimal desinfiziert, steril abgedeckt und erneut desinfiziert. Auf eine etwa 2 cm lange Inzision durch Haut und Unterhaut über dem ventralen Anteil der *Crista iliaca* folgte eine scharfe Präparation auf das Periost. Über eine ca. 1 cm tief in die Spongiosa des Markraums eingedrehte Knochenmark-Biopsienadel (Jamshidi®-Nadel, CareFusion, San Diego, USA)

und eine 20 ml Einmalspritze mit 2 ml Antikoagulant-Vorlage (ACD-A Antikoagulant, Charité Hausapotheke, Berlin, Deutschland) wurde langsam 15 ml Aspirat gewonnen (Abbildung) und direkt in heparinisierte Falcon-Röhrchen (BD Falcon® Tubes, Becton Dickinson GmbH, Freiburg, Deutschland) verbracht (1 ml Heparin für 15 ml Aspirat). Nach Beendigung des Eingriffs wurde das Weichteilgewebe reponiert, die Unterhaut mit resorbierbaren Fäden (Vicryl®-2-0, Ethicon GmbH) und die Haut mit nicht-resorbierbaren Einzelknopfheften vernäht (Ethilon® 0, Ethicon GmbH). Zur Vermeidung von Wundinfektionen wurde das OP-Feld mit Aluminium-Spray (MeproVet®, mepro, Vechta) geschützt.

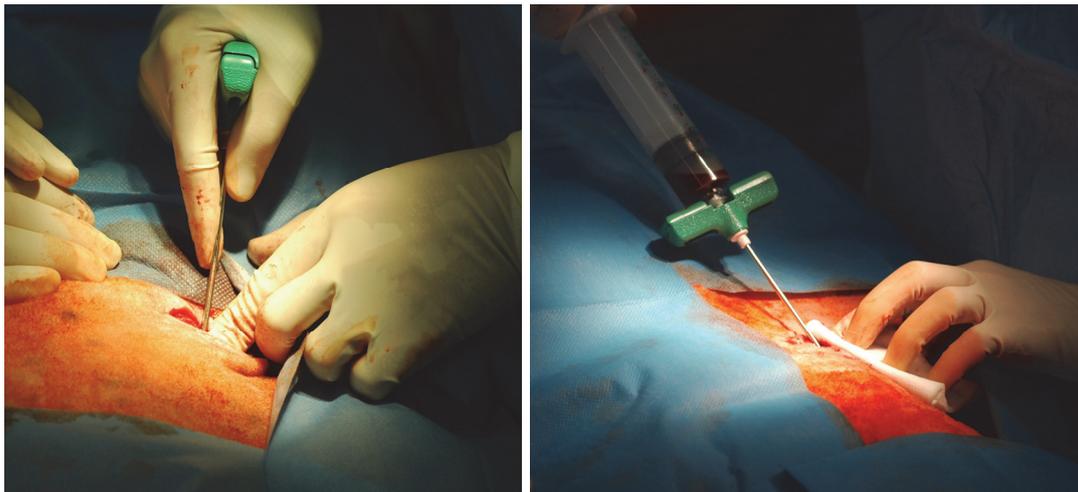


Abbildung 8: Stammzellentnahme aus dem rechten Beckenkamm. links – Einführen der Punktionskanüle (Jamshidi-Nadel); rechts – Aspiration des Knochenmarks

4.6 Stammzellkultivierung

Die Kultivierung der MSCs erfolgte im Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT). Das entnommene Aspirat wurde unter sterilen Bedingungen mit 25 ml PBS (Dulbecco's *phosphate buffered saline*, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) verdünnt, 3 sec geschwenkt und anschließend 10 min bei 300 g gebremst zentrifugiert (Rotofix 32 Rotor 1624, Andreas Hettich GmbH & Co. KG). Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 20 ml PBS resuspendiert und in ein mit einem 100 µm Zellsieb bestückten Falcon-Röhrchen überführt. Unter Vermeidung der Phasenvermischung wurde die gesiebte Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit 20 ml Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) gegeben. Durch die anschließende ungebremste Zentrifugation (Modell 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 30 min bei 400 g bildete sich in der Mitte eine weiße Phase, die vorsichtig aspiriert, in 50 ml PBS suspendiert und gebremst für 10 min bei 300 g zentrifugiert wurde. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Pellet in 35 ml Expansionsmedium (500 ml *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) *Low Glucose*, 50 ml fetales Kälberserum (FCS), 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S<9, 5 ml Glutamax) resuspendiert. Die

Lagerung erfolgte in einer Zellkulturflasche (t175) im Inkubator bei 36 °C und 5 % Sauerstoff. Alle drei bis vier Tage wurde das Expansionsmedium gewechselt. Nach sieben bis neun Tagen zeigten die Zellen eine Koloniebildung und eine Plastikadhärenz. Die morphologische Beurteilung der Zellen berücksichtigte die Zelldichte, Zellzahl, Koloniebildung und die Interzelladhäsion. Schneller proliferierende Zellen wurden viermal und langsamer proliferierende Zellen fünfmal auf neue Zellkulturflaschen verteilt (passagiert). Zur Ablösung vom Flaschenboden wurden die Zellen mit Trypsin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) inkubiert (Trypsinierung). Jeweils 10^5 Zellen wurden in ein neues Gefäß verbracht. Eine qualitative Beurteilung der MSCs anhand der ovinen Oberflächenmarker (*Cluster of differentiation*, CD) CD29⁺, CD44⁺, CD166⁺, CD11b⁻, CD31⁻, CD45⁻ und CD14⁻ erfolgte mittels Durchflusszytometrie (*engl. FACS = Fluorescent activated cell sorting*) (Adan et al. 2017).

Am OP-Tag wurden die MSCs je nach Proliferation in Passage vier oder fünf verwendet, trypsiniert und anschließend unter sterilen Bedingungen auf den *Scaffold* in eine Petrischale pipettiert. Bis zur Platzierung des *Scaffolds* in den gesetzten Meniskusrisse wurde dieser ca. 30 min bei 36 °C gelagert.

4.7 PrP-Herstellung

Das Blut für die PrP-Herstellung wurde den Schafen der PrP- und PrP+MSC-Gruppe 20–30 min präoperativ entnommen. Im Vorfeld wurden vier 15 ml-Falcon-Röhrchen mit jeweils 1,25 ml ACD-A Antikoagulanzen bestückt. Nach dem Einstechen in die *Vena jugularis* mittels einer Strauss-Kanüle (Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland) wurden die Röhrchen mit 8,75 ml Blut bis zur 10 ml Marke befüllt. Weiter wurde ein Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Röhrchen mit Vollblut für die Analyse der Thrombozyten-Zahl im Vollblut abgenommen. Die Proben wurden gekühlt und umgehend weiterverarbeitet. Die Thrombozyten wurden über eine zweistufige Zentrifugation angereichert. Im ersten Schritt wurde das Vollblut für 10 min bei 840 g und 4 °C ungebremst zentrifugiert (Rotixa RP, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand aus Plasma, Leukozyten und Thrombozyten wurde abpipettiert und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt; das Erythrozyten-Sediment wurde verworfen. Im zweiten Schritt wurde der abpipettierte Überstand erneut für 10 min bei 1250 g und 4 °C ungebremst zentrifugiert. Am Boden des Röhrchens lagerte sich ein klares Thrombozyten-Pellet ab; der Thrombozyten-arme Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde in ein neues Falcon-Röhrchen verbracht, in 400 µl des Thrombozyten-armen Überstandes aus Schritt zwei resuspendiert und mit einem Vortex-Schüttler (Lab dancer, IKA®-Werke, GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) vermischt (Abbildung 9). Die Zusammenführung der vier Resuspensate (jeweils 400 µl) ergab 1,6 ml PrP.

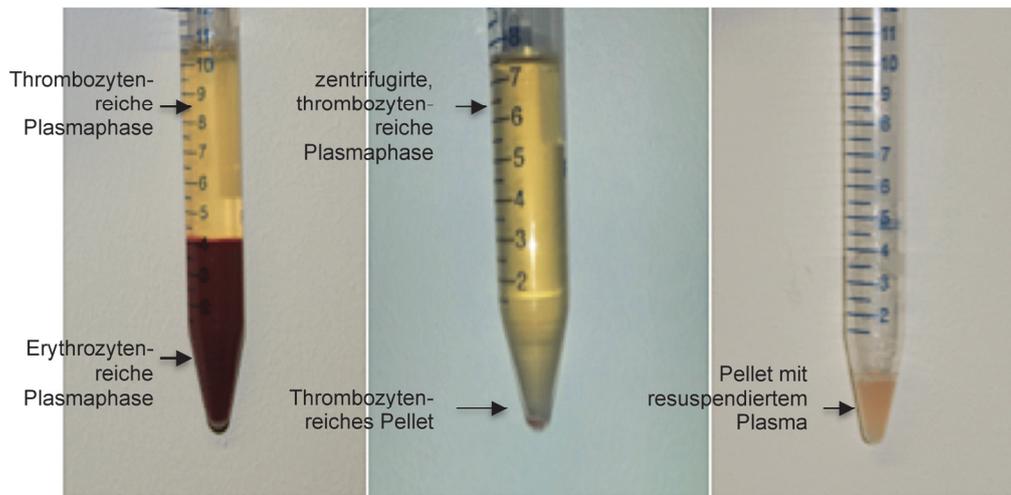


Abbildung 9: Herstellung des Platelet-rich plasma (PrP)

1 ml des PrP wurde verwendet, wobei 0,5 ml auf den *Scaffold* gegeben und 0,5 ml direkt in den gesetzten Meniskusriss injiziert wurden. Der PrP-Rest wurde für die Thrombozyten-Zählung in einer Zählkammer (C-Chip, Biochrom AG) verwendet.

Bis zur manuellen Thrombozyten-Zählung wurden das Vollblut und das PrP für wenige Minuten bei 4 °C gelagert und schnellstmöglich weiterverarbeitet. Bei der zweistufigen Verdünnung auf 1:1000 mit PBS wurde jede Verdünnung 15 sec invertiert und durch Vortexen vermischt. Anschließend wurden 10 µl der Verdünnung in den C-Chip gegeben. Die Thrombozyten wurden bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Von jeder Probe wurden die vier Kleinquadrate der unteren Reihe der vier großen Eckquadrate und damit 16 Kleinquadrate ausgezählt. Das arithmetische Mittel der vier Kleinquadrate wurde vervierfacht, um den Wert für ein Großquadrat zu erhalten. Die Thrombozyten-Zahl im Vollblut und im PrP wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Thrombozyten-Zahl} / \mu\text{l Blut} &= \text{Dilutionsfaktor} \times \text{Volumenfaktor} \times (\text{Thrombozyten/Großquadrat}) \\ &= 1000 \times 10 \times (\text{Thrombozyten/Großquadrat}) \end{aligned}$$

4.8 Postoperatives Vorgehen

Nach Beendigung der OP wurden die Schafe für 24 h in ein abgetrenntes Aufwachabteil gebracht. Sie konnten sich aber frei bewegen und wurden zu keiner Zeit immobilisiert. Für 14 Tage folgte eine tägliche Visite mit Beurteilung des Allgemeinbefindens, des Gangbildes und der OP-Wunde. In den ersten drei postoperativen Tagen erhielten die Tiere dabei das nicht-steroidale Antiphlogistikum Flunixin 1,5 mg/kg KG. Das Fentanyl-Pflaster und der Wundverband wurden am dritten Tag entfernt und die Fäden am zehnten Tag gezogen. Ab dem 15. postoperativen Tag wurden die Schafe für ca. sechs Wochen in die Freilandhaltung verbracht.

4.9 Tötung und Materialgewinnung

Die Tiere wurden am 56. Tag nach der Meniskus-OP getötet. Den Tieren wurden nach Legen eines Venenverweilkatheters in die *Vena cephalica antebrachii* zur Sedation intravenös 0,2 mg/kg KG Thiopental-Natrium verabreicht. Nach Aussetzen der Reflexe erhielten die Tiere intravenös 60 ml (1 mmol/ml) Kaliumchlorid (Fresenius KgaA) zum Herbeiführen des Kreislaufstillstandes. Durch Auskultation des Herzens wurde der Tod der Tiere festgestellt.

Beide Knie wurden äußerlich inspiziert unter Berücksichtigung der Gelenksfüllung, der Narbe und etwaiger Auffälligkeiten (z. B. Infektionszeichen). Nach Rasur und Desinfektion wurden unter Schonung des Knorpels und der Menisken der distale Anteil des *Os femoris* und der proximale Teil des *Os tibiae* beider Hintergliedmaßen freipräpariert. Nach Eröffnung des Kniegelenks wurden der operierte und kontralaterale *Meniscus medialis* unter aseptischen Bedingungen entnommen. Die Heilung des Meniskusrisses wurde makroskopisch beurteilt: keine Heilung (< 50 % verheilt), partielle (> 50 % bis 90 % verheilt) und komplette Heilung (> 90 % verheilt) (Henning et al. 1990). Der Riss wurde makroskopisch auf Durchgängigkeit und etwaiges Reparaturgewebe untersucht.

Der operierte Meniskus wurde im Bereich des Risses in zwei gleichgroße Stücke für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Immunhistochemie/Histologie geschnitten. Dem kontralateralen, nicht operierten Meniskus wurden zwei entsprechende Anteile in korrespondierender Lokalisation entnommen (Abbildung).

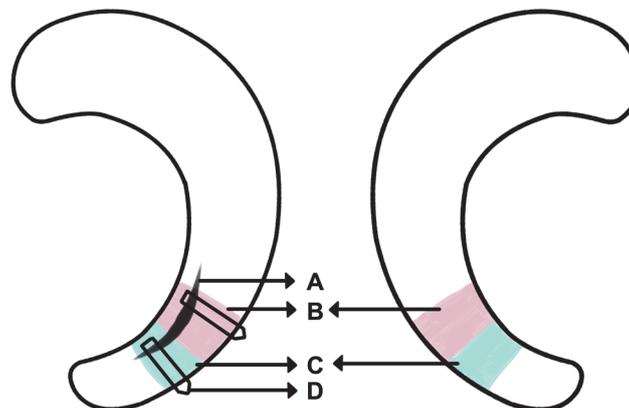


Abbildung 10: Rissverlauf und schematische Darstellung der Gewebeentnahme im Meniskus. A = Schnitt, B = Gewebe für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (rosa), C = für die Immunhistochemie (grün), D = Naht

Für die Histologie wurde zusätzlich jeweils eine Gewebeprobe vom Myokard und von der Achillessehne entnommen. Die Proben für die Histologie wurden in Tissue-Tek®-Boxen (Sakura Finetek, Torrance, USA) gelegt und in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert.

Für die RT-PCR wurde die im Mörser auf ca. 3 mm³ große Würfel zerkleinerten Meniskusproben in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit 2 ml Ribonukleinsäure-(engl: *ribonucleic acid*,-(RNA)-Stabilisierlösung (RNAlater™, QIAGEN, Valencia, USA) bedeckt. Zur Hemmung der Proteolyse wurde das Gemisch in Kryoröhrchen (Nalgene®, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) verbracht, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert.

4.10 Aufarbeitung der Proben

Für die histologische Untersuchung wurden die in Formaldehyd fixierten Proben drei Tage nach Entnahme 45 min unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend für sieben Tage bei 37 °C in EDTA inkubiert (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland). Während dieser Zeit wurde das EDTA alle drei Tage gewechselt. Es folgten eine automatisierte Entwässerung (TP10020 Programm 3, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und Einbettung in flüssigem Paraffin (Paraplast Plus®, Mc Cormick™ Scientific, Leica, Richmond, Virginia, USA) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Protokoll des Einbettungsautomats. Entwässerung und anschließender Paraffinierung

1.	Ethanol 70 %	8 h
2.	Ethanol 80 %	5 h
3.	Ethanol 80 %	4 h
4.	Ethanol 96 %	8 h
5.	Ethanol 96 %	10 h
6.	Ethanol 100 %	10 h
7.	Ethanol 100 %	10 h
8.	Ethanol 100 %	10 h
9.	Xylol	1,5 h
10.	Xylol	1,5 h
11.	Paraffin	2 h
12.	Paraffin	2 h

Zur Generierung der Gewebeschnitte wurden die Schnittflächen der Paraffinblöcke kurz auf eine auf -10 °C temperierte Kühlplatte (Medit Cop30, Burgdorf, Deutschland) gelegt. Mit einem Mikrotom (RM2125, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden aus den Paraffinblöcken mit dem Meniskus-, Achillessehnen- und Myokardgewebe 4 µm dünne Schnitte angefertigt.

Die Paraffinschnitte wurden für 30 sec in ein auf 10 °C temperiertes Wasserbad (Leica HI1210, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) und anschließend in ein auf 40 °C temperiertes Wasserbad gegeben, um die Schnitte zu strecken und eventuelle Falten zu entfernen. Nach dem Aufziehen auf einen Objektträger (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden sie 24 h bei 37 °C im Wärmeschrank (Heraeus T12, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) getrocknet. Zur Vorbereitung auf die Färbungen wurden die Proben entparaffiniert und rehydriert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Entparaffinierungs- und Rehydratationsprotokoll der Gewebeschnitte vor der Färbung

1.	Xylol	10 min
2.	Xylol	10 min
3.	Ethanol 100 %	2 min
4.	Ethanol 100 %	2 min
5.	Ethanol 96 %	2 min
6.	Ethanol 80 %	2 min
7.	Ethanol 70 %	2 min
8.	<i>Aqua destillata</i>	kurz

4.11 Übersichtsfärbungen – Hämatoxylin/Eosin und Safranin-O-Lichtgrün

Die Hämatoxylin/Eosin- und Safranin-O-Lichtgrün-Färbung der Gewebeschnitte erfolgte nach hauseigenen Protokollen des Julius Wolff Instituts (Tabelle 4).

Tabelle 4: Protokolle für Hämatoxylin-Eosin- und Safranin-O-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbung			Safranin-O-Färbung	
1.	Hämatoxylin nach Harris	7 min	Safranin-O	8 min
2.	<i>Aqua destillata</i>	kurz spülen	<i>Aqua destillata</i>	kurz spülen
3.	HCl-Ethanol (0,25 %)	kurz eintauchen		
4.	Leitungswasser	10 min		
5.	Eosin	3 x 5 sec		
6.	Ethanol 96 %	2 x 2 min	Ethanol 96 %	2 x 3 min
7.	Ethanol 100 %	2 x 2 min	Ethanol 100 %	2 x 3 min
8.	Xylol	2 x 10 min	Xylol	2 x 5 min

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit Aquatex® (Merck KGaA) unter einem Deckglas (Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) eingedeckelt und somit konserviert.

Die histologische Auswertung der Übersichtsfärbungen wurde nach einem leicht modifizierten, der vorliegenden Studie angepassten *Score* nach Ishida *et al.* (2007) durchgeführt. Dieser *Score* beurteilt die mikroskopische Heilung anhand verschiedener Kriterien (Vorhandensein von Regenerationsgewebe, Adaptation an das umliegende Gewebe, das Vorkommen von Fibrochondrozyten und die Anfärbbarkeit mit Safranin-O) und ermöglicht einen Vergleich der Gruppen. Da jedoch gewisse Kriterien zur Beschreibung der Veränderungen des umliegenden Gewebes fehlen, wurden Parameter des Pauli-Scores (Pauli *et al.* 2011) ergänzt (Tabelle 5). Diese Parameter bilden die zelluläre oder bindegewebige Antwort auf ein Trauma ab. Die Punkte der einzelnen Parameter wurden zu einer Gesamtpunktzahl addiert. Die kontralateralen, gesunden Menisken erhielten mit 16 Punkten die maximale Punktzahl. Untersucht wurde in allen Menisken die Region um den Riss, wobei die vaskuläre und avaskuläre Seite getrennt voneinander bewertet wurden.

Tabelle 5: Parameter des Meniskus-Scores

Beschaffenheit Rissränder	Punkte	Gewebetyp Rissränder	Punkte
Intakt	3	Meniskusähnliches Gewebe	3
Geringgradige Destruktion	2	Fibrocartilaginäres Gewebe	2
Mittelgradige Destruktion	1	Fibröse Matrix	1
Hochgradige Destruktion	0	Diffuse Degeneration	0
Periläsionale Zellzahl		Reparationsgewebe	
Vergleichbar nativer Meniskus	3	Voll adaptiert	3
Hyperzellulär	2	Teilweise adaptiert	2
Hypozellulär	1	Vorhanden	1
Azellulär	0	Nicht vorhanden	0
Dominierender Zelltyp		Faserorganisation	
Fibrochondrozyten	2	Kollagenfasern abgrenzbar und organisiert	2
Fibroblastenartige Zellen	1	Kollagenfasern abgrenzbar, nicht organisiert	1
Mononukleäre Zellen	0	Kollagenfasern nicht abgrenzbar	0

Zum Ausschluss eines *intra- und interobserver*-Bias wurden die Proben vom selben Untersucher nach sechs Wochen erneut beurteilt und von einem zweiten Untersucher bewertet.

4.12 Immunhistochemie VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII

In Vorversuchen wurde durch Modifikationen der Demaskierungsschritte, der Blockierung der unspezifischen Bindung, Einwirkdauer des Primärantikörpers und durch Verdünnung der Antikörper ein spezifisches Protokoll erstellt, das zu überzeugenden Färbeergebnissen führte. Als Positivkontrollen wurden für VEGF-A und Faktor VIII Leber- (Pan et al. 2016; Bates et al. 2013) und für PDGF- β Herzgewebe (Li et al. 2018) verwendet, da diese Faktoren dort stark exprimiert werden. Für die Negativkontrolle aller drei Faktoren wurde Gewebe der ovinen Achillessehne verwendet, da in der gesunden Achillessehne VEGF-A (Petersen et al. 2003), PDGF- β (Molloy et al. 2003) und Faktor VIII (Beck et al. 2011) nicht bzw. kaum exprimiert werden (Spezifitätsprüfung).

Der Immunhistochemie nutzt das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zur Detektion von Zielmolekülen (Lang 2013). Primärantikörper binden spezifisch an Epitope der im Gewebe vorhandenen Zielmoleküle. Für eine spezifische Bindung des Antikörpers ist eine hohe Aminosäuresequenzhomologie mit dem Epitop Voraussetzung. Vor der Antikörper-Inkubation werden die Epitope z. B. durch Hitze oder Enzyme demaskiert, um Formaldehyd-Bindungen und Membranvernetzungen zu lösen. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper folgt die Bindung des Sekundärantikörpers, der bei der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Methode) mit Biotin gekoppelt ist. Durch die Zugabe von Substrat bewirkt der enzymmarkierte Avidin-Biotin-Komplex am Sekundärantikörper einen Farbumschlag (Lang 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Schnitte entparaffiniert, rehydriert und zweimal in PBS gespült. Zur enzymatischen Demaskierung der Epitope wurden die Gewebe mit Pepsin, Trypsin oder Proteinkinase K behandelt. Beendet wurde dieser Vorgang durch erneutes zweimaliges Spülen mit PBS. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der in der Ziege bzw. im Pferd produzierten Sekundärantikörper wurden die Schnitte mit verdünntem Ziegen- bzw. Pferde-Normalserum inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII. Der Antikörper für PDGF- β ist spezifisch für die B-Formen PDGF-AB und PDGF-BB. Da keine speziell anti-ovinen Primärantikörper für Faktor VIII und VEGF-A verfügbar waren, wurden Antikörper gegen Epitope der humanen Proteine verwendet, deren Sequenzen mit dem Epitop beim Schaf zu 100 % übereinstimmen. Nach zweimaliger Spülung mit PBS erfolgte eine Inkubation mit den enzymmarkierten Sekundärantikörpern Anti-Kaninchen aus der Ziege bzw. Anti-Maus aus dem Pferd. Nach einer zweimaligen Spülung mit PBS wurde der Avidin-Biotin-Komplex mit der gekoppelten Alkalischen Phosphatase zugegeben. Der Komplex wurde durch zweimaliges Spülen in PBS entfernt. Die

Schnitte wurden anschließend zweimal mit Chromogenpuffer inkubiert, um den pH-Wert zu erhöhen. Nach Zugabe des Substrates für die alkalische Phosphate wurden die Gewebeschnitte unter Sichtkontrolle entwickelt. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die chromogene Reaktion durch Spülen in PBS abgestoppt. Die Schnitte wurden bis zum nächsten Färbeschritt in *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) aufbewahrt. Zur Kontrastoptimierung wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin bzw. Methylgrün durchgeführt. Zum Bläuen wurde die Schnitte in Leitungswasser gewässert und anschließend mit Deckgläschen versiegelt.

Das Vorgehen bei der immunhistochemischen Färbung der drei Faktoren und die verwendeten Materialien sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Immunhistochemische Färbeprotokolle. Faktor VIII, VEGF-A und PDGF- β

PBS =	Phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,2; 100 ml Phosphatpuffer ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i>)
TE-Puffer =	6,1 g 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA,) + 0,37 g 1 mM EDTA ad 995 ml <i>Aqua dest.</i> + 5 ml Triton X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
TBS-Puffer =	6,6 g Hydrogenchlorid (HCLT 3253, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) + 0,9 g Tris-Base (Trizma Base T1503, Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) + 8,78 g NaCl (Natriumchlorid 6404, Merc KGaA, Darmstadt, Deutschland)
2 %-BSA/PBS =	2 ml Bovine Serum Albumin Blocking Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ad 100 ml PBS
Chromogenpuffer =	pH 8,2; 3,96 g Tris-HCl (Trizma Hydrochloride HCLT 3253, Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) + 0,54 g Tris Base + 2,63 g NaCl ad 300 ml <i>Aqua dest.</i>
Proteinkinase K Stammlösung =	8 mg Proteinkinase K (Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe, Deutschland) + 10 ml TE-Puffer + 10 ml Glycerin)
Pepsin 0,1 % (100 mg Pepsin ad 100 ml 0,01 % HCl)	
Trypsin 0,05 % (50 mg Trypsin ad 100 ml TBS-Puffer)	
AG = Antigen, AK = Antikörper, LW = Leitungswasser, RT = Raumtemperatur	

Faktor		Faktor VIII	VEGF-A	PDGF- β
Ablauf				
1.	Entparaffinieren und rehydrieren	2x Xylol 2x 100 % Ethanol 1x 96 % Ethanol 1x 80 % Ethanol 1x 70 % Ethanol 1x <i>Aqua dest.</i>	je 10 min je 2 min je 2 min je 2 min je 2 min kurz	
2.	Spülen im Puffer	2x PBS	5 min	
3.	Demaskierung des AGs	0,1 % Pepsin 30 min bei 37° C	0,05 % Trypsin 10 min bei 37° C	Proteinkinase K Stammlösung: TE-Puffer 1 : 20 10 min bei 37° C
4.	Spülen im Puffer	2 x PBS	5 min	
5.	Inkubation mit Normalserum	98 % PBS 2 % Normalserum Ziege (S1000, Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland) 30 min bei RT	98 % PBS 2 % Normalserum Pferd (Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland) 30 min bei RT	95 % 2 %-BSA/PBS 5 % Normalserum Ziege 30 min bei RT

Faktor Ablauf		Faktor VIII	VEGF-A	PDGF- β
6.	Inkubation mit Primärantikörper	Faktor VIII (Biocare Medical, LLC, Concord, USA) Zielspezies: Mensch Herkunftsspezies: Kaninchen Verdünnung: 1 : 100 mit AK-Verdünnungsmedium (Antibody Diluent S3022, Dako Pathology Products, Hamburg, Deutschland) 12 h bei 4° C	VEGF-A (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, USA) Zielspezies: Mensch Herkunftsspezies: Maus Verdünnung: 1 : 200 mit AK-Verdünnungsmedium 12 h bei 4° C	PDGF- β (PDGF- β GTX41234, Gene Tex, Zielspezies: Mensch, Schaf, Ratte, Maus, Hamster, Hund, Katze, Rind Herkunftsspezies: Kaninchen Verdünnung: 1 : 50 mit AK-Verdünnungsmedium 12 h bei 4° C
7.	Spülen im Puffer	2x PBS	5 min	
8.	Inkubation mit biotinyliertem (enzym-markierten) Zweitantikörper	2 % Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) Made in Goat, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) + 2 % Normalserum Ziege + PBS	2 % Anti-Maus IgG aus dem Pferd (Anti-Mouse IgG, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) + 2 % Normalserum Pferd + PBS	2 % Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege + 2 % Normalserum Ziege + 2 % BSA/PBS
9.	Spülen im Puffer	2x PBS	5 min	
10.	Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Kit AK-5000, Vector Lab. Inc, Burlingame, CA USA)	50 min bei RT		
11.	Spülen im Puffer	2x PBS	5 min	
12.	Inkubation mit Chromogen-puffer	2x	5 min	
13.	Inkubation mit Alkaline-Phosphate-Substrat (Kit 1 SK 5100, Vector Lab. Inc, Burlingame, CA, USA.)	5 bis 8 min	3 bis 5 min	4 bis 7 min
14.	Spülen im Puffer	2x PBS	5 min	
15.	Spülen in <i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua dest.</i>	2 min	
16.	Färbung	Hämatoxylin nach Meyer (Mayers Hämalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) 2 min	Methylgrün 15 min	Hämatoxylin nach Meyer 2 min
17.	Spülung	LW 5 min	96 % Ethanol 1 min 100 % Ethanol 2 x 2 min Xylol 2 x 2 min	LW 5 min
18.	Eindeckeln	Aquatex	Vidroclud (VitroClud®, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)	Aquatex
19.	Trocknung	RT	2 Tage	
	Positivkontrolle	Leber	Leber	Herz
	Negativkontrolle	Achillessehne	Achillessehne	Achillessehne

Zur histomorphometrischen Auswertung der Meniskuspräparate und zum Vergleich der operierten und kontralateralen Seite wurden in den Menisken Zonen definiert. Dazu wurden die gefärbten Gewebeschnitte (VEGF-A, PDGF- β , Faktor VIII) mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und des Computerprogramm AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) mit einem 10x Objektiv in Form von Mosaikaufnahmen digitalisiert und archiviert. Mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems, San José, Kalifornien, USA) wurden die Bilder zugeschnitten sowie im Falle der kontralateralen Menisken gespiegelt, deckungsgleich zum operierten Meniskus ausgerichtet und in ihrer Größe angepasst (Superimposition). Im Anschluss erfolgte über das Programm ImageJ 1.49 (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) die histomorphometrische Auswertung. Zum Vergleich definierter Regionen der Menisken wurde eine Hilfslinie durch den Meniskusriss in der avaskulären Zone gelegt und diese an gleicher Stelle und im gleichen Winkel auf die avaskuläre Zone des kontralateralen Meniskus übertragen. Vom Riss ausgehend wurden *Regions of interest* (ROI) in Form von Quadraten (500 x 500 μm) definiert. Die ROIs wurden in Reihe unmittelbar an der Läsion im avaskulären Teil (AVN1-5) und im rissnahen vaskulären Teil (VN1-5) platziert. Unmittelbar daneben wurden weitere ROIs rissfern avaskulär (AVF1-5) und rissfern vaskulär (VF1-5) parallel zur Läsion angeordnet. Mittels eines halbautomatisierten Makros im Programm ImageJ wurden in der avaskulären und vaskulären Zone randomisiert weitere ROIs gesetzt (AV1-5, V1-5) (Abbildung 10). Für eine bessere Beurteilung der Regionen wurden für einzelne statistische Berechnungen ROIs gemeinsam ausgewertet. Die Kombination der rissnahen und rissfernen ROIs auf der vaskulären (VN+VF) und der avaskulären Seite (AVN+AVF) ergab die ROIs V_ auf der vaskulären Seite und AV_ auf der avaskulären Seite. Für eine gemeinsame Analyse aller ROIs am Riss, wurden die ROIs VF, VN, AVN und AVF zu einer ROI VAV_ zusammengelegt. Die Kombination der ROIs VN und AVN ergab die Region direkt am Riss N_.

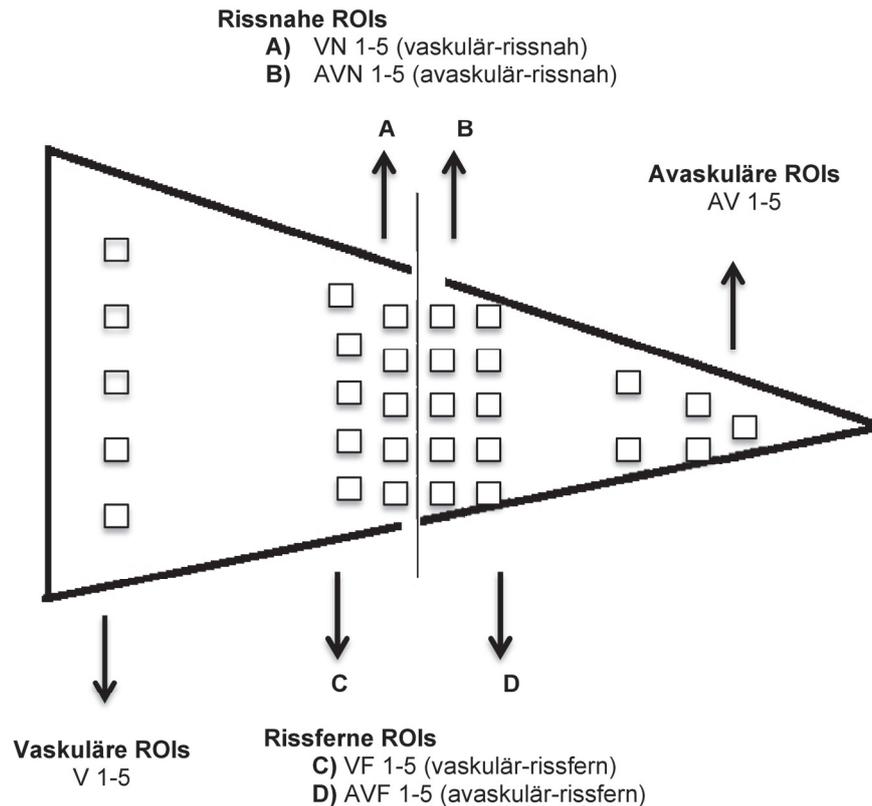


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Meniskus mit Regions of interest (ROIs) von peripher nach zentral. ROIs der vaskulären Zone (V), ROIs rissfern im vaskulären Teil (VF), ROIs rissnah im vaskulären Teil (VN), ROIs rissnah im avaskulären Teil (AVN), ROIs rissfern im avaskulären Teil (AVF) und ROIs der avaskulären Zone (AV), Kombination der Regionen $AVN+AVF=AV_{-}$, Kombination der Regionen $VN+VF=V_{-}$, Kombination der Regionen $V_{-}+AV_{-}=VAV_{-}$, Kombination der Regionen $VN+AVN = N_{-}$

Die Auszählung erfolgte manuell mit Hilfe eines in ImageJ integrierten Counters, wobei für jede ROI durch Mausklick die immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen und die immunhistochemisch ungefärbten Zellen gezählt wurden. Anschließend wurde für jede ROI der Quotient aus gefärbten Zellen und der Gesamtzellzahl gebildet, um den prozentualen Anteil der immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen im operierten und kontralateralen Meniskus zu vergleichen. Auf dieser Basis konnten sowohl einzelne Regionen (V, VF, VN, AVN, AVF, AV), Gruppen (Naht, Carrier, PrP, MSC PrP+MSC) als auch Seiten (operierter und kontralateraler Meniskus) verglichen werden.

4.13 Quantitative Real-Time RT-PCR

Die Analyse der Proben erfolgte im Rahmen einer weiteren Dissertation der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dr. med. Janine Igel (Igel 2020).

Das Prinzip der quantitativen Real-Time RT-PCR besteht darin, die relative Expression der *Messenger-Ribonukleinsäure* (mRNA) eines Zielgens in Bezug zur mRNA eines Referenzgens (*Housekeeping-Gen*), das konstitutiv im Zielgewebe exprimiert wird, zu ermitteln (Pfaffl 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen gewählt, da es als Enzym der Glykolyse ubiquitär vorkommt (Kosova et al. 2017). Zunächst wird die RNA aus den Zellen isoliert und durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Vervielfältigung der cDNA durch die Taq-Polymerase mit phosphorylierten Nukleosiden. Durch Zugabe eines Farbstoffs (SYBR-Green) wird die entstehende Doppelstrang-DNA markiert. Das detektierte Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Menge der Doppelstrang-DNA an.

In der vorliegenden Studie wurden in Vorversuchen verschiedene Homogenisierungsmethoden getestet, da sich aufgrund der geringen Anzahl der Zellen im Gewebe und der Gewebefestigkeit nur schwer ausreichend RNA isolieren ließ. Das beste Ergebnis wurde durch eine Zerkleinerung des Meniskusgewebes mit einem speziell angefertigten Mörser aus Glas und einem Stößel aus Keramik unter Stickstoff-Vereisung erzielt.

Nach Entnahme wurden die Meniskusproben mit 2 ml RNA-Stabilisierlösung auf Eis gelagert, umgehend zum Gefrierschrank des Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT) des Campus Virchow Klinikums der Charité – Universitätsmedizin Berlin transportiert und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Nach Auftauen der Proben auf *Crushed*-Eis und Abgießen der RNA-Stabilisierlösung wurden die Proben mit einer sterilen Pinzette in einer sterilen Petrischale zerkleinert und in den Mörser gegeben. Dieser wurde zuvor mit 100 % Ethanol, 70 % Ethanol und mit Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Wasser 0,1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gereinigt. Durch den Zusatz von flüssigem Stickstoff wurden die Proben thermisch gehärtet, so dass sie zu Pulver homogenisiert werden konnten. Zwischen jeder Probe wurde der Mörser gereinigt (siehe oben). Im Anschluss wurden die Proben in ein mit 1 ml Trizollysate (Trizol® Reagent, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) befülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf AG) gegeben und 15 sec invertiert. Eine weitere Homogenisierung erfolgte durch die mechanische Bearbeitung der Probe mittels Ultra Turrax (IKA®-Werke, GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland). Die flüssige Phase wurde nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 15.000 g (Mikro 22 R, Hettich) in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und auf 1000 μl Trizol® aufgefüllt, um eine Überführung nicht-homogenisierter Meniskusbestandteile zu vermeiden. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben 15 min geschüttelt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert, wodurch drei Phasen entstanden. Die obere Phase enthielt die RNA, die Interphase Proteine und die untere Phase DNA. Die obere, klare Phase wurde in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde das Reaktionsgefäß vielmal invertiert und nach 10 min bei Raumtemperatur bei 15.000 g und 4°C 10 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des flüssigen Überstandes wurde das RNA-

Pellet nacheinander mit 1 ml 70 % Ethanol und 1 ml 100 % Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte eine Zentrifugation (15 min, 15.000 g, 4 °C). Die Proben wurden unter dem Abzug verkehrt herum mit offenem Deckel für 10 min getrocknet.

Für die RNA-Suspension wurden 15 µl nukleasefreies Wasser (Life Technologies) auf das Pellet pipettiert, zentrifugiert (5 min, 15.000 g, 4 °C) und im Wärmeblock Thermomixer Compact (Eppendorf AG) bei 50 °C und 650 rpm (Umdrehungen pro Minute, engl. *revolutions per minute*) für 5 min durchmischt. Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte spektrophotometrisch (Nano-Drop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aus je 1 µl der Meniskusproben. Bis zur cDNA-Synthese wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Vor der cDNA-Synthese erfolgte ein DNA-Verdau nach einem Protokoll von Thermo Fisher Scientific mit RNase-freier DNase (DNase I, RNase free 1 U/µl, Thermo Fisher Scientific). Nach Auftauen der RNA der Gewebeproben auf *Crushed*-Eis wurden 1 µl DNase, 1 µl 10-fach Puffer mit Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich), die RNA und DEPC-Wasser ad 10 µl Volumen in ein Eppendorfgefäß gegeben. Nach einer Zentrifugation (2 min, 10.000 g, 4 °C) und einer Inkubation im Wärmeblock Thermomixer Compact (30 min, 37 °C) wurde 1 µl 50 mM EDTA (Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat, Sigma-Aldrich) zugesetzt. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und erneut 10 min bei 65 °C inkubiert. Die RNA-Menge wurde nochmals spektrophotometrisch gemessen. Die cDNA-Synthese erfolgte nach einem Protokoll des iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA). Die Reverse Transkriptase schreibt dabei die RNA in cDNA um und die Taq-Polymerase vervielfältigt die cDNA.

