

Aus dem Julius Wolff Institut und dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**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)**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Janine Igel, geb. Schrödter
aus Bad Belzig

Datum der Promotion:
18.12.2020

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
II. TABELLENVERZEICHNIS	6
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
IV. ABSTRACTS	10
1. EINLEITUNG.....	14
2. ZIELSTELLUNG UND HYPOTHESEN.....	30
3. MATERIALIEN	31
4. METHODEN	38
4.1 Versuchstiere	38
4.2 Anästhesie.....	39
4.3 Operation.....	40
4.4 Gewinnung und Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen	43
4.5 Produktion des plättchenreichen Plasmas	46
4.6 Postoperative Betreuung und Euthanasie der Versuchstiere.....	49
4.7 Makroskopische Beurteilung und Probenentnahme.....	50
4.8 Histologische Verfahren	52
4.9 FGF-2-Immunhistochemie.....	53
4.10 Quantitative Real-Time RT-PCR.....	59
4.11 Statistische Analyse	65
5. ERGEBNISSE	67
5.1 Makroskopische Beurteilung	67
5.2 Versuchstierparameter	68
5.3 Zellzahlen im plättchenreichen Plasma (PRP).....	68
5.4 Histologie.....	69
5.5 FGF-2-Immunhistochemie.....	72
5.6 Quantitative Bestimmung der relativen mRNA-Expression (RT-PCR).....	81
6. DISKUSSION	88
7. ZUSAMMENFASSUNG	106
8. LITERATURVERZEICHNIS	107
9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	120
10. PUBLIKATIONEN: KONGRESSVORTRÄGE- UND POSTER	122
11. LEBENS LAUF	123

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

12. DANKSAGUNG	124
----------------------	-----

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Anatomie des Kniegelenks	15
Abb. 2: Durchblutung des Meniskus nach Zonen	16
Abb. 3: Kollagenfaserstruktur des Meniskus.....	17
Abb. 4: Zellmorphologie des Meniskus	17
Abb. 5: Morphologie der Meniskusrisse	18
Abb. 6: Outside-In-Meniskusnaht.....	19
Abb. 7: Merino-Mix-Schafe im Tierstall des tierexperimentellen Instituts der Charité – Universitätsmedizin Berlin (FEM).....	38
Abb. 8: Schaf auf dem OP-Tisch	40
Abb. 9: Intraoperative Sicht auf den Meniskusriss.....	41
Abb. 10: Meniskusnaht in Outside-in-Technik	43
Abb. 11: Entnahme des Knochenmarkspirats aus dem Beckenkamm	44
Abb. 12: Kollagencarrier	46
Abb. 13: Schema der PRP-Herstellung	47
Abb. 14: C-Chip Zählkammer	48
Abb. 15: Schematische Darstellung der Zählkammer.....	49
Abb. 16: Schematische Darstellung der Gewebeentnahme im Meniskus	51
Abb. 17: Menisken nach Superimposition.....	56
Abb. 18: Schema der ROIs des Meniskus	57
Abb. 19: Operierter Meniskus mit eingezeichneten ROIs (bunt).....	58
Abb. 20: Speziell angefertigter Mörser zur Homogenisation des Meniskusgewebes	60
Abb. 21: Meniskus mit Riss <i>ex situ</i> und sichtbarem Fadenmaterial im Riss.....	67
Abb. 22: Thrombozytenkonzentration im Vollblut und im PRP in den PRP- und PRP + MSC-Gruppen	69
Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines operierten Meniskus der PRP-Gruppe mit sichtbarem Riss (10-fache Vergrößerung).....	70
Abb. 24: Safranin-O-Lichtgrün-Färbung eines operierten Meniskus der MSC-Gruppe mit sichtbarem Riss (10-fache Vergrößerung).....	71
Abb. 25: Gesamtzellzahl in den rissnahen ROIs (Rs1Va+Rs1Av) der operierten (OP) und kontralateralen Menisken (KL)	72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 26: FGF-2(1:100)-Färbung eines operierten Meniskus der PRP + MSC-Gruppe (10-fache Vergrößerung)	73
Abb. 27: FGF-2(1:100)-Färbung (10-fache Vergrößerung) von Achillessehne und Myokard	74
Abb. 28: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen aller ROIs der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	75
Abb. 29: Veränderung FGF-2-positiver Zellen in den einzelnen Regionen der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	76
Abb. 30: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen am Riss (Rs1Va + Rs1Av) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	77
Abb. 31: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen rissnah vaskulär (Rs1Va + Rs2Va) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	78
Abb. 32: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen rissnah avaskulär (Rs1Av + Rs1Av) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	79
Abb. 33: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen vaskulär (Va) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	80
Abb. 34: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen avaskulär (Av) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken	81
Abb. 35: Relative FGF-2-mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken	82
Abb. 36: Relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken	84
Abb. 37: Relative mRNA-Expression der Zytokine ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken	85
Abb. 38: Relative mRNA-Expression der Kollagene ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken	87