Die Ansätze (Totalvolumen 20 µl) für die cDNA-Synthese enthielten 1 µl iScript *reverse transcriptase* und 4 µl iScript *reaction* (Mastermix). Das Restvolumen bestand aus RNA (10 ng RNA/µl Probe) und nukleasefreiem Wasser (Life Technologies). Ein Reaktionsgefäß (0,2 ml-PCR Strip 211-0339, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) wurde zuerst mit nukleasefreiem Wasser befüllt, gefolgt vom Mastermix und letztlich mit der RNA, wobei die Gefäße zwischen den Zugaben und am Ende für jeweils 1 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Die Inkubation erfolgte im Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research, St. Bruno, Quebec, Kanada) für 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C. Aus allen entnommenen Menisken konnte cDNA hergestellt werden. Bis zur RT-PCR erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

Der quantitativen PCR mit SYBR Green (IQTMSYBR® Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, Inc.) ging eine Testphase voraus, wobei die zur Bestimmung der Genexpression der Wachstumsfaktoren (VEGF-A, PDGF-β) genutzten Primer mit Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) auf ihre Effizienz untersucht wurden (Tabelle 7). Zur Normalisierung wurden Primer für GAPDH verwendet. Für den Wachstumsfaktor Faktor VIII wurde kein geeigneter Primer gefunden. Unter Nutzung dieser Primer wurde die mRNA-Menge von jedem Meniskus (operiert und kontralateral; n = 60) bestimmt.

Tabelle 7: Primer mit Sequenzen, Produktlänge und Effizienz. Fwd = *forward* Primer, Rev = *reverse* Primer

Primer	Genname	Sequenz	Produktlänge (bp)	Effizienz
GAPDH	Glycerindehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	Fwd 5' - GACCCCTTCATTGACCTTCA - 3' Rev 5' - GATCTCGCTCCTGGAAGATG - 3'	142	1,95
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	Fwd 5' - ATTTCAAGCCGTCCTGTGT - 3' Rev 5' - TATGTGCTGGCTTTGGTGAG - 3'	251	2,15
PDGF-β	<i>Platelet-derived growth factor beta</i>	Fwd 5' - ACGCTAACTTCCTGGTGTGG - 3' Rev 5' - CTTCTTCTCCGCACGATCT - 3'	146	2,04

Die Herstellung der Gebrauchslösungen für jedes Primerpaar erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 80 µl RNA-freiem Wasser, 10 µl des *Reverse* und 10 µl des *Forward* Primers. Nach einer kurzen (10 sec) Zentrifugation wurde der Primer-Mastermix aus 2 µl Primer Gebrauchslösung und 12,5 µl des iScript SYBR Green® pro *well* vermischt. Der DNA-Mastermix (1 µl DNA und 9,5 µl nukleasefreies Wasser = 10,5 µl pro *well*) wurde angesetzt und für 30 sec bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. In die *wells* einer 96-*well*-Platte wurden 14,5 µl Primer-Mastermix und 10,5 µl DNA-Mastermix pipettiert. Jeder Ansatz wurde im Triplet (3 *Wells*) analysiert. Eine 10,5 µl Wasserprobe diente der Qualitätsprüfung der Primer. Nach Abdeckung mit einem hitzebeständigen Deckel (Ultra Clear Cap Strips, Thermo Fisher Scientific) wurde die Platte 1 min bei 500 rpm zentrifugiert und für 40 Zyklen in den ICycler zur quantitativen Analyse verbracht.

4.14 Statistische Analyse

Pro Gruppe und Seite wurden n = 6 Proben immunhistochemisch und mittels RT-PCR analysiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Probenanzahl (n) pro Auswertemethode, Gruppe und Seite. OP = operierter Meniskus, KL = kontralateraler Meniskus, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, RT-PCR = Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Auswertung	Gruppen					
	Seite	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Immunhistochemie	OP	6	6	6	6	6
	KL	6	6	6	6	6
RT-PCR	OP	6	6	6	6	6
	KL	6	6	6	6	6

Das Vorhandensein von Ergussflüssigkeit bei der makroskopischen Beurteilung wurde in vier Kategorien unterteilt: kein, geringer, mäßiger und deutlicher Erguss.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm R (Version 3.5.2, Microsoft Corporation, Richmond, Virginia, USA) verwendet. Die Daten wurden aufgrund der fehlenden Normalverteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test und Shapiro-Wilk-Test) mittels nicht-parametrischer Tests analysiert. Das Signifikanzniveau wurde bei einem $p < 0,05$ als signifikant und bei einem $p < 0,01$ als hochsignifikant festgelegt.

Die mediane Dauer der postoperativen Belastung wurde mit Hilfe des Friedman-Tests ausgewertet. Die mediane Thrombozyten-Konzentration im PrP und im Vollblut wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

Zum Vergleich der ROIs in den operierten und kontralateralen Menisken wurde der Friedman-Test angewandt. Zur Analyse der Gruppenunterschiede wurden die normalisierten Daten verglichen. Hierzu wurden die Ergebnisse der operierten Menisken durch die Ergebnisse der kontralateralen Menisken dividiert und mit 100 multipliziert. Daraus ergab sich die prozentuale Veränderung der operierten Menisken. Weiter wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test in jeder Gruppe die Unterschiede zwischen den operierten und kontralateralen Menisken untersucht. Derselbe Test wurde für jede Region angewandt, um mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren, gefolgt vom Dunn-Test als Post-hoc-Analyse.

Durch die niedrige Anzahl der Zellen bei der Faktor VIII Analyse wurden die Daten für einige Berechnungen binärisiert (logistische Regression), wobei das Nicht-Vorhandensein von Zellen in einer Zone „0“ und das Vorhandensein von Zellen „1“ entsprach.

Da bei der Auswertung der VEGF-A-Immunhistochemie eine hohe Anzahl von „0“-Ergebnissen auftrat, wurden die Daten mittels logarithmischer Transformation normalisiert, um die Daten grafisch anschaulicher präsentieren zu können.

Die Auswertung und Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgte anhand der Mediane, der Interquartilabstände (engl. *interquartile range*, IQR, 25.-75. Quartile), den medianen Unterschieden zwischen den operierten und kontralateralen Menisken sowie durch Berechnung potenzieller signifikanter Unterschiede (p-Werte).

Für die Analyse der RT-PCR wurden die *Delta-cycle-threshold*-(Ct)-Werte mit der Pfaffl-Methode unter Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Weiter erfolgte eine Normalisierung der Delta-Ct-Werte der operierten Menisken innerhalb einer Gruppe zu den gepoolten kontralateralen Menisken aller Gruppen. Die relative mRNA-Expression innerhalb der Gruppen wurden mit einem paarweisen

t-Test (Mann-Whitney-Test) analysiert. Für den Vergleich der relativen mRNA-Expression zwischen den Gruppen wurden eine Zweiwege-Analyse der Varianz (engl. *two-way analysis of variance*) und ein Tukey-Test für Mehrfachvergleiche verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Versuchstierparameter

Das Gewicht der Versuchstiere betrug zum Zeitpunkt der Meniskus-OP im Median 61,1 kg (IQR 58,9–67,1 kg). Alle 30 Schafe tolerierten die Eingriffe ohne Komplikationen. Nach spätestens zwölf Stunden waren die Tiere wieder steh- und gehfähig und zeigten eine ungestörte Futteraufnahme. Die Schafe wiesen postoperativ keine klinischen Auffälligkeiten auf. Es wurden weder lokale Wundinfektionen noch systemische Infektionen festgestellt. Alle Tiere zeigten in der postoperativen Periode ein konstantes Gewicht.

Zwischen den Gruppen traten jedoch Unterschiede in der Entwicklung der postoperativen Belastung auf (Dauer bis zur vollständigen Entlastung, Teilbelastung und Vollbelastung); diese erreichten jedoch keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Die Tiere der PrP- und PrP+MSC-Gruppe belasteten tendenziell schneller die operierte Gliedmaße wieder vollständig (2 Tage postoperativ) im Vergleich zu den Tieren der Naht- (3,5 Tage), Carrier- (3 Tage) und MSC-Gruppe (4 Tage) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Mediane Dauer der postoperativen Ent-, Teil- und Vollbelastung

	Vollständige Entlastung (Tage)	Teilbelastung (Tage)	OP bis Vollbelastung (Tage)
Gruppe 1 (Naht)	0	3	3,5
Gruppe 2 (Carrier)	2	1	3
Gruppe 3 (PrP)	0	2,5	2
Gruppe 4 (MSC)	4	0	4
Gruppe 5 (PrP+MSC)	0	2	2

5.2 Thrombozyten-Konzentration

Im Median betrug die Thrombozyten-Konzentration im Vollblut 335.000 Tc/ μ l (IQR 255.000–396.875 Tc/ μ l). Im PrP lag die Konzentration mit 910.000 Tc/ μ l (IQR 725.625–1.191.250 Tc/ μ l) im Median um den Faktor 2,72 höher als im Vollblut. In der PrP-Gruppe betrug der Median im Vollblut 293.750 Tc/ μ l (IQR 219.375–477.500 Tc/ μ l) und im PrP 810.000 Tc/ μ l (IQR 496.875–1.292.500 Tc/ μ l), was einer Anreicherung um den Faktor 2,75 entspricht. In der PrP+MSC-

Gruppe wurden die Thrombozyten um den Faktor 2,84 angereichert, mit einer medianen Konzentration von 347.500 Tc/ μ l (IQR 304.375–455.625 Tc/ μ l) im Vollblut und 987.500 Tc/ μ l (IQR 847.000–1.398.750 Tc/ μ l im PrP. In beiden Gruppen war die Anreicherung im PrP im Vergleich zum Vollblut signifikant ($p=0,0312$).

Neben den Thrombozyten waren in der PrP-Gruppe keine anderen Zellen im PrP mikroskopisch erkennbar (0 Zellen/ μ l). In der PrP+MSC-Gruppe traten hingegen vereinzelt andere Zelltypen auf (1.250 Zellen/ μ l).

5.3 Makroskopische Heilung

In keiner der Behandlungsgruppen zeigte sich nach 56 Tagen eine komplette oder partielle makroskopische Heilung (Abbildung 12).

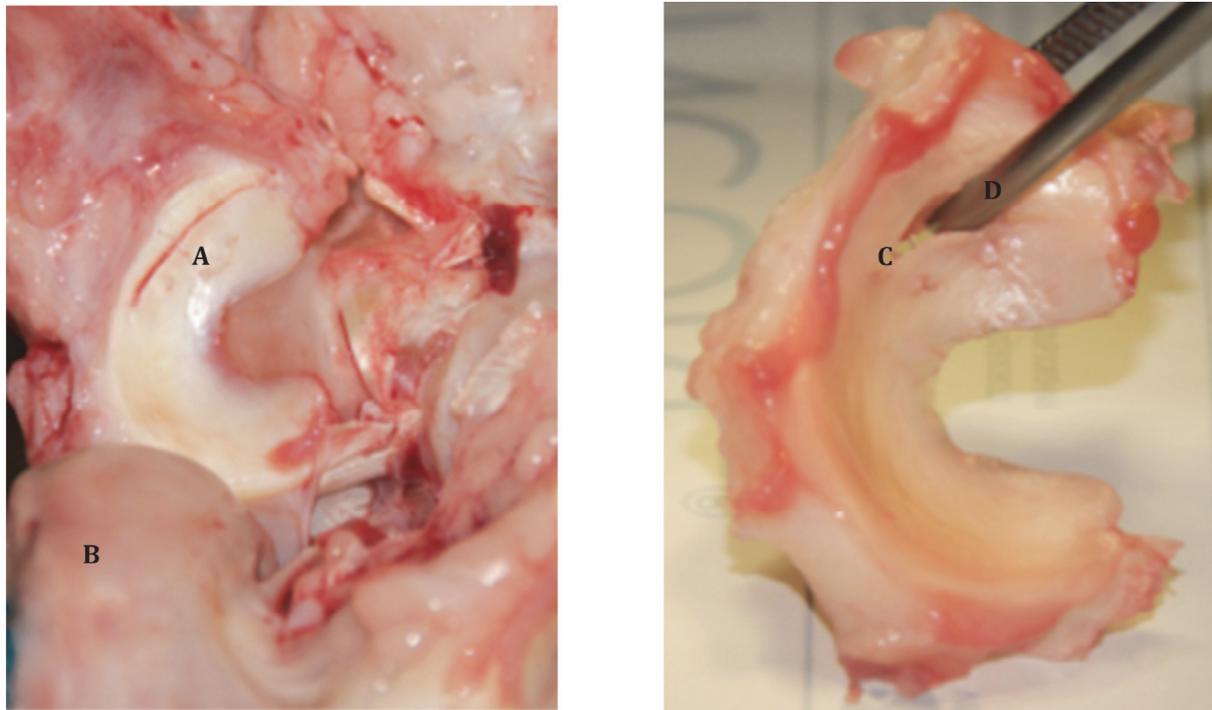


Abbildung 12: Aufsicht auf den *Meniscus medialis* nach Eröffnung des Kniegelenks (links) A) Riss deutlich erkennbar, B) *Epycondylus medialis femoris*. *Meniscus medialis ex situ*. (rechts) nicht verheilte Riss (C), sondiert mit einer Klemme (D).

Während der Obduktion zeigte keines der Schafe Auffälligkeiten im Bereich der Narbe oder im umliegenden Weichteilgewebe. Das bei der Meniscus-OP ossär abgesetzte und anschließend refixierte *Lig. collaterale tibiale* war bei allen Tieren wieder angewachsen. Zwei Schafe der Naht- und PrP-Gruppe sowie ein Schaf der Carrier-Gruppe zeigten einen geringen serösen Gelenkerguss. Zwei Schafe der MSC-Gruppe und drei Schafe der PrP+MSC-Gruppe hatten einen mäßigen Erguss. Ein Schaf der Carrier-Gruppe wies einen deutlichen serösen Gelenkerguss auf.

Nahtmaterial-Rückstände im Meniskus wurden in der PrP-Gruppe bei vier, in der MSC-Gruppe bei zwei und in der PrP+MSC-Gruppe bei drei Tieren gefunden. In keinem Knie wurden übriggebliebene Anteile des *Scaffolds* detektiert.

5.4 Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin- und Safranin-O-Lichtgrün-Färbung und histologische Auswertung

In allen operierten Menisken zeigten die Übersichtsfärbungen vollständige Rissspalten ohne Bildung von Gewebebrücken. In allen Fällen war, mit Ausnahme eines Tieres der Carrier-Gruppe, Reparationsgewebe an den Rissrändern der operierten Menisken sichtbar. Der Nachweis von Gefäßen beschränkte sich auf die vaskuläre Zone; rissnahe Gefäße und Gefäße in der avaskulären Zone wurden nicht detektiert. In der vaskulären Zone lagen viele fusiforme Fibrochondrozyten. In der avaskulären Zone waren homogen verteilte runde Fibrochondrozyten sichtbar.

In der Hämatoxylin/Eosin-Färbung färbten sich die Zellkerne der Fibrochondrozyten und der Endothelzellen blau. Das Zytoplasma und das kollagene Bindegewebe waren rot gefärbt (Abbildung 13).

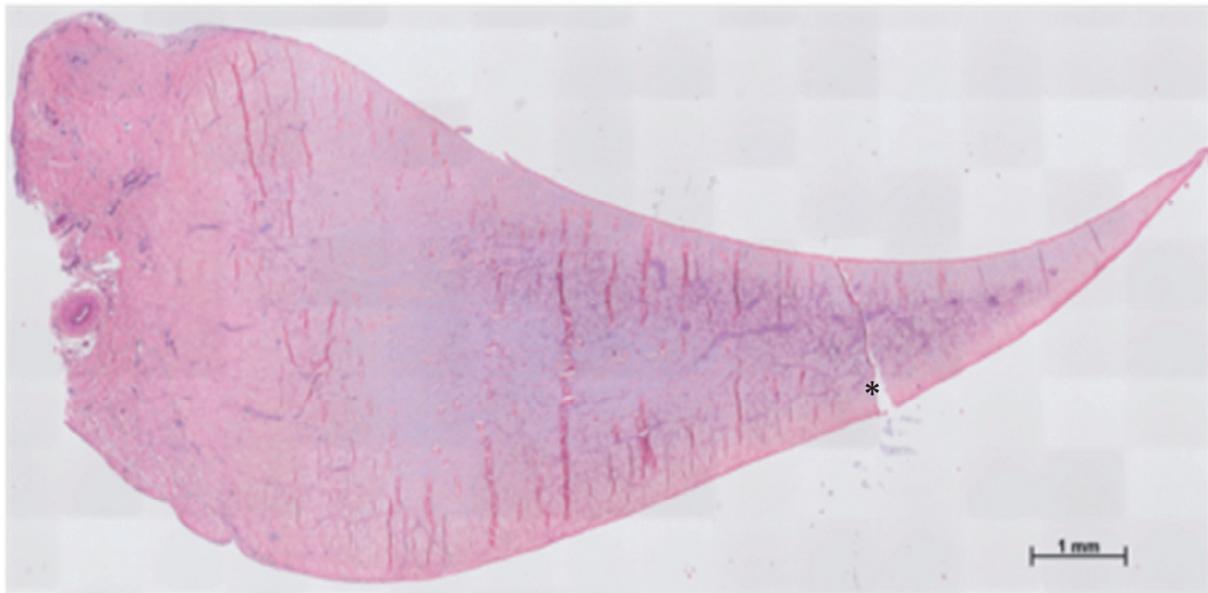


Abbildung 13: Hämatoxylin/Eosin gefärbter Radiärschnitt. Operierter Meniskus mit sichtbarem Riss (*) in 10-facher Vergrößerung

In der Safranin-O-Färbung waren die Knorpelanteile im Meniskusinneren teilweise rot angefärbt. Binde- und Reparationsgewebe im Rissspalt stellten sich grün, die Zellkerne der Fibrochondrozyten schwarz und das Zytoplasma weiß bis hellgrün dar (Abbildung 14).

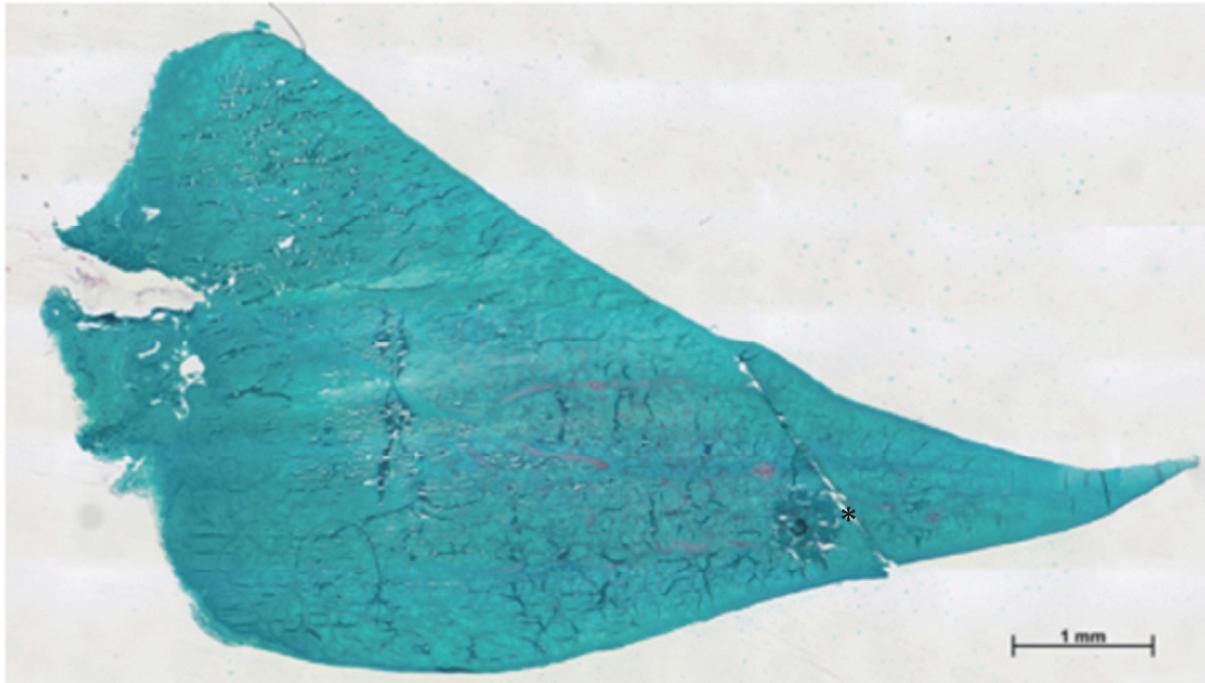


Abbildung 14: Safranin-O gefärbter Radiärschnitt. Operierter Meniskus mit sichtbarem Riss (*) in 10-facher Vergrößerung

Die Meniskus-Scores zur Beurteilung der histologischen Heilung zeigten sowohl auf der vaskulären als auch auf der avaskulären Seite im Rissbereich in allen Regionen acht Wochen postoperativ signifikant ($p < 0,01$) geringere Werte im Vergleich zum Maximalwert (k, Tabelle 10). Dieser Befund veranschaulicht das Fehlen der Adaptation der Wundränder und deren Gewebedestruktion. Innerhalb der Therapiegruppen bestand zwischen der vaskulären und avaskulären rissnahen Region kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Ebenso fehlten signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen.

Tabelle 10: Histologisches Scoring. Scoring-Ergebnisse und Differenzen der Scoring-Werte der vaskulären (v) und avaskulären (a) rissnahen Region zum kontralateralen Meniskus (k, maximaler Scoringwert = 16), IQR = Interquartilabstand, MSC = mesenchymale Stromazellen, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma

Gruppen	Zone	Score (Median + IQR)	Mediandifferenz		p-Wert
			Zone	Differenz	
Naht	Vaskulär (v)	10,5 (10,0–12,0)	v – k	-5,5	0,0001
	Avaskulär (a)	10,5 (9,75–12)	a – k	-5,5	0,0001
			v – a	0,0	0,9999
Carrier	Vaskulär (v)	11,0 (10,75–12,0)	v – k	-5,0	0,0001
	Avaskulär (a)	10,5 (10,0–11,0)	a – k	-5,5	0,0001
			v – a	-5,0	0,9999
PrP	Vaskulär (v)	11 (9,5–12,0)	v – k	-5,0	0,0001
	Avaskulär (a)	11,5 (9,0–12,0)	a – k	-4,5	0,0001
			v – a	-5,0	0,9999
MSC	Vaskulär (v)	10,5 (10,0–12,25)	v – k	-5,5	0,0001
	Avaskulär (a)	11,0 (10,75–12,25)	a – k	-5,0	0,0001
			v – a	-5,0	0,5931
PrP+MSC	Vaskulär (v)	10,0 (8,75–11,0)	v – k	-6,0**	0,0001
	Avaskulär (a)	10,5 (9,25–11,25)	a – k	-5,5**	0,0001
			v – a	-5,0	0,5671

5.5 Immunhistochemie

Alle Zielmoleküle (VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII) waren mittels immunhistochemischer Analysen detektierbar. Bei der VEGF-A- (Abbildung 15) und PDGF- β - Analyse (Abbildung 23) waren Fibrochondrozyten positiv, bei der Faktor VIII-Analyse (Abbildung 33) Endothelzellen.

5.5.1 *Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)*

Vergleicht man die Anzahl der VEGF-A-positiven Zellen aller ROIs des gesamten Meniskus, bestand in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und den kontralateralen Menisken (Tabelle 11). Auch zwischen den Behandlungsgruppen war kein signifikanter Unterschied erkennbar ($p=0,26$; Abbildung 15). In der Carrier- und MSC-Gruppe lag der Median in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken aber niedriger.

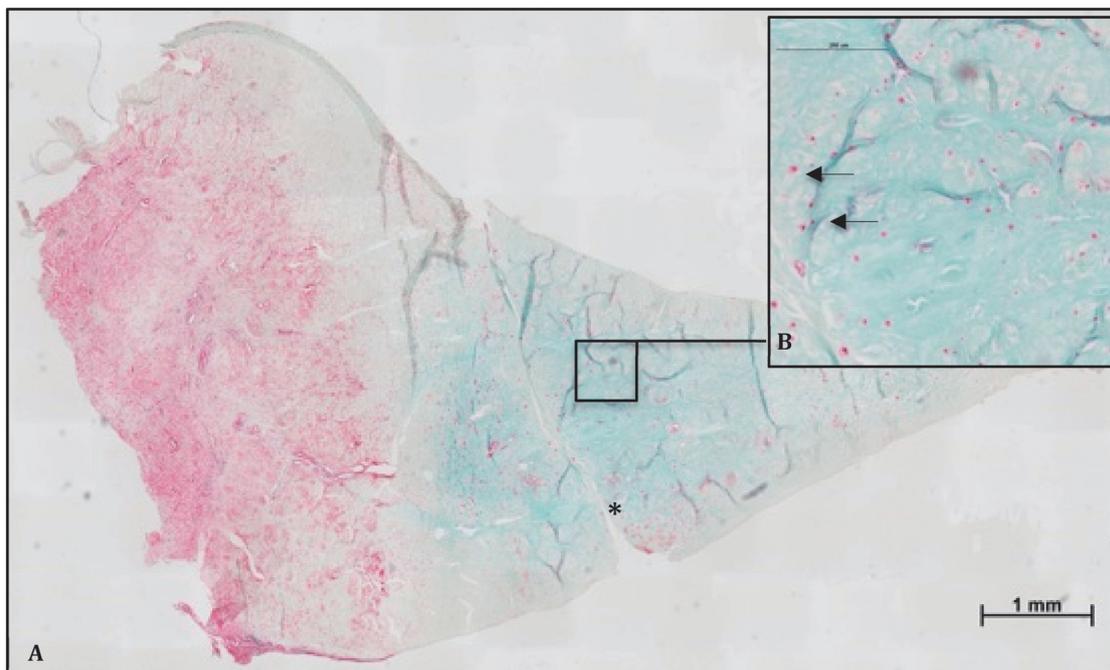


Abbildung 15: Nachweis des *Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)*. Immunhistochemisch gefärbter Radiärschnitt eines operierten Meniskus aus der MSC-(mesenchymale Stromazellen)-Gruppe, A) gesamter Meniskus mit sichtbarem Riss (*), VEGF-positives Gefäßendothel und Fibrochondrozyten in der vaskulären Zone sowie positive Fibrochondrozyten im gesamten Meniskus, B) Bildausschnitt aus der avaskulären Zone mit zahlreichen VEGF-positiven Fibrochondrozyten (Pfeile).

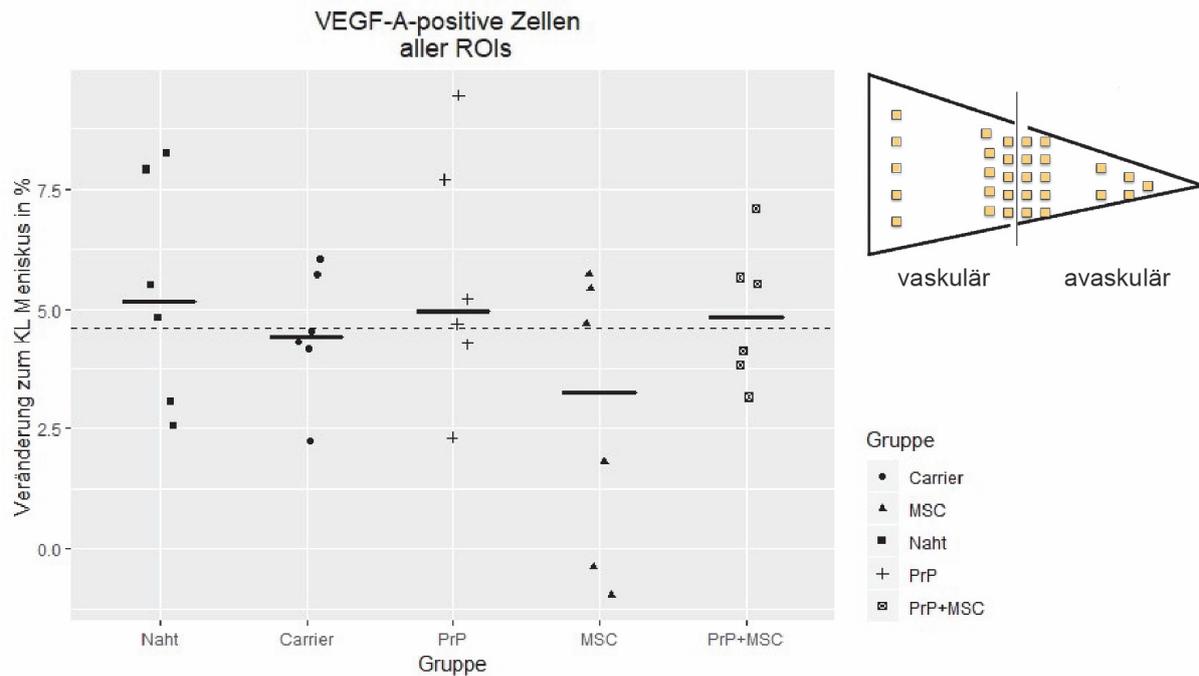


Abbildung 16: Abweichung (%) der Anzahl Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) positiver Zellen aller Regions of interest (ROIs) der operierten Menisken normalisiert auf die kontralateralen Menisken in den Therapiegruppen. KL = kontralateraler Meniskus = log (100) % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 11: Abweichung (%) der Anzahl Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) positiver Zellen aller Regions of interest (ROIs) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), IQR = Interquartilabstand, MSC = mesenchymale Stromazellen, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma

Gruppe	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	5 (3–7)	4 (4–5)	5 (4–7)	3 (0–5)	5 (3–6)
Differenz in % OP vs. KL	+1	0	0	-1	0
Signifikanz OP vs. KL	p=0,33	p>0,99	p=0,52	p=0,26	p=0,87

Zur genaueren Beurteilung der Regionen wurden die ROIs der läsionsnahen Zonen AVN und AVF zu AV_ (avaskulär rissnah) sowie VN und VF zu V_ (vaskulär rissnah) zusammengefasst. Für keine der Gruppen zeichnete sich eine konstante Tendenz ab. In der Naht-Gruppe lag in allen Regionen im Median die Anzahl VEGF-A-positiver Zellen in den operierten Menisken höher als in den kontralateralen Menisken. In den anderen Gruppen wechselte das Verhältnis von Region zu Region. Auffällig war die hohe Streuung der Anzahl der Zellen innerhalb der Gruppen. Dies betraf insbesondere die vaskulären Regionen (V und V_) in der MSC-Gruppe (Abbildung 17).

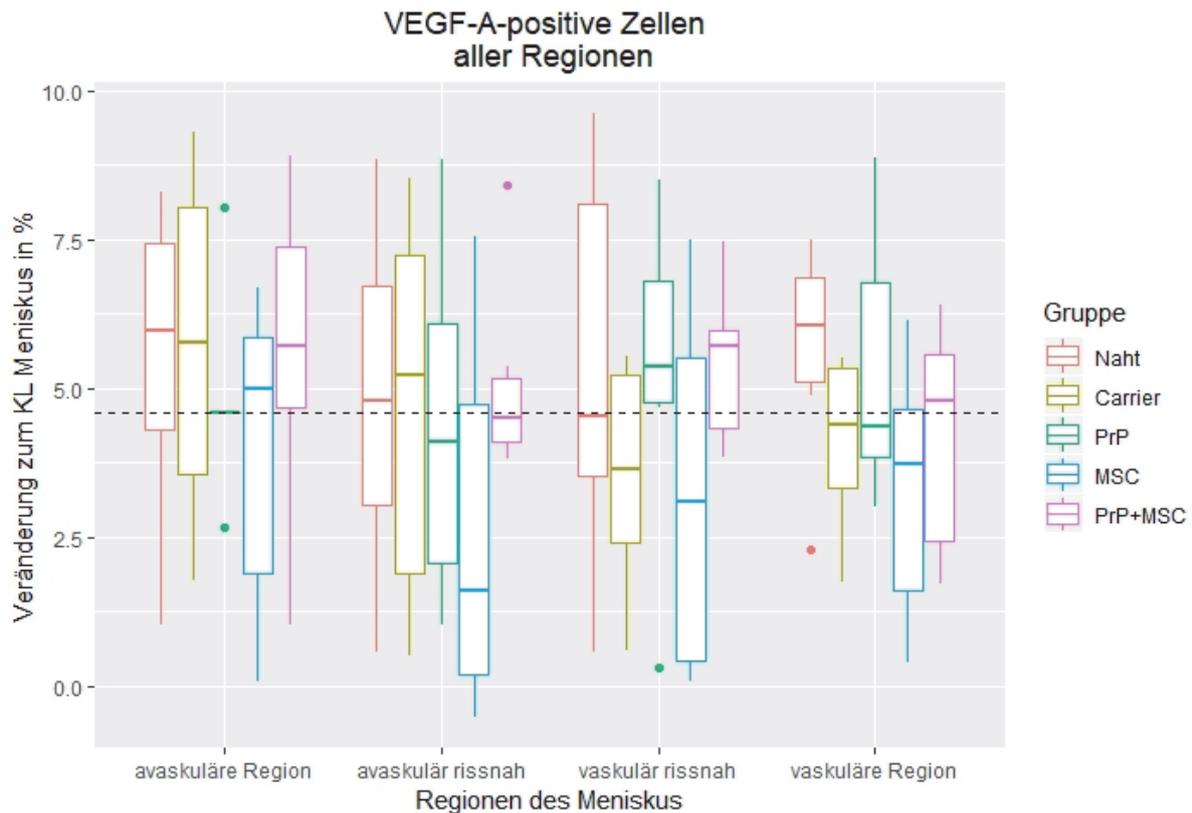


Abbildung 17: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen in den einzelnen Regionen der operierten Menisken normalisiert auf die kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = $\log(100)$ %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, dargestellt sind die Mediane (horizontale Linie) mit Interquartilsabstand (IQR), log Skala

Anschließend wurden die vaskulären ($VN+VF=V_{-}$) und avaskulären Regionen um den Riss ($AVN+AVF=AV_{-}$) zusammengefasst ($V_{-}+AV_{-}=VAV_{-}$). In keiner Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl positiv gefärbter Zellen um den Riss in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (Tabelle 12). Auch beim Gruppenvergleich waren keine signifikanten Unterschiede detektierbar ($p=0,46$). In der Carrier-Gruppe und besonders in der MSC-Gruppe waren weniger VEGF-A-positive Zellen um den Riss in den operierten Menisken im Vergleich zum kontralateralen Meniskus erkennbar (Abbildung 18).

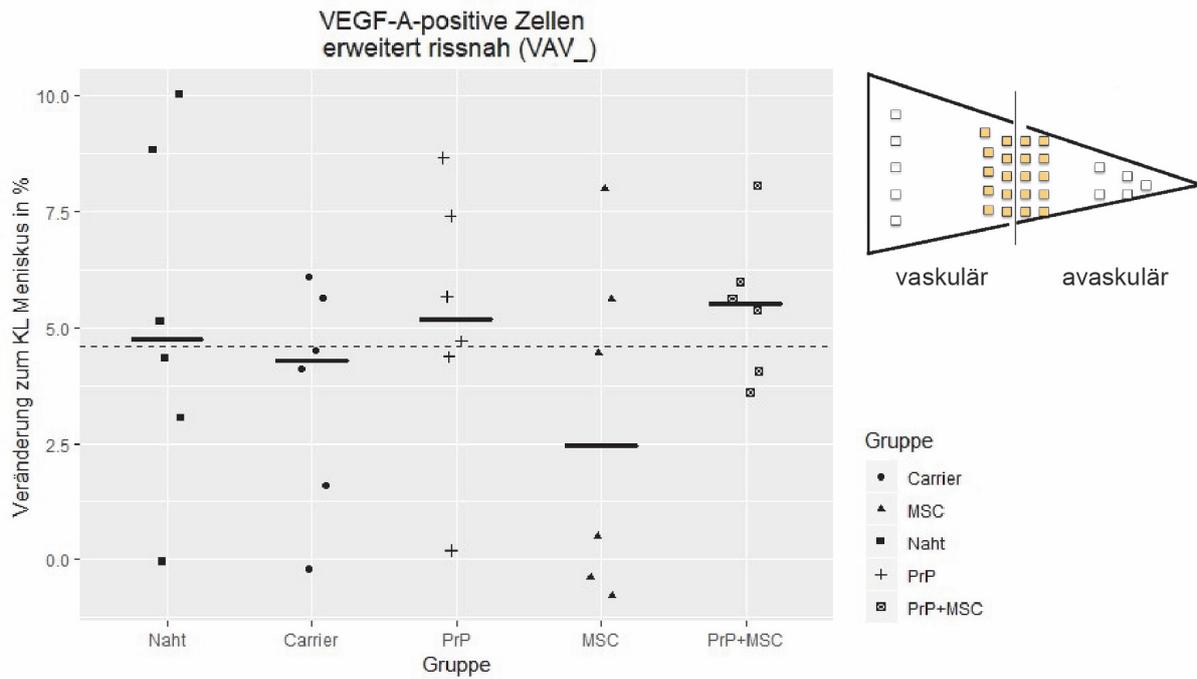


Abbildung 18: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region $VAV_{=V}+AV_{=}$ der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = $\log(100)$ %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 12: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region ($VAV_{=V}+AV_{=}$) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), IQR = Interquartilabstand, MSC = mesenchymale Stromazellen, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma

Gruppe	Kontrolle	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	5 (3–8)	4 (2–5)	5 (4–7)	2 (0–5)	6 (4–6)
Differenz in % OP vs. KL	0	0	+1	-2	+1
Signifikanz OP vs. KL	p=0,68	p=0,63	p=0,37	p=0,22	p=0,68

Zur Beurteilung der VEGF-A-positiven Zellen unmittelbar am Riss wurden die ROIs AVN und VN zusammengefasst ($N_{=AVN+VN}$). Es bestand weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,40$) noch zwischen den operierten und kontralateralen Menisken innerhalb der Gruppen (Tabelle 13). Der Median der VEGF-A positiven Zellen lag in der MSC-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen in den operierten Menisken aber niedriger (Abbildung 19).

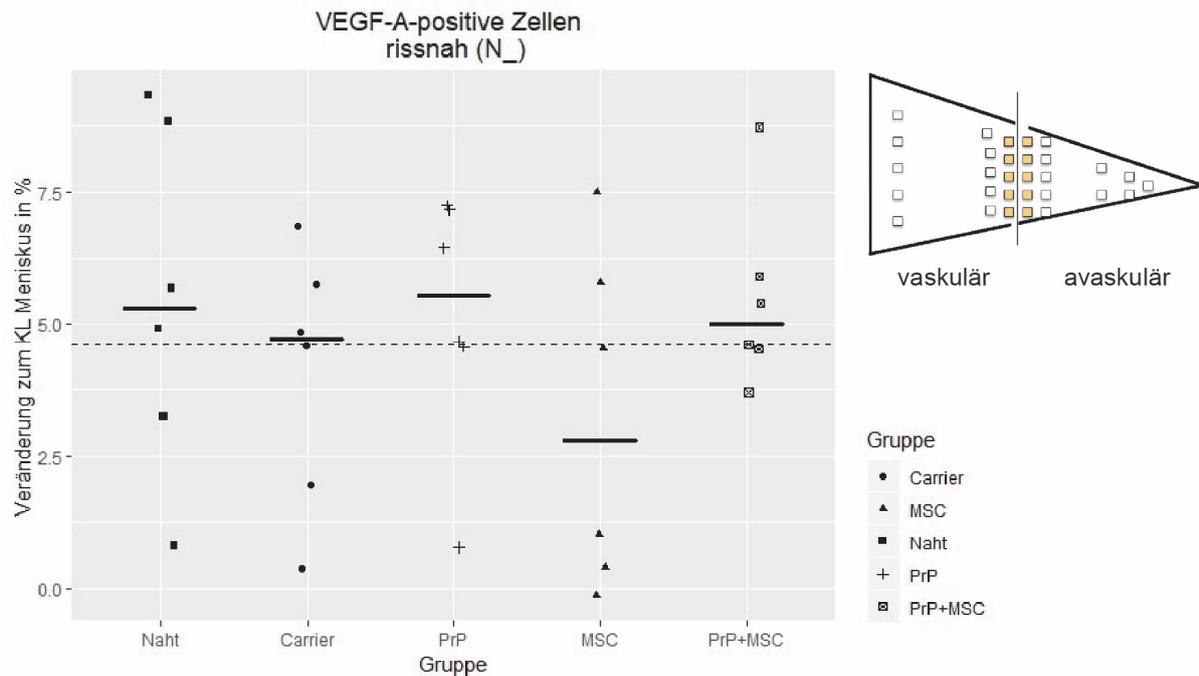


Abbildung 19: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen der rissnahen Region $N_r=VN_r+AVN_r$ der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = $\log(100)\%$, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 13: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen am Riss ($N_r=VN_r+AVN_r$) der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), * $p < 0,05$, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

Gruppe	Kontrolle	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	5 (4–8)	5 (3–6)	6 (5–7)	3 (1–5)	5 (5–6)
Differenz in % OP vs. KL	+1	0	+1	-2	0
Signifikanz OP vs. KL	$p=0,41$	$p>0,99$	$p=0,68$	$p=0,22$	$p=0,62$

Zur Bestimmung der rissnahen vaskulären VEGF-A positiven Zellen wurden die ROIs VN und VF zusammengefasst ($V_r=VN_r+VF_r$). Die Mediane zeigten in keiner Gruppe einen signifikanten Unterschied zwischen operierten und kontralateralen Menisken (Tabelle 14). Auch zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p=0,35$). In der Grafik war in der PrP- und PrP+MSC-Gruppe eine höhere Anzahl VEGF-A positiv gefärbter Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken erkennbar (Abbildung 20).

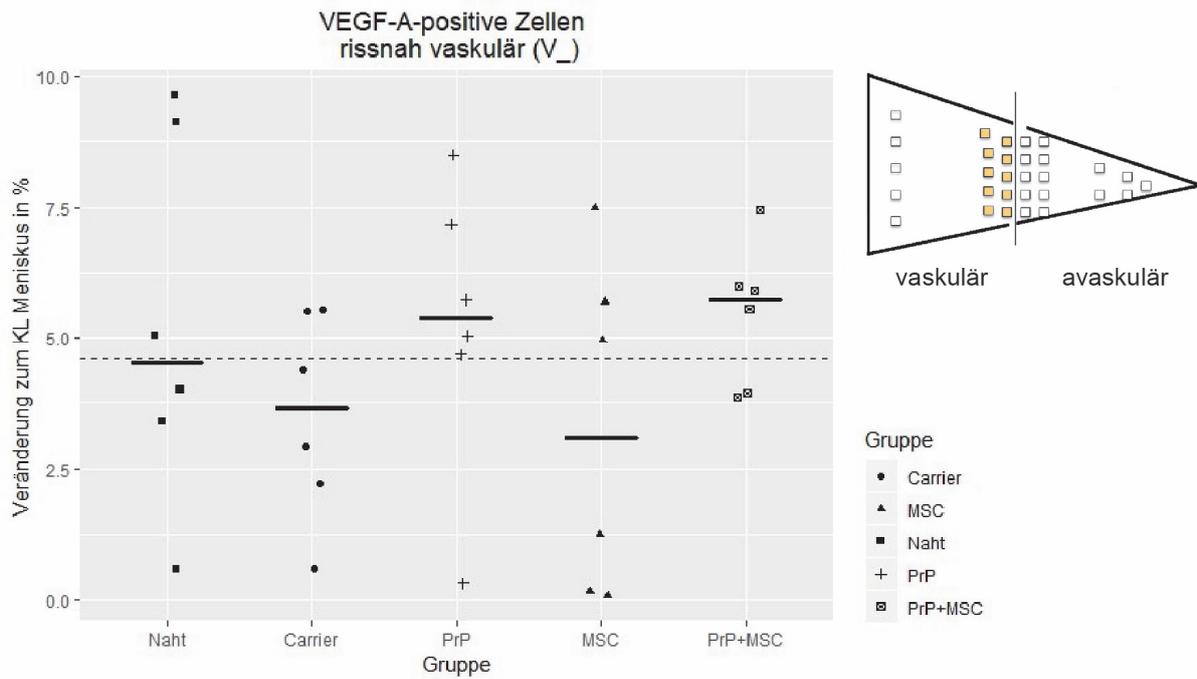


Abbildung 20: Abweichung (%) der Anzahl Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) positiver Zellen vaskulär rissnah (V₊=VN+VF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = log (100) %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 14: Abweichung (%) der Anzahl Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) positiver Zellen vaskulär rissnah vaskulär rissnah (V₊=VN+VF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

Gruppe	Kontrolle	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	5 (4–8)	4 (2–5)	5 (5–7)	3 (0–6)	6 (4–6)
Differenz in % OP vs. KL	0	-1	+1	-2	+1
Signifikanz OP vs. KL	p=0,74	p=0,63	p=0,29	p=0,28	p=0,80

Für die Analyse der VEGF-A positiv gefärbten Zellen avaskulär rissnah (AV₊) wurden die ROIs AVN und AVF zusammengefasst. Die Mediane der avaskulären rissnahen Region (AV₊) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den operierten und den kontralateralen Menisken (Tabelle 15). Auch zwischen den Gruppen traten keine signifikanten Unterschiede auf (p=0,43). Die Gruppenmediane lagen nah beieinander, mit Ausnahme des Medians der MSC-Gruppe. Dieser lag wie der Median der PrP-Gruppe auf der operierten Seite niedriger als auf der kontralateralen Seite (Abbildung 21).

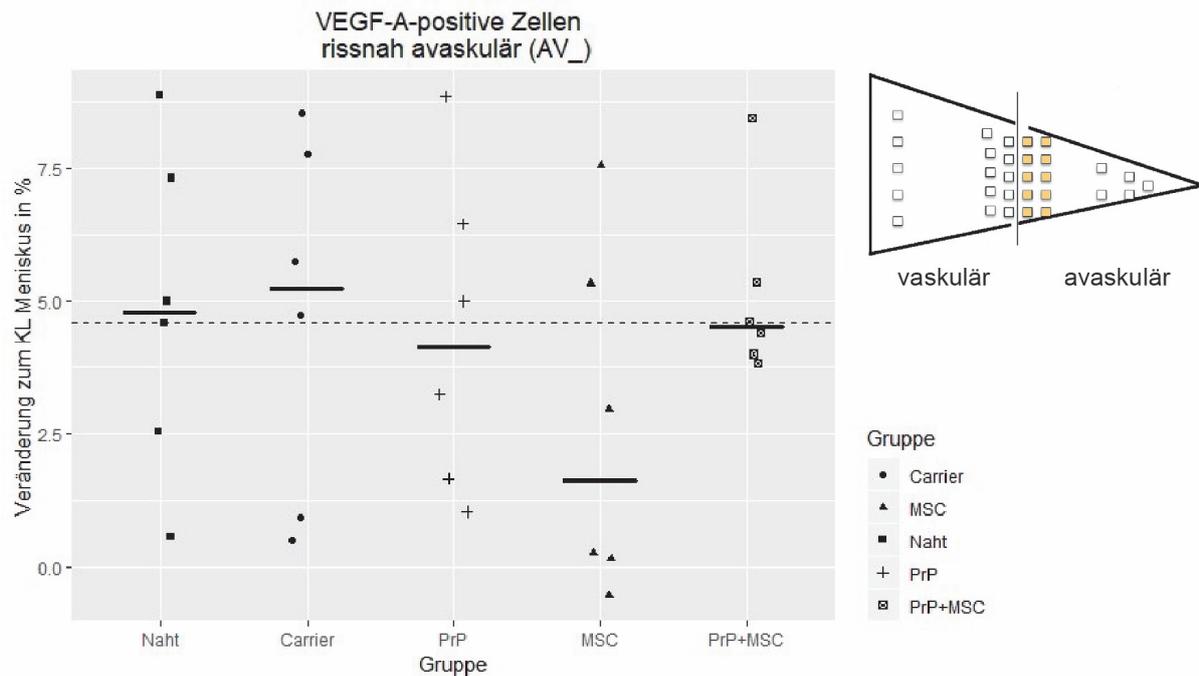


Abbildung 21: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen avaskulär rissnah (AV₋=AVN+AVF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = $\log(100)\%$, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 15: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen avaskulär rissnah (AV₋=AVN+AVF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

Gruppe	Kontrolle	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	5 (3–7)	5 (2–7)	4 (0–5)	2 (2–6)	5 (4–5)
Differenz in % OP vs. KL	0	+1	0	-3	0
Signifikanz OP vs. KL	p=0,80	p=0,42	p=0,12	p=0,74	p>0,99

In der vaskulären Region (V) war die Anzahl VEGF-A positiv gefärbter Zellen in den operierten und kontralateralen Menisken und in den Gruppen nicht signifikant verschieden ($p=0,12$). Ein tendenzieller Unterschied ($p=0,07$) bestand in der Naht-Gruppe zwischen den operierten und kontralateralen Menisken mit einer deutlich höheren Anzahl VEGF-A positiver Zellen in den operierten Menisken (Tabelle 16). Die Anzahlen VEGF-A positiv gefärbter Zellen der operierten Menisken in der Carrier-, PrP- und PrP+MSC-Gruppe entsprach weitgehend denen der kontralateralen Menisken. Dagegen war in der MSC-Gruppe die Anzahl in den operierten Menisken gegenüber den kontralateralen Menisken erniedrigt (Abbildung 22).

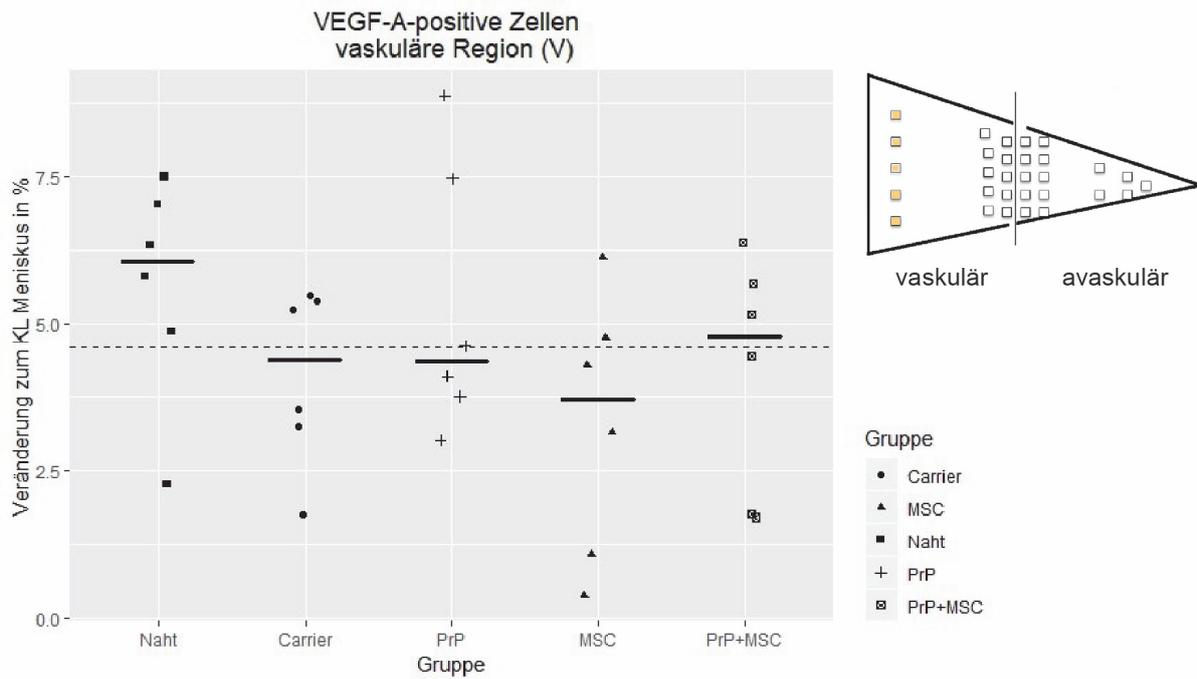


Abbildung 22: Abweichung (%) der Anzahl Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) positiver Zellen der vaskulären Region (V) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = log (100) %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 16: Abweichung (%) der Anzahl Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) positiver Zellen der vaskulären Region (V) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

Gruppe	Kontrolle	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	6 (5–7)	4 (3–5)	4 (4–7)	4 (2–5)	5 (2–6)
Differenz in % OP vs. KL	+1	0	0	-1	0
Signifikanz OP vs. KL	p=0,07	p=0,87	p=0,87	p=0,26	p=0,87

Die Anzahl VEGF-A positiver Zellen der avaskulären Region war in den Gruppen signifikant verschieden ($p=0,02$). In der PrP-Gruppe waren im Vergleich zur Carrier-Gruppe ($p=0,028$) signifikant weniger positive Zellen nachweisbar (Abbildung 23). In keiner Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tabelle 17). Die Naht-Gruppe zeigte die höchste Abweichung VEGF-A-positiver Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken, gefolgt von der Carrier-, PrP+MSC-Gruppe und MSC-Gruppe. In der PRP-Gruppe war die Anzahl VEGF-A positiver Zellen in den operierten und kontralateralen Menisken in der avaskulären Region identisch.

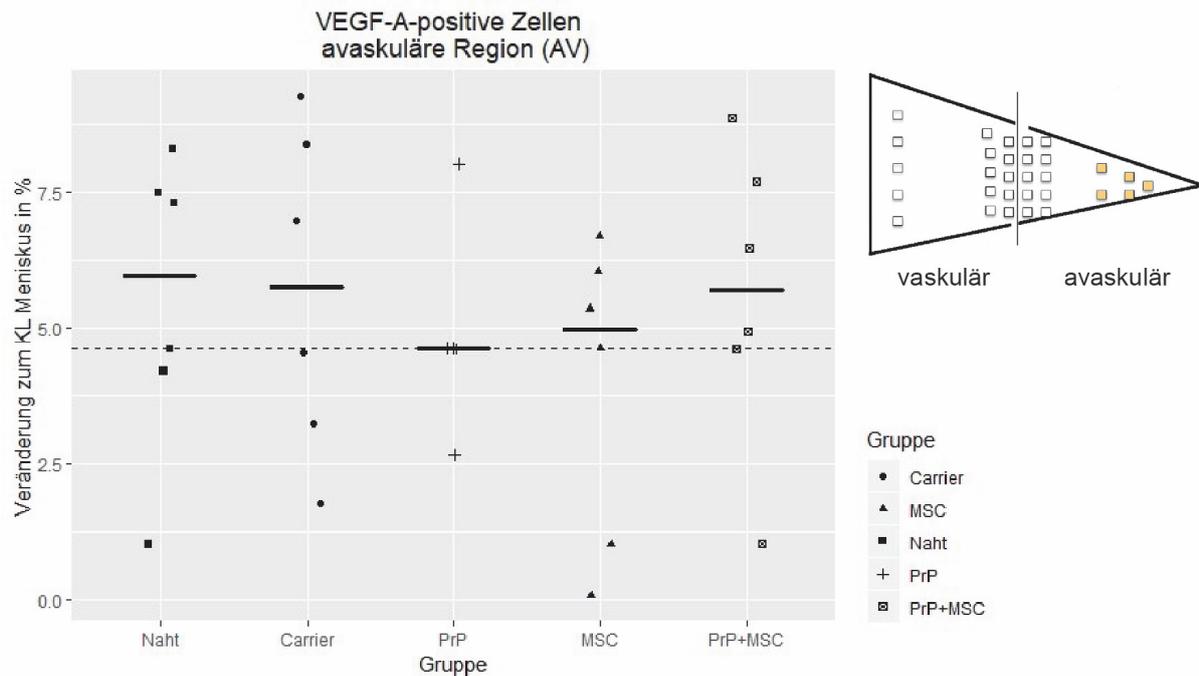


Abbildung 23: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen der avaskulären Region (AV) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = $\log(100)\%$, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 17: Abweichung (%) der Anzahl *Vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) positiver Zellen der avaskulären Region (AV) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartil-abstand

Gruppe	Kontrolle	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median in % (IQR)	6 (4–7)	6 (4–8)	5 (5–5)	5 (2–6)	6 (5–7)
Differenz in % OP vs. KL	+1	+1	0	0	+1
Signifikanz OP vs. KL	p=0,49	p=0,25	p=0,90	p=0,50	p=0,31

5.5.2 Platelet-derived growth factor (PDGF- β)

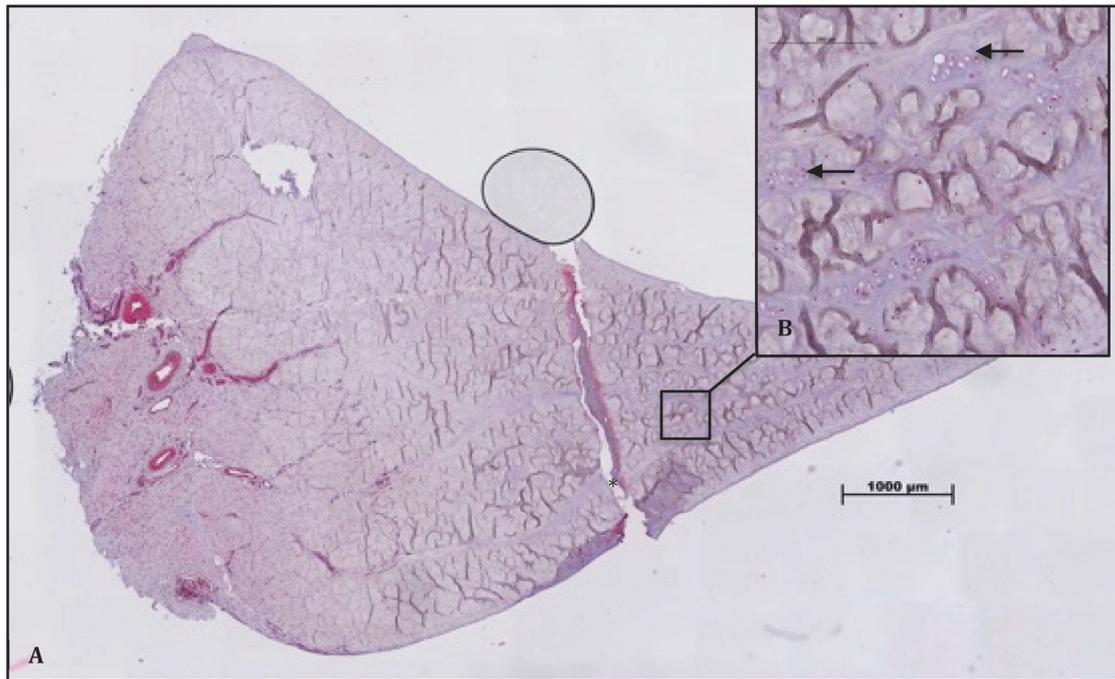


Abbildung 24: Nachweis des *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) – Immunhistochemisch gefärbter Radiärschnitt eines operierten Meniskus aus der Naht-Gruppe, A) gesamter Meniskus mit sichtbarem Riss (*), PDGF- β -positive(s) Gefäßendothel und Fibrochondrozyten in der vaskulären Zone und positive Fibrochondrozyten im gesamten Meniskus, B) Bildausschnitt aus der avaskulären Zone mit zahlreichen PDGF- β -positiven Fibrochondrozyten (Pfeile)

Die Anzahl PDGF- β -positiv gefärbter Zellen aller ROIs war in den operierten und kontralateralen Menisken nicht signifikant verschieden (Tabelle 18). Weiter bestand zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied ($p=0,08$). Im Median lag die Anzahl PDGF- β -positiver Zellen in der MSC-Gruppe bei den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken niedriger und in der Naht- und PrP-Gruppe geringfügig höher (Abbildung 25).

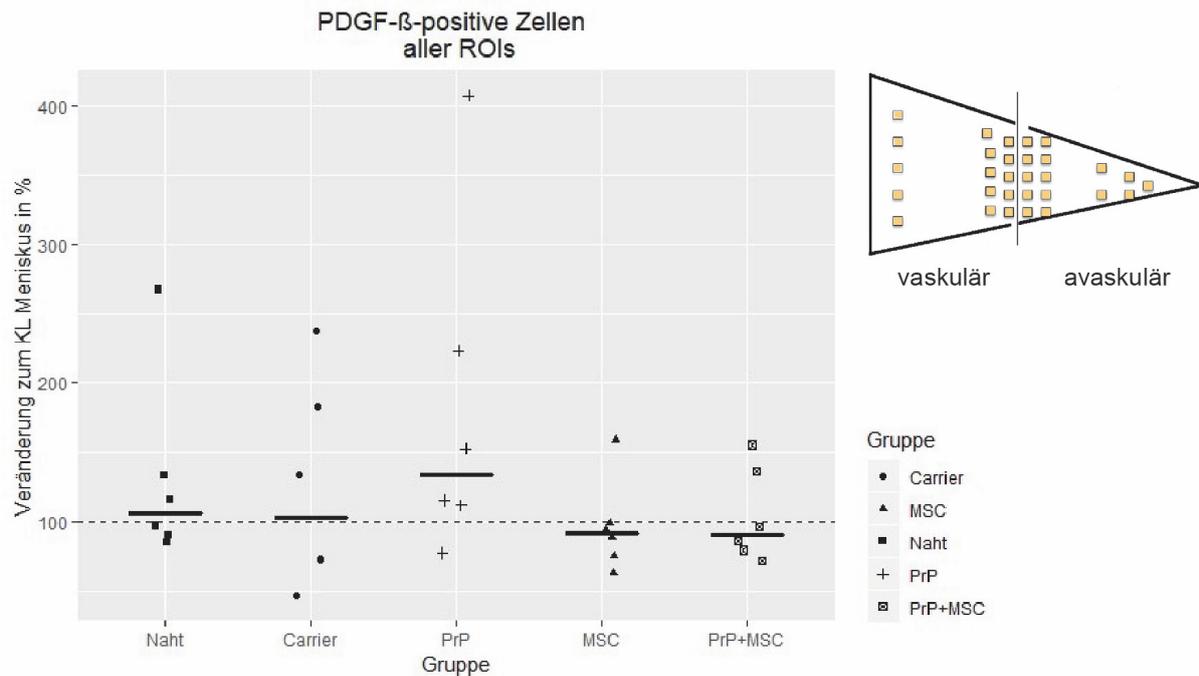


Abbildung 25: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) positiver Zellen aller *Regions of interest* (ROIs) der operierten Menisken, normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 18: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) aller *Regions of interest* (ROIs) der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	113 (97–128)	105 (61–139)	167 (90–291)	92 (72–102)	105 (105–130)
Differenz in % OP vs. KL	13	5	67	-8	5
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,33	p>0,99	p=0,12	p=0,87	p=0,23

Zur Beurteilung der Regionen um den Riss wurden die ROIs der läsionsnahen Zonen AN und AF zu A_ (avaskulär rissnah) sowie VN und VF zu V_ (vaskulär rissnah) zusammengefasst. Abbildung 26 zeigt, dass bezüglich der Anzahl der PDGF- β -positiv gefärbten Zellen keine konstante Tendenz in den einzelnen Gruppen bestand. In einigen Regionen war die Anzahl der PDGF- β -positive Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken erhöht, in anderen dagegen erniedrigt. Auffällig war die erhebliche Streuung der Werte in den Gruppen. Dies betraf besonders die vaskuläre Zone in der PrP-Gruppe.

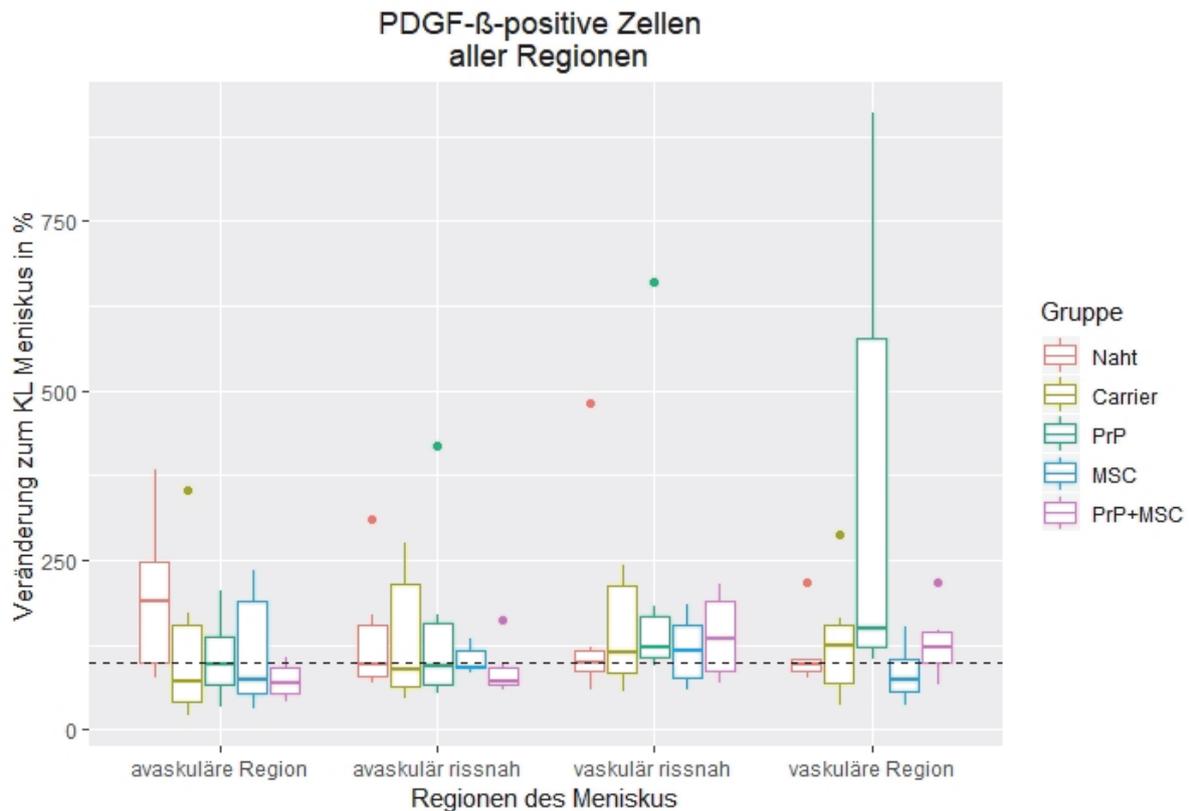


Abbildung 26: Abweichung (%) der Anzahl Platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) positiver Zellen in den einzelnen Regionen der operierten Menisken, normalisiert auf die kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, dargestellt sind pro Gruppe und Region die Mediane (horizontale Linie) mit Interquartilabstand (IQR)

Zur Beurteilung der Zonen am Riss (VF, VN, AVN und AVF) wurden die Mediane der rissnahen vaskulären Zone ($V_{\text{VF+VN}}$) und der rissnahen avaskulären Zone ($AV_{\text{AVN+AVF}}$) zusammengefasst ($VAV_{\text{}}$). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl PDGF- β -positiver Zellen zwischen den operierten und kontralateralen Menisken oder zwischen den Gruppen ($p=0,06$; Tabelle 19). In der PrP- und die MSC-Gruppe zeigten die operierten Menisken eine erhöhte Anzahl PDGF- β -positiver Zellen verglichen mit den kontralateralen Menisken (Abbildung 27).

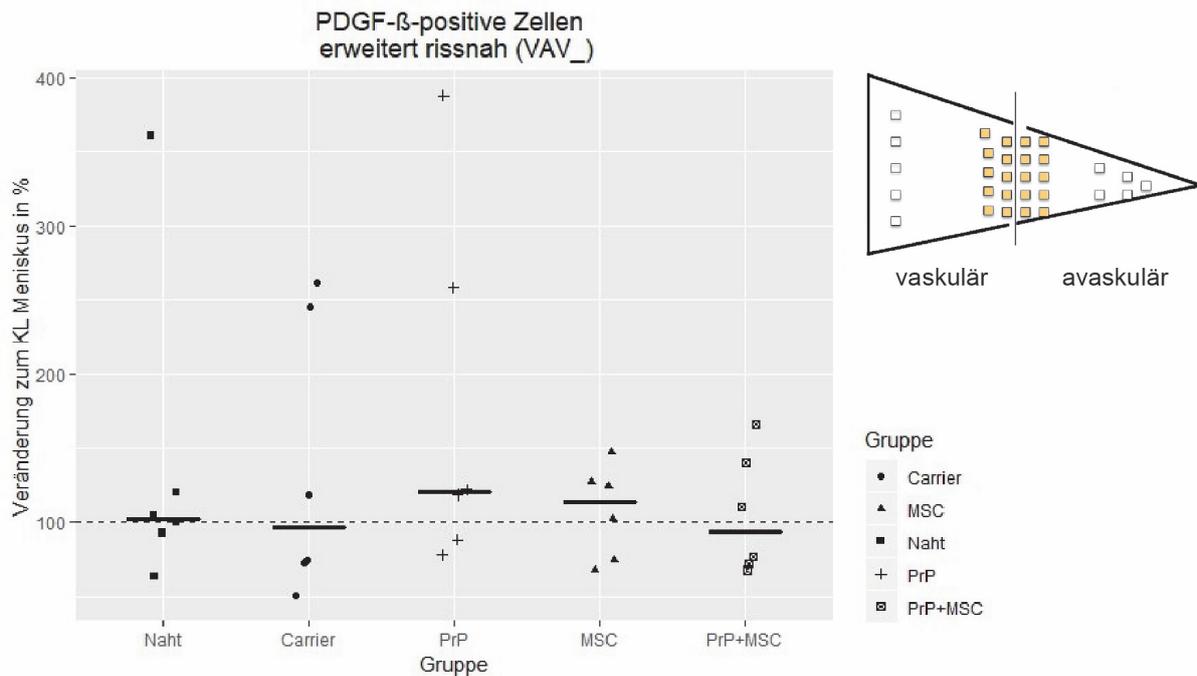


Abbildung 27: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region VAV₋=V₋+AV₋ der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 19: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) positiver Zellen am Riss (VAV₋=V₋+AV₋) der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	102 (95–116)	97 (74–214)	120 (96–224)	114 (82–126)	94 (74–133)
Differenz in % OP vs. KL	2	-3	20	14	-6
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,52	p=0,63	p=0,14	p=0,52	p=0,87

Zur Beurteilung der PDGF- β -positiven Zellen unmittelbar am Riss wurden die Werte der direkt am Riss anliegenden ROIs AVN und VN zusammengefasst (N_{-} =AVN+VN). Die Mediane der PDGF- β -positiven Zellen zeigten in keiner Gruppe einen signifikanten Unterschied zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tabelle 20). Dagegen waren hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,01$) detektierbar, beispielsweise zwischen der PrP- und Carrier-Gruppe ($p=0,04$) und der PrP- und PrP+MSC-Gruppe ($p=0,04$). In beiden Fällen wurden deutlich weniger positive Zellen in der PrP-Gruppe nachgewiesen (Abbildung 28). In der MSC- und PrP+MSC-Gruppe waren in den operierten Menisken verglichen mit den kontralateralen Menisken mehr PDGF- β -positive Zellen nachweisbar.

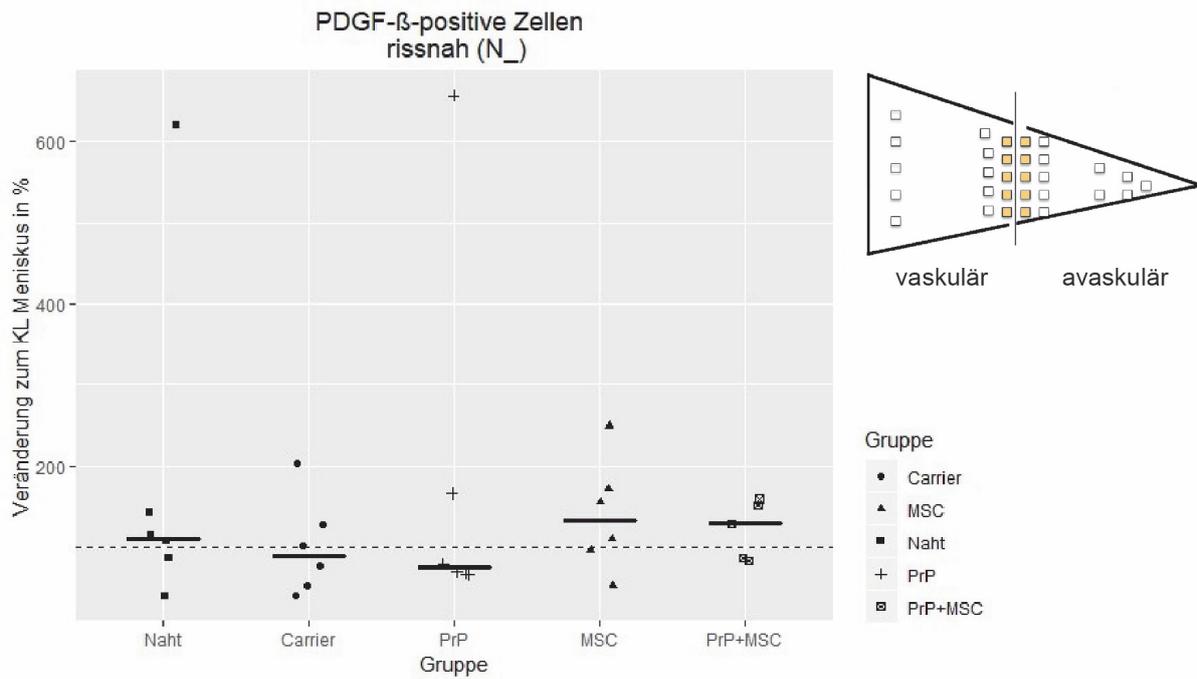


Abbildung 28: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF-β) positiver Zellen der rissnahen Region $N_ = VN_ + AVN_$ der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 20: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF-β) positiver Zellen am Riss ($N_ = VN_ + AVN_$) der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	111 (93–135)	90 (60–121)	75 (68–145)	133 (100–168)	130 (88–151)
Differenz in % OP vs. KL	11	-10	-25	33	30
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,33	p=0,74	p=0,63	p=0,33	p=0,36

Zur Analyse der rissnahen vaskulären PDGF-β-positiven Zellen wurden die ROIs VN und VF (= V_) zusammengefasst. Die Mediane der Anzahl PDGF-β positiver Zellen in der Region V_ waren zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden (p=0,25; Abbildung 29). In keiner Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tabelle 21). In allen Gruppen war die Anzahl PDGF-β positiv gefärbter Zellen in den operierten im Vergleich zu den kontralateralen Menisken erhöht.

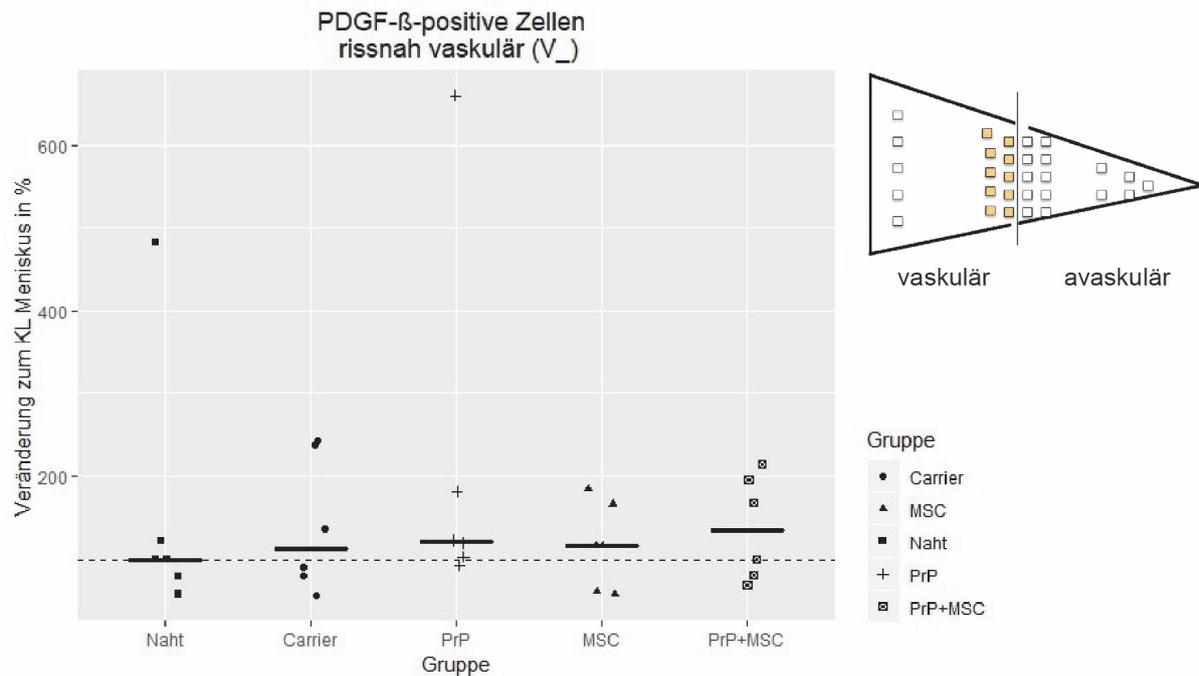


Abbildung 29: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) positiver Zellen vaskulär rissnah (V₋ = VN + VF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, log Skala

Tabelle 21: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β) positiver Zellen vaskulär rissnah (V₋ = VN + VF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	100 (85–117)	114 (83–212)	121 (107–167)	116 (75–154)	134 (86–189)
Differenz in % OP vs. KL	0	14	21	16	0
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,63	p=0,42	p=0,10	p=0,63	p=0,33

Für die Analyse der avaskulär rissnahen PDGF- β positiven Zellen wurden die ROIs AVN und AVF (AV₋) zusammengefasst. In der avaskulären rissnahen Region (AV₋) bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p=0,012). Dies betraf beispielsweise die PrP- und die Naht-Gruppe (p=0,019) mit signifikant weniger positiv gefärbten Zellen in der PrP-Gruppe. Im Vergleich zur PrP+MSC-Gruppe (p=0,018) und Carrier-Gruppe (p=0,019) zeigte die PrP-Gruppe signifikant mehr positiv gefärbte Zellen (Abbildung 30). Innerhalb der Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und kontralateralen Menisken bezüglich der PDGF- β positiven Zellen (Tabelle 22). In Kontrast zu der rissnahen vaskulären

Region (V₁), wo die Anzahl PDGF-β-positiver Zellen in den operierten Menisken in allen Gruppen im Vergleich zu den kontralateralen erhöht war, war die Anzahl in der rissnah avaskulären Region (AV₁) erniedrigt.