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Schema der Behandlungsgruppen	42
Tab. 2: Protokoll Einbettungsautomat.....	52
Tab. 3: Eigenschaften des verwendeten FGF-2-Antikörpers	55
Tab. 4: Primer mit Sequenzen, Produktlänge und Effizienz	62
Tab. 5: Dauer der postoperativen Belastung der operierten Gliedmaße (Mediane).....	68
Tab. 6: Gesamtzellzahlen der operierten (OP) und kontralateralen (KL) Menisken	72
Tab. 7: FGF-2-positive Zellen aller ROIs der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)	75
Tab. 8: FGF-2-positive Zellen am Riss (Rs1Va + Rs1Av) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL).....	77
Tab. 9: FGF-2-positive Zellen rissnah vaskulär (Rs1Va + Rs2Va) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL).....	78
Tab. 10: FGF-2-positive Zellen rissnah avaskulär (Rs1Av + Rs1Av) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL).....	79
Tab. 11: FGF-2-positive Zellen vaskulär (Va) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)	80
Tab. 12: FGF-2-positive Zellen avaskulär (Av) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL).....	81
Tab. 13: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der FGF-2- $\Delta\Delta$ Ct-Werte normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken.....	82
Tab. 14: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Wachstumsfaktoren normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken.....	84
Tab. 15: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Zytokine normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken	86
Tab. 16: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Kollagene normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken.....	87

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADAMTS-5	eng. <i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5</i>
Aqua dest.	Aqua destillata = destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
Col1	Kollagen Typ I
Col1A1	Kollagen Typ 1A1
Col1A2	Kollagen Typ 1A2
Col2	Kollagen Typ II
Col2A	Kollagen Typ 2A
Col2A1	Kollagen Typ 2A1
Col3	Kollagen Typ III
Ct-Werte	engl. <i>threshold cycle</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	eng. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
fwd	forward (Primer)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxylin – Eosin
i. v.	intravenös

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin 1
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IQR	Interquartilspanne (eng. <i>interquartile range</i>)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KL	kontralateral
LCA	Ligamentum cruciatum anterius
LCP	Ligamentum cruciatum posterius
LCT	Ligamentum collaterale tibiale
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP-13	Matrix-Metalloproteinase 13
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure (eng. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (eng. <i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF-AB	Platelet-derived growth factor AB
PDGF- β	Platelet-derived growth factor beta, auch PDGF-BB
PRP	plättchenreiches Plasma (engl. <i>platelet-rich plasma</i>)
rev	reverse (Primer)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RNA	Ribonukleinsäure (eng. <i>ribonucleic acid</i>)
ROIs	Regions of interest
Rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (eng. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
s	Sekunde
s. c.	subkutan (latein. <i>subcutan</i>)
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TIMP-1	Tissue inhibitor of Metalloproteinase 1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
V.	Vena
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
$\Delta\Delta$ Ct-Werte	Delta-delta-CT Werte
μ l	Mikroliter