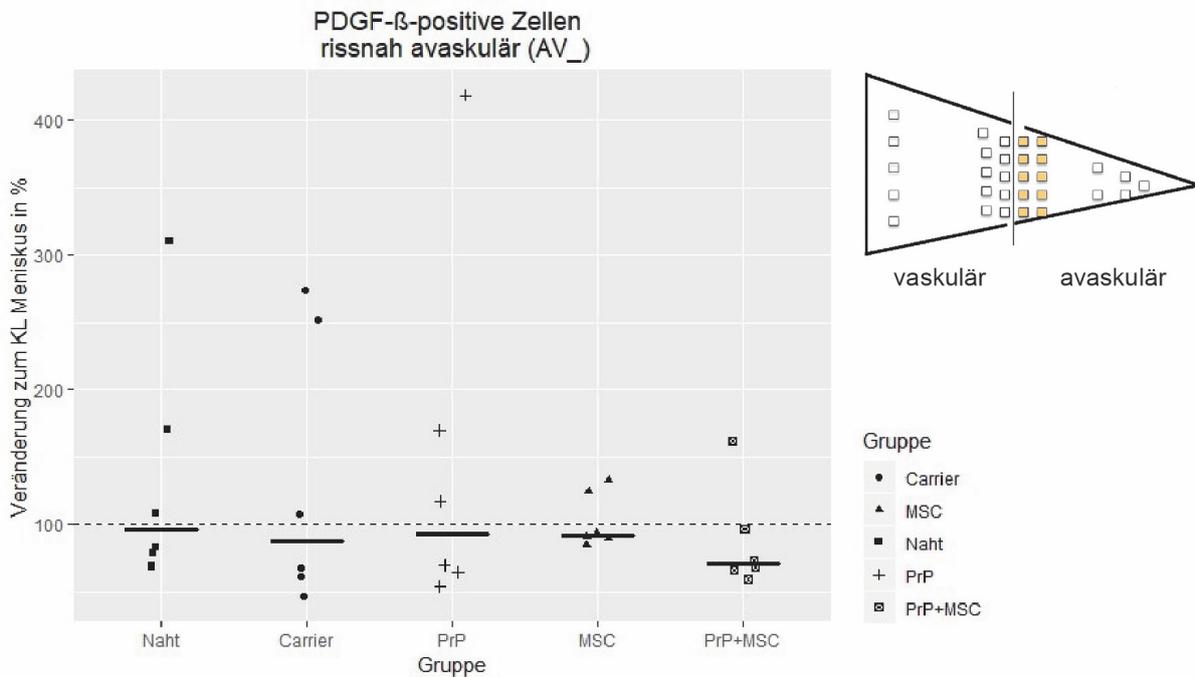


Abbildung 30: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF-β) positiver Zellen avaskulär rissnah (AV₁=AVN+AVF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 22: Abweichung (%) der Anzahl *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF-β) positiver Zellen avaskulär rissnah (AV₁=AVN+AVF) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	96 (80–155)	88 (63–216)	94 (66–157)	92 (90–117)	71 (67–91)
Differenz in % OP vs. KL	-4	-12	-6	-8	-26
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p>0,99	p=0,63	p>0,99	p=0,87	p=0,26

In der vaskulären Zone (V) bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl PDGF-β-positiver Zellen zwischen den Gruppen. Es zeigte sich aber ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und kontralateralen Menisken in der PrP-Gruppe (p=0,04; Tabelle 23) mit deutlich mehr positiv gefärbten Zellen in den operierten Menisken. In der Carrier-, PrP- und PrP+MSC-Gruppe war die Anzahl PDGF-β-positiver Zellen in den operierten Menisken im

Vergleich zu den kontralateralen Menisken erhöht, in der Naht- und MSC-Gruppe dagegen erniedrigt (Abbildung 31).

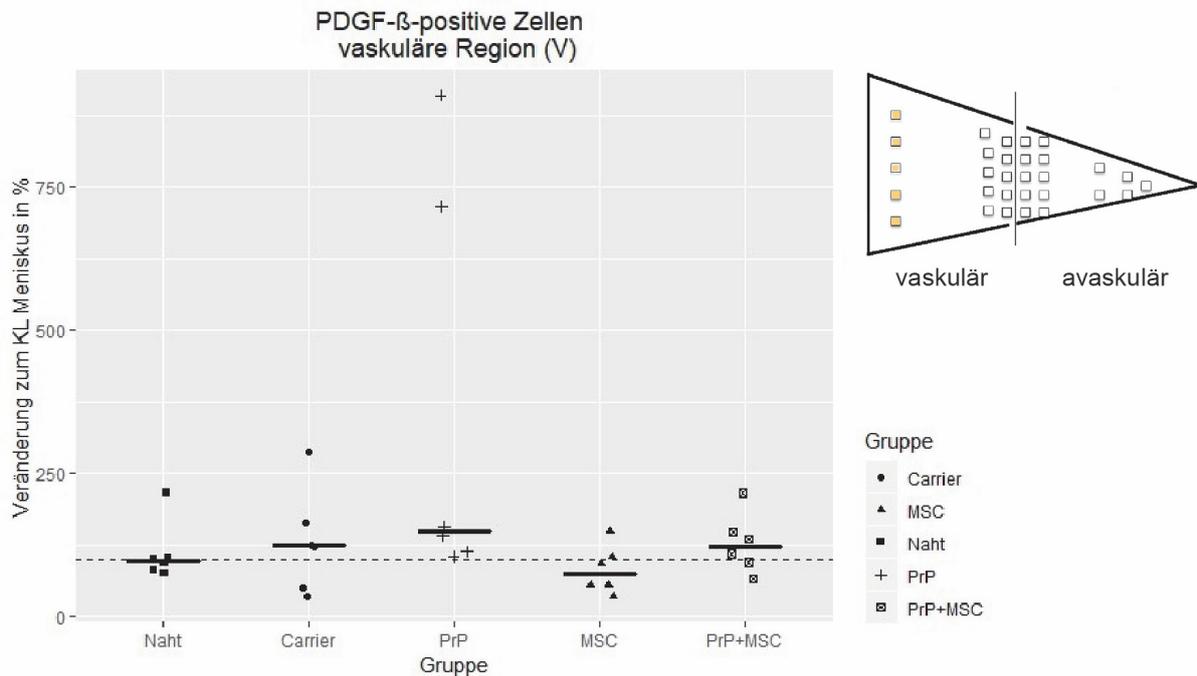


Abbildung 31: Abweichung (%) der Anzahl Platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) positiver Zellen der vaskulären Region (V) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 23: Abweichung (%) der Anzahl Platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) positiver Zellen der vaskulären Region (V) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), * $p < 0,05$, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	97 (86–103)	224 (68–154)	150 (121–576)	75 (56–103)	123 (99–145)
Differenz in % OP vs. KL	-3	24	50	-25	23
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	$p=0,93$	$p=0,63$	$p=0,04^*$	$p=0,26$	$p=0,26$

In der avaskulären Region (AV) bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Anzahl der PDGF- β -positiven Zellen ($p = 0,03$). Die Naht-Gruppe zeigte deutlich mehr positiv gefärbte Zellen als die PrP-Gruppe und die PrP-Gruppe wiederum mehr als die Carrier-bzw. PrP+MSC-Gruppe (jeweils $p=0,05$; Abbildung 32). Zwischen den operierten und kontralateralen Menisken bestanden innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede

(Tabelle 24). In der Naht-Gruppe zeigten die operierten Menisken deutlich mehr PDGF- β positive Zellen als die kontralateralen Menisken. In den anderen Gruppen enthielten die kontralateralen Menisken dagegen mehr PDGF- β positive Zellen.

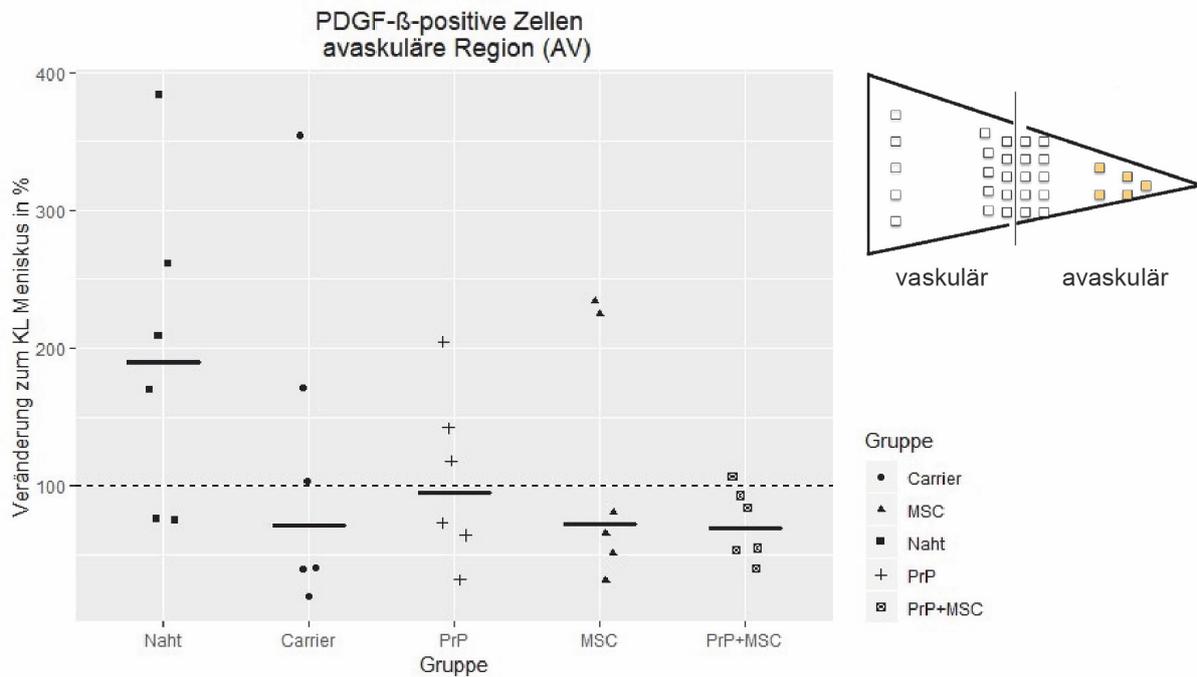


Abbildung 32: Abweichung (%) der Anzahl Platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) positiver Zellen der avaskulären Region (AV) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL) = 100 %, horizontal gepunktete Linie, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 24: Abweichung (%) der Anzahl Platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) positiver Zellen der avaskulären Region (AV) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartil-abstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	187 (100–248)	45 (40–154)	118 (67–136)	88 (54–189)	70 (54–91)
Differenz in % OP vs. KL	87	-55	18	-12	-30
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,06	p=0,52	p=0,87	p=0,74	p=0,09

5.5.3 Faktor VIII

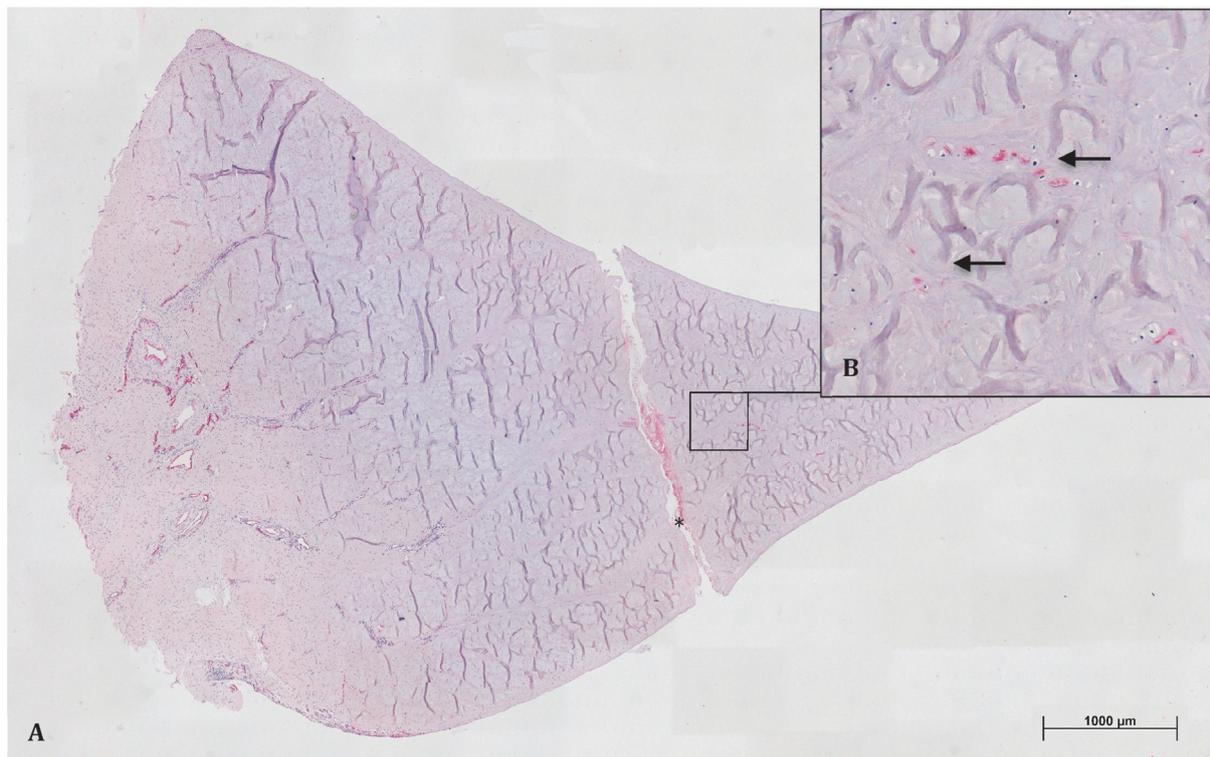


Abbildung 33: Nachweis des Faktor VIII. Immunhistochemisch gefärbter Radiärschnitt eines operierten Meniskus aus der PrP-(Thrombozyten-reiches Plasma)-Gruppe, A) gesamter Meniskus mit sichtbarem Riss (*), Faktor VIII-positive Endothelzellen im gesamten Meniskus, B) Bildausschnitt aus der avaskulären Zone mit Faktor VIII-positiven Endothelzellen (Pfeile)

Bei der Beurteilung aller ROIs hinsichtlich des Vorkommens Faktor VIII-positiver Zellen war eine nicht-binärisierte Analyse der Daten möglich. In der Carrier-Gruppe waren verglichen mit der Naht-Gruppe ($p=0,03$; Abbildung 34) signifikant mehr Zellen positiv gefärbt. Zwischen den operierten und kontralateralen Menisken bestand in der PrP+MSC-Gruppe ein hochsignifikanter Unterschied ($p=0,003$) mit deutlich mehr positiv gefärbten Zellen in den operierten Menisken (Tabelle 25). Die Naht- und Carrier-Gruppe waren die einzigen Gruppen mit einem niedrigeren Median an Faktor VIII-positiven Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken.

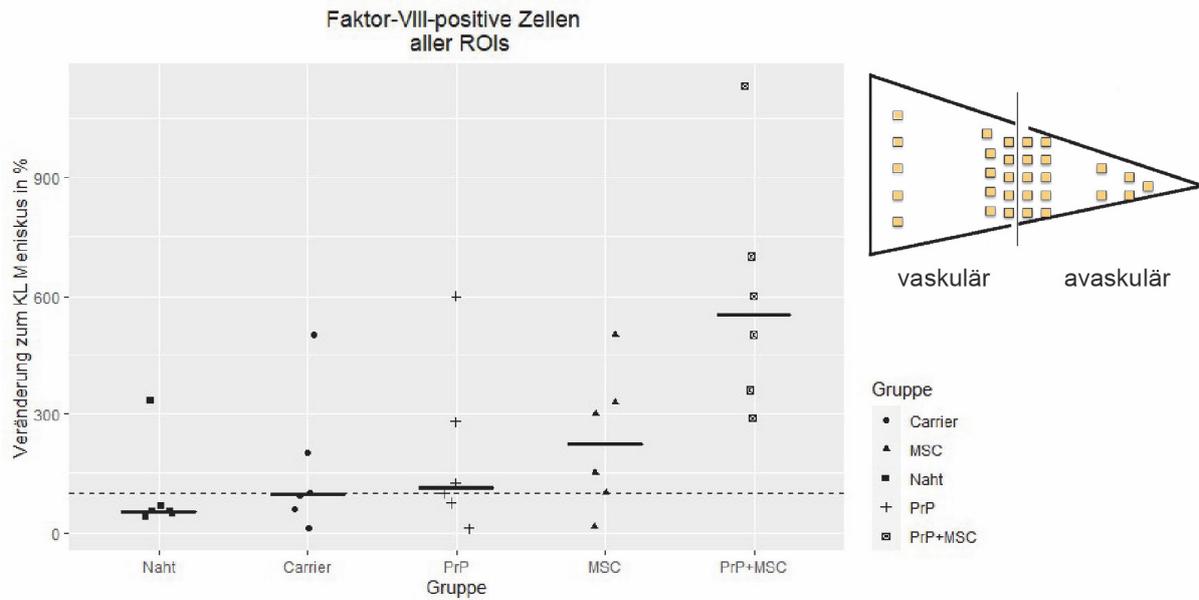


Abbildung 34: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen aller ROIs der operierten Menisken, normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 25: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen aller ROIs der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), ** p<0,01, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	53 (50–98)	98 (69–176)	112 (81–241)	225 (112–321)	550 (396–675)
Differenz in % OP vs. KL	-46	-2	12	125	450
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,10	p=0,68	p>0,99	p=0,45	p=0,003**

Zur Beurteilung der Regionen am Riss wurden die erweiterte rissnahe vaskuläre Region (V_=VN+VF) und die erweiterte rissnahe avaskuläre Region (AV_=AVN+AVF) zusammengefasst (VAV_=V_+AV_). Die gebildeten Mediane der Faktor VIII-positiven Zellen waren zwischen den Gruppen hochsignifikant verschieden (p=0,01; Abbildung 35). In der Naht-Gruppe lag der Median verglichen mit der MSC-Gruppe signifikant niedriger (p=0,02). In der Carrier-Gruppe zeigten die operierten Menisken signifikant weniger Faktor VIII-positive Zellen als die kontralateralen Menisken (p=0,02; Tabelle 26). In den Naht- und Carrier-Gruppen waren weniger Faktor VIII-positive Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken erkennbar, in den anderen Gruppen mehr (Abbildung 35).

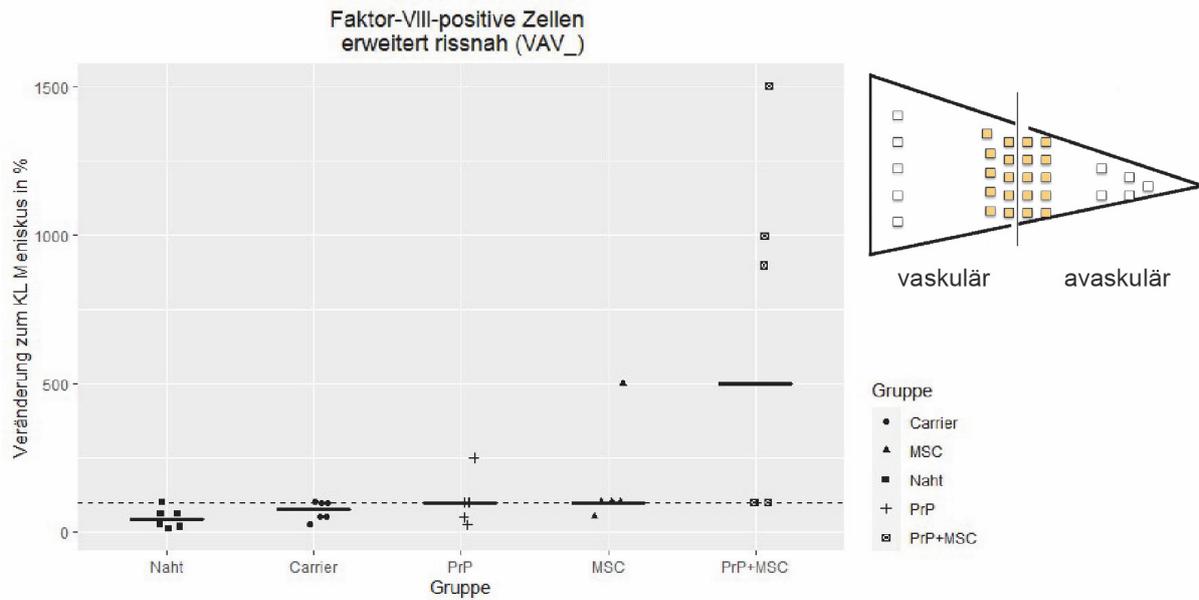


Abbildung 35: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region VAV_V=V_V+AV_V der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 26: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der erweiterten rissnahen Region (VAV_V=V_V+AV_V) der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), * p<0,05, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartil-abstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	42 (19–62)	75 (50–100)	100 (62–100)	100 (100–100)	500 (100–975)
Differenz in % OP vs. KL	-58	-25	0	0	400
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,07	p=0,02*	p=0,39	p=0,90	p=0,28

Für die Analyse der rissnahen Region wurden die Regionen unmittelbar am Riss zusammengefasst (N_V=VN+AVN). In den Gruppen war die Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen nicht signifikant verschieden (p=0,20; Abbildung 36). In der Carrier-Gruppe zeigten die operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken signifikant weniger Faktor VIII-positive Zellen (p=0,02) und in der PrP+MSC-Gruppe tendenziell mehr Faktor VIII-positive Zellen (p=0,058; Abbildung 30). Die PrP+MSC-Gruppe war die einzige Gruppe mit einer höheren Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen in den operierten Menisken.

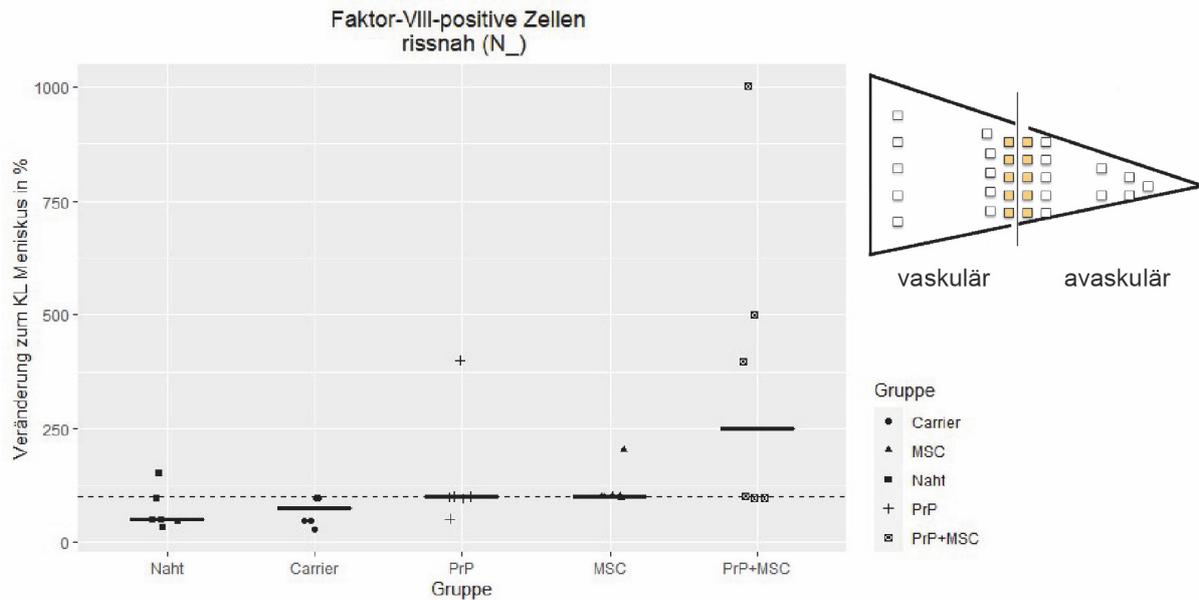


Abbildung 36: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der rissnahen Region $N_{=}VN_{+}AVN_{}$ der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 27: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der rissnahen Region ($N_{=}VN_{+}AVN_{}$) der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), * $p < 0,05$, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	50 (50–88)	75 (50–100)	100 (100–100)	100 (100–100)	250 (100–475)
Differenz in % OP vs. KL	-50	-25	0	0	150
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	$p=0,09$	$p=0,02^*$	$p=0,90$	$p=0,90$	$p=0,058$

Für die Analyse die Faktor VIII-positiven Zellen rissnah in der vaskulären Zone wurden die ROIs VN und VF zusammengefasst ($V_{=}VN+VF$). Die Mediane der Faktor VIII-positiven Zellen waren zwischen den Gruppen signifikant verschieden ($p=0,024$; Abbildung 37). In der Naht-Gruppe fanden sich deutlich weniger Faktor VIII-positive Zellen als in der Carrier-Gruppe ($p=0,05$). In keiner Gruppe bestanden bezüglich der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen signifikante Unterschiede zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tabelle 28). Nur in der Naht-Gruppe war die Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen in den operierten Menisken niedriger als in den kontralateralen Menisken. Dagegen zeigte die PrP+MSC-Gruppe eine höhere Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen in den operierten Menisken.

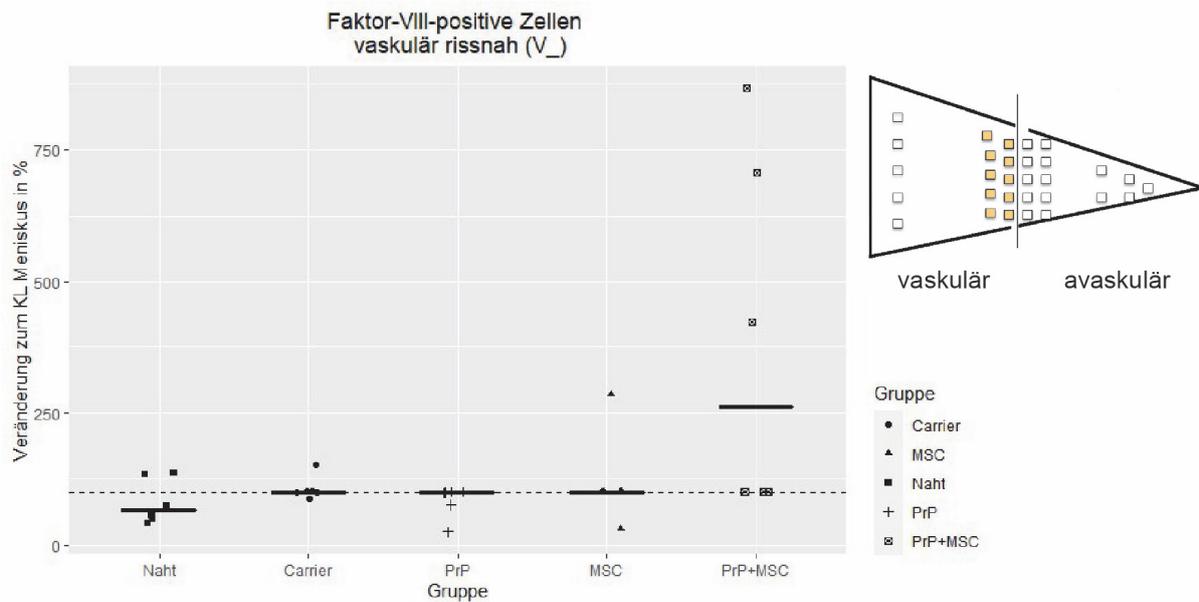


Abbildung 37: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulär rissnahen Region V₋=VN₋+VF₋ der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 28: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulär rissnahen Region (V₋=VN₋+VF₋) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	65 (51–119)	100 (100–100)	100 (81–100)	100 (100–100)	261 (100–637)
Differenz in % OP vs. KL	-35	0	0	0	161
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,32	p=0,13	p=0,13	p=0,90	p=0,28

Zur Analyse der Faktor VIII-positiven Zellen im rissnahen avaskulären Bereich wurden die ROIs AVN und AVF zusammengefasst (AV₋=AVN+AVF). Die Mediane zeigten einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (p=0,002). Dies betraf besonders die Naht- und MSC-Gruppe (p=0,011). Tendenzielle Unterschied bestanden zwischen der Naht- und Carrier-Gruppe (p=0,07) sowie zwischen der Naht- und PrP+MSC-Gruppe (p=0,06; Abbildung 38). In allen zwei Fällen färbten sich weniger Zellen in der Naht-Gruppe an. Innerhalb der Gruppen zeigten die operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken in der Naht-Gruppe (p=0,059) und in der Carrier-Gruppe (p=0,058; Tabelle 29) tendenziell weniger Faktor VIII-positiv Zellen. Im Vergleich zur vaskulär rissnahen Region (V₋) wiesen die operierten Menisken in der avaskulär rissnahen Region in allen Gruppen eine niedrigere Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen auf.

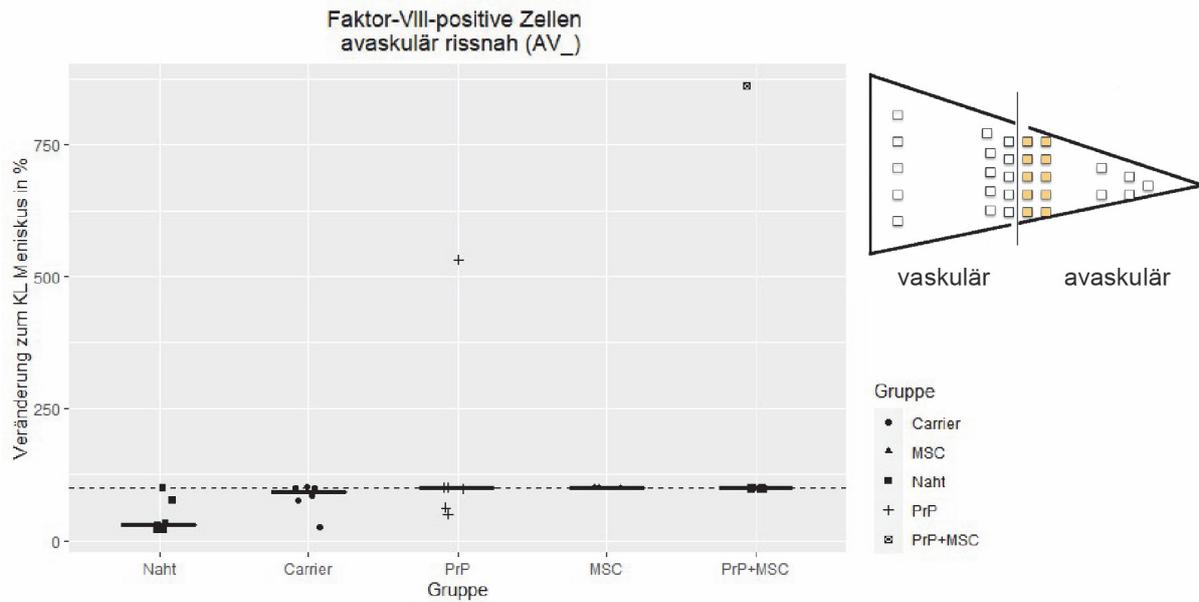


Abbildung 38: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der avaskulär rissnahen Region AV__{AVN}+AVF_{AVF} der operierten Menisken (OP), normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 29: Abweichung (%) der Anzahl der VIII-positiven Zellen der avaskulär rissnahen Region (AV__{AVN}+AVF_{AVF}) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	32 (19–65)	94 (78–100)	100 (72–100)	100 (100–100)	100 (100–100)
Differenz in % OP vs. KL	-68	-6	0	0	0
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	p=0,059	p=0,058	p=0,67	p>0,99	p=0,31

In der vaskulären Region (V) war die Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen in den Gruppen nicht signifikant verschieden (p=0,68; Abbildung 39). In der PrP+MSC-Gruppe enthielten die operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken hochsignifikant mehr Faktor VIII-positive Zellen (p=0,003; Tabelle 30). In allen Gruppen lagen die Mediane der Faktor VIII-positiven Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken höher.

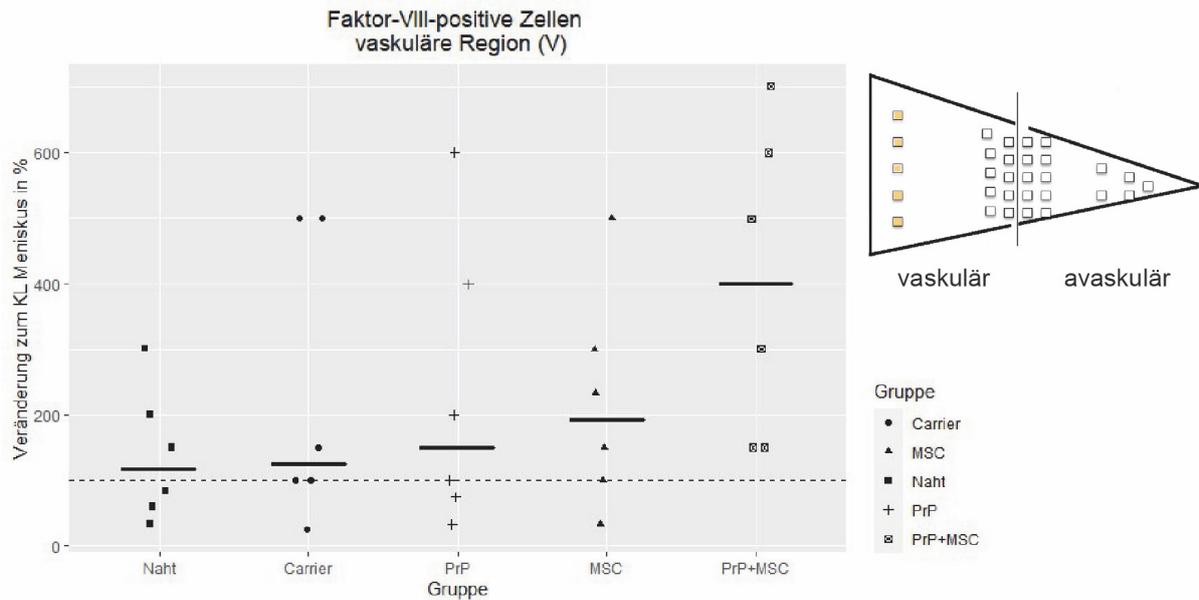


Abbildung 39: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulären Region (V) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken in Abhängigkeit der Therapiegruppe. KL = kontralateraler Meniskus = 100 % (gepunktete Linie), PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 30: Abweichung (%) der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen der vaskulären Region (V) der operierten Menisken (OP) normalisiert auf die kontralateralen Menisken (KL), ** $p < 0,01$, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen, IQR = Interquartilabstand

	Naht	Carrier	PrP	MSC	PrP+MSC
Median (IQR)	117 (66–188)	125 (100–412)	150 (81–350)	192 (112– 283)	400 (188–575)
Differenz in % OP vs. KL	17	25	50	92	300
Signifikanz OP- vs. KL-Menisken	$p=0,86$	$p=0,73$	$p=0,51$	$p=24$	$p=0,003^{**}$

Die avaskulären Region (AV) enthielten nur wenige Faktor VIII-positive Zellen. Daher wurde bei der Analyse nur zwischen vorhanden und nicht-vorhanden unterschieden (Abbildung 40). In der Naht-Gruppe wurden nur in zwei Einheiten und in der PrP+MSC-Gruppe nur in einer Einheit Faktor VIII-positive Zellen in den operierten Menisken detektiert. In der PRP-Gruppe wurden nur in einer Einheit Faktor VIII-positive Zellen in den kontralateralen Menisken nachgewiesen. Laut Cochran-Mantel Haenszel Chi Quadrat-Test bestand keine signifikante Assoziation zwischen dem Meniskustyp (operiert und kontralateral) und dem Vorhandensein Faktor VIII-positiver Zellen ($p=0,6$). Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sowie zwischen den operierten und kontralateralen Menisken innerhalb der einzelnen Gruppen ($p > 0,3$ für alle Gruppen).

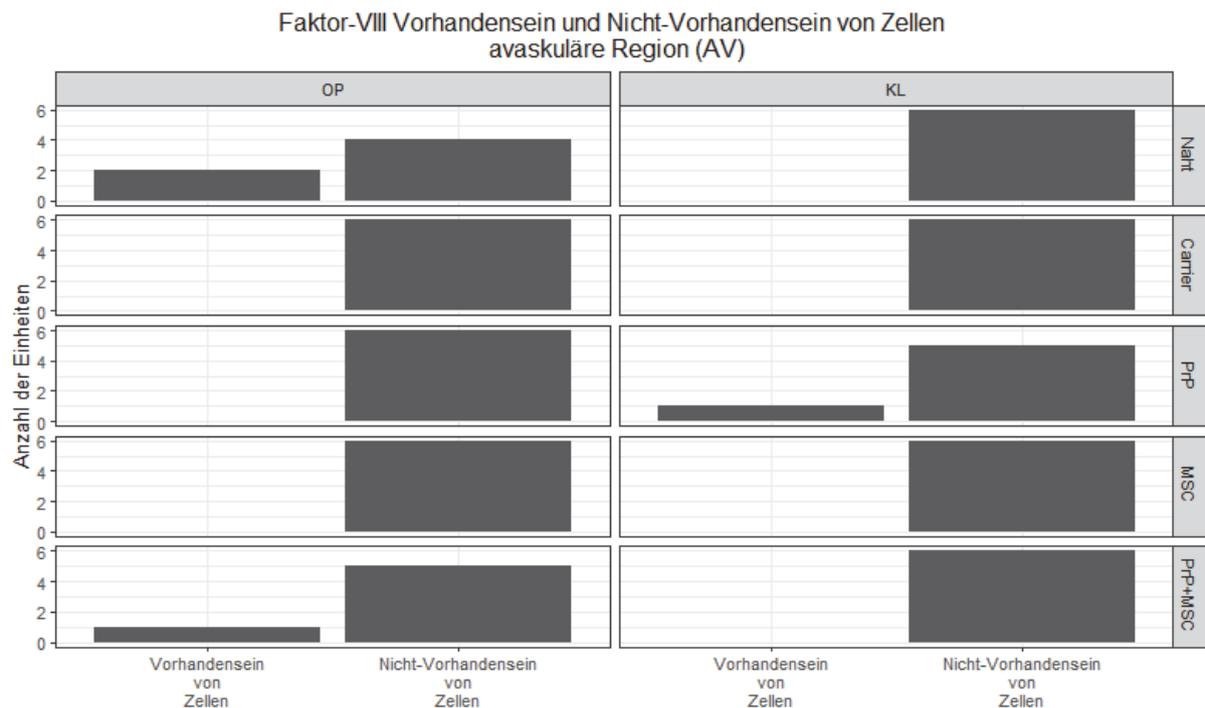


Abbildung 40: Anzahl der Einheiten mit und ohne Faktor VIII-positive Zellen in der avaskulären Region (AV), OP = operierter Meniskus, KL = kontralateraler Meniskus, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSC = mesenchymale Stromazellen

5.6 Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren VEGF-A und PDGF- β in den operierten Menisken wurde anhand der Ct-Werte normalisiert auf die mRNA-Expression von GAPDH und auf die mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren in den gepoolten kontralateralen Menisken ($\Delta\Delta$ CT-Werte) ermittelt. Da kein Primer zur Verfügung stand, konnten entsprechende Analysen für Faktor VIII nicht durchgeführt werden.

5.6.1 *Vascular endothelial growth factor (VEGF-A)*

In keiner der Gruppen zeigten die operierten Menisken verglichen mit den kontralateralen Menisken eine signifikant veränderte relative VEGF-A-mRNA-Expression (Tabelle 31). Die relative VEGF-A-mRNA-Expression war in der Naht-, Carrier- und PrP-Gruppe ($p > 0,99$; $p = 0,08$; $p = 0,36$) tendenziell erhöht und in der MSC- und PrP+MSC-Gruppe tendenziell vermindert ($p = 0,05$; $p = 0,08$; Abbildung 41).

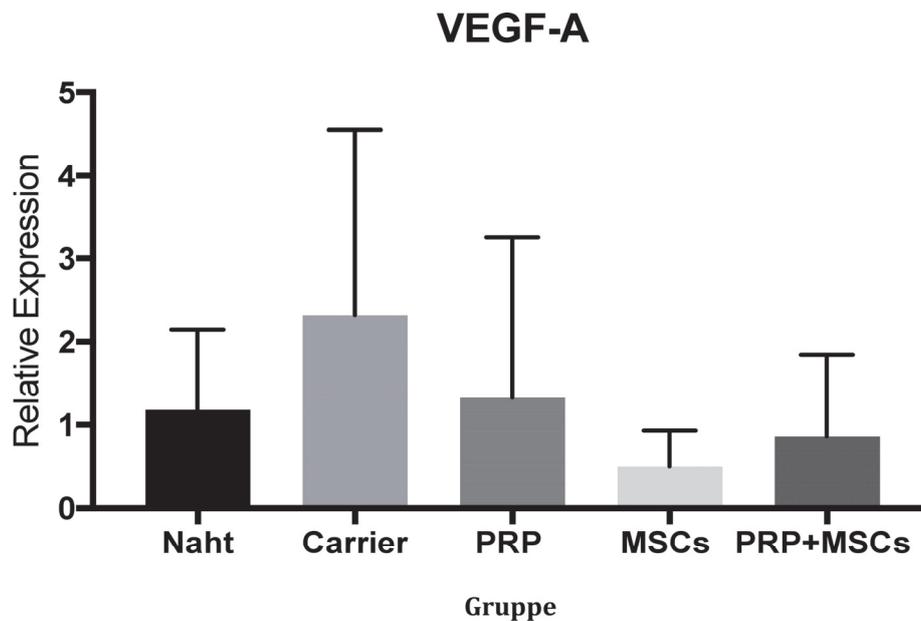


Abbildung 41: Relative mRNA-Expression des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF-A). $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte normalisiert auf die mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und auf die VEGF-A-mRNA-Expression der gepoolten kontralateralen Menisken. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Ct = *cycle threshold*, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSCs = mesenchymale Stromazellen

5.6.2 *Platelet-derived growth factor* (PDGF- β)

In der MSC- und PrP-Gruppe war die PDGF- β -mRNA-Expression in den operierten Menisken gegenüber den kontralateralen Menisken hochsignifikant erniedrigt ($p=0,002^*$, Tabelle 31). In den anderen drei Gruppen (Naht-, Carrier- und PrP+MSC-Gruppe) war eine leicht erhöhte Expression. Die höchste relative Expression zeigte die Naht-Gruppe ($p=0,57$), gefolgt von der Carrier-Gruppe ($p=0,08$) und der PrP+MSC-Gruppe ($p=0,05$; Abbildung 42).

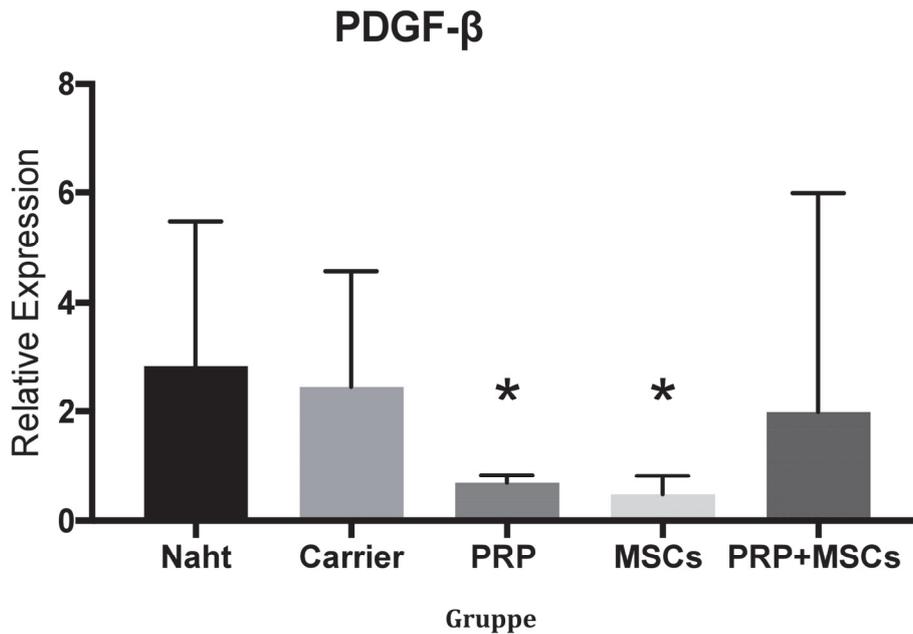


Abbildung 42: Relative mRNA-Expression des *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β). $\Delta\Delta$ Ct-Werte normalisiert auf die mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und auf die PDGF- β -mRNA-Expression der gepoolten kontralateralen Menisken. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Ct = *cycle threshold* PrP = plättchenreiches Plasma, MSCs = mesenchymale Stromazellen

Tabelle 31: Relative mRNA-Expression des *Vascular endothelial growth factors A* (VEGF-A) und des *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β). Mittelwerte \pm Standardabweichungen der $\Delta\Delta$ Ct-Werte von VEGF-A und PDGF- β normalisiert auf die mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und auf die VEGF-A/PDGF- β -mRNA-Expression der gepoolten kontralateralen Menisken, * $p < 0,01$ hochsignifikanter Unterschied zu den kontralateralen Menisken, PrP = Thrombozyten-reiches Plasma, MSCs = mesenchymale Stromazellen

Wachstumsfaktor relative mRNA-Expression	VEGF-A	PDGF- β
Naht-Gruppe	1,2 \pm 1,0 $p > 0,99$	2,8 \pm 2,6 $p = 0,57$
Carrier-Gruppe	2,3 \pm 2,2 $p = 0,08$	2,5 \pm 2,1 $p = 0,08$
PrP-Gruppe	1,3 \pm 1,9 $p = 0,3636$	0,7 \pm 0,2 $p = 0,002^*$
MSC-Gruppe	0,5 \pm 0,4 $p = 0,05$	0,5 \pm 0,4 $p = 0,002^*$
PrP+MSC-Gruppe	0,9 \pm 1,0 $p = 0,08$	2,0 \pm 4,0 $p = 0,05$

6 Diskussion

Die Applikation von PrP und/oder MSCs in Meniskusrisse der avaskulären Zone führte in der vorliegenden Studie entgegen der Hypothese zu keiner verbesserten makroskopischen Heilung. Die Kombination von PrP und MSCs war der isolierten Applikation von PrP bzw. MSCs oder einer Meniskusnaht nicht überlegen. Der Effekt der kombinierten Applikation von PrP und MSCs auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse wurde unseres Wissens bis dato *in vivo* am Großtiermodell noch nicht untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von PrP und MSCs auf die Meniskusheilung im Tiermodell zu analysieren. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten, wurde ein Tiermodell gewählt, das die humanen anatomischen und zellulären Gegebenheiten im Meniskus möglichst genau abbildet (Proffen et al. 2012). Der Meniskus des Hundes ähnelt dem Meniskus des Menschen bezüglich der Vaskularisation, der Anatomie und der biochemischen Zusammensetzung (Heijkants et al. 2004; Tienen et al. 2003; Klompaker und Veth 1999); aufgrund ethischer Bedenken und hoher Haltungsansprüche werden Hunde jedoch nur selten eingesetzt. In der Vergangenheit wurden häufig Kaninchen wegen ihrer unkomplizierten Haltung, der einfachen Handhabung und geringen Kosten als Tiermodell für Meniskusstudien verwendet (Angele et al. 2008; Becker et al. 2004; Klompaker et al. 1999; Ghadially et al. 1986). Jedoch weist der Kaninchenmeniskus trotz der histologischen Ähnlichkeit mit dem humanen Meniskus ein anderes Heilungsverhalten auf (Martini et al. 2001; Bland und Ashhurst 1996).

Inzwischen hat sich das Schaf als orthopädisches Tiermodell zunehmend etabliert. Zwischen 1990 und 2001 kamen sie in 9–12 % der orthopädischen klinischen Studien als Versuchstiere zum Einsatz (Martini et al. 2001). Aktuell sind sie das am häufigsten verwendete Großtiermodell in orthopädischen präklinischen Studien (Haddouti et al. 2020). Schafe sind relativ kostengünstig, in großer Anzahl erhältlich und unkompliziert in ihren Haltungsansprüchen (O'Loughlin et al. 2008). Sie ähneln Menschen hinsichtlich ihrer Knochengröße und ihres Gesamtgewichts (Pearce et al. 2007; Martini et al. 2001; Newman et al. 1995). Auch bei Untersuchungen zur Meniskusheilung werden Schafe häufig eingesetzt (Whitehouse et al. 2017; Forriol et al. 2015; Petersen et al. 2007). Die Ähnlichkeit bei den für die Meniskusheilung wichtigen Eigenschaften wie Vaskularisation, Zellenverteilung und Kollagen-Struktur ist zwischen Schaf und Mensch größer als zwischen Mensch und Kaninchen (Chevrier et al. 2009). Zudem sind die anatomischen Gegebenheiten und die Zugänglichkeit der *V. jugularis externa* zur Blutentnahme für die PrP-Gewinnung bzw. des Beckenkamms zur Knochenmarksentnahme für

die MSC-Kultivierung günstig. Zudem sind ovine und humane MSCs bezüglich ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten, ihrer Oberflächenmarker und ihres Differenzierungspotential vergleichbar (Haddouti et al. 2020). Daher wurde das Schaf als Tiermodell für die vorliegende Studie ausgewählt. Dennoch gilt es, einige Besonderheiten zu beachten. Der humane Meniskus ist größer als der ovine (Joshi et al. 1995). Der prozentuale Anteil der vaskulären Infiltration des Meniskus ist beim Schaf etwas geringer (11,2 %) als beim Menschen (14,4 %) (Chevrier et al. 2009).

Zudem erschwert das Fehlen eines kontrollierten postoperativen Rehabilitationsprogramms den Vergleich des Heilungsprozesses zwischen Mensch und Schaf (Barber 1994). Während in der klinischen Praxis eine Teilbelastung durch zwei Unterarmstützen oder Tragen einer Knieschiene bzw. Orthese von bis zu acht Wochen nach einer Meniskusnaht üblich ist (Cavanaugh und Killian 2012), ist bei Schafen (Vierfüßler) davon auszugehen, dass die operierte Gliedmaße bis zur Schmerzkompensation partiell entlastet wird, aber schnellstmöglich wieder belastet wird, da es sich um Fluchttiere handelt. Eine körperliche Schonung der Gliedmaße beim Großtier wäre nur durch einen *Fixateur externe* zu gewährleisten, der der partiellen Belastung im klinischen Rahmen nicht entspräche. Daher wurde auf eine Bewegungseinschränkung verzichtet. Studien belegen, dass sich der Heilungserfolg bei einer Ruhigstellung im Vergleich zu einer frühen postoperativen Belastung nicht verbessert (Guisasola et al. 2002; Barber 1994; Huang et al. 1991). Mechanische Einflüsse können sich negativ auf die Meniskusheilung auswirken, besonders wenn der Meniskus pathologisch belastet wird und katabole und inflammatorische Effekte auftreten. Eine physiologische Belastung hat hingegen nachweislich einen anti-inflammatorischen und anabolen Effekt (Jacob et al. 2019). Ausschlaggebend ist die Stabilisierung des Risses mit adäquater Nahtversorgung und nicht die Immobilisierung des Kniegelenks (Nakagawa et al. 2019; Dowdy et al. 1995). In einer Studie am ovinen Meniskus heilten nach sechs Wochen nur zwei von zwölf nahtversorgten Meniskusrissen in der avaskulären Zone durch Bildung von Fasergewebe aus. Die beiden Tiere stammten aus der Gruppe der immobilisierten Schafe (Guisasola et al. 2002). Unabhängig von der Mobilisierung zeigten jedoch alle Menisken eine um 50 % reduzierte biomechanische Belastbarkeit im Vergleich zu gesunden Menisken (Guisasola et al. 2002). Aufgrund der niedrigen Anzahl an Tieren lässt die Studie aber keine validen Aussagen zum Vorteil einer Immobilisierung zu (Guisasola et al. 2002). In Hundemodellen verringerte die postoperative Immobilisierung im Vergleich zu einer sofortigen Belastung nach einem artifiziell gesetzten Meniskusriss die Bildung von fibrocartilaginärem Gewebe (Arnoczky et al. 1988) und Kollagen (Dowdy et al. 1995). Laut *in vitro* Ergebnissen erhöht sich die Kollagen-Synthese in Meniskuszellkulturen durch hydrostatischen Druck (Gunja et al. 2009). Diese Daten bestätigen die Vorteile einer frühen

Mobilisierung im Zug der Meniskusheilung. Daher kam dieses Verfahren auch in der vorliegenden Studie zur Anwendung.

Die biomechanische Belastung des Meniskus unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Art des Defektes. Stanzdefekte und mit dem Skalpell gesetzte, scharfe longitudinale Risse haben sich zur Imitation von traumatischen Meniskusdefekten am Tiermodell in der Forschung etabliert. Ein 2 mm großer Stanzdefekt zeigte gegenüber einem 4 mm longitudinalen Riss unter Applikation von PrP in der avaskulären Zone von Kaninchenmenisken eine bessere Heilungstendenz (Zellner et al. 2014). Kleinere runde Stanzdefekte heilen möglicherweise schneller, da weniger Reparationsgewebe gebildet werden muss. Hinzu kommt, dass der Defekt nach longitudinalen Rissen einer deutlich höheren biomechanischen Belastung ausgesetzt ist als nach dem Setzen eines Stanzdefektes (Zellner et al. 2014). Ein artifiziell gesetzter longitudinaler Riss – wie in der vorliegenden Arbeit verwendet – imitiert die biomechanische Realität traumatischer Risse beim Menschen besser als ein Stanzdefekt. Letztlich spiegeln longitudinale Risse die klinische Realität wider, in der traumatische Meniskusrisse in der avaskulären Zone eine hohe therapeutischen Versagensrate aufweisen.

Daneben hängt die Beurteilung der makroskopischen Heilung von der Länge des postoperativen Beobachtungszeitraumes ab. Die Analyse der Menisken erfolgte in der vorliegenden Analyse acht Wochen nach der OP. Dieser Zeitraum wurde entsprechend dem Nachbehandlungsschema (6–8 Wochen) in der Humanmedizin gewählt. Ein Großteil der Tierstudien zu diesem Thema nutzte einen identischen Zeitraum (Forriol et al. 2015; Kopf et al. 2010; Becker et al. 2004). Bei der Beurteilung der Heilung avaskulärer Meniskusrisse beim Schwein erwies sich der Zeitraum von acht Wochen als geeignet, da nach dieser Zeit keine weiteren makroskopischen Veränderungen beobachtet wurden (Dutton et al. 2010). Dagegen bildete sich in einem Hundemodell sechs Wochen nach Setzen eines artifiziellen Meniskusrisses in der avaskulären Zone zwar bei einem Teil der Tiere Reparationsgewebe vom Defektrand in den Riss, aber erst nach 24 Wochen ein defektübergreifendes Bindegewebe in allen Menisken (Cook und Fox 2007). In einer weiteren Studie zur Durchblutungssteigerung wurde erst nach zehn Wochen eine Defektfüllung mit meniskusähnlichem Gewebe in einem Hundemodell beobachtet (Dutton et al. 2010). Die Defektfüllung trat nur in der Gruppe mit zusätzlichem Radiärriss auf. Fehlte der Radiärriss wurde auch nach diesem Zeitraum keine Bildung von Narbengewebe beobachtet (Arnoczky et al. 1983). Diese Befunde lassen vermuten, dass selbst mit zusätzlichen Methoden zur gesteigerten Durchblutung ein längerer Beobachtungszeitraum interessant ist. Es bleibt fraglich, ob in der vorliegenden Studie ein längerer Therapiezeitraum die Ergebnisse in den Gruppen mit PrP- und MSCs-Applikation verbessert hätte.

Der Erfolg der makroskopischen Heilung hängt maßgeblich von der Lokalisation des Meniskusrisses ab. In einer Studie mit Kaninchen waren nach zehn Wochen 90 % der longitudinalen

Meniskusrisse in der vaskulären Zone komplett ausgeheilt, jedoch kein Riss in der avaskulären Zone (Becker et al. 2004). In einer weiteren Studie am Kaninchenmodell zeigte kein nahtversorgter longitudinaler Riss der avaskulären Zone nach 28 und 84 Tagen eine Heilungstendenz (Lee et al. 2014). Der Heilungsvorteil der vaskulären Zone im Vergleich zur avaskulären Zone wird ausschließlich der besseren Durchblutung zugeschrieben. *In vitro* kam es jedoch auch in Abwesenheit einer Synovia und Gefäßversorgung zur einer besseren Heilung in der vaskulären verglichen mit der avaskulären Zone von leporinen (Kobayashi et al. 2004), porcinen (Hennerbichler et al. 2007) und humanen (Croutze et al. 2013) Menisken. Die Autoren vermuteten einen Unterschied im intrinsischen Heilungspotential zwischen den Zonen unabhängig von der Gefäßversorgung (Kobayashi et al. 2004). Zu den potenziellen intrinsischen Faktoren zählen beispielsweise die Zellform, die Biosyntheserate und die Genexpression. Beispiele für extrinsische Faktoren sind mechanischer Stress und der Sauerstoffpartialdruck (Upton et al. 2006a; Upton et al. 2006b; Upton et al. 2006c; Melrose et al. 2005; Hellio Le Graverand et al. 2001; Collier und Ghosh 1995). Zellen der vaskulären Zone besitzen eine höhere Proliferationsrate (Spindler et al. 1995). Im caninen medialen Meniskus synthetisieren die Zellen des peripheren Drittels deutlich mehr Kollagen als die Zellen der zentralen zwei Drittel (Spindler et al. 1994). Weiter zeigen die beiden Zonen eine unterschiedliche Zusammensetzung und Struktur. Die äußere Zone bestand aus größeren Faserbündeln von Kollagen Typ 1; die innere Zone enthielt mehr Kollagen Typ 2 und Proteoglykane (Kambic und McDevitt 2005; Melrose et al. 2005; Nakano et al. 1997; Adams und Ho 1987). Diese Unterschiede in der Zusammensetzung, Struktur und dem zellulären Phänotyp sind potenziell neben der Blutversorgung am ungleichen Heilungsvermögen der Zonen beteiligt.

Auch in der klinischen Praxis gehen Risse in der avaskulären Zone mit einer schlechten Heilung und hohen Versagensraten einher (Stärke et al. 2009; Kimura et al. 1995). Ein Fokus der klinischen Forschung liegt daher auf der Verbesserung des Reparationsvermögens dieser Zone. In der vorliegenden Studie kam dazu PrP zum Einsatz. Laut Studien hat die Anwendung von PrP einen positiven Effekt auf das Heilungsvermögen von Meniskusgewebe (Freymann et al. 2016; Ishida et al. 2007). *In vitro* führte die Zugabe von PrP zu einer gesteigerten Meniskuszellproliferation und EZM-Bildung (Freymann et al. 2016; Ishida et al. 2007). *In vivo* kam es durch die Applikation von PrP (durchschnittlich 1.040.000 Tc/ μ l) in Stanzdefekte im avaskulären Teil des Kaninchenmeniskus schon nach vier Wochen zur Bildung von Reparationsgewebe und nach zwölf Wochen zu einer vermehrten Bildung von Fibrochondrozyten und EZM (Ishida et al. 2007). Histologisch waren jedoch auch nach zwölf Wochen die Grenzen zwischen dem normalen Gewebe und Reparationsgewebe noch immer sichtbar. Andere *in vivo* Studien mit Kaninchenmenisken fanden dagegen keinen positiven Effekt von PrP auf die Heilung; nach

sechs und zwölf Wochen zeigten avaskuläre Stanzdefekte oder artifiziell gesetzte longitudinale Risse nach PRP-Applikation keine bessere Heilungstendenz (Kurnaz und Balta 2020; Zellner et al. 2014). Zellner *et al.* (2014) beobachteten nach zwölf Wochen sogar eine schlechtere Heilungstendenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Kurnaz und Balta (2020) bestand zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Gruppen. Die oben erwähnte Studie mit einem positiven PrP-Effekt verwendete Stanzdefekte am Kaninchen (Ishida et al. 2007). Wie erwähnt heilen diese durch die geringeren biomechanischen Kräfte und den kleineren Defekt schneller als Risse. Andere Studien mit Kaninchen fanden keinen vorteilhaften Effekt von PrP auf Stanz- und Rissdefekte (Zellner et al. 2014) bzw. auf Rissdefekte (Kurnaz et al. 2020). Die kontroversen Ergebnisse beruhen vermutlich eher auf unterschiedlichen Defektmodellen als auf dem Einfluss des PrP. In der Studie von Zellner *et al.* (2014), in der weder bei Stanz- noch bei Rissdefekten durch eine PrP-Applikation eine bessere Heilung erzielt werden konnte, wurde die Thrombozyten-Konzentration im PrP nicht untersucht, so dass unklar bleibt, ob therapeutisch wirksame Konzentrationen appliziert wurden. Wie schon diskutiert, eignen sich zudem Großtiermodelle besser für orthopädische klinische Vorversuche. PrP wurde jedoch auch schon klinisch an humanen Menisken eingesetzt. In einer Studie mit genähten Meniskusrissen ($n=550$), von denen 46 % die avaskuläre Zone betrafen, wurde die Versagensrate innerhalb von drei Jahren postoperativ evaluiert. Die Versagensrate bei den mit PrP versorgten isolierten Meniskusrissen lag verglichen mit denen ohne PrP-Applikation signifikant niedriger (Everhart et al. 2019). Das Fehlen einer Subanalyse avaskulärer und vaskulärer Meniskusrisse limitiert die Aussagekraft der Befunde. Denkbar ist, dass die bessere Erfolgsquote in der PrP-Gruppe auf einen höheren Anteil an Rissen in vaskularisierten Zonen zurückzuführen war. Der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen (mit und ohne PrP) trat erst im dritten Jahr postoperativ auf; nach einem Jahr bestand kein Unterschied. Daher bleibt es aktuell unklar, ob und inwieweit PrP im klinischen Einsatz die Meniskusheilung verbessern kann. Daher sollte die Wirkweise von PrP an einem adäquaten Tiermodell untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit verbesserte die PrP-Applikation mit nachvollziehbar erhöhter Thrombozyten-Konzentration die Heilung der Rissdefekte am Großtiermodell Schaf nicht.

Die kontroversen Ergebnisse in den Studien beruhen möglicherweise auf unterschiedlichen Einflussfaktoren. Dazu zählen die Thrombozytenzahl im PrP, das Vorhandensein von Leukozyten, die Aktivierung der Blutplättchen und die Konzentration thrombozytärer Wachstumsfaktoren.

Die Daten zur optimalen „therapeutischen“ Thrombozyten-Konzentration im PrP für dieses Einsatzgebiet sind ebenfalls widersprüchlich. In der Literatur wird ein therapeutischer Effekt bei einer Konzentration von 1.000.000 Tc/ μ l (Marx 2004), bzw. 300.000 Tc/ μ l beschrieben

(Anitua et al. 2004). Die Verwendung von durchschnittlich 1.380.000 Tc/ μ l führte in Stanzdefekten der avaskulären Zone von Kaninchenmenisken zu einer verbesserten Heilung (Ishida et al. 2007). In einem Knochendefektmodell am Schaf hingegen beeinflussten ähnliche Thrombozyten-Konzentrationen im PrP den Heilungsverlauf nicht (Sarkar et al. 2006). Osteochondrale Defekte oviner Femurkondylen heilten unter Zugabe einer vergleichbaren Konzentration sogar schlechter als mit einem Kollagen-Hydroxyapatit-*Scaffold* allein (Kon et al. 2010a). Hinweise belegen, dass sich eine zu hohe Thrombozyten-Konzentration negativ auf die Heilung auswirkt. Beispielsweise hatten in einer *in vitro* Studie mit Tenozyten sehr hohe Konzentrationen von > 2.000.000 Tc/ μ l im PrP einen hemmenden Effekt auf die Migration, Proliferation und Kollagen-Synthese (Giusti et al. 2014). In der vorliegenden Studie sollte das autologe PrP mindestens 1.000.000 Tc/ μ l enthalten (Marx 2001). Die Thrombozyten wurden durchschnittlich um das 2,7-Fache im Vergleich zum Vollblut auf im Mittel 910.000 Tc/ μ l aufkonzentriert. Möglicherweise variiert die optimale „therapeutische“ Thrombozyten-Konzentration zwischen verschiedenen Gewebearten. Diverse *in vitro* Studien bestätigen den proliferativen Effekt von PrP auf unterschiedliche Zelltypen durch eine erhöhte Synthese von Kollagen I, II und Hyaluronsäure (Jo et al. 2012; Wang et al. 2012; Anitua et al. 2009) oder eine verstärkte Zellmotilität und -migration (Berger et al. 2019; Graziani et al. 2006). Diese Effekte waren jedoch Zelltyp-abhängig. Osteoblasten waren empfänglicher für höhere PrP-Konzentrationen als Fibroblasten (Graziani et al. 2006). Das Proliferationsmaximum lag bei Fibroblasten bei einer niedrigeren PrP-Konzentration als bei humanen MSCs (Jo et al. 2015). In Tieren und beim Menschen treten große inter- und intraindividuelle Schwankungen der Thrombozyten-Konzentrationen auf. In der vorliegenden Studie variierten die Konzentrationen im PrP zwischen 496.875 und 1.399.000 Tc/ μ l. Diese Schwankungen sind mit denen bei Sarkar *et al.* (2006) vergleichbar (423.000–1.695.000 Tc/ μ l), auf dessen Thrombozyten-Aufarbeitungsprotokoll sich die vorliegende Studie stützte. Aufgrund inter- und intraindividuelle Schwankungen der Tc-Werte im Blut (Mazzocca et al. 2012) lassen sich Schwankungen bei den PrP-Konzentrationen nicht vermeiden. In der vorliegenden Arbeit wurden im Vollblut Werte von 180.000–770.000 Tc/ μ l gemessen. Neben den Thrombozyten-Konzentrationen variieren auch die Konzentration an Wachstumsfaktoren interindividuell und bei einem Individuum im zeitlichen Verlauf (Mazzocca et al. 2012; Cho et al. 2011; Eppley et al. 2004).

Das Vorkommen von Leukozyten im PrP ist ein weiterer Einflussfaktor, der die kontroversen Ergebnisse beim PrP-Effekt auf die Meniskusheilung erklären könnte. Die Konzentrationen an Wachstumsfaktoren in Leukozyten-armen und -reichen PrP sind zwar ähnlich, jedoch besitzen Leukozyten im PrP durch die Sekretion bestimmter Zytokine (z. B. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), Interleukin-(IL)-1- β) pro-inflammatorische Eigenschaften. Es wird postuliert, dass sich diese entzündungsfördernden Faktoren negativ auf das Heilungspotential auswirken (Yin

et al. 2016; Anitua et al. 2015b; Anitua et al. 2015a; Sundman et al. 2011). Die intraartikuläre Injektion von Leukozyten-armem PrP nach Kreuzbanddefekt am Kaninchen erwies sich als chondroprotektiver als die Injektion von Leukozyten-reichem PrP (Yin et al. 2016). Leukozyten-reiches PrP zeigte in einer *in vivo* Studie am Kaninchen keinen positiven Effekt auf die Heilung horizontaler Meniskusrisse (Shin et al. 2015); da kein Leukozyten-armes PrP verwendet wurde, lässt sich nicht klären, ob dieses die Heilung verbessert hätte (Ferretti et al. 2006). Zur Minimierung möglicher kataboler Effekte der Leukozyten wurde in der vorliegenden Arbeit Leukozyten-armes PrP verwendet. Möglicherweise haben aber auch andere Bestandteile des PrP einen katabolen Effekt. *In vitro* wurde nach Kultivierung von Meniskuszellen mit PrP eine Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMPs) beobachtet (Lee et al. 2016). Zur Generierung eines mit einer Meniskusverletzung vergleichbaren Milieus wurde den Zellen IL-1 α als inflammatorischer Reiz zugesetzt. Analysiert wurde die Expressionsrate von Kollagen I und II sowie Aggrecan. Mit IL-1 α vorbehandelte und mit PrP kultivierte Meniskuszellen zeigten eine signifikant niedrigere Expression von Kollagen II und Aggrecan als Zellen, die ohne PrP kultiviert wurden, oder die nicht mit IL-1 α vorbehandelt wurden. Diese Ergebnisse deuten auf einen heilungshemmenden Effekt des PrP hin, der durch katabole Zytokine verstärkt wird. Im darauffolgenden *in vivo* Teil der Studie an Kaninchenstanzdefekten führte die Applikation von PrP zu keiner verbesserten Heilung des Meniskugewebes, sondern zu einer gesteigerten Proteoglykanolyse (Lee et al. 2016). Danach scheint die Applikation von PrP in einen Defekt mit inflammatorischem Milieu, wie es bei Meniskusverletzungen vorliegt, eher kontraproduktiv hinsichtlich der Heilungschancen zu sein. Das Design und die Schlussfolgerungen der Studie von Lee *et al.* lassen sich nur bedingt auf die klinischen Gegebenheiten einer Meniskusnaht übertragen. Meniskusrisse beim Menschen werden oft erst Wochen nach dem Trauma operiert. Das Milieu in der Akutphase direkt nach einem Kniegelenkstrauma und zu einem späteren Zeitpunkt unterscheidet sich maßgeblich im Hinblick auf das Vorkommen kataboler Zytokine (Bigoni et al. 2016). In ihrer klinischen Studie verglichen Bigoni *et al.* das Vorkommen kataboler Zytokine zu drei verschiedenen Zeitpunkten: (1) akut (Riss des vorderen Kreuzbandes), (2) präoperativ (zum Zeitpunkt der Kreuzband-OP, einen Monat nach Trauma) und (3) postoperativ (einen Monat nach der OP). Als Kontrollgruppe dienten Patienten mit chronischen Kreuzbanddefekten. Die Autoren fanden deutlich erhöhte Level kataboler Zytokine in der Akutphase. Die Level zum präoperativen Zeitpunkt lagen deutlich niedriger und glichen denen in der Kontrollgruppe und damit dem Zustand eines chronischen Defektes. Daher ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der Meniskusnaht ein weniger kataboles Milieu vorherrscht als im Moment des Meniskusrisses und dass unter diesen Bedingungen die anabolen Eigenschaften des PrP möglicherweise überwiegen.

Der anabole Effekt des PrP beruht vor allem auf der Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten (Cho et al. 2011; Sundman et al. 2011; Kon et al. 2010b; Ishida et al. 2007). Auf eine Quantifizierung der Wachstumsfaktoren im PrP wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da zahlreiche Studien erhöhte Konzentrationen im PrP nachgewiesen haben (Cho et al. 2011; Sundman et al. 2011; Kon et al. 2010a; Ishida et al. 2007). Die Freisetzungskinetik dieser Wachstumsfaktoren ins Gewebe spielt eine große Rolle. Im Rahmen der Gerinnung werden die Wachstumsfaktoren im PrP zu 95 % durch die Thrombozyten freigesetzt (Marx 2004). Zur Verhinderung einer vorzeitigen und unkontrollierten Aktivierung wurden den Ansätzen das Antikoagulanz ACD-A zugesetzt, das im Vergleich zu den anderen verfügbaren Antikoagulanzen bei der PrP-Gewinnung die beste Wirkung zeigte (Hua et al. 2015). Das PrP sollte unmittelbar nach der Herstellung appliziert werden, um die Wirkung der Wachstumsfaktoren im Gewebe sicherzustellen. Daher wurde in der vorliegenden Studie das frisch hergestellte PrP binnen weniger Minuten in den Meniskusriss verbracht und parallel die Thrombozyten ausgezählt. Die Zählung erfolgte manuell, da eine automatisierte Auszählung logistisch nicht zu realisieren war. Beide Methoden sind aber gleichwertig (Woodell-May et al. 2005). Auch die Agglutinate waren mikroskopisch gut auszählbar. Auf eine exogene Aktivierung z. B. durch Calcium oder Thrombin wurde verzichtet, da das applizierte PrP mit dem Kollagen Typ I des *Scaffolds* und mit den Kollagenfasern des Meniskus bei Applikation in Kontakt kam und somit endogen aktiviert wurde (Pietrzak und Eppley 2005). Diese Vorgehensweise entspricht der zweier vorangegangener *in vivo* Studien zum Einfluss von PrP auf die Meniskusheilung (Zellner et al. 2014; Ishida et al. 2007). Ein zusätzlicher Grund für den Verzicht auf eine Zugabe von Thrombin oder Calcium war das unklare Verhalten der ebenfalls in der vorliegenden Studie verwendeten MSCs auf diese Substanzen.

Neben Thrombozyten stellen MSCs eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Heilung avaskulärer Meniskusrisse dar. MSCs kommen zum einen wegen ihrer Fähigkeit der Sezernierung von Wachstumsfaktoren und zum anderen wegen ihrer Funktion als Reparationszellen zum Einsatz. MSCs schütten in Abhängigkeit vom Umgebungsmilieu Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, die parakrin und autokrin wirken. Beispielsweise haben sie chemotaktische Effekte (Caplan und Dennis 2006; Haynesworth et al. 1996). Die Wirkung der Moleküle wurde in verschiedenen Ischämie-Modellen nachgewiesen (Tang et al. 2004; Chen et al. 2003). Im Nervengewebe bewirkte eine intravenöse Applikation von MSCs eine verminderte Narbenbildung und Apoptose, eine vermehrte Angiogenese und FGF- β -Expression sowie eine Stimulation intrinsischer Zellen zur Wiederherstellung von Neuronenbahnen nach artifiziell induziertem zerebralem Gefäßverschluss (Chen et al. 2003). Diese Befunde lassen vermuten, dass positive Effekte der MSCs über die Sezernierung bioaktiver Mediatoren ausgelöst werden

(Tang et al. 2004; Chen et al. 2003; Haynesworth et al. 1996). MSCs verringern über die Inhibition der Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Matrixmetalloproteasen (MMPs) nach einer Meniskusverletzung im Kniegelenk den Knorpelschaden (Saulnier et al. 2015). Als Reparationszellen verbessern die MSCs am Meniskusgewebe die Heilung (Dutton et al. 2010; Angele et al. 2008; Agung et al. 2006). In einem Rattenmodell ließ sich nach Injektion von *green fluorescent protein* (GFP) markierten MSCs die Ansiedlung der Zellen im avaskulären Meniskusdefekt und eine gesteigerte EZM-Produktion nachweisen (Agung et al. 2006). Nachteilig war eine übermäßige freie Narbenbildung im Kniegelenk bei Verwendung höherer MSC-Konzentrationen. In zwei *in vivo* Studien bildete sich nach Zugabe von MSCs Meniskus-ähnliches Defektgewebe (Dutton et al. 2010; Angele et al. 2008). Beim Hund verbesserte die Applikation von BM-MSCs die Heilung longitudinaler Meniskusrisse der rot-weißen Zone (Abdel-Hamid et al. 2005). Demnach heilten mit BM-MSCs nach zwölf Wochen 75 % der Risse komplett aus, ohne dagegen nur 50 % (Abdel-Hamid et al. 2005). Im porcinen Modell heilten nach acht Wochen durch die lokale Applikation von MSCs mit Fibrinkleber und anschließender Naht 75 % der Meniskusrisse makroskopisch vollständig aus, zeigten aber eine ungenügende biomechanische Stabilität. In der Kontrollgruppe, die mit Fibrinkleber und Naht versorgt wurde, kam es zur partiellen Heilung bei 36 % der Meniskusrisse, und in keinem Fall zu einer kompletten Ausheilung (Dutton et al. 2010). Bei der Entfernung der *Pars intermedia* des Kaninchenmeniskus betrug die Heilungsrate nach Gabe chondrogen differenzierter MSCs 73 % der Menisken versus 18 % ohne MSC-Applikation (Angele et al. 2008). Auch am Schafmodell heilten 60 % der Meniskusrisse nach lokaler Applikation eines Kollagen-*Scaffolds* und BM-MSC mit anschließender Naht aus (Whitehouse et al. 2017). In den Kontrollgruppen (Naht und Naht-*Scaffold*) kam es nach dreizehn Wochen bei keinem der Risse zu einer Heilung. Unabhängig von der MSC-Implantation waren nach 24 Wochen bei allen Menisken noch mikroskopisch messbare Läsionen nachweisbar. Das frühzeitig auftretende Reparationsgewebe war möglicherweise nicht stabil genug, um den biomechanischen Ansprüchen langfristig zu genügen (Whitehouse et al. 2017). Diese Arbeit am Schafmodell diente als Vorversuch für eine klinische Studie an fünf Patienten. Dabei wurden Risse der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* mit BM-MSCs, einem Kollagen-*Scaffold* und einer vertikalen Matratzennaht versorgt. Drei Patienten (60 %) waren nach 24 Monaten symptomlos ohne auffällige Magnetresonanztomografie-(MRT)-Befunde. In zwei Fällen (40 %) war nach Heilungsversagen oder einem erneuten Riss eine partielle Meniskektomie 15 Monate nach der Implantation erforderlich (Whitehouse et al. 2017). Die niedrige Fallzahl von fünf Patienten lässt eine aussagekräftige Schlussfolgerung und einen Vergleich mit anderen Studien nur bedingt zu. In einer Übersichtsarbeit, in die 70 Studien inkludiert wurden (Paxton et al. 2011), betrug die durchschnittliche Re-OP-Rate nach Meniskusnaht 16,5 %. Die Rate lag deutlich niedriger als in den oben genannten Studien

mit MSC-Applikation. Ursachen für die schlechten Heilungsraten in den Studien trotz MSC-Applikation sind möglicherweise die Herkunft, die Qualität und die Applikationsart der MSCs.

Der Einfluss der Herkunft und der Vordifferenzierung der MSCs auf den Heilungserfolg belegen Studien an Tiermodellen (Zellner et al. 2013; Pabbruwe et al. 2010; Zellner et al. 2010; Zscharnack et al. 2010). Bei Knorpelstanzdefekten oviner Femurkondylen und an avaskulären Rissen von Kaninchenmenisken waren chondrogen differenzierte MSCs gegenüber undifferenzierten MSCs in Bezug auf die Qualität des gebildeten Defektgewebes überlegen (Zellner et al. 2013; Zscharnack et al. 2010). Bei der Applikation eines mit chondrogen differenzierten MSCs beladenen *Scaffolds* in einen artifiziell gesetzten Meniskusdefekt am Kaninchen war das gebildete Reparationsgewebe deutlich belastbarer, aber schlechter in das umgebende Gewebe integriert als bei Verwendung von undifferenzierten MSCs (Zellner et al. 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine *in vitro* Studie, wo der Einsatz eines mit undifferenzierten MSCs bestückten Kollagen-*Scaffolds* zu einer Integration beider Rissoberflächen und einer Verbesserung der Reißfestigkeit des Reparationsgewebes führte. Eine vorangegangene Differenzierung zu chondrogenen MSCs resultierte in einer schlechteren Integration in das umliegende Gewebe (Pabbruwe et al. 2010). Diese Befunde lassen vermuten, dass chondrogen differenzierte MSCs in Bezug auf die Bildung von Reparationsgewebe den undifferenzierten MSCs überlegen sind, jedoch bei der Integration in das umliegende Gewebe schlechter abschneiden. In der vorliegenden Studie wurden undifferenzierte BM-MSCs eingesetzt, die zu den am häufigsten verwendeten Zelltypen gehören (Yu et al. 2015). Die isolierte Applikation autologer undifferenzierter BM-MSCs verbesserte die Meniskusheilung in der vorliegenden Studie nicht. Hingegen führte in einem Kaninchenmodell die Applikation von BM-MSCs zur Ausbildung eines fibrokartilaginärem Bindegewebes nach partieller Meniskektomie (Walsh et al. 1999). In dieser Arbeit wurden wie in der vorliegenden Studie keine MSCs mit chondrogener Differenzierung verwendet, sodass unklar bleibt, ob eine chondrogene Vordifferenzierung die Meniskusheilung verbessert hätte. Eine weitere vielversprechende MSC-Quelle ist die Synovia, die eine zentrale Rolle beim natürlichen Heilungsprozess von Meniskusrissen spielt und MSCs mit hohem chondrogenen Potential enthält (Yoshimura et al. 2007; Sakaguchi et al. 2005). Die Genexpression synovialer MSCs ähnelt der von Meniskuszellen deutlich mehr als die Genexpression von BM-MSCs (Segawa et al. 2009). Synoviale MSCs haben *in vitro* außerdem den Vorteil eines höheren Proliferationspotentials (Yoshimura et al. 2007). Histologisch bestand *in vivo* jedoch kein Unterschied in der Qualität des Reparationsgewebes am murinen Meniskusriss oder an Knorpeldefekten von Kaninchen nach Gabe von synovialen MSCs und BM-MSC (Horie et al. 2009; Koga et al. 2008). Zudem lassen sich BM-MSCs unter klinischen Bedingungen deutlich einfacher gewinnen.