IV.ABSTRACTS

Deutsche Version

Einleitung: Der Meniskus ist häufig von traumatischen Verletzungen betroffen. Die Durchblutung und dadurch das Heilungspotenzial nehmen von peripher nach zentral ab, sodass die Heilung zentraler, avaskulärer Meniskusrisse limitiert ist. Häufig erfolgt eine partielle Meniskusresektion, da das Risiko, dass die gewebeerhaltende Meniskusnaht versagt, hoch ist. Forschungsansätze untersuchen potenziell heilungsfördernde Blutbestandteile, wie das plättchenreiche Plasma (PRP) und die mesenchymalen Stromazellen (MSC). Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus dem PRP kommt es z. B. zur Steigerung der Zellproliferation, Bildung extrazellulärer Matrix und Chemotaxis der MSC. Dass die Kombination von PRP und MSC heilungsfördernder sein kann als eine alleinige Applikation, konnte bereits am Knochen und Gelenkknorpel gezeigt werden. In der vorliegenden tierexperimentellen Studie soll die Wirkung von PRP + MSC *in vivo* auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse untersucht werden. Dabei sollen wundheilungsrelevante Wachstumsfaktoren (FGF-2, TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2), katabole Zytokine (TNF- α , IL-1 α) sowie Kollagene (Col1A1, 1A2, 2A1) analysiert werden.

Methodik: 30 Schafen wurde ein longitudinaler Riss in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* gesetzt. In fünf Gruppen (je n = 6) wurde der Riss versorgt mit: (1) Naht, (2) Naht + Kollagencarrier, (3) Naht + Kollagencarrier + PRP, (4) Naht + Kollagencarrier + MSC sowie (5) Naht + Kollagencarrier + PRP + MSC. Nach acht Wochen wurden der operierte und der kontralaterale (als Referenz) *Meniscus medialis* entnommen und makroskopisch, histologisch sowie FGF-2-immunohistochemisch untersucht. Die relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren FGF-2, TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2, der Zytokine TNF- α , IL-1 α sowie der Kollagene Col1A1, Col1A2 und Col2A1 wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Für die Statistik wurden nicht-parametrischen Testverfahren verwendet (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Ergebnisse: In keiner Gruppe konnte eine makroskopische Heilung festgestellt werden. Die relative FGF-2-mRNA-Expression war in allen Gruppen signifikant vermindert im

ABSTRACTS

Vergleich zu den kontralateralen gesunden Menisken. Die niedrigste FGF-2-mRNA-Expression zeigte die PRP + MSC-Gruppe. Die relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2, Zytokine TNF- α , IL-1 α und Kollagene Col1A2, Col2A1, Col1A1 war dort nicht signifikant verändert. Zwischen den Gruppen war nur die Col1A1-mRNA-Expression signifikant verändert, mit einer geringeren Expression in der PRP + MSC-Gruppe als in der Carrier-Gruppe.

Schlussfolgerung: Durch die alleinige und kombinierte lokale Applikation von PRP + MSC kam es nach acht Wochen zu keiner verbesserten makroskopischen Heilung avaskulärer Meniskusrisse. Aufgrund dieser Studienergebnisse kann aktuell die lokale Anwendung von PRP, MSC und ihrer Kombination zur Therapie avaskulärer Meniskusrisse nicht empfohlen werden. Nach kombinierter Applikation wurde die niedrigste FGF-2-mRNA-Expression nachgewiesen, sodass sogar ein negativer Einfluss auf die Wundheilung nicht auszuschließen ist.

ABSTRACTS

English version

Introduction: Traumatic meniscus injuries are common. Due to decreasing vascularization the healing potential is strongly declining from the periphery to the central zone. Therefore the healing of a central avascular meniscal tear is limited. It often requires a partial meniscectomy due to the high meniscus suture failure rate. Efforts focus on potentially healing promoting blood components such as platelet-rich plasma (PRP) and mesenchymal stroma cells (MSC). Growth factors released from PRP stimulate e. g. cell proliferation, extracellular matrix syntheses and chemotaxis of MSC. The fact that PRP + MSC can be more beneficial to healing than a single application was already demonstrated on bones and joint cartilage. This experimental sheep study aims to evaluate the effect of PRP + MSC on meniscal healing of avascular tears by analyzing important growth factors of wound healing (FGF-2, TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2, cytokines (TNF- α , IL-1 α) and collagens (Col1A1, Col1A2, Col2A1).