Neben der isolierten Anwendung von PrP und MSCs sollte in der vorliegenden Studie analysiert werden, ob eine Kombination die heilungsfördernden Eigenschaften der beiden Komponenten potenziert und zu einer Heilung des Meniskusrisses führt. Die vom PrP und von den MSCs sezernierten Signalmoleküle zeigen vergleichbare Effekte auf Zellen. Die Förderung der Chemotaxis, der Proliferation, der Differenzierung und der Interaktion mit anderen Zellen kann zu einer Regeneration von defektem Gewebe führen (Anitua et al. 2004). Der additive Effekt einer Kombination aus PrP und MSCs wurde *in vitro* nachgewiesen. Die Applikation von PrP steigerte die Proliferation der MSCs und die EZM-Produktion (Goedecke et al. 2011). Ein heilungsfördernder Effekt der kombinierten Applikation von PrP und MSCs wurde *in vivo* an Knochen, Knorpel und an Sehnen nachgewiesen (Dehghan et al. 2015; van Pham et al. 2013; Uysal et al. 2012; Lucarelli et al. 2005). In einem Hundemodell steigerte die Injektion von PrP und MSCs die Bildung und Qualität des Knochengewebes verglichen mit der alleinigen Applikation von PrP (Dehghan et al. 2015). Am Schafmodell verbesserte die Kombination aus PrP und MSCs im Kollagen-Carrier die Vaskularisation, die Knochenheilung und die Integration des Allotransplantates in den Knochen (Lucarelli et al. 2005). Ein Gel aus adipogenen MSCs und PrP verbesserte die Festigkeit und erhöhte die VEGF-Konzentrationen nach Achillessehnennaht beim Kaninchen (Uysal et al. 2012). Auch an Kaninchenmenisken beeinflusste die Kombination von BM-MSCs und PrP die Wundheilung positiv. Durch die zusätzliche Gabe von BM-MSCs in ein PrP-Gel heilten die Stanzdefekte deutlich schneller (Liu et al. 2019). Die Aussagekraft dieser positiven Effekte ist jedoch kritisch zu bewerten. Die bereits für den isolierten Einsatz von PrP und MSCs diskutierten Limitationen (Gewebe, Tier- und Defektmodelle) treffen auch auf die kombinierte Applikation zu. In einer *in vivo* Untersuchung oviner Beugesehnenverletzungen war kein synergistischer Effekt von PrP und MSCs nachweisbar (Martinello et al. 2013). Nach Setzen einer Läsion durch Injektion von Kollagenase in die Beugesehne erhielten die Tiere PrP mit einer medianen Konzentration von 882.000 Tc/ μ l und/oder MSCs aus dem peripheren Blut. In der Kontrollgruppe wurde auf jegliche Applikation verzichtet. Nach 30 und 120 Tagen waren keine synergistischen Effekte von PrP und MSCs auf die Heilung nachweisbar. Diese Studie unterscheidet sich von der vorliegenden Arbeit in wesentlichen Aspekten. In Sehnen und in Menisken besteht die EZM aus Kollagen. In Sehnen dominiert aber stets Kollagen Typ I, wobei in Menisken die Kollagen-Verteilung regional variiert (Kannus 2000); in der vaskulären Zone dominiert Kollagen Typ I und in der avaskulären Zone Kollagen Typ II (Makris et al. 2011). Im Hinblick auf die Zellularität bestehen Sehnen vorrangig aus Tenozyten, Menisken dagegen aus Fibrochondrozyten. Auch die Methodik der MSC-Applikation unterschied sich. In der Studie von Martinello *et al.* wurden die MSCs aus Vollblut gewonnen und anschließend injiziert; in der vorliegenden Arbeit wurden BM-MSCs dagegen mittels *Scaffold* appliziert. Weiter wurden die Beugesehnen nach Setzen der Läsion anders als in der vorliegenden Arbeit nicht genäht. Trotz dieser Unterschiede konnte ein positiver Effekt der isolierten

Applikation von PrP oder MSCs auf das Heilungsvermögen von Sehnen nachgewiesen werden, was einen Vergleich mit Meniskusgewebe prinzipiell zulässt (Zhou et al. 2015; Yokoya et al. 2012). Ungeachtet der heterogenen Ergebnisse in Tierversuchen wurde die Kombination von PrP und MSCs bereits klinisch eingesetzt. In einer prospektiven Kohortenstudie zu Osteotomien nach Varusfehlstellung förderte die Kombination beider Komponenten die Knorpelbildung (Koh et al. 2014). Zum Zeitpunkt der Implantatentfernung hatte sich nach kombinierter intraartikulärer Applikation von PrP und adipogenen MSCs (n=21) signifikant mehr Knorpel gebildet als nach einer alleinigen PrP-Injektion (n=23). Klinische Untersuchungen zum synergistischen Effekt von PrP und MSCs auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse wurden bis *dato* nicht veröffentlicht. Weiter fehlen vergleichbaren Studien am Großtiermodell. In der vorliegenden Studie verbesserte die Kombination von lokal appliziertem PrP und MSCs die makroskopische Heilung von Rissen in der avaskulären Zone der Menisken beim Schaf nicht. Im Rissbereich der PrP+MSC-Gruppe war jedoch eine signifikant höhere Zellzahl im Vergleich zur reinen Naht-Gruppe nachweisbar, was auf eine potenziell gesteigerte Zellmigration und -proliferation hindeutet. Die erhöhte Zellularität könnte auf einer potenzierten parakrinen Wirkung des PrP und der MSCs beruhen, die jedoch nicht in der Lage war das schlechte Heilungsvermögen aufgrund der Avaskularität zu kompensieren und die zu Heilung verbessern.

Eine verbesserte Durchblutung stellt daher einen essenziellen Therapieansatz für die Meniskusheilung dar. Bei Reparationsprozessen führen lokale Blutungen zur Einwanderung von für die Heilung relevanten Zellen und erhöhen die Konzentration biochemischer Mediatoren. Daher wird das schlechte Heilungsvermögen der avaskulären Zone auf die unzureichende Vaskularisation zurückgeführt (Lee et al. 2014; Becker et al. 2004). Die Förderung des Heilungsprozesses durch eine Verbesserung der Gefäßversorgung der avaskulären Zone wurde in *in vivo* Studien an Hunden untersucht. Dabei wurde von einem longitudinalen Riss in der avaskulären Zone zusätzlich ein transmuraler Radiärriss nach peripher in die vaskuläre Zone gesetzt. In den Rissen hatte sich nach zehn Wochen fibröses Narbengewebe mit unorganisierten Kollagenfasern gebildet. In den Rissen ohne zusätzlichen Radiärriss blieb die Bildung von Narbengewebe aus (Arnoczky et al. 1983). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine weitere Studie am Meniskus des Hundes (Cook et al. 2007). Dazu wurde nach Vorbohrung ein resorbierbares Rohr als Transportkanal für heilungsfördernde Mediatoren von der vaskulären Zone hin zum avaskulären longitudinalen Meniskusriss implantiert und der Riss anschließend vernäht. Vier von neun Rissen heilten komplett aus, die anderen fünf zeigten nach zwölf und 24 Wochen eine partielle Heilung. In der Gruppe ohne Rohr war bei keinem Tier eine Heilung feststellbar. Die Implantation des resorbierbaren Rohres wirkte sich jedoch nachteilig auf die biomechanische Belastbarkeit der Menisken aus (Cook et al. 2007). Eine weitere Möglichkeit der Verbesserung der lokalen Vaskularisation im Riss ist die Implantation eines gestielten Lappens der

Membrana synovialis (Ghadially et al. 1986). Die Implantation eines solchen Lappens in einen horizontalen Riss am Schafsmeniskus führte drei Monate nach der Vernähung zu einer Heilung der Risse. Histologisch war in den Rissen Kollagen-armes Knorpelgewebe nachweisbar. In der Vergleichsgruppe ohne den Lappen der *Membrana synovialis* wurde keine Heilung beobachtet (Ghadially et al. 1986). Die gesetzten Risse entsprachen jedoch nicht den Gegebenheiten humaner traumatischer Meniskusrisse und die Qualität des Reparaturgewebes war mangelhaft. Aufgrund der vielen Nachteile wurde in der vorliegenden Studie auf die Anwendung dieser Methoden zur Durchblutungssteigerung verzichtet. Stattdessen sollte die Angiogenese durch die Komponenten PrP und MSCs verbessert werden.

Das angiogenetische Potential von MSCs beruht auf ihrer Funktion als Reparaturzellen (direkter Effekt) und auf der Sekretion parakrin wirkender, angiogenetischer Faktoren (indirekter Effekt) (Baraniak und McDevitt 2010; Kinnaird et al. 2004b; Kinnaird et al. 2004a). Die in diesem Kontext wichtigsten Faktoren sind FGF- β , VEGF, TGF- β , PDGF, Angiopoetin-1, der Plazenta-Wachstumsfaktor (PGF), IL-6 und das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (Tao et al. 2016). Diese Faktoren haben einen positiven Effekt auf die Zelldifferenzierung sowie auf das Überleben, die Neubildung und die Reifung von Gefäßen (Yu et al. 2015; Caplan et al. 2006; Zwaginga und Doevendans 2003). Die direkten und indirekten Effekte von MSCs wurden in Infarkt- und Ischämie-Modellen *in vivo* untersucht (Kinnaird et al. 2004b; Tang et al. 2004; Tomita et al. 2002), wobei die Injektion von BM-MSCs zu einer signifikant gesteigerten Gefäßdichte, einer erhöhten VEGF-Konzentration, einer verbesserten Perfusion und einer geringeren Apoptose führte (Tang et al. 2004). Weiter wurde das angiogenetische Potential von MSCs an Meniskuszell-Pellets der vaskulären und avaskulären Zone von Kaninchen, die in eine Hautfaltenkammer von Mäusen transplantiert wurden, untersucht (Koch et al. 2017). Die in einem Hyaluron-Gelatin-*Scaffold* applizierten MSCs induzierten in beiden Meniskuszell-Pellets eine Angiogenese, wobei diese in den vaskulären Pellets schneller erfolgte (Koch et al. 2017). Weiter traten signifikante Unterschiede beim Einsatz undifferenzierter und chondrogen vordifferenzierter BM-MSCs auf. Die Applikation der chondrogen vordifferenzierten MSCs führte zu einer deutlich ausgeprägteren Angiogenese und zu einer signifikant niedrigeren Konzentration des anti-angiogenetischen Faktors Endostatin (Koch et al. 2017). In der vorliegenden Studie verbesserte die isolierte Applikation von MSCs die Angiogenese nicht; die Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen war in der MSC-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht erhöht. Eine mögliche Ursache für diesen Befund ist das niedrigere angiogenetische Potential undifferenzierter BM-MSCs, das durch eine chondrogene Vordifferenzierung eventuell hätte verbessert werden können. Die von den MSCs sezernierten pro-angiogenetischen Faktoren scheinen je nach Herkunft zu variieren. Da MSCs aus adipogenem Gewebe mehr VEGF-A

und VEGF-D als MSCs anderer Herkunft ausschütten, eignen sie sich potenziell eher zur Steigerung der Angiogenese (Hsiao et al. 2012). Neben pro-angiogenetischen spielen aber auch anti-angiogenetische Faktoren eine Rolle. In der oben aufgeführten Studie zeigten die mit undifferenzierten BM-MSCs behandelten Meniskuszellen höhere Konzentrationen des anti-angiogenetischen Faktors Endostatin (Koch et al. 2017). Dieser Effekt könnte auch in der vorliegenden Arbeit den pro-angiogenetischen Effekten der MSCs entgegengewirkt haben. Zudem wird die Endostatin-Expression durch hydrostatischen Druck gefördert (Pufe et al. 2003). Die Gegebenheiten in dem Tiermodell bei Koch *et al.* entsprechen vermutlich nicht den Verhältnissen im Kniegelenk. Es ist anzunehmen, dass nach einem Meniskusriss ein deutlich höherer hydrostatischer Druck vorliegt als in der Hautfaltenkammer und daher auch höhere Endostatin-Konzentrationen.

Neben MSCs besitzt auch das PrP durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (FGF- β , TGF- β , PDGF), Zytokinen und angiogenetischen Faktoren (VEGF, Angiopoetin) ein angiogenetisches Potential (Kakudo et al. 2008; Anitua et al. 2004). *In vitro* Analysen belegen, dass die Applikation von PrP die Proliferation, Migration und Tubulusbildung von Endothelzellen anregt (Kakudo et al. 2014; Bir et al. 2009). In *in vivo* Experimenten mit subkutan implantierten Angioreaktoren (*in vivo* Angiogenese-assay, Silikonzylinder) war nur bei Verwendung von PrP-Medium eine Gefäßbildung im Angioreaktor nachweisbar; mit PrP-freiem Medium blieb der Zylinder leer (Kakudo et al. 2011). Murine Ischämie-Modelle bestätigen diese Ergebnisse (Kurita et al. 2011; Bir et al. 2009), indem eine PrP-Applikation mittels Gelatine-Hydrogel die Gefäßdichte im ischämischen Gewebe deutlich erhöhte (Kurita et al. 2011; Bir et al. 2009). Im klinischen Kontext wurde versucht, die Angiogenese durch PrP in einem schlecht durchbluteten Hauttransplantat zu verbessern (Kakudo et al. 2011). In einem Fallbericht wurde in die Hälfte eines Hauttransplantates PrP injiziert; die andere Seite und normale Haut dienten als Kontrollen. 13 Tage nach Transplantation war in den Stanzbiopsien des PrP-behandelten Teil des Transplantates eine signifikant größere Anzahl an Blutgefäßen nachweisbar als in den Kontrollen (Kakudo et al. 2011). Am Meniskusgewebe wurde der Einfluss von PrP auf die Angiogenese bis *dato* noch nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Angiogenese mittels Faktor VIII-Färbung untersucht. Die isolierte Applikation von PrP führte zu keiner gesteigerten Angiogenese im Meniskusgewebe. Wie oben diskutiert, wirken im Knie nach einem Meniskusriss auch anti-angiogenetische Faktoren wie Endostatin (Pufe et al. 2004; O'Reilly et al. 1997) und Angiostatin (O'Reilly et al. 1999), deren Expression durch einen erhöhten hydrostatischen Druck verstärkt wird (Pufe et al. 2003). Die Menisken sind neben biochemischen auch biomechanischen Einflüssen ausgesetzt, da sie eine besondere Rolle bei der Lastenverteilung im Kniegelenk spielen (Fukubayashi et al. 1980). Zusätzlich besitzen sie eine schockabsorbierende Funktion, die eine Schutzfunktion für das Kniegelenk darstellt. Für

diese Funktionen ist eine bestimmte Struktur erforderlich. Im Meniskus bilden Kollagen-Fibrillen und Glykosaminoglykane eine funktionelle Einheit (Petersen et al. 1999). Die Einwanderung von Blutgefäßen kann den biomechanischen *status quo* des Meniskusgewebes erheblich stören. Damit erfüllen die anti-angiogenetischen Faktoren eine physiologische Schutzfunktion für die Menisken. Eine Neoangiogenese ist aus Sicht der Funktionalität der Menisken eventuell nicht erwünscht, auch wenn die Bildung von Gefäßen die Voraussetzung für eine bessere Wundheilung darstellt.

Eine isolierte Applikation von PrP oder MSCs reicht nicht aus, die Hürden, die einer Angiogenese avaskulärer Meniskusrisse entgegenstehen, zu überwinden. Daher wurde versucht, durch die Applikationen beider Komponenten die Angiogenese zu verbessern. Die synergistische Wirkung von PrP und MSCs auf die Angiogenese strahleninduzierter Hautwunden wurde bereits *in vitro* und *in vivo* belegt (Myung et al. 2020). Die mit PrP kultivierten MSCs aus Nabelschnurblut zeigten im Vergleich zum PrP oder zu den MSCs eine signifikant höhere Expression der angiogenetischen Faktoren VEGF und Endothelin-1, sowie der VEGF-aktivierenden Peptidase Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA). Die Konzentration der drei Faktoren im PrP+MSC-Medium lag höher als die Summe der Konzentrationen aus dem PrP- und MSC-Medium und übertraf die Konzentration im MSC-Medium um das Vierfache. Die pro-angiogenetischen Effekte von PrP und MSCs addieren sich demnach nicht nur, sondern potenzieren sich in ihrer Wirkweise. Weiterhin erhöhte das Medium aus MSCs und PrP verglichen mit dem MSC-Medium ohne PrP die mittels *tube-like structure formation assay* (*in vitro* Nachweis der Angiogenese) nachgewiesene Gefäßbildung signifikant (Myung et al. 2020). *In vivo* wies dieselbe Arbeitsgruppe eine signifikant verbesserte Reepithelialisierung und Wundheilung von strahleninduzierten Hautdefekten an Mäusen durch die Applikation mit PrP kultivierten MSCs nach (Myung et al. 2020); bei der Applikation von MSCs allein blieb dieser Effekt hingegen aus (Lee et al. 2017). Die VEGF-Expression im Defektgewebe war drei Wochen nach Applikation von PrP+MSC-Medium im Vergleich zum isolierten PRP- oder MSC-Medium signifikant erhöht (Myung et al. 2020). Diese Ergebnisse zeigen teilweise Parallelen zur vorliegenden Arbeit. Die Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen als Marker der Angiogenese war in der PrP+MSC-Gruppe in den gesamten operierten Menisken signifikant und im rissnahen Bereich im Vergleich zu den kontralateralen Menisken erhöht. Die isolierte Applikation dieser Komponenten beeinflusste die Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen nicht. Die Anzahl VEGF-A-positiver Zellen war dagegen weder zwischen den Gruppen PrP, MSC und PrP+MSC noch zwischen den operierten und kontralateralen Menisken der PrP+MSC-Gruppe signifikant verschieden. Mögliche Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind der Zeitpunkt der Probenentnahme (3 Wochen vs. 8 Wochen), die unterschiedlichen Gewebe (Haut vs. Me-

niskus) sowie die verschiedenen MSC-Quellen (MSCs aus Nabelschnurblut vs. undifferenzierte BM-MSCs). Aktuell fehlen Studien zum Vergleich der beiden MSC-Quellen in Bezug auf die Meniskusheilung. In einem Übersichtartikel zum Einsatz von MSCs unterschiedlicher Herkunft auf die Heilung von Hautwunden zeigten alle MSCs unabhängig von ihrer Herkunft positive Auswirkungen; die MSCs aus Nabelschnurblut waren den anderen MSCs nicht überlegen (Sierra-Sánchez et al. 2021). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Verwendung von MSCs aus Nabelschnurblut in der vorliegenden Arbeit einen Vorteil gehabt hätte. Außerdem scheint das PrP auf MSCs unterschiedlicher Herkunft unterschiedlich zu wirken. In der oben beschriebenen *in vitro* Studie führte die Kultivierung mit PrP bei MSCs aus Nabelschnurblut zu einer Steigerung der VEGF-Expression (Myung et al. 2020), bei adipogenen MSCs dagegen zu einer Inhibition der VEGF-Expression (van Pham et al. 2013). Das PrP könnte demnach auch eine hemmende Wirkung auf die in der vorliegenden Studie verwendeten BM-MSCs und deren VEGF-Expression gehabt haben. Weiterhin sollte bedacht werden, dass das PrP und die MSCs ohne vorangegangene gemeinsame Kultivierung parallel in den Meniskusriss appliziert wurden. Auch die bereits diskutierten unterschiedlichen Milieus und damit auch katabolen Gegebenheiten in Hautwunden und in Kniegelenken nach Meniskusnaht, u. a. durch biomechanisch wirkende Kräfte und die damit verbundenen Expression kataboler Zytokine, könnten die abweichenden Effekte auf die VEGF-Expression erklären.

Die Rolle von VEGF bei der Angiogenese im Rahmen der Heilung avaskulärer Meniskusrisse ist nicht vollständig geklärt. Trotz der erhöhten VEGF-Konzentration nach Meniskusrissen in der avaskulären Zone (Becker et al. 2004) blieb ein Einwachsen von Gefäßen und die Heilung aus (Becker et al. 2002). Eine exogene Applikation von VEGF in Meniskusrisse der avaskulären Zone verbesserte die Heilung ebenfalls nicht (Kopf et al. 2010; Petersen et al. 2007; Petersen et al. 2005). Beim Einsatz eines mit VEGF ummantelten Nahtmaterials wurden im gesamten Meniskus signifikant mehr Faktor VIII-positive Zellen nachgewiesen als ohne Ummantelung (Petersen et al. 2007). Die Bildung funktionstüchtiger Gefäße und eine makroskopische Heilung hingegen blieb wie in der vorliegenden Studie aus. Im Gegensatz dazu erhöhte die VEGF-Applikation in anderen avaskulären Gewebe, z. B. in der Cornea (Phillips et al. 1994), die Gefäßneubildung und an genähten Achillessehnen zwei Wochen postoperativ die Zugfestigkeit (Zhang et al. 2003). Da der positive Effekt auf die Zugfestigkeit nach vier Wochen nicht mehr nachweisbar war, schlussfolgerten die Autoren, dass VEGF nur die frühe Heilung fördert (Zhang et al. 2003). Dieser Befund passt zu den Ergebnissen einer anderen Studie, in der eine hohe VEGF-Expression in akuten Hautwunden auftrat, in chronischen Hautwunden dagegen eine signifikant erniedrigte (Jiang et al. 2014). Studien an Menisken bestätigen diese Ergebnisse (Ibán et al. 2014; Becker et al. 2004). Nach einem VEGF-Maximum am siebten (Becker

et al. 2004) bzw. vierzehnten Tag (Ibán et al. 2014) nach Setzen eines Risses in der avaskulären Zone nahm die Expression stetig wieder ab. Aufgrund der Datenlage wurde für die vorliegende Studie angenommen, dass bei einer kombinierten Applikation von PrP und MSCs nicht nur initial erhöhte Mengen VEGF aus PrP und MSCs freigesetzt werden, sondern dass auch ortsständige Zellen zu einer vermehrten und verlängerten Expression von Wachstumsfaktoren und insbesondere VEGF angeregt werden. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Acht Wochen postoperativ war nach der kombinierten Gabe von PrP und MSCs keine erhöhte Anzahl VEGF-A-positiver Zellen in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken nachweisbar. Die Anzahl der VEGF-A-positiven Zellen unterschied sich auch nicht von der in den anderen Therapie- und Kontrollgruppen. Die erhöhte Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen in der PrP+MSC-Gruppe deutet auf einen pro-angiogenetischen Effekt dieser Kombination auf das Meniskusgewebe hin. Eine potenziell aufgetretene temporäre Erhöhung der VEGF-Expression ortsständiger Zellen durch PrP und MSCs war zum Zeitpunkt der Probenengewinnung acht Wochen postoperativ nicht mehr nachweisbar. Daher bleibt unklar, ob und inwieweit die Applikation von PrP und MSCs die VEGF-Expression kurzfristig erhöht.

Neben VEGF ist der proliferativ und angiogenetisch wirkende Faktor PDGF maßgeblich an Wundheilungsprozessen beteiligt. Der positive Effekt von PDGF auf den Heilungsverlauf von schlecht vaskularisiertem Gewebe wie Sehnen (Meier Bürgisser et al. 2020; Evrova und Buschmann 2017; Qiu et al. 2014), Bänder (Weiler et al. 2004; Letson et al. 1994) und Menisken (Lee et al. 2018; Stewart et al. 2007; Bhargava et al. 2005) ist *in vivo* und *in vitro* gut dokumentiert. *In vitro* zeigten bovine Menisken zwei und vier Wochen nach einem artifiziell gesetzten Riss in der avaskulären Zone unter PDGF-Inkubation eine signifikant höhere Zellproliferation, eine deutliche Integration des Meniskusgewebes in den *Scaffold* und eine höhere Zugfestigkeit verglichen mit der Kontrollgruppe (Lee et al. 2018). Zudem nahm die Kollagen-1-Synthese oviner Fibrochondrozyten des Meniskus *in vitro* nach Zugabe von PDGF- β nach 20 Tagen nicht jedoch nach 39 Tag signifikant zu (Stewart et al. 2007). Der zeitliche Verlauf der PDGF-Expression beim Heilungsprozess von Meniskusgewebe wurde in einer *in vivo* Studie an Kaninchen untersucht (Ochi et al. 2001). Einen Tag nach Setzen eines artifiziellen Risses in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* und Anrauen der Oberfläche nahm die PDGF-Expression an der femoralen Oberfläche deutlich zu, erreichte ihr Maximum am 14. Tag und fiel danach wieder ab. Dagegen war am Riss nur eine Woche postoperativ eine geringe Erhöhung von PDGF messbar. Als Kontrollgruppe dienten Kaninchen mit einem Riss in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis*, aber ohne Anrauerung der Oberfläche (Ochi et al. 2001). Daher waren Vergleiche zwischen der PDGF-Expression in verletztem und gesundem Meniskus nicht möglich. Auch an den Beugesehnen von Hunden wurden erhöhte PDGF-Konzentrationen in der frühen Heilungsphase nach drei Tagen und ein Abfall am zehnten und

siebzehnten Tag beobachtet (Duffy Jr et al. 1995). Die Befunde lassen vermuten, dass die PDGF-Expression vorrangig in der Akutphase aktiviert und gegebenenfalls zusätzlich mechanisch durch eine Anrauung stimuliert wird. In der avaskulären Zone von Kaninchenmenisken kam es bereits ein Tag postoperativ zu einem Abfall der PDGF-Werte (Ibán et al. 2014). Am 120. Tag lagen die Werte sogar unter der gemessenen Ausgangskonzentration. In der deutlich besser durchbluteten vaskulären Zone fiel die PDGF-Konzentration initial bis zum siebten Tag ebenfalls ab, zeigte aber bereits am 14. Tag einen deutlich Anstieg im Vergleich zur Ausgangskonzentration am OP-Tag (Ibán et al. 2014). In einer klinischen Studie verringerte sich nach einer partiellen Meniskektomie die PDGF-Konzentration in der Synovia des betroffenen Knies bereits nach 30 min (De Girolamo et al. 2015). Bei einer kombinierten partiellen Meniskektomie und Plastik des *Lig. cruciatum anterius* wurden jedoch deutlich erhöhte PDGF-Konzentrationen gemessen. Ein Erklärungsansatz der Autoren für die erhöhten PDGF-Konzentrationen ist das größere Trauma, die Knochenbohrung und die vermehrte Blutung. In der Zusammenschau deuten die Befunde auf eine gesteigerte PDGF-Expression in der frühen Heilungsphase hin, die durch eine verbesserte Durchblutung (z. B. in der vaskulären Zone), durch mechanische Stimulation (z. B. Anrauen) und/oder durch eine zusätzliche „blutige“ OP begünstigt wird. PDGF wird posttraumatisch als einer der ersten Wachstumsfaktoren vor allem von Thrombozyten, aber auch von Makrophagen, Epithelzellen und Fibroblasten ausgeschüttet, um die Synthese anderer Wachstumsfaktoren wie TGF-1 und IGF-1 zu induzieren (Creaney und Hamilton 2008; Lynch et al. 1987). Weiter fördert PDGF den frühen Heilungsprozess durch die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten sowie durch die Stimulation der Kollagen-Synthese und Angiogenese (Rönstrand und Heldin 2001; Wu et al. 1997). In der oben beschriebenen klinischen Studie ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der partiellen Meniskektomie ein chronisches Heilungsmilieu vorlag, da solche Eingriffe in der Regel erst Wochen nach dem Meniskustrauma durchgeführt werden. Wie erwähnt nimmt im Laufe des Heilungsprozesses die PDGF-Expression ab. Das Einsetzen der Kreuzbandplastik stellt wiederum ein akutes Trauma dar. Mögliche Ursachen für die erhöhte PDGF-Konzentration sind in diesem Kontext die Blutung und der damit verbundene Zustrom an PDGF-freisetzenden Thrombozyten sowie insgesamt das Milieu eines akuten Heilungsprozesses. Ein zusätzlicher mechanischer Reiz kam in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz; die PDGF-Konzentration sollte durch die Applikation von PrP und MSCs in der avaskulären Zone gesteigert werden. Analog zum Faktor VEGF sezernieren diese Komponenten nicht nur PDGF, sondern können auch andere Zellen zu einer erhöhten und verlängerten PDGF-Sekretion anregen. Daran ist auch die chemotaktische Wirkung von aus PrP und MSCs freigesetzten Wachstumsfaktoren, insbesondere PDGF, beteiligt. Chemotaktisch rekrutierte und aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen sekretieren PDGF über einen längeren Zeitraum (Mayer et al. 2010; Hollinger et al. 2008; Siegbahn et al. 1990; Deuel et al. 1982). In

der vorliegenden Studie war jedoch acht Wochen postoperativ nach der Applikation von PrP und MSCs keine erhöhte Anzahl PDGF- β -positiver Zellen in den operierten im Vergleich zu den kontralateralen Menisken nachweisbar. Weiter unterschieden sich die Anzahl auch nicht von der in den anderen Therapie- und Kontrollgruppen. Ein möglicher Grund ist auch hier der Zeitpunkt der Probengewinnung. Die Applikation von PrP und MSCs könnte zu einem früheren Zeitpunkt die PDGF- β -Konzentration im Meniskusgewebe erhöht haben. Weitere potenzielle Gründe für das Fehlen einer erhöhten PDGF- β -Konzentration sind biochemische und biomechanische Faktoren. Wie oben diskutiert, wird in der avaskulären Zone des Meniskus vermehrt Endostatin exprimiert. Diese Expression wird durch ein inflammatorisches Milieu und hydrostatischen Druck zusätzlich gesteigert. Endostatin wirkt inhibitorisch auf die Expression von PDGF-Rezeptoren (Li und Ren 2017). Zudem inhibiert eine hohe statische Kompression die PDGF-Expression im Meniskusgewebe (Imler et al. 2004).

In der vorliegenden Studie sind einige Limitationen zu berücksichtigen. Ein mit einem Skalpell artifiziell gesetzter Riss in der avaskulären Zone des Meniskus kann eine traumatische Meniskusverletzung nur begrenzt abbilden. Beim Menschen entstehen Meniskusverletzungen meist durch ein Trauma mit Kniegelenksdistorsion, wobei auch andere Strukturen des Kniegelenks betroffen sein können. Tiermodelle, die einen Meniskusriss durch Kniedistorsion erzeugen, ohne dabei weitere Strukturen zu verletzen, existieren nicht. Der artifiziell gesetzte Riss wurde in der vorliegenden Arbeit direkt genäht, während unter klinischen Bedingungen die OP oft erst Wochen nach dem Trauma erfolgt. Eine weitere Limitation stellt die relativ kleine Subgruppengröße von sechs Tieren ($n=6$) dar. Die Anzahl der Tiere war aus ethischen, logistischen und finanziellen Gründen begrenzt. Die Gruppengrößen vorangegangener Studien waren vergleichbar (Kopf et al. 2010; Burger et al. 2006; Guisasola et al. 2002). Inter- und intraindividuelle Unterschiede (z. B. Thrombozytenzahl und Wachstumsfaktor-Konzentrationen im Vollblut/PrP) haben möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst. Das Gleiche gilt für die uneingeschränkte postoperative Mobilität der Tiere. Die daraus folgende Mehrbelastung des kontralateralen, gesunden Meniskus, der in den Analysen als Referenz genutzt wurde, könnte die Zellproliferation und die Wachstumsfaktor-Expression beeinflusst haben. Studien zu diesen potenziellen Effekten sind nicht bekannt. Zudem sind auch mögliche systemische Effekte von PrP und MSCs zu berücksichtigen. Durch die Wahl des kontralateralen, gesunden Meniskus als Referenz wurden eventuelle systemische Effekte jedoch relativiert. Der gewählte Analysezeitraum von acht Wochen postoperativ stellt nur eine Momentaufnahme dar. Die makroskopischen, histologischen und biochemischen Ergebnisse beziehen sich nur auf diesen Zeitpunkt und erlauben keine Aussagen über den zeitlichen Verlauf. Mit der Wahl des Großtiermodells und des Untersuchungszeitpunktes sollten die humanen Verhältnisse möglichst genau imitiert werden.

Fazit

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von lokal appliziertem PrP und MSCs auf die Meniskusheilung eines Longitudinalrisses in der avaskulären Zone am Schafmodell untersucht. PrP und MSCs führten weder allein noch in Kombination zu einer Verbesserung der makroskopischen Heilung nach acht Wochen. In keiner Gruppe bestanden Unterschiede bezüglich der Anzahl VEGF-A- und PDGF- β -positiver Zellen in den operierten im Vergleich zu den gesunden kontralateralen Menisken. Weiter fehlten auch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Ausschließlich in der PrP+MSC-Gruppe wurden signifikant mehr Faktor VIII-positiv Zellen im gesamten operierten Meniskus und in der rissnahen Region im Vergleich zu den kontralateralen Menisken nachgewiesen. In den anderen Gruppen war die Anzahl der Faktor VIII-positiv Zellen in den operierten im Vergleich zu den kontralateralen Menisken vermindert. Die lokale Applikation von PrP und MSCs führte zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl VEGF-A-positiver Zellen und zu einer verminderten Anzahl PDGF- β -positiver Zellen in den operierten Menisken verglichen mit den kontralateralen Menisken.

7 Zusammenfassung

Der Effekt von lokal appliziertem thrombozytenreichem Plasma, mesenchymalen Stromazellen und ihrer Kombination auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse sowie auf VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII

Die Versorgung traumatischer Meniskusverletzungen stellt bis heute eine Herausforderung dar. Meniskusrisse der avaskulären, zentralen Zone zeigen aufgrund ihrer schlechten Gefäßversorgung eine geringe Heilungstendenz. Die Therapie der Wahl von Meniskusrissen in der avaskulären Zone ist aktuell die partielle Meniskektomie, die jedoch das Risiko für eine Knorpelabnutzung und damit für den verfrühten Beginn einer Gonarthrose erhöht. Dieses Risiko korreliert mit der Menge an reseziertem Meniskusgewebe. Neue Behandlungsansätze zielen daher darauf ab, möglichst viel Meniskusgewebe zu erhalten und das intrinsische Reparaturvermögen des Meniskus durch heilungsfördernde Substanzen wie Thrombozyten-reiches Plasma (PrP) und mesenchymale Stromazellen (MSCs) zu verbessern. PrP wirkt sich positiv auf die Zellproliferation, die Bildung der extrazellulären Matrix und die Chemotaxis der MSCs aus. Die MSCs wirken als Reparationszellen und über die Sekretion parakrin wirkender Mediatoren. Eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, Zellproliferation, -migration und Wundheilung spielen die Wachstumsfaktoren *Vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) und *Platelet-derived growth factor beta* (PDGF- β), die sowohl im PrP als auch von den MSCs exprimiert werden. Tierexperimentelle Studien am Knochen und Gelenkknorpel belegen ein additives Heilungspotential der Kombination aus PrP und MSCs. In *in vitro* Versuchen wirkten sich sowohl das PrP als auch MSCs positiv auf Meniskuszellen und auf die Sekretion heilungsfördernder Wachstumsfaktoren und Zytokine aus; die kombinierte Applikation von PrP und MSCs verstärkte diese Effekte. Diese Befunde wurden partiell auch in Tierversuchen für die Heilung avaskulärer Meniskusrisse bestätigt. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Effekt einer Applikation von PrP und/oder MSCs auf die Heilung von Meniskusrissen in der avaskulären Zone zu untersuchen. Dabei sollte geprüft werden, wie sich die unterschiedlichen Therapien auf die makroskopische Heilung auswirken und die Anzahl VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII positiver Zellen als Marker der Angiogenese beeinflussen.

Hierzu wurden 30 Schafe, bei denen ein longitudinaler Riss in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* gesetzt wurde, den fünf Therapiegruppen (je n =6) (1) Naht, (2) Naht + Kollagen-*Scaffold*, (3) Naht + Kollagen-*Scaffold* + PrP, (4) Naht + Kollagen-*Scaffold* + MSCs und (5) Naht + Kollagen-*Scaffold* + PrP + MSCs zugeordnet. Die kontralateralen Menisken dienten als individuelle Referenz bei den Auswertungen. Nach acht Wochen wurden die operierten

und kontralateralen *Menisci mediales* entnommen und makroskopisch, histologisch sowie immunhistochemisch (VEGF-A, PDGF- β und Faktor VIII) untersucht. Zusätzlich wurde die relative messenger Ribonukleinsäure-(mRNA)-Expression der Wachstumsfaktoren VEGF-A und PDGF- β mit Hilfe der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) quantifiziert. Die statistische Signifikanz der detektierten Unterschiede wurde mittels Wilcoxon-, Kruskal-Wallis- und Dunn-Test überprüft. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

In keiner der Gruppen war es acht Wochen nach dem Eingriff zu einer makroskopischen Heilung des Meniskusrisses gekommen. Die relative VEGF-A-mRNA-Expression in den operierten Menisken unterschied sich in keiner der Gruppen signifikant von der Expression in den kontralateralen Menisken. Auch bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. Die relative PDGF- β -mRNA-Expression lag in der PrP- und in der MSC-Gruppe in den operierten Menisken hochsignifikant niedriger als in den kontralateralen Menisken. Immunhistochemisch bestanden bezüglich der Anzahl VEGF-A- und PDGF- β -positiver Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder zwischen den operierten und kontralateralen Menisken. Die immunhistochemische Analyse ergab aber eine signifikante Erhöhung der Anzahl Faktor VIII-positiver Zellen in der PrP+MSC-Gruppe in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken. Dieser Unterschied war in den anderen Therapiegruppen nicht nachweisbar. In der Naht- und Carrier-Gruppe lag die Anzahl Faktor VIII-positiver Gefäße in den operierten Menisken verglichen mit den kontralateralen Menisken tendenziell niedriger.

Zusammenfassend führte weder die lokale Applikation von PrP oder MSCs allein noch die kombinierte Gabe von PrP und MSCs nach acht Wochen zu einer makroskopischen Heilung. Das Therapieregime schien die Anzahl VEGF-A- und PDGF- β -positiver Zellen nicht zu beeinflussen. Die Zunahme der Gefäße in den operierten Menisken der PrP+MSC-Gruppe deutet jedoch auf einen positiven Einfluss der Kombination aus PrP und MSCs auf die Angiogenese hin.

8 Summary

The effect of locally applied platelet-rich plasma, mesenchymal stromal cells and their combination on meniscal healing of avascular tears as well as on VEGF-A, PDGF- β and factor VIII.

The treatment of traumatic meniscal injuries is still posing a challenge today. Meniscal tears in the avascular, central zone show a poor tendency to heal due to their poor blood supply. The therapy of choice for lesions in the avascular zone so far has been the partial meniscectomy, which inevitably leads to a higher risk for gonarthrosis in the future. This risk correlates with the amount of resected tissue. New treatment approaches therefore aim to preserve as much meniscal tissue as possible and to improve the healing potential by adding healing promoting substances such as platelet-rich plasma (PrP) and mesenchymal stromal cells (MSCs). PrP has a positive effect on cell proliferation, the formation of extracellular matrix and chemotaxis of MSCs. MSCs act as reparation cells and through the secretion of paracrine mediators. The growth factors vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and the platelet-derived growth factor- β (PDGF- β) expressed in PrP and in MSCs are playing a critical role in angiogenesis, cell proliferation, cell migration and wound healing. The enhanced healing potential of the combination of PrP and MSCs has already been shown in bone and cartilage repair. Animal experiments have also shown that PrP and MSCs could partially improve the repair of avascular meniscal tears. The aim of this study was to investigate the effect of PrP and/or MSCs on the healing of meniscal tears in the avascular zone. It should be examined to what extent the different therapies affect macroscopic healing and the concentrations of VEGF-A, PDGF- β and factor VIII as a marker of angiogenesis.

For this purpose, a longitudinal tear was created in the avascular zone of the medial meniscus in 30 sheep. The sheep were treated in five therapy groups (n=6 each). (1) suture, (2) suture + collagen scaffold, (3) suture + collagen scaffold + PrP, (4) suture + collagen scaffold + MSCs, and (5) suture + collagen scaffold + PrP + MSCs. The contralateral meniscus served as an individual reference for evaluating the growth factors. After eight weeks the operated and the contralateral meniscus were harvested and gross healing, histology and immunohistochemistry (VEGF-A, PDGF- β and factor VIII) were examined. The relative messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of the growth factors VEGF-A and PDGF- β was also quantified by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis-, Wilcoxon and Dunn-tests. Significance level was set to $p < 0,05$.