Methods: A longitudinal tear was created in the avascular zone of the medial meniscus of 30 sheep. In five groups (n = 6 each) the tear was treated with: (1) suture, (2) suture + collagen-carrier, (3) suture + collagen-carrier + PRP; (4) suture + collagen-carrier + MSC and (5) suture + collagen-carrier + PRP + MSC. After eight weeks, the operated and the contralateral (as reference) medial menisci were harvested. Evaluation of gross healing, histology and FGF-2 immunohistochemistry were performed. Relative mRNA expression of growth factors FGF-2, TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2, cytokines TNF- α , IL-1 α , as well as collagens Col1A1, Col1A2 and Col2A1 were quantified by qRT-PCR. Nonparametric statistics (significance level $p < 0,05$) were used.

Results: No group showed gross healing. The relative FGF-2 mRNA expression was significantly decreased in all groups compared to the contralateral menisci. The PRP + MSC-group showed the lowest FGF-2 mRNA expression. The relative mRNA expression of the growth factors (TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2), cytokines (TNF- α , IL-1 α) und collagens (Col1A2, Col2A1, Col1A1) showed no significant change in the PRP + MSC-group. Between the groups only the mRNA expression of Col1A1 was significantly downregulated in the PRP + MSC-group compared to the carrier-group.

ABSTRACTS

Conclusion: The isolated and combined application of PRP + MSC failed to improve the repair of avascular meniscus tears after eight weeks. Therefore the local application of PRP, MSC and its combination cannot be recommended. The reduced FGF-2 mRNA expression after PRP + MSC application even suggests a negative effect onto meniscus healing.

1. EINLEITUNG

Das Knie ist die am häufigsten von Sportverletzungen betroffene Körperregion (1). Zu den Sportarten mit den häufigsten Knieverletzungen zählen Fußball, Skiabfahrt und Handball (1, 2). Traumatische intraartikuläre Verletzungen betreffen am häufigsten das *Ligamentum cruciatum anterius* (LCA, ca. 45 %) (2). Am zweithäufigsten ist der *Meniscus medialis* verletzt (ca. 24 %), während der *Meniscus lateralis* seltener Verletzungen erleidet (ca. 8 %) (2). Der Meniskus ist eine wichtige anatomische Struktur des Kniegelenks. Er besitzt bedeutende Funktionen für die Kniegelenksmechanik und -stabilität: Er verteilt und nimmt Druck auf, stabilisiert das Kniegelenk passiv und verhindert extreme Extension sowie Flexion (3-5). Außerdem trägt der Meniskus zur Kongruenz und Lubrikation des Kniegelenks bei und besitzt propriozeptive Funktionen (3-5).

Um die Funktion des Meniskus zu verstehen, müssen die anatomischen Gegebenheiten betrachtet werden. Menisken sind paarig angelegte Faserknorpel im Kniegelenk. In jedem Kniegelenk befindet sich ein lateraler und medialer Meniskus auf dem Tibiaplateau gelegen und kranial in Kontakt mit den Femurkondylen. Der *Meniscus medialis* ist über bandartig auslaufende Strukturen des Vorder- und Hinterhorns, den Meniskuswurzeln, mit dem Tibiaplateau verbunden. Die Vorderhornwurzel inseriert in der *Fossa intercondylaris anterior tibiae* und die Hinterhornwurzel in der *Fossa intercondylaris posterior tibiae* zwischen dem *Ligamentum cruciatum posterius* (LCP) und der Hinterhornwurzel des *Meniscus lateralis* am Tibiaplateau (6). Das *Ligamentum transversum genus* verbindet die Vorderhörner der *Menisci medialis et lateralis* (6). Zusätzlich ist der *Meniscus medialis* mit dem *Ligamentum collaterale tibiale* (LCT) verbunden (4, 6). Der *Meniscus lateralis* ist mit dem Vorderhorn an der *Eminentia intercondylaris lateral* der Insertion des LCA und mit der Hinterhornwurzel zwischen Hinterhornwurzel des *Meniscus medialis* und des tibialen LCA-Ansatzes am Tibiaplateau befestigt (5, 6). Zusätzlich kann das Hinterhorn des *Meniscus lateralis* durch die *Ligamenta meniscofemorale anterius* (Humphrey-Ligament) *et posterius* (Wrisberg-Ligament) am Femur fixiert sein (Abb. 1). Beide sind jedoch inkonsistent angelegt (4, 5, 7).