Gross healing of the meniscal tear was not observed in any of the groups after eight weeks. The relative VEGF-A mRNA expression did not show a significant difference between the operated menisci and contralateral menisci in any group. Furthermore, there were no significant expression differences between the therapy groups. The relative PDGF- β mRNA expression of the operated menisci was shown to be highly statistically significant downregulated in the PrP and MSC groups compared with the contralateral menisci. Immunohistochemically no significant differences between the groups or between the operated and contralateral menisci were found with regards to VEGF-A and PDGF- β . The immunohistochemical evaluation of factor VIII revealed a significant increase in the number of factor VIII positive cells in the PrP+MSC group of the operated menisci compared to the contralateral healthy ones. This difference could not be seen in any other group. Particularly in the suture and the carrier groups a tendency to a lower number of factor VIII positive cells was observed in the operated compared to the contralateral menisci.

Neither the sole nor the combined application of PrP and MSCs led to gross healing after eight weeks. The type of therapy does not seem to have had any influence on the presence of the growth factors VEGF-A and PDGF- β . However, the increase in blood vessels in the PrP+MSC group suggests a positive influence of the combination of PrP and MSCs on angiogenesis.

9 Literaturverzeichnis

Abdeen A. A., Weiss J. B., Lee J. und Kilian K. A. (2014):
Matrix composition and mechanics direct proangiogenic signaling from mesenchymal stem cells.
Tissue Eng Part A, 20, 2737-2745.

Abdel-Hamid M., Hussein M. R., Ahmad A. F. und Elgezawi E. M. (2005):
Enhancement of the repair of meniscal wounds in the red white zone (middle third) by the injection of bone marrow cells in canine animal model.
Int J Exp Pathol, 86, 117-123.

Adams M. E. und Ho Y. A. (1987):
Localization of glycosaminoglycans in human and canine menisci and their attachments.
Connect Tissue Res, 16, 269-279.

Adams M. E. und Hukins D. W. L. (1992):
The extracellular matrix of the meniscus.
In: *Knee meniscus basic and clinical foundations*: Mow V. C., Arnoczky S. P. and Jackson D. W., 15-28
New York: Raven Press - ISBN: 0881678953.

Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y. und Nalbant A. (2017):
Flow cytometry: basic principles and applications.
Crit Rev Biotechnol, 37, 163-176.

Agung M., Ochi M., Yanada S., Adachi N., Izuta Y., Yamasaki T. und Toda K. (2006):
Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 14, 1307-1314.

Al-Khaldi A., Eliopoulos N., Martineau D., Lejeune L., Lachapelle K. und Galipeau J. (2003):
Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo.
Gene Ther, 10, 621-629.

Albrecht-Olsen P., Kristensen G., Burgaard P., Joergensen U. und Toerholm C. (1999):
The arrow versus horizontal suture in arthroscopic meniscus repair. A prospective randomized study with arthroscopic evaluation.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 7, 268-273.

Allen R. J., Jr., Soares M. A., Haberman I. D., Szpalski C., Schachar J., Lin C. D., Nguyen P. D., Saadeh P. B. und Warren S. M. (2014):
Combination therapy accelerates diabetic wound closure.
PLoS One, 9, e92667.

Angele P., Johnstone B., Kujat R., Zellner J., Nerlich M., Goldberg V. und Yoo J. (2008):
Stem cell based tissue engineering for meniscus repair.
J Biomed Mater Res A, 85, 445-455.

- Anitua E. (1999):
Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants.
Int J Oral Maxillofac Implants, 14, 529-535.
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P. und Nurden A. T. (2004):
Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration.
J Thromb Haemost, 91, 4-15.
- Anitua E., Sánchez M., Zalduendo M. M., de la Fuente M., Prado R., Orive G. und Andía I. (2009):
Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors.
Cell Prolif, 42, 162-170.
- Anitua E., Zalduendo M., Prado R., Alkhraisat M. und Orive G. (2015a):
Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF - Endoret fibrin scaffolds: Evaluation of the effect of leukocyte inclusion.
J Biomed Mater Res A, 103, 1011-1020.
- Anitua E., Zalduendo M., Troya M., Padilla S. und Orive G. (2015b):
Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties.
PloS one, 10, e0121713.
- Antoniades H. N. (1981):
Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits.
Proc Natl Acad Sci 78, 7314-7317.
- Arnoczky S. P. und Warren R. F. (1982):
Microvasculature of the human meniscus.
Am J Sports Med, 10, 90-95.
- Arnoczky S. P. und Warren R. F. (1983):
The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog.
Am J Sports Med, 11, 131-141.
- Arnoczky S. P., Warren R. F. und Spivak J. M. (1988):
Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs.
J Bone Joint Surg Am, 70, 1209-1217.
- Aukhil I. (2000):
Biology of wound healing.
Periodontol 2000, 22, 44-50.
- Ball S. G., Shuttleworth C. A. und Kielty C. M. (2007a):
Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors.
J Cell Mol Med, 11, 1012-1030.
- Ball S. G., Shuttleworth C. A. und Kielty C. M. (2007b):
Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors.
J Cell Biol, 177, 489-500.

- Baraniak P. R. und McDevitt T. C. (2010):
Stem cell paracrine actions and tissue regeneration.
Regen Med, 5, 121-143.
- Baratz M. E., Fu F. H. und Mengato R. (1986):
Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report.
Am J Sports Med, 14, 270-275.
- Barber F. A. (1994):
Accelerated rehabilitation for meniscus repairs.
Arthroscopy, 10, 206-210.
- Barleon B., Siemeister G., Martiny-Baron G., Weindel K., Herzog C. und Marme D. (1997):
Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells.
Cancer Res, 57, 5421-5425.
- Bates D. O., Mavrou A., Qiu Y., Carter J. G., Hamdollah-Zadeh M., Barratt S., Gammons M. V., Millar A. B., Salmon A. H. und Oltean S. (2013):
Detection of VEGF-A xxx b isoforms in human tissues.
PloS one, 8, e68399.
- Batten M. L., Hansen J. C. und Dahners L. E. (1996):
Influence of dosage and timing of application of platelet-derived growth factor on early healing of the rat medial collateral ligament.
J Orthop Res, 14, 736-741.
- Bauters C., Asahara T., Zheng L. P., Takeshita S., Bunting S., Ferrara N., Symes J. F. und Isner J. M. (1995):
Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor.
J Vasc Surg, 21, 314-324.
- Beck S., Blunden T., Dyson S. und Murray R. (2011):
Are matrix and vascular changes involved in the pathogenesis of deep digital flexor tendon injury in the horse?
Vet J, 189, 289-295.
- Becker R., Pufe T., Giessmann N., Kuhlow S., Mentlein R. und Petersen W. (2002):
Die Rolle des Angiogenesefaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) bei der Heilung von Meniskusläsionen.
Arthroskopie, 15, 190-195.
- Becker R., Pufe T., Kulow S., Giessmann N., Neumann W., Mentlein R. und Petersen W. (2004):
Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model.
J Bone Joint Surg Br, 86, 1082-1087.
- Beckermann B. M., Kallifatidis G., Groth A., Frommhold D., Apel A., Mattern J., Salnikov A. V., Moldenhauer G., Wagner W., Diehlmann A., Saffrich R., Schubert M., Ho A. D., Giese N., Büchler M. W., Friess H., Büchler P. und Herr I. (2008):
VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma.

Br J Cancer, 99, 622-631.

Berger D., Centeno C. und Steinmetz N. (2019):
Platelet lysates from aged donors promote human tenocyte proliferation and migration in a concentration-dependent manner.
Bone Joint J, 8, 32-40.

Betsholtz C. (2004):
Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice.
Cytokine Growth Factor Rev, 15, 215-228.

Bhargava M. M., Attia E. T., Murrell G. A., Dolan M. M., Warren R. F. und Hannafin J. A. (1999):
The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells.
Am J Sports Med, 27, 636-643.

Bhargava M. M., Hidaka C., Hannafin J. A., Doty S. und Warren R. F. (2005):
Effects of hepatocyte growth factor and platelet-derived growth factor on the repair of meniscal defects in vitro.
In Vitro Cell Dev Biol Anim, 41, 305-310.

Bigoni M., Turati M., Gandolla M., Sacerdote P., Piatti M., Castelnuovo A., Franchi S., Gorla M., Munegato D., Gaddi D., Pedrocchi A., Omeljaniuk R. J., Locatelli V. und Torsello A. (2016):
Effects of ACL Reconstructive Surgery on Temporal Variations of Cytokine Levels in Synovial Fluid.
Mediators Inflamm, 2016, 8243601.

Bir S. C., Esaki J., Marui A., Yamahara K., Tsubota H., Ikeda T. und Sakata R. (2009):
Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: Characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse.
J Vasc Surg, 50, 870-879.

Bland Y. S. und Ashhurst D. E. (1996):
Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing.
Histochem J, 28, 265-274.

Bortolotti F., Ukovich L., Razban V., Martinelli V., Ruozi G., Pelos B., Dore F., Giacca M. und Zacchigna S. (2015):
In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure.
Stem Cell Rep, 4, 332-339.

Breier G., Albrecht U., Sterrer S. und Risau W. (1992):
Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation.
Development, 114, 521-532.

Brindle T., Nyland J. und Johnson D. L. (2001):
The meniscus: review of basic principles with application to surgery and rehabilitation.
J Athl Train, 36, 160-169.

Broos K., Feys H. B., De Meyer S. F., Vanhoorelbeke K. und Deckmyn H. (2011):
Platelets at work in primary hemostasis.
Blood Rev, 25, 155-167.

- Bullough P. G., Munuera L., Murphy J. und Weinstein A. M. (1970):
The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure.
J Bone Joint Surg Br, 52, 564-567.
- Burger C., Kabir K., Rangger C., Mueller M., Minor T. und Tolba R. H. (2006):
Polylactide (LTS) causes less inflammation response than polydioxanone (PDS): a meniscus repair model in sheep.
Arch Orthop Trauma Surg, 126, 695-705.
- Caplan A. I. und Dennis J. E. (2006):
Mesenchymal stem cells as trophic mediators.
J Cell Biochem, 98, 1076-1084.
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W. und Nagy A. (1996):
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.
Nature, 380, 435-439.
- Cavanaugh J. T. und Killian S. E. (2012):
Rehabilitation following meniscal repair.
Curr Rev Musculoskelet Med, 5, 46-58.
- Chen H., Ji X. R., Zhang Q., Tian X. Z., Zhang B. X. und Tang P. F. (2016):
Effects of Calcium Sulfate Combined with Platelet-rich Plasma on Restoration of Long Bone Defect in Rabbits.
Chin Med J (Engl), 129, 557-561.
- Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S. C. und Chopp M. (2003):
Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat.
J Neurosci, 73, 778-786.
- Chevrier A., Nelea M., Hurtig M. B., Hoemann C. D. und Buschmann M. D. (2009):
Meniscus structure in human, sheep, and rabbit for animal models of meniscus repair.
J Orthop Res, 27, 1197-1203.
- Cho H. S., Song I. H., Park S.-Y., Sung M. C., Ahn M.-W. und Song K. E. (2011):
Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells.
Korean J Lab Med, 31, 212-218.
- Christensen K., Vang S., Brady C., Isler J., Allen K., Anderson J. und Holt D. (2006):
Autologous platelet gel: an in vitro analysis of platelet-rich plasma using multiple cycles.
J Extra Corpor Technol, 38, 249-253.
- Clark C. R. und Ogden J. A. (1983):
Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury.
J Bone Joint Surg Am, 65, 538-547.
- Clauss M., Gerlach M., Gerlach H., Brett J., Wang F., Familletti P. C., Pan Y. C., Olander J. V., Connolly D. T. und Stern D. (1990):

Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration.
J Exp Med, 172, 1535-1545.

Clauss M., Weich H., Breier G., Knies U., Rockl W., Waltenberger J. und Risau W. (1996):
The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis.
J Biol Chem, 271, 17629-17634.

Coelho M. B., Cabral J. M. und Karp J. M. (2012):
Intraoperative stem cell therapy.
Annu Rev Biomed Eng, 14, 325-349.

Collier S. und Ghosh P. (1995):
Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus.
Osteoarthritis Cartilage, 3, 127-138.

Cook J. L. und Fox D. B. (2007):
A novel bioabsorbable conduit augments healing of avascular meniscal tears in a dog model.
Am J Sports Med, 35, 1877-1887.

Creaney L. und Hamilton B. (2008):
Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play.
Br J Sports Med, 42, 314-320.

Croutze R., Jomha N., Uludag H. und Adesida A. (2013):
Matrix forming characteristics of inner and outer human meniscus cells on 3D collagen scaffolds under normal and low oxygen tensions.
BMC Musculoskelet Disord, 14, 353.

Dallari D., Fini M., Stagni C., Torricelli P., Nicoli Aldini N., Giavaresi G., Cenni E., Baldini N., Cenacchi A., Bassi A., Giardino R., Fornasari P. M. und Giunti A. (2006):
In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination.
J Orthop Res, 24, 877-888.

Dandy D. (1990):
The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions.
J Bone Joint Surg Br, 72, 628-633.

De Girolamo L., Galliera E., Volpi P., Denti M., Dogliotti G., Quaglia A., Cabitza P., Romanelli M. C. und Randelli P. d. (2015):
Why menisci show higher healing rate when repaired during ACL reconstruction? Growth factors release can be the explanation.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 23, 90-96.

de Obarrio J. J., Arauz-Dutari J. I., Chamberlain T. M. und Croston A. (2000):
The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports.
Int J Periodontics Restorative Dent, 20, 486-497.

DeHaven K. E. (1999):
Meniscus repair.
Am J Sports Med, 27, 242-250.

- Dehghan M. M., Baghaban Eslaminejad M., Motallebizadeh N., Ashrafi Halan J., Tagiyar L., Soroori S., Nikmahzar A., Pedram M., Shahverdi A., Kazemi Mehrjerdi H. und Izadi S. (2015): Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Platelet-Rich Plasma Accelerate Distraction Osteogenesis in A Canine Model. *Cell J*, 17, 243-252.
- DeLong J. M., Russell R. P. und Mazzocca A. D. (2012): Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*, 28, 998-1009.
- Des Guetz G., Uzzan B., Nicolas P., Cucherat M., Morere J. F., Benamouzig R., Breau J. L. und Perret G. Y. (2006): Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer*, 94, 1823-1832.
- Deuel T. F., Senior R. M., Huang J. S. und Griffin G. L. (1982): Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*, 69, 1046-1049.
- Deuel T. F., Kawahara R. S., Mustoe T. A. und Pierce A. F. (1991): Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu Rev Med*, 42, 567-584.
- Doucet C., Ernou I., Zhang Y., Llense J. R., Begot L., Holy X. und Lataillade J. J. (2005): Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205, 228-236.
- Dowdy P. A., Miniaci A., Arnoczky S. P., Fowler P. J. und Boughner D. R. (1995): The effect of cast immobilization on meniscal healing: an experimental study in the dog. *Am J Sports Med*, 23, 721-728.
- Drengk A., Zapf A., Sturmer E. K., Sturmer K. M. und Frosch K. H. (2009): Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 189, 317-326.
- Duffy Jr F. J., Seiler J. G., Gelberman R. H. und Hergueter C. A. (1995): Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg Am*, 20, 645-649.
- Dugrillon A., Eichler H., Kern S. und Kluter H. (2002): Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31, 615-619.
- Dumont D. J., Fong G. H., Puri M. C., Gradwohl G., Alitalo K. und Breitman M. L. (1995): Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*, 203, 80-92.
- Dürselen L. und Freutel M. (2015): Biomechanik des Meniskus. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 10, 215-227.

- Dutton A. Q., Choong P. F., Goh J. C., Lee E. H. und Hui J. H. (2010):
Enhancement of meniscal repair in the avascular zone using mesenchymal stem cells in a porcine model.
J Bone Joint Surg Br, 92, 169-175.
- Eggl S., Wegmuller H., Kosina J., Huckell C. und Jakob R. P. (1995):
Long-term results of arthroscopic meniscal repair. An analysis of isolated tears.
Am J Sports Med, 23, 715-720.
- Ellermann A., Siebold R., Buelow J. U. und Sobau C. (2002):
Clinical evaluation of meniscus repair with a bioabsorbable arrow: a 2- to 3-year follow-up study.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 10, 289-293.
- Eppley B. L., Woodell J. E. und Higgins J. (2004):
Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing.
Plast Reconstr Surg, 114, 1502-1508.
- Esparza R., Gortazar A. R. und Forriol F. (2012):
Cell study of the three areas of the meniscus: effect of growth factors in an experimental model in sheep.
J Orthop Res, 30, 1647-1651.
- Everhart J. S., Flanigan D. C., Magnussen R. A. und Kaeding C. C. (2019):
Platelet-Rich Plasma: Does It Decrease Meniscus Repair Failure Risk?
Am J Sports Med, 7, doi: 10.1177/2325967119S2325900247.
- Everts P. A., Brown Mahoney C., Hoffmann J. J., Schonberger J. P., Box H. A., van Zundert A. und Knape J. T. (2006):
Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release.
Growth Factors, 24, 165-171.
- Evrova O. und Buschmann J. (2017):
In vitro and in vivo effects of PDGF-BB delivery strategies on tendon healing: A review.
Eur Cell Mater, 34, 15-39.
- Fairbank T. J. (1948):
Knee joint changes after meniscectomy.
J Bone Joint Surg Br, 30B, 664-670.
- Fava R. A., Olsen N. J., Spencer-Green G., Yeo K. T., Yeo T. K., Berse B., Jackman R. W., Senger D. R., Dvorak H. F. und Brown L. F. (1994):
Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue.
J Exp Med, 180, 341-346.
- Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K. S., Powell-Braxton L., Hillan K. J. und Moore M. W. (1996):
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.
Nature, 380, 439-442.
- Ferrara N. und Keyt B. (1997):
Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications.

EXS, 79, 209-232.

Ferrara N. (1999):

Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.

J Mol Med (Berl), 77, 527-543.

Ferrara N. (2002):

VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors.

Nat Rev Cancer, 2, 795-803.

Ferrara N., Gerber H. P. und LeCouter J. (2003):

The biology of VEGF and its receptors.

Nat Med, 9, 669-676.

Ferretti M., Madhavan S., Deschner J., Rath-Deschner B., Wypasek E. und Agarwal S. (2006):
Dynamic biophysical strain modulates proinflammatory gene induction in meniscal fibrochondrocytes.

Am J Physiol Cell Physiol, 290, 1610-1615.

Foley S. R., Solano C., Simonova G., Spanevello M. M., Bird R. J., Semple J. W., Jackson D. E., Schibler A., Fraser J. F. und Fung Y. L. (2014):

A comprehensive study of ovine haemostasis to assess suitability to model human coagulation.

Thromb Res, 134, 468-473.

Fong G. H., Rossant J., Gertsenstein M. und Breitman M. L. (1995):

Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.

Nature, 376, 66-70.

Forriol F., Longo U. G., Duarte J., Ripalda P., Vaquero J., Loppini M., Romeo G., Campi S., Khan W. S., Muda A. O. und Denaro V. (2015):

VEGF, BMP-7, Matrigel(TM), hyaluronic acid, in vitro cultured chondrocytes and trephination for healing of the avascular portion of the meniscus. An experimental study in sheep.

Curr Stem Cell Res Ther, 10, 69-76.

Foster T. E., Puskas B. L., Mandelbaum B. R., Gerhardt M. B. und Rodeo S. A. (2009):

Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications.

Am J Sports Med, 37, 2259-2272.

Fox J. M., Rintz K. G. und Ferkel R. D. (1993):

Trephination of incomplete meniscal tears.

Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 9, 451-455.

Frank S., Hubner G., Breier G., Longaker M. T., Greenhalgh D. G. und Werner S. (1995):

Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing.

J Biol Chem, 270, 12607-12613.

Fredriksson L., Li H. und Eriksson U. (2004):

The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms.

Cytokine Growth Factor Rev, 15, 197-204.

Freymann U., Metzloff S., Krüger J. P., Hirsh G., Endres M., Petersen W. und Kaps C. (2016):

Effect of Human Serum and 2 Different Types of Platelet Concentrates on Human Meniscus Cell Migration, Proliferation, and Matrix Formation.

Arthroscopy, 32, 1106-1116.

Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I. und Frolova G. P. (1968):
Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.
Transplantation, 6, 230-247.

Fukubayashi T. und Kurosawa H. (1980):
The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints.
Acta Orthop Scand, 51, 871-879.

Furst G., Gruber R., Tangl S., Zechner W., Haas R., Mailath G., Sanroman F. und Watzek G. (2003):
Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs.
Clin Oral Implants Res, 14, 500-508.

Gawaz M. P. (1999).
Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung.
Stuttgart - NewYork: Thieme-Verlag - ISBN: 3131182210.

Gaweda K., Tarczynska M. und Krzyzanowski W. (2010):
Treatment of Achilles tendinopathy with platelet-rich plasma.
Int J Sports Med, 31, 577-583.

Gemmell C. und Park J. (2000):
Initial blood interactions with endosseous implant materials.
In: Bone Engineering: Davies J. E. and Vacanti J. P., 108-117
Toronto: EM Squared Incorporated - ISBN: 096869800.

Gerber H. P., Vu T. H., Ryan A. M., Kowalski J., Werb Z. und Ferrara N. (1999):
VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.
Nat Med, 5, 623-628.

Gershuni D. H., Skyhar M. J., Danzig L. A., Camp J., Hargens A. R. und Akeson W. H. (1989):
Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci.
J Bone Joint Surg Am, 71, 1363-1370.

Ghadially F. N., Wedge J. H. und Lalonde J. M. (1986):
Experimental methods of repairing injured menisci.
J Bone Joint Surg Br, 68, 106-110.

Giusti I., D'Ascenzo S., Mancò A., Di Stefano G., Di Francesco M., Rughetti A., Dal Mas A., Properzi G., Calvisi V. und Dolo V. (2014):
Platelet Concentration in Platelet-Rich Plasma Affects Tenocyte Behavior In Vitro.
Biomed Res Int, 2014, 630870.

Goedecke A., Wobus M., Krech M., Munch N., Richter K., Holig K. und Bornhauser M. (2011):
Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro.
J Tissue Eng Regen Med, 5, 648-654.

- Grant J. A., Wilde J., Miller B. S. und Bedi A. (2012):
Comparison of inside-out and all-inside techniques for the repair of isolated meniscal tears: a systematic review.
The American journal of sports medicine, 40, 459-468.
- Graziani F., Ivanovski S., Cei S., Ducci F., Tonetti M. und Gabriele M. (2006):
The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts.
Clin Oral Implants Res, 17, 212-219.
- Greis P. E., Bardana D. D., Holmstrom M. C. und Burks R. T. (2002):
Meniscal injury: I. Basic science and evaluation.
Am Acad Orthop Surg, 10, 168-176.
- Griffin J. W., Hadeed M. M., Werner B. C., Diduch D. R., Carson E. W. und Miller M. D. (2015):
Platelet-rich Plasma in Meniscal Repair: Does Augmentation Improve Surgical Outcomes?
Clin Orthop Relat Res, 473, 1665-1672.
- Grotendorst G. R., Martin G. R., Pencev D., Sodek J. und Harvey A. K. (1985):
Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats.
J Clin Invest, 76, 2323-2329.
- Guisasola I., Vaquero J. und Forriol F. (2002):
Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep.
Clin Orthop Relat Res, 227-233.
- Gumieiro E. H., Abrahao M., Jahn R. S., Segretto H., Alves M. T., Nannmark U., Granstrom G. und Dib L. L. (2010):
Platelet-rich plasma in bone repair of irradiated tibiae of Wistar rats.
Acta Cir Bras, 25, 257-263.
- Gunja N. J., Uthamanthil R. K. und Athanasiou K. A. (2009):
Effects of TGF-beta1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds.
Biomaterials, 30, 565-573.
- Guzel Y., Karalezli N., Bilge O., Kacira B. K., Esen H., Karadag H., Toker S., Goncu R. G. und Doral M. N. (2015):
The biomechanical and histological effects of platelet-rich plasma on fracture healing.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 23, 1378-1383.
- Haas A. L., Schepsis A. A., Hornstein J. und Edgar C. M. (2005):
Meniscal repair using the FasT-Fix all-inside meniscal repair device.
Arthroscopy, 21, 167-175.
- Haddouti E.-M., Randau T. M., Hilgers C., Masson W., Walgenbach K. J., Pflugmacher R., Burger C., Gravius S. und Schildberg F. A. (2020):
Characterization and comparison of human and ovine mesenchymal stromal cells from three corresponding sources.
Int J Mol Sci, 21, 2310.
- Hanks G. A., Gause T. M., Sebastianelli W. J., O'Donnell C. S. und Kalenak A. (1991):
Repair of peripheral meniscal tears: open versus arthroscopic technique.
Arthroscopy, 7, 72-77.

- Harada K., Friedman M., Lopez J. J., Wang S. Y., Li J., Prasad P. V., Pearlman J. D., Edelman E. R., Sellke F. W. und Simons M. (1996):
Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia.
Am J Physiol, 270, H1791-1802.
- Haynesworth S. E., Baber M. A. und Caplan A. I. (1996):
Cytokine expression by human marrow - derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL - 1 α .
J Cell Physiol, 166, 585-592.
- Heckmann T. P., Barber-Westin S. D. und Noyes F. R. (2006):
Meniscal repair and transplantation: indications, techniques, rehabilitation, and clinical outcome.
J Orthop Sports Phys Ther, 36, 795-814.
- Heijkants R. G., van Calck R. V., De Groot J. H., Pennings A. J., Schouten A. J., van Tienen T. G., Ramrattan N., Buma P. und Veth R. P. (2004):
Design, synthesis and properties of a degradable polyurethane scaffold for meniscus regeneration.
J Mater Sci Mater Med, 15, 423-427.
- Heldin C. H. und Westermark B. (1999):
Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.
Physiol Rev, 79, 1283-1316.
- Hellio Le Graverand M. P., Ou Y., Schield-Yee T., Barclay L., Hart D., Natsume T. und Rattner J. B. (2001):
The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture.
J Anat, 198, 525-535.
- Hennerbichler A., Moutos F. T., Hennerbichler D., Weinberg J. B. und Guilak F. (2007):
Repair response of the inner and outer regions of the porcine meniscus in vitro.
Am J Sports Med, 35, 754-762.
- Henning C. E., Lynch M. A. und Clark J. R. (1987):
Vascularity for healing of meniscus repairs.
Arthroscopy, 3, 13-18.
- Henning C. E., Lynch M. A., Yearout K. M., Vequist S. W., Stallbaumer R. J. und Decker K. A. (1990):
Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot.
Clin Orthop Relat Res, 252, 64-72.
- Herwig J., Egner E. und Buddecke E. (1984):
Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration.
Ann Rheum Dis, 43, 635-640.
- Hildebrand K. A., Woo S. L.-Y., Smith D. W., Allen C. R., Deie M., Taylor B. J. und Schmidt C. C. (1998):
The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Healing of the Rabbit Medial Collateral Ligament.
Am J Sports Med, 26, 549-554.

- Hoch R. V. und Soriano P. (2003):
Roles of PDGF in animal development.
Development, 130, 4769-4784.
- Hokugo A., Sawada Y., Hokugo R., Iwamura H., Kobuchi M., Kambara T., Morita S. und Tabata Y. (2007):
Controlled release of platelet growth factors enhances bone regeneration at rabbit calvaria.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 104, 44-48.
- Hollinger J. O., Hart C. E., Hirsch S. N., Lynch S. und Friedlaender G. E. (2008):
Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications.
J Bone Joint Surg Am, 90 Suppl 1, 48-54.
- Holmes D. I. und Zachary I. (2005):
The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease.
Genome Biol, 6, 209.
- Horibe S., Shino K., Maeda A., Nakamura N., Matsumoto N. und Ochi T. (1996):
Results of isolated meniscal repair evaluated by second-look arthroscopy.
Arthroscopy, 12, 150-155.
- Horie M., Sekiya I., Muneta T., Ichinose S., Matsumoto K., Saito H., Murakami T. und Kobayashi E. (2009):
Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect.
Stem Cells, 27, 878-887.
- Howell J. R. und Handoll H. H. (2000):
Surgical treatment for meniscal injuries of the knee in adults.
Cochrane Database Syst Rev, 2, DOI: 10.1002/14651858.CD14001353.
- Hsiao S. T., Asgari A., Lokmic Z., Sinclair R., Dusting G. J., Lim S. Y. und Dilley R. J. (2012):
Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue.
Stem Cells Dev, 21, 2189-2203.
- Hua L., Lai G., Zhenjun L. und Guie M. (2015):
The study of anticoagulants selection in platelet-rich plasma preparation.
Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 31, 295-300.
- Huang T. L., Lin G. T., O'Connor S., Chen D. Y. und Barmada R. (1991):
Healing potential of experimental meniscal tears in the rabbit. Preliminary results.
Clin Orthop Relat Res, 299-305.
- Ibán M. Á. R., Melero N. C., Martinez-Botas J., Ortiz A. und Heredia J. D. (2014):
Growth factor expression after lesion creation in the avascular zone of the meniscus: A quantitative PCR study in rabbits.
Arthroscopy, 30, 1131-1138.
- Igel J.: Der Einfluss von lokal appliziertem plättchenreichem Plasma und mesenchymalen Stromazellen auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse unter Analyse von wundheilungsrelevanten Wachstumsfaktoren (FGF-2, TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2), katabolen Zytokinen (TNF- α , IL-1 α) und Kollagenen (Col1A1, 1A2, 2A1).
unv. Diss., Freie Universität Berlin, 2020

- Imler S. M., Doshi A. N. und Levenston M. E. (2004):
Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis.
Osteoarthritis Cartilage, 12, 736-744.
- Ishida K., Kuroda R., Miwa M., Tabata Y., Hokugo A., Kawamoto T., Sasaki K., Doita M. und Kurosaka M. (2007):
The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel.
Tissue Eng, 13, 1103-1112.
- Ishii-Watabe A., Uchida E., Mizuguchi H. und Hayakawa T. (2000):
On the mechanism of plasmin-induced platelet aggregation. Implications of the dual role of granule ADP.
Biochem Pharmacol, 59, 1345-1355.
- Izuta Y., Ochi M., Adachi N., Deie M., Yamasaki T. und Shinomiya R. (2005):
Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats.
Knee, 12, 217-223.
- Jacob G., Shimomura K., Krych A. J. und Nakamura N. (2019):
The Meniscus Tear: A Review of Stem Cell Therapies.
Cells, 9, doi: 10.3390/cells9010092.
- Jansen H., Meffert R. H., Birkenfeld F., Petersen W. und Pufe T. (2012):
Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in moderate osteoarthritis in a rabbit model.
Ann Anat, 194, 452-456.
- Jiang L., Dai Y., Cui F., Pan Y., Zhang H., Xiao J. und Xiaobing F. (2014):
Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing.
Spinal Cord, 52, 145-151.
- Jin Hwan A., Lee Y. S., Yoo J. C., Chang M. J., Koh K. H. und Kim M. H. (2010):
Clinical and Second-Look Arthroscopic Evaluation of Repaired Medial Meniscus in Anterior Cruciate Ligament—Reconstructed Knees.
Am J Sports Med, 38, 472-477.
- Jo C. H., Kim J. E., Yoon K. S. und Shin S. (2012):
Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears.
Am J Sports Med, 40, 1035-1045.
- Jo C. H., Shin J. S., Shin W. H., Lee S. Y., Yoon K. S. und Shin S. (2015):
Platelet-rich plasma for arthroscopic repair of medium to large rotator cuff tears: a randomized controlled trial.
Am J Sports Med, 43, 2102-2110.
- Jones R. E., Smith E. C. und Reisch J. S. (1978):
Effects of medial meniscectomy in patients older than forty years.
J Bone Joint Surg Am, 60, 783-786.

- Jose S., Highbanks M. L., Binder B. Y., Ingavle G. C. und Leach J. K. (2014):
Enhanced trophic factor secretion by mesenchymal stem/stromal cells with Glycine-Histidine-Lysine (GHK)-modified alginate hydrogels.
Acta Biomater, 10, 1955-1964.
- Joshi M. D., Suh J. K., Marui T. und Woo S. L. (1995):
Interspecies variation of compressive biomechanical properties of the meniscus.
J Biomed Mater Res, 29, 823-828.
- Kakudo N., Minakata T., Mitsui T., Kushida S., Notodihardjo F. Z. und Kusumoto K. (2008):
Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts.
Plast Reconstr Surg, 122, 1352-1360.
- Kakudo N., Kushida S., Minakata T., Suzuki K. und Kusumoto K. (2011):
Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site.
Med Mol Morphol, 44, 233-236.
- Kakudo N., Morimoto N., Kushida S., Ogawa T. und Kusumoto K. (2014):
Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo.
Med mol morphol, 47, 83-89.
- Kalliakmanis A., Zourtos S., Bousgas D. und Nikolaou P. (2008):
Comparison of arthroscopic meniscal repair results using 3 different meniscal repair devices in anterior cruciate ligament reconstruction patients.
Arthroscopy, 24, 810-816.
- Kambic H. E. und McDevitt C. A. (2005):
Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus.
J Orthop Res, 23, 142-149.
- Kannus P. (2000):
Structure of the tendon connective tissue.
Scand J Med Sci Sports, 10, 312-320.
- Kanthan S. R., Kavitha G., Addi S., Choon D. S. und Kamarul T. (2011):
Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models.
Injury, 42, 782-789.
- Kassolis J. D., Rosen P. S. und Reynolds M. A. (2000):
Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet - rich plasma in combination with freeze - dried bone allograft: case series.
J Periodontol, 71, 1654-1661.
- Kasten P., Vogel J., Geiger F., Niemeyer P., Luginbühl R. und Szalay K. (2008):
The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects.
Biomaterials, 29, 3983-3992.
- Keating A. (2006):
Mesenchymal stromal cells.
Curr Opin Hematol, 13, 419-425.

- Kettelkamp D. B. und Jacobs A. W. (1972):
Tibiofemoral contact area--determination and implications.
J Bone Joint Surg Am, 54, 349-356.
- Kim Y., Kim H., Cho H., Bae Y., Suh K. und Jung J. (2007):
Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia.
Cell Physiol Biochem, 20, 867-876.
- Kim Y. H., Furuya H. und Tabata Y. (2014):
Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels.
Biomaterials, 35, 214-224.
- Kimura M., Shirakura K., Hasegawa A., Kobuna Y. und Nijima M. (1995):
Second look arthroscopy after meniscal repair. Factors affecting the healing rate.
Clin Orthop Relat Res, 314, 185-191.
- King T. V. und Vallee B. L. (1991):
Neovascularisation of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits.
J Bone Joint Surg Br, 73, 587-590.
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M., Lee C., Barr S., Fuchs S. und Epstein S. (2004a):
Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms.
Circ Res, 94, 678-685.
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M. S., Shou M., Lee C. W., Barr S., Fuchs S. und Epstein S. E. (2004b):
Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms.
Circulation, 109, 1543-1549.
- Kirchberg K., Lange T. S., Klein E. C., Jungtäubl H., Heinen G., Meyer-Ingold W. und Scharffetter-Kochanek K. (1995):
Induction of $\beta 1$ Integrin Synthesis by Recombinant Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-AB) Correlates with an Enhanced Migratory Response of Human Dermal Fibroblasts to Various Extracellular Matrix Proteins.
Exp Cell Res, 220, 29-35.
- Klimkiewicz J. J. und Shaffer B. (2002):
Meniscal surgery 2002 update: indications and techniques for resection, repair, regeneration, and replacement.
Arthroscopy, 18, 14-25.
- Klompaker J. und Veth R. P. H. (1999):
Animal models of meniscal repair.
In: Animal models in orthopaedic research: Friedman R. J., 327-347
Boca Raton: CRC Press LLC. - ISBN: 9780429173479.
- Kobayashi K., Fujimoto E., Deie M., Sumen Y., Ikuta Y. und Ochi M. (2004):
Regional differences in the healing potential of the meniscus-an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium.
Knee, 11, 271-278.

- Koch A. E., Harlow L. A., Haines G. K., Amento E. P., Unemori E. N., Wong W. L., Pope R. M. und Ferrara N. (1994):
Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis.
J Immunol, 152, 4149-4156.
- Koch M., Ehrenreich T., Koehl G., Pattappa G., Pfeifer C., Loibl M., Müller M., Nerlich M., Angele P. und Zellner J. (2017):
Do cell based tissue engineering products for meniscus regeneration influence vascularization?
Clin Hemorheol Microcirc, 67, 125-140.
- Koga H., Muneta T., Nagase T., Nimura A., Ju Y. J., Mochizuki T. und Sekiya I. (2008):
Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit.
Cell Tissue Res, 333, 207-215.
- Koh Y.-G., Kwon O.-R., Kim Y.-S. und Choi Y.-J. (2014):
Comparative outcomes of open-wedge high tibial osteotomy with platelet-rich plasma alone or in combination with mesenchymal stem cell treatment: a prospective study.
Arthroscopy, 30, 1453-1460.
- Kohn D., Mussack T. und Plitz W. (1993):
[Material properties of meniscus tissue and the effect of the menisci on the compression behavior of the knee joint].
Z Orthop Ihre Grenzgeb, 131, 397-403.
- Kohn D. und Moreno B. (1995):
Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study.
Arthroscopy, 11, 96-103.
- Kon E., Filardo G., Delcogliano M., Fini M., Salamanna F., Giavaresi G., Martin I. und Marcacci M. (2010a):
Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model.
BMC Musculoskelet Disord, 11, 220.
- Kon E., Filardo G., Delcogliano M., Fini M., Salamanna F., Giavaresi G., Martin I. und Marcacci M. (2010b):
Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model.
BMC Musculoskelet Disord, 11, doi: 10.1186/1471-2474-1111-1220.
- Kopf S., Birkenfeld F., Becker R., Petersen W., Starke C., Wruck C. J., Tohidnezhad M., Varoga D. und Pufe T. (2010):
Local treatment of meniscal lesions with vascular endothelial growth factor.
J Bone Joint Surg Am, 92, 2682-2691.
- Kopf S., Stärke C. und Becker R. (2011):
Klinische Ergebnisse nach Meniskusnaht.
Arthroskopie, 24, 30-35.
- Kosova A., Khodyreva S. und Lavrik O. (2017):
Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair.

Biochem (Mosc), 82, 643-654.

Kowanetz M. und Ferrara N. (2006):
Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective.
Clin Cancer Res, 12, 5018-5022.

Krause W. R., Pope M. H., Johnson R. J. und Wilder D. G. (1976):
Mechanical changes in the knee after meniscectomy.
J Bone Joint Surg Am, 58, 599-604.

Kurita J., Miyamoto M., Ishii Y., Aoyama J., Takagi G., Naito Z., Tabata Y., Ochi M. und Shimizu K. (2011):
Enhanced vascularization by controlled release of platelet-rich plasma impregnated in biodegradable gelatin hydrogel.
Ann Thorac Cardiovasc Surg, 92, 837-844.

Kurnaz R. und Balta O. (2020):
Effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin matrix on healing of vertical meniscal tears in a rabbit model.
Acta Orthop Traumatol Turc, 54, 186-195.

Lang G. (2013).
Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.
Vienna: Springer - ISBN: 9783709111901.

Langer H. F., Stellos K., Steingen C., Frohofer A., Schönberger T., Krämer B., Bigalke B., May A. E., Seizer P., Müller I., Gieseke F., Siegel-Axel D., Meuth S. G., Schmidt A., Wendel H. P., Müller I., Bloch W. und Gawaz M. (2009):
Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro.
J Mol Cell Cardiol, 47, 315-325.

Laprell H., Stein V. und Petersen W. (2002):
Arthroscopic all-inside meniscus repair using a new refixation device: a prospective study.
Arthroscopy, 18, 387-393.

Lee C., Shim S., Jang H., Myung H., Lee J., Bae C. H., Myung J. K., Kim M. J., Lee S. B., Jang W. S., Lee S. J., Kim H. Y., Lee S. S. und Park S. (2017):
Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells and small intestinal submucosa hydrogel composite promotes combined radiation-wound healing of mice.
Cytotherapy, 19, 1048-1059.

Lee C. S., Tasto J., Healey R., Sano S. und Amiel D. (2014):
Radiofrequency stimulation for potential healing of meniscal injuries in the avascular zone.
Am J Orthop (Belle Mead NJ), 43, E292-E298.

Lee H. R., Shon O. J., Park S. I., Kim H. J., Kim S., Ahn M. W. und Do S. H. (2016):
Platelet-Rich Plasma Increases the Levels of Catabolic Molecules and Cellular Dedifferentiation in the Meniscus of a Rabbit Model.
Int J Mol Sci, 17, DOI: 10.3390/ijms17010120.

Lee K. I., Olmer M., Baek J., D'Lima D. D. und Lotz M. K. (2018):
Platelet-derived growth factor-coated decellularized meniscus scaffold for integrative healing of meniscus tears.
Acta Biomater, 76, 126-134.

- Lee S. J. (2000):
Cytokine delivery and tissue engineering.
Yonsei Med J, 41, 704-719.
- Lei J., Jiang A. und Pei D. (1998):
Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183.
Biochim Biophys Acta, 1443, 400-406.
- Letson A. K. und Dahners L. E. (1994):
The effect of combinations of growth factors on ligament healing.
Clin Orthop Relat Res, 207-212.
- Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V. und Ferrara N. (1989):
Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.
Science, 246, 1306-1309.
- Li H., Zeitelhofer M., Nilsson I., Liu X., Allan L., Gloria B., Perani A., Murone C., Catimel B. und Neville A. M. (2018):
Development of monoclonal anti-PDGF-CC antibodies as tools for investigating human tissue expression and for blocking PDGF-CC induced PDGFR α signalling in vivo.
PloS one, 13, e0201089.
- Li Y. und Ren H. T. (2017):
Endostatin inhibits fibrosis by modulating the PDGFR/ERK signal pathway: an in vitro study.
J Zhejiang Univ Sci B, 18, 994-1001.
- Liu F., Xu H. und Huang H. (2019):
A novel kartogenin-platelet-rich plasma gel enhances chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and promotes wounded meniscus healing in vivo.
Stem Cell Res Ther, 10, 201.
- Lohmann C., Schwartz Z., Niederauer G., Carnes Jr D., Dean D. und Boyan B. (2000):
Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo.
Biomaterials, 21, 49-61.
- Lucarelli E., Fini M., Beccheroni A., Giavaresi G., Di Bella C., Aldini N. N., Guzzardella G., Martini L., Cenacchi A., Di Maggio N., Sangiorgi L., Fornasari P. M., Mercuri M., Giardino R. und Donati D. (2005):
Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration.
Clin Orthop Relat Res, 62-68.
- Lynch S. E., Nixon J. C., Colvin R. B. und Antoniades H. N. (1987):
Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors.
Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 7696-7700.
- Majewski M., Susanne H. und Klaus S. (2006):
Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study.
Knee, 13, 184-188.
- Makris E. A., Hadidi P. und Athanasiou K. A. (2011):
The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration.

Biomaterials, 32, 7411-7431.

Martinello T., Bronzini I., Perazzi A., Testoni S., De Benedictis G. M., Negro A., Caporale G., Mascarello F., Iacopetti I. und Patruno M. (2013):
Effects of in vivo applications of peripheral blood - derived mesenchymal stromal cells (PB - MSCs) and platelet - rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep.

J Orthop Res, 31, 306-314.

Martini L., Fini M., Giavaresi G. und Giardino R. (2001):
Sheep model in orthopedic research: a literature review.
Comp Med, 51, 292-299.

Maruyama M. (1996):
The all-inside meniscal suture technique using new instruments.
Arthroscopy, 12, 256-258.

Marx R. E., Carlson E. R., Eichstaedt R. M., Schimmele S. R., Strauss J. E. und Georgeff K. R. (1998):
Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 85, 638-646.

Marx R. E. (2001):
Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?
Implant Dent, 10, 225-228.

Marx R. E. (2004):
Platelet-rich plasma: evidence to support its use.
J Oral Maxillofac Surg, 62, 489-496.

Mayer A., Lee S., Jung F., Grütz G., Lendlein A. und Hiebl B. (2010):
CD14+ CD163+ IL-10+ monocytes/macrophages: Pro-angiogenic and non pro-inflammatory isolation, enrichment and long-term secretion profile.
Clin Hemorheol Microcirc, 46, 217-223.

Mazurkiewicz-Pisarek A., Plucienniczak G., Ciach T. und Plucienniczak A. (2016):
The factor VIII protein and its function.
Acta Biochim Pol, 63, 11-16.

Mazzocca A. D., McCarthy M. B., Chowaniec D. M., Cote M. P., Romeo A. A., Bradley J. P., Arciero R. A. und Beitzel K. (2012):
Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability.
J Bone Joint Surg Am, 94, 308-316.

McCarty R. C., Gronthos S., Zannettino A. C., Foster B. K. und Xian C. J. (2009):
Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells.
J Cell Physiol, 219, 324-333.

McDevitt C. A. und Webber R. J. (1990):
The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage.
Clin Orthop Relat Res, 8-18.

McDevitt C. A. P., Mukherjee S. P., Kambic H. M. S. und Parker R. M. D. (2002):
Emerging concepts of the cell biology of the meniscus.
Current Opinion in Orthopaedics, 13, 345-350.

- McNicol D. und Roughley P. J. (1980):
Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus.
Biochem J, 185, 705-713.
- Meier Bürgisser G., Evrova O., Calcagni M., Scalera C., Giovanoli P. und Buschmann J. (2020):
Impact of PDGF - BB on cellular distribution and extracellular matrix in the healing rabbit Achilles tendon three weeks post - operation.
FEBS Open Bio, 10, 327-337.
- Melrose J., Smith S., Cake M., Read R. und 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.
- Messner K. und Gao J. (1998):
The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment.
J Anat, 193 (Pt 2), 161-178.
- Mishima Y. und Lotz M. (2008):
Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells.
J Orthop Res, 26, 1407-1412.
- Mishra A. und Pavelko T. (2006):
Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma.
Am J Sports Med, 34, 1774-1778.
- Molina-Minano F., Lopez-Jornet P., Camacho-Alonso F. und Vicente-Ortega V. (2009):
Plasma rich in growth factors and bone formation: a radiological and histomorphometric study in New Zealand rabbits.
Braz Oral Res, 23, 275-280.
- Molloy T., Wang Y. und Murrell G. A. (2003):
The roles of growth factors in tendon and ligament healing.
Sports medicine, 33, 381-394.
- Monto R. R. (2012):
Platelet rich plasma treatment for chronic Achilles tendinosis.
Foot Ankle Int, 33, 379-385.
- Morgan C. D. (1991):
The "all-inside" meniscus repair.
Arthroscopy, 7, 120-125.
- Moriguchi Y., Tateishi K., Ando W., Shimomura K., Yonetani Y., Tanaka Y., Kita K., Hart D. A., Gobbi A., Shino K., Yoshikawa H. und Nakamura N. (2013):
Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model.
Biomaterials, 34, 2185-2193.
- Mow V. und Rattcliffe A. (1997):
Structure and function of articular cartilage and meniscus.
In: Basic orthopedic biomechanics. : Mow V.C. and W.C. H., Philadelphia: Lippincott- Raven - ISBN: 9780397516841.

- Myung H., Jang H., Myung J. K., Lee C., Lee J., Kang J., Jang W. S., Lee S. J., Kim H., Kim H. Y., Park S. und Shim S. (2020):
Platelet-rich plasma improves the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells by enhancing their secretion of angiogenic factors in a combined radiation and wound injury model.
Exp Dermatol, 29, 158-167.
- Najar M., Raicevic G., Boufker H. I., Fayyad-Kazan H., De Bruyn C., Meuleman N., Bron D., Toungouz M. und Lagneaux L. (2010):
Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor.
Tissue Eng Part A, 16, 3537-3546.
- Nakagawa Y., Fortier L. A., Mao J. J., Lee C. H., Goodale M. B., Koff M. F., Uppstrom T. J., Croen B., Wada S. und Carballo C. B. (2019):
Long-term Evaluation of Meniscal Tissue Formation in 3-dimensional-Printed Scaffolds with Sequential Release of Connective Tissue Growth Factor and TGF- β 3 in an Ovine Model.
Am J Sports Med, 47, 2596-2607.
- Nakano T., Dodd C. M. und Scott P. G. (1997):
Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus.
J Orthop Res, 15, 213-220.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S. und Poltorak Z. (1999):
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.
Faseb J, 13, 9-22.
- Newman E., Turner A. S. und Wark J. D. (1995):
The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models.
Bone, 16, 277S-284S.
- Nicosia R. F., Nicosia S. und Smith M. (1994):
Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro.
Am J Pathol, 145, 1023.
- Nurden A. T., Nurden P., Sanchez M., Andia I. und Anitua E. (2008):
Platelets and wound healing.
Front Biosci, 13, 3532-3548.
- O'Loughlin P. F., Morr S., Bogunovic L., Kim A. D., Park B. und Lane J. M. (2008):
Selection and development of preclinical models in fracture-healing research.
J Bone Joint Surg Br, 90, 79-84.
- O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W. S., Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R. und Folkman J. (1997):
Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.
Cell, 88, 277-285.
- O'Reilly M. S., Wiederschain D., Stetler-Stevenson W. G., Folkman J. und Moses M. A. (1999):
Regulation of Angiostatin Production by Matrix Metalloproteinase-2 in a Model of Concomitant Resistance.
J Biol Chem, 274, 29568-29571.

- Ochi M., Uchio Y., Okuda K., Shu N., Yamaguchi H. und Sakai Y. (2001):
Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing.
Arthroscopy, 17, 724-731.
- Okuda K., Ochi M., Shu N. und Uchio Y. (1999):
Meniscal rasping for repair of meniscal tear in the avascular zone.
Arthroscopy, 15, 281-286.
- Osterhoff G., Löffler S., Steinke H., Feja C., Josten C. und Hepp P. (2011):
Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee.
Knee, 18, 98-103.
- Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhäuser M. und Werner C. (2004):
Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.
Stem Cells, 22, 377-384.
- Pabbruwe M. B., Kafienah W., Tarlton J. F., Mistry S., Fox D. J. und Hollander A. P. (2010):
Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant.
Biomaterials, 31, 2583-2591.
- Paletta G. A., Jr., Manning T., Snell E., Parker R. und Bergfeld J. (1997):
The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study.
Am J Sports Med, 25, 692-698.
- Pan J., Dinh T. T., Rajaraman A., Lee M., Scholz A., Czupalla C. J., Kiefel H., Zhu L., Xia L. und Morser J. (2016):
Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo.
Blood, 128, 104-109.
- Pauli C., Grogan S., Patil S., Otsuki S., Hasegawa A., Koziol J., Lotz M. und D'Lima D. (2011):
Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis.
Osteoarthritis Cartilage, 19, 1132-1141.
- Paxton E. S., Stock M. V. und Brophy R. H. (2011):
Meniscal repair versus partial meniscectomy: a systematic review comparing reoperation rates and clinical outcomes.
Arthroscopy, 27, 1275-1288.
- Pearce A., Richards R., Milz S., Schneider E. und Pearce S. (2007):
Animal models for implant biomaterial research in bone: a review.
Eur Cell Mater, 13, 1-10.
- Pedersen T. O., Blois A. L., Xue Y., Xing Z., Sun Y., Finne-Wistrand A., Lorens J. B., Fristad I., Leknes K. N. und Mustafa K. (2014):
Mesenchymal stem cells induce endothelial cell quiescence and promote capillary formation.
Stem Cell Res Ther, 5, DOI: 10.1186/scrt1412.
- Peerbooms J. C., Sluimer J., Bruijn D. J. und Gosens T. (2010):
Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up.
Am J Sports Med, 38, 255-262.

- Pepper M. S., Ferrara N., Orci L. und Montesano R. (1992):
Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro.
Biochem Biophys Res Commun, 189, 824-831.
- Pepper M. S., Wasi S., Ferrara N., Orci L. und Montesano R. (1994):
In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells.
Exp Cell Res, 210, 298-305.
- Peters K. G., De Vries C. und Williams L. T. (1993):
Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth.
Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 8915-8919.
- Petersen W. und Tillmann B. (1995):
Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study.
Acta Orthop Scand, 66, 308-312.
- Petersen W. und Tillmann B. (1998):
Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci.
Anat Embryol (Berl), 197, 317-324.
- Petersen W. und Tillmann B. (1999):
[Structure and vascularization of the knee joint menisci].
Z Orthop Ihre Grenzgeb, 137, 31-37.
- Petersen W., Pufe T., Unterhauser F., Zantop T., Mentlein R. und Weiler A. (2003):
The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing.
Arch Orthop Trauma Surg, 123, 475-480.
- Petersen W., Pufe T., Starke C., Fuchs T., Kopf S., Raschke M., Becker R. und Tillmann B. (2005):
Locally applied angiogenic factors--a new therapeutic tool for meniscal repair.
Ann Anat, 187, 509-519.
- Petersen W., Pufe T., Starke C., Fuchs T., Kopf S., Neumann W., Zantop T., Paletta J., Raschke M. und Becker R. (2007):
The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings.
Arch Orthop Trauma Surg, 127, 235-240.
- Pfaffl M. W. (2001):
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucleic Acids Res, 29, e45-e45.
- Phillips G. D., Stone A. M., Jones B. D., Schultz J. C., Whitehead R. A. und Knighton D. R. (1994):
Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea.
In Vivo, 8, 961-965.
- Phipps M. C., Xu Y. und Bellis S. L. (2012):
Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds.

PLoS One, 7, e40831.

Pietrzak W. S. und Eppley B. L. (2005):
Platelet rich plasma: biology and new technology.
J Craniofac Surg, 16, 1043-1054.

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. und Marshak D. R. (1999):
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
Science, 284, 143-147.

Plouet J., Schilling J. und Gospodarowicz D. (1989):
Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells.
EMBO J, 8, 3801-3806.

Poehling G. G., Ruch D. S. und Chabon S. J. (1990):
The landscape of meniscal injuries.
Clin Sports Med, 9, 539-549.

Pons J., Huang Y., Arakawa-Hoyt J., Washko D., Takagawa J., Ye J., Grossman W. und Su H. (2008):
VEGF improves survival of mesenchymal stem cells in infarcted hearts.
Biochem Biophys Res Commun, 376, 419-422.

Ponte A. L., Marais E., Gallay N., Langonne A., Delorme B., Herault O., Charbord P. und Domenech J. (2007):
The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities.
Stem Cells, 25, 1737-1745.

Port J., Jackson D. W., Lee T. Q. und Simon T. M. (1996):
Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model.
Am J Sports Med, 24, 547-555.

Proffen B. L., McElfresh M., Fleming B. C. und Murray M. M. (2012):
A comparative anatomical study of the human knee and six animal species.
Knee, 19, 493-499.

Pufe T., Petersen W., Tillmann B. und Mentlein R. (2001a):
The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage.
Arthritis Rheum, 44, 1082-1088.

Pufe T., Petersen W., Tillmann B. und Mentlein R. (2001b):
The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons.
Virchows Arch, 439, 579-585.

Pufe T., Petersen W., Tillmann B. und Mentlein R. (2001c):
Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis.
J Rheumatol, 28, 1482-1485.

- Pufe T., Petersen W., Kurz B., Tsokos M., Tillmann B. und Mentlein R. (2003):
Mechanical factors influence the expression of endostatin--an inhibitor of angiogenesis--in tendons.
J Orthop Res, 21, 610-616.
- Pufe T., Petersen W. J., Miosge N., Goldring M. B., Mentlein R., Varoga D. J. und Tillmann B. N. (2004):
Endostatin/collagen XVIII—an inhibitor of angiogenesis—is expressed in cartilage and fibrocartilage.
Matrix Biol, 23, 267-276.
- Puissant B., Barreau C., Bourin P., Clavel C., Corre J., Bousquet C., Taureau C., Cousin B., Abbal M., Laharrague P., Penicaud L., Casteilla L. und Blancher A. (2005):
Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells.
Br J Haematol, 129, 118-129.
- Pujol N., De Chou E. S., Boisrenoult P. und Beaufils P. (2015):
Platelet-rich plasma for open meniscal repair in young patients: Any benefit?
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 23, 51-58.
- Qiu Y., Wang X., Zhang Y., Carr A. J., Zhu L., Xia Z. und Sabokbar A. (2014):
Development of a refined tenocyte expansion culture technique for tendon tissue engineering.
J Tissue Eng Regen Med, 8, 955-962.
- Radin E. L. und Rose R. M. (1986):
Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage.
Clin Orthop Relat Res, 213, 34-40.
- Randelli P. S., Arrigoni P., Cabitza P., Volpi P. und Maffulli N. (2008):
Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study.
Disabil Rehabil, 30, 1584-1589.
- Rangger C., Klestil T., Gloetzer W., Kemmler G. und Benedetto K. P. (1995):
Osteoarthritis after arthroscopic partial meniscectomy.
Am J Sports Med, 23, 240-244.
- Red-Horse K., Crawford Y., Shojaei F. und Ferrara N. (2007):
Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult.
Dev Cell, 12, 181-194.
- Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C. J., Bovenkerk J. E., Pell C. L., Johnstone B. H., Considine R. V. und March K. L. (2004):
Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.
Circulation, 109, 1292-1298.
- Reigstad L. J., Varhaug J. E. und Lillehaug J. R. (2005):
Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family.
Febs J, 272, 5723-5741.
- Rentsch C., Hess R., Rentsch B., Hofmann A., Manthey S., Scharnweber D., Biewener A. und Zwipp H. (2010):
Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds.

In Vitro Cell Dev Biol Anim, 46, 624-634.

Robinson C. J. und Stringer S. E. (2001):
The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.
J Cell Sci, 114, 853-865.

Rodeo S. A. und Warren R. F. (1996):
Meniscal repair using the outside-to-inside technique.
Clin Sports Med, 15, 469-481.

Rodeo S. A. (2000):
Instructional course lectures, the American Academy of Orthopaedic Surgeons-arthroscopic
meniscal repair with use of the outside-in technique.
J Bone Joint Surg Br, 82, 127-141.

Rodrigues M., Griffith L. G. und Wells A. (2010):
Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells.
Stem Cell Res Ther, 1, DOI: 10.1186/scrt1132.

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

Roffi A., Di Matteo B., Krishnakumar G. S., Kon E. und Filardo G. (2017):
Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in
the clinical practice. A systematic review.
Int Orthop, 41, 221-237.

Rönnstrand L. und Heldin C. H. (2001):
Mechanisms of platelet - derived growth factor-induced chemotaxis.
Int J Cancer, 91, 757-762.

Roos E. M., Ostenberg A., Roos H., Ek Dahl C. und Lohmander L. S. (2001):
Long-term outcome of meniscectomy: symptoms, function, and performance tests in patients
with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls.
Osteoarthritis Cartilage, 9, 316-324.

Rosenberg E. S. und Torosian J. (2000):
Sinus grafting using platelet-rich plasma--initial case presentation.
Pract Periodontics Aesthet Dent, 12, 843-850.

Rubman M. H., Noyes F. R. und Barber-Westin S. D. (1998):
Arthroscopic repair of meniscal tears that extend into the avascular zone.
Am J Sports Med, 26, 87-95.

Ruiz-Iban M. A., Diaz-Heredia J., Garcia-Gomez I., Gonzalez-Lizan F., Elias-Martin E. und
Abraira V. (2011):
The effect of the addition of adipose-derived mesenchymal stem cells to a meniscal repair in
the avascular zone: an experimental study in rabbits.
Arthroscopy, 27, 1688-1696.

Rupp S., Seil R. und Kohn D. (2002):
[Meniscus lesions].
Orthopäde, 31, 812-828; quiz 829-831.

- Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K. und Muneta T. (2005):
Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source.
Arthritis Rheum, 52, 2521-2529.
- Salgado A. J., Reis R. L., Sousa N. J. und Gimble J. M. (2010):
Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine.
Curr Stem Cell Res Ther, 5, 103-110.
- Sanchez M., Anitua E., Azofra J., Andia I., Padilla S. und Mujika I. (2007):
Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices.
Am J Sports Med, 35, 245-251.
- Sanchez-Adams J. und Athanasiou K. A. (2009):
The Knee Meniscus: A Complex Tissue of Diverse Cells.
Mol Cell Biol, 2, 332.
- Sarkar M. R., Augat P., Shefelbine S. J., Schorlemmer S., Huber-Lang M., Claes L., Kinzl L. und Ignatius A. (2006):
Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold.
Biomaterials, 27, 1817-1823.
- Saulnier N., Viguier E., Perrier-Groult E., Chenu C., Pillet E., Roger T., Maddens S. und Boulocher C. (2015):
Intra-articular administration of xenogeneic neonatal Mesenchymal Stromal Cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis.
Osteoarthritis Cartilage, 23, 122-133.
- Schlegel K., Kloss F., Schultze-Mosgau S., Neukam F. und Wiltfang J. (2003):
Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Kombinationen von autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien (Biogran® und Algipore®).
Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 7, 112-118.
- Schmidt C. C., Georgescu H. I., Kwok C. K., Blomstrom G. L., Engle C. P., Larkin L. A., Evans C. H. und Woo S. L. Y. (1995):
Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligaments.
J Orthop Res, 13, 184-190.
- Schmidt M. B., Chen E. H. und Lynch S. E. (2006):
A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair.
Osteoarthritis Cartilage, 14, 403-412.
- Schünke M., Schulte E., Schumacher U., Voll M. und Wesker K. (2018).
Prometheus LernAtlas-Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem.
5., überarbeitete Auflage, Stuttgart: Thieme - ISBN: 3132420867.
- Segawa Y., Muneta T., Makino H., Nimura A., Mochizuki T., Ju Y. J., Ezura Y., Umezawa A. und Sekiya I. (2009):

Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles.
J Orthop Res, 27, 435-441.

Seil R. und Kohn D. (2001):
[Meniscus reconstruction. Established and innovative methods].
Unfallchirurg, 104, 274-287.

Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S. und Dvorak H. F. (1983):
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.
Science, 219, 983-985.

Setton L. A., Guilak F., Hsu E. W. und Vail T. P. (1999):
Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair.
Clin Orthop Relat Res, 367, 254-272.

Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L. und Schuh A. C. (1995):
Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.
Nature, 376, 62-66.

Shen W., Chen J., Zhu T., Yin Z., Chen X., Chen L., Fang Z., Heng B. C., Ji J., Chen W. und Ouyang H. W. (2013):
Osteoarthritis prevention through meniscal regeneration induced by intra-articular injection of meniscus stem cells.
Stem Cells Dev, 22, 2071-2082.

Shen W., Chen J., Zhu T., Chen L., Zhang W., Fang Z., Heng B. C., Yin Z., Chen X., Ji J., Chen W. und Ouyang H. W. (2014):
Intra-articular injection of human meniscus stem/progenitor cells promotes meniscus regeneration and ameliorates osteoarthritis through stromal cell-derived factor-1/CXCR4-mediated homing.
Stem Cells Transl Med, 3, 387-394.

Shin K. H., Lee H., Kang S., Ko Y. J., Lee S. Y., Park J. H. und Bae J. H. (2015):
Effect of Leukocyte-Rich and Platelet-Rich Plasma on Healing of a Horizontal Medial Meniscus Tear in a Rabbit Model.
Biomed Res Int, 2015, DOI: 10.1155/2015/179756.

Shweiki D., Itin A., Soffer D. und Keshet E. (1992):
Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.
Nature, 359, 843-845.

Siebert C. H., Becker R., Buchner M., Förster J., Frosch K.-H., Losch A., Niemeyer P. und Scheffler S. (2018):
S2k-Leitlinie Meniskuserkrankung: konservative und operative Therapie.
Z Orthop Unfall, 156, 324-329.

Siegbahn A., Hammacher A., Westermarck B. und Heldin C. (1990):
Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes.
J Clin Invest, 85, 916-920.

- Sierra-Sánchez Á., Montero-Vilchez T., Quiñones-Vico M. I., Sanchez-Diaz M. und Arias-Santiago S. (2021):
Current Advanced Therapies Based on Human Mesenchymal Stem Cells for Skin Diseases.
Front Cell Dev Biol, 9, 643125.
- Simman R., Hoffmann A., Bohinc R. J., Peterson W. C. und Russ A. J. (2008):
Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing.
Ann Plast Surg, 61, 337-344.
- Sonoda M., Harwood F. L., Amiel M. E., Moriya H., Temple M., Chang D. G., Lottman L. M., Sah R. L. und Amiel D. (2000):
The effects of hyaluronan on tissue healing after meniscus injury and repair in a rabbit model.
Am J Sports Med, 28, 90-97.
- Souza T. F., Andrade A. L., Ferreira G. T., Sakamoto S. S., Albuquerque V. B., Bonfim S. R., Luvizotto M. C. und Louzada M. J. (2012):
Healing and expression of growth factors (TGF-beta and PDGF) in canine radial ostectomy gap containing platelet-rich plasma.
Vet Comp Orthop Traumatol, 25, 445-452.
- Spindler K. P., Miller R. R., Andrish J. T. und McDevitt C. A. (1994):
Comparison of collagen synthesis in the peripheral and central region of the canine meniscus.
Clin Orthop Relat Res, 256-263.
- Spindler K. P., Mayes C. E., Miller R. R., Imro A. K. und Davidson J. M. (1995):
Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB).
J Orthop Res, 13, 201-207.
- Stärke C., Kopf S., Petersen W. und Becker R. (2009):
Meniscal repair.
Arthroscopy, 25, 1033-1044.
- Stein T., Mehling A. P., Welsch F., von Eisenhart-Rothe R. und Jäger A. (2010):
Long-term outcome after arthroscopic meniscal repair versus arthroscopic partial meniscectomy for traumatic meniscal tears.
Am J Sports Med, 38, 1542-1548.
- Steinbrück K. (1999):
Epidemiology of sports injuries--25-year-analysis of sports orthopedic-traumatologic ambulatory care.
Sportverletz Sportschaden, 13, 38-52.
- Stewart K., Pabbruwe M., Dickinson S., Sims T., Hollander A. und Chaudhuri J. (2007):
The effect of growth factor treatment on meniscal chondrocyte proliferation and differentiation on polyglycolic acid scaffolds.
J Tissue Eng, 13, 271-280.
- Stone R. G. und Miller G. A. (1985):
A technique of arthroscopic suture of torn menisci.
Arthroscopy, 1, 226-232.
- Sugimori E., Shintani S., Ishikawa K. und Hamakawa H. (2006):
Effects of apatite foam combined with platelet-rich plasma on regeneration of bone defects.
Dent Mater J, 25, 591-596.

- Sundman E. A., Cole B. J. und Fortier L. A. (2011):
Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma.
Am J Sports Med, 39, 2135-2140.
- Szilvassy S. J. (2003):
The biology of hematopoietic stem cells.
Arch Med Res, 34, 446-460.
- Tammela T., Enholm B., Alitalo K. und Paavonen K. (2005):
The biology of vascular endothelial growth factors.
Cardiovasc Res, 65, 550-563.
- Tang Y. L., Zhao Q., Zhang Y. C., Cheng L., Liu M., Shi J., Yang Y. Z., Pan C., Ge J. und Phillips M. I. (2004):
Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium.
Regul Pept, 117, 3-10.
- Tao H., Han Z., Han Z. C. und Li Z. (2016):
Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications.
Stem Cells Int, 2016, DOI: 10.1155/2016/1314709.
- Tenuta J. J. und Arciero R. A. (1994):
Arthroscopic evaluation of meniscal repairs. Factors that effect healing.
Am J Sports Med, 22, 797-802.
- Terman B. I., Carrion M. E., Kovacs E., Rasmussen B. A., Eddy R. L. und Shows T. B. (1991):
Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase.
Oncogene, 6, 1677-1683.
- Terman B. I., Dougher-Vermazen M., Carrion M. E., Dimitrov D., Armellino D. C., Gospodarowicz D. und Böhlen P. (1992):
Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.
Biochem Biophys Res Commun, 187, 1579-1586.
- Thanasas C., Papadimitriou G., Charalambidis C., Paraskevopoulos I. und Papanikolaou A. (2011):
Platelet-rich plasma versus autologous whole blood for the treatment of chronic lateral elbow epicondylitis: a randomized controlled clinical trial.
Am J Sports Med, 39, 2130-2134.
- Tielinen L., Lindahl J., Koskinen S. und Hirvensalo E. (2007):
Clinical and MRI evaluation of meniscal tears repaired with bioabsorbable arrows.
Scand J Surg, 96, 252-255.
- Tienen T. G., Heijkants R. G., Buma P., De Groot J. H., Pennings A. J. und Veth R. P. (2003):
A porous polymer scaffold for meniscal lesion repair--a study in dogs.
Biomaterials, 24, 2541-2548.
- Tomita S., Mickle D. A., Weisel R. D., Jia Z.-Q., Tumiati L. C., Allidina Y., Liu P. und Li R.-K. (2002):
Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation.

J Thorac Cardiovasc Surg, 123, 1132-1140.

Tozum T. und Demiralp B. (2003):
Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry.
Journal-Canadian Dental Association, 69, 664-665.

Ueblacker P., Gebauer M., Ziegler M., Braumann K.-M. und Rueger J. (2005):
Verletzungen und Fehlbelastungsfolgen im Sport.
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 48, 927-938.

Upton M. L., Chen J. und Setton L. A. (2006a):
Region-specific constitutive gene expression in the adult porcine meniscus.
J Orthop Res, 24, 1562-1570.

Upton M. L., Guilak F., Laursen T. A. und Setton L. A. (2006b):
Finite element modeling predictions of region-specific cell-matrix mechanics in the meniscus.
Biomech Model Mechanobiol, 5, 140-149.

Upton M. L., Hennerbichler A., Fermor B., Guilak F., Weinberg J. B. und Setton L. A. (2006c):
Biaxial strain effects on cells from the inner and outer regions of the meniscus.
Connect Tissue Res, 47, 207-214.

Uysal C. A., Tobita M., Hyakusoku H. und Mizuno H. (2012):
Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation.
J Plast Reconstr Aesthet Surg, 65, 1712-1719.

van Pham P., Bui K. H., Ngo D. Q., Vu N. B., Truong N. H., Phan N. L., Le D. M., Duong T. D., Nguyen T. D., Le V. T. und Phan N. K. (2013):
Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage.
Stem Cell Res Ther, 4, DOI: 10.1186/scrt1277.

van Trommel M. F., Simonian P. T., Potter H. G. und Wickiewicz T. L. (1998):
Arthroscopic meniscal repair with fibrin clot of complete radial tears of the lateral meniscus in the avascular zone.
Arthroscopy, 14, 360-365.

Veth R. P. (1985):
Clinical significance of knee joint changes after meniscectomy.
Clin Orthop Relat Res, 198, 56-60.

von der Burchard C.: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Migration von mesenchymalen Progenitorzellen im menschlichen Kniemeniskus.
unv. Diss., Georg-August-Universität Göttingen, 2015

Walker P. S. und Erkman M. J. (1975):
The role of the menisci in force transmission across the knee.
Clin Orthop Relat Res, 184-192.

Walsh C. J., Goodman D., Caplan A. I. und Goldberg V. M. (1999):
Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model.
Tissue Eng, 5, 327-337.

- Wang X., Hu Q., Mansoor A., Lee J., Wang Z., Lee T., From A. H. und Zhang J. (2006):
Bioenergetic and functional consequences of stem cell-based VEGF delivery in pressure-overloaded swine hearts.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 290, H1393-1405.
- Wang X., Qiu Y., Triffitt J., Carr A., Xia Z. und Sabokbar A. (2012):
Proliferation and differentiation of human tenocytes in response to platelet rich plasma: an in vitro and in vivo study.
J Orthop Res, 30, 982-990.
- Warren R. F. (1985):
Arthroscopic meniscus repair.
Arthroscopy, 1, 170-172.
- Weibrich G., Buch R. S., Kleis W. K., Hafner G., Hitzler W. E. und Wagner W. (2002a):
Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation.
Growth factors, 20, 93-97.
- Weibrich G., Kleis W. K., Hafner G. und Hitzler W. E. (2002b):
Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count.
J Craniomaxillofac Surg, 30, 97-102.
- Weibrich G., Kleis W. K., Buch R., Hitzler W. E. und Hafner G. (2003):
The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit.
Clin Oral Implants Res, 14, 233-239.
- Weidner N., Semple J. P., Welch W. R. und Folkman J. (1991):
Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma.
N Engl J Med, 324, 1-8.
- Weigel B. und Nerlich M. (2005).
Praxisbuch Unfallchirurgie.
Vol. 1, Berlin - Heidelberg: Springer Verlag - ISBN: 978-3-540-41115-4.
- Weiler A., Forster C., Hunt P., Falk R., Jung T., Unterhauser F. N., Bergmann V., Schmidmaier G. und Haas N. P. (2004):
The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction.
Am J Sports Med, 32, 881-891.
- Weiss C. B., Lundberg M., Hamberg P., DeHaven K. E. und Gillquist J. (1989):
Non-operative treatment of meniscal tears.
J Bone Joint Surg Am, 71, 811-822.
- Whitehouse M. R., Howells N. R., Parry M. C., Austin E., Kafienah W., Brady K., Goodship A. E., Eldridge J. D., Blom A. W. und Hollander A. P. (2017):
Repair of Torn Avascular Meniscal Cartilage Using Undifferentiated Autologous Mesenchymal Stem Cells: From In Vitro Optimization to a First-in-Human Study.
Stem Cells Transl Med, 6, 1237-1248.
- Windmolders S., De Boeck A., Koninckx R., Daniels A., De Wever O., Bracke M., Hendrikx M., Hensen K. und Rummens J. L. (2014):

Mesenchymal stem cell secreted platelet derived growth factor exerts a pro-migratory effect on resident Cardiac Atrial appendage Stem Cells.
J Mol Cell Cardiol, 66, 177-188.

Woodell-May J. E., Ridderman D. N., Swift M. J. und Higgins J. (2005):
Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting.
J Craniofac Surg, 16, 749-756.

Wu L., Brucker M., Gruskin E., Roth S. I. und Mustoe T. A. (1997):
Differential effects of platelet-derived growth factor BB in accelerating wound healing in aged versus young animals: the impact of tissue hypoxia.
Plast Reconstr Surg, 99, 815-822.

Wu X., Huang L., Zhou Q., Song Y., Li A., Jin J. und Cui B. (2005):
Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth.
Int J Cardiol, 105, 274-282.

Yamazaki Y. und Morita T. (2006):
Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors.
Mol Divers, 10, 515-527.

Yanez R., Lamana M. L., Garcia-Castro J., Colmenero I., Ramirez M. und Bueren J. A. (2006):
Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease.
Stem Cells, 24, 2582-2591.

Yanez R., Oviedo A., Aldea M., Bueren J. A. und Lamana M. L. (2010):
Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells.
Exp Cell Res, 316, 3109-3123.

Yin W.-J., Xu H.-T., Sheng J.-G., An Z.-Q., Guo S.-C., Xie X.-T. und Zhang C.-Q. (2016):
Advantages of Pure Platelet-Rich Plasma Compared with Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma in Treating Rabbit Knee Osteoarthritis.
Med Sci Monit, 22, 1280-1290.

Yokoya S., Mochizuki Y., Natsu K., Omae H., Nagata Y. und Ochi M. (2012):
Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model.
Am J Sports Med, 40, 1259-1268.

Yoshikawa Y. und Abrahamsson S. O. (2001):
Dose-related cellular effects of platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro.
Acta Orthop Scand, 72, 287-292.

Yoshimura H., Muneta T., Nimura A., Yokoyama A., Koga H. und Sekiya I. (2007):
Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle.
Cell Tissue Res, 327, 449-462.

Yu H., Adesida A. B. und Jomha N. M. (2015):
Meniscus repair using mesenchymal stem cells – a comprehensive review.
Stem Cell Res Ther, 6, DOI: 10.1186/s13287-13015-10077-13282.

- Zellner J., Mueller M., Berner A., Dienstknecht T., Kujat R., Nerlich M., Hennemann B., Koller M., Prantl L., Angele M. und Angele P. (2010):
Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus.
J Biomed Mater Res A, 94, 1150-1161.
- Zellner J., Hierl K., Mueller M., Pfeifer C., Berner A., Dienstknecht T., Krutsch W., Geis S., Gehmert S., Kujat R., Dendorfer S., Prantl L., Nerlich M. und Angele P. (2013):
Stem cell-based tissue-engineering for treatment of meniscal tears in the avascular zone.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 101, 1133-1142.
- Zellner J., Taeger C. D., Schaffer M., Roldan J. C., Loibl M., Mueller M. B., Berner A., Krutsch W., Huber M. K., Kujat R., Nerlich M. und Angele P. (2014):
Are applied growth factors able to mimic the positive effects of mesenchymal stem cells on the regeneration of meniscus in the avascular zone?
Biomed Res Int, 2014, DOI: 10.1155/2014/537686.
- Zhang F., Liu H., Stile F., Lei M.-P., Pang Y., Oswald T. M., Beck J., Dorsett-Martin W. und Lineaweaver W. C. (2003):
Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing.
Plast Reconstr Surg, 112, 1613-1619.
- Zhang Z., Arnold J. A., Williams T. und McCann B. (1995):
Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats.
Am J Sports Med, 23, 35-41.
- Zhang Z. Y., Huang A. W., Fan J. J., Wei K., Jin D., Chen B., Li D., Bi L., Wang J. und Pei G. (2013):
The potential use of allogeneic platelet-rich plasma for large bone defect treatment: immunogenicity and defect healing efficacy.
Cell Transplant, 22, 175-187.
- Zhou Y., Zhang J., Wu H., Hogan M. V. und Wang J. H. (2015):
The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries.
Stem Cell Res Ther, 6, DOI: 10.1186/s13287-13015-10172-13284.
- Zscharnack M., Hepp P., Richter R., Aigner T., Schulz R., Somerson J., Josten C., Bader A. und Marquass B. (2010):
Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model.
Am J Sports Med, 38, 1857-1869.
- Zwaginga J. J. und Doevendans P. (2003):
Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering.
Clin Exp Pharmacol Physiol, 30, 900-908.

10 Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. med. vet. Robert Klopffleisch für die Betreuung und Durchsicht meiner Doktorarbeit als Doktorvater danken. Ebenso danke ich Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg für die Durchsicht meiner Doktorarbeit als Drittgutachter.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. med. Sebastian Kopf, in dessen Team ich diese Arbeit erstellen durfte, für die großartige Betreuung und die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und die Durchsicht der Doktorarbeit als Zweitgutachter. Sein umfangreiches Wissen, sein kritisches Urteil, seine Hilfsbereitschaft und Geduld haben maßgeblich zum Gelingen dieser Promotion beigetragen.

Weiter möchte ich mich bei Dr. med. vet. Tanja Schmidt und Dr. med. vet. Elisabeth Beutel für die Hilfe bei tiermedizinischen Fragen und bei der Organisation der Operationen bedanken.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders auch bei meinen Mitdoktoranden Raphael-Donatus Hein, Janine Igel und Jasmin Rose für die gegenseitige Unterstützung, die hervorragende Teamarbeit sowie das Verständnis für- und das Lachen miteinander.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeiter:innen des Julius Wolff Instituts und allen voran Gabriela Korus für die Einarbeitung sowie die unermüdliche Unterstützung bei der Immunhistochemie und Mario Thiele für die Hilfe bei der Bildanalyse. Auch bei Andrea Palmiini möchte ich mich auch ganz besonders bedanken, da er Licht in das statistische Dunkel gebracht hat und mich sehr geduldig durch die Welt der Statistik geführt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpfleger:innen der tierexperimentellen Einrichtung des Virchow-Klinikums für die liebevolle Betreuung und Pflege unserer Versuchstiere. Ganz besonderer Dank gilt den Schafen. Ich danke auch meinem Chef der Tierarztpraxis Sörensen GmbH Lennart Sörensen für die Unterstützung und die freien Tage, an denen ich diese Arbeit schreiben konnte.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern Martina und Mario Stein. Sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern haben es auch geschafft, mich während der Zeit meiner Dissertation immer wieder zu ermutigen. Mein besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Niels Folta, meiner besten Freundin Georgette-André Ziegler sowie meinem besten Freund Boris Winter, die mir emotional beigestanden haben und es mit Humor, Liebe und Zugewandtheit geschafft haben, mich immer wieder zu motivieren. Ich danke all meinen Freunden für die wohlwollende Ablenkung und die Energie zum Auftanken, ohne die eine so arbeitsintensive Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

11 Erklärung zu Interessenskonflikten und Finanzierungshilfen

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenkonflikte durch Zuwendungen Dritter.

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Nadja Goldbach

Berlin, den 08.09.2022



9 783967 291834

mbvberlin mensch und buch verlag

59,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-183-4