EINLEITUNG

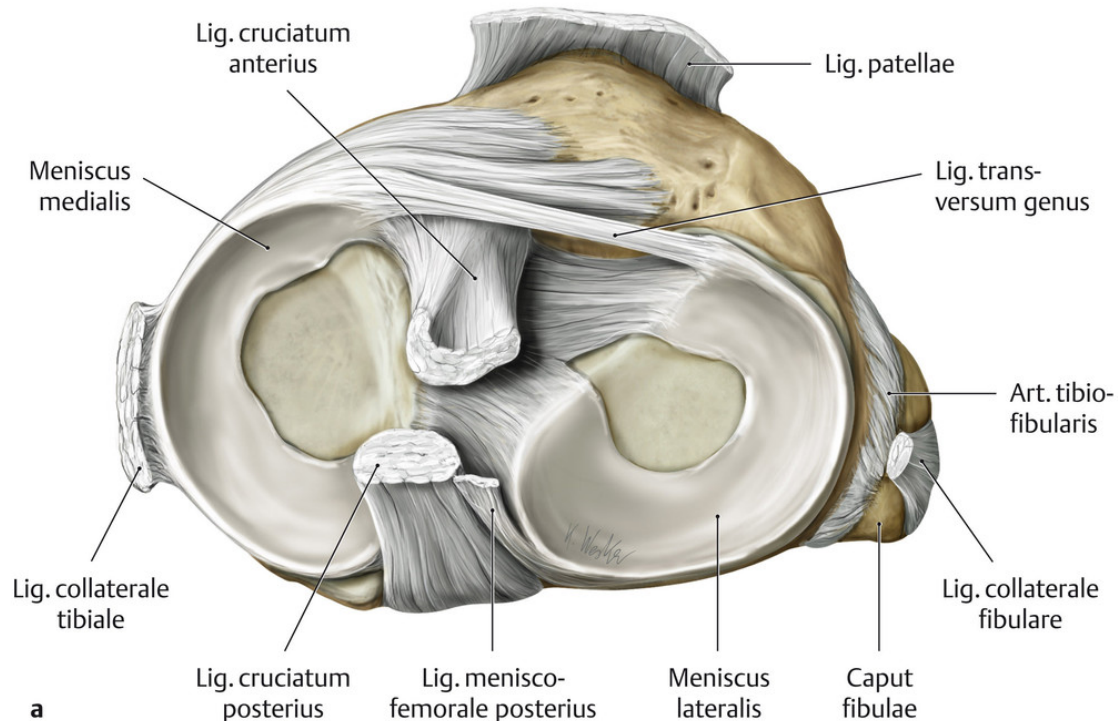


Abb. 1: Anatomie des Kniegelenks: Ansicht auf das rechte Tibiaplateau von proximal nach Eröffnung der Kniegelenkscapsel und Durchtrennung der Kreuz- und Kollateralbändern. Das Lig. meniscofemorale anterius fehlt in der Darstellung. Aus (8) mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlags.

Durchblutet wird der Meniskus über einen kapillaren Plexus von Kapsel und Synovialgewebe (9). Der Gefäßplexus des *Meniscus medialis* wird aus den *Aa. superior et inferiores medialis genus* und der *Meniscus lateralis* über die *Aa. superior et inferiores lateralis genus* versorgt (5). Diese Arterien entspringen der *A. poplitea* und formen einen Gefäßplexus in der Peripherie des Meniskus (5). Nach der Geburt ist der Meniskus noch komplett vaskularisiert, wird jedoch bis zum 10. Lebensjahr avaskulärer und entspricht dann dem eines Erwachsenen (5). Die Peripherie des Meniskus ist vaskularisiert und wird rote Zone genannt (6). Sie umfasst etwa 10 bis 30 % der Meniskusbreite (9). Der Übergang von der peripher vaskulären (rote Zone) zur avaskulären Zone (weiße Zone) wird als rot-weiße Zone bezeichnet (Abb. 2).

Aufgrund der abnehmenden Durchblutung von peripher nach zentral nimmt auch das Heilungspotenzial nach zentral hin ab (9, 10). Für die Therapie von Meniskusverletzungen spielt demzufolge deren Lokalisation eine entscheidende Rolle.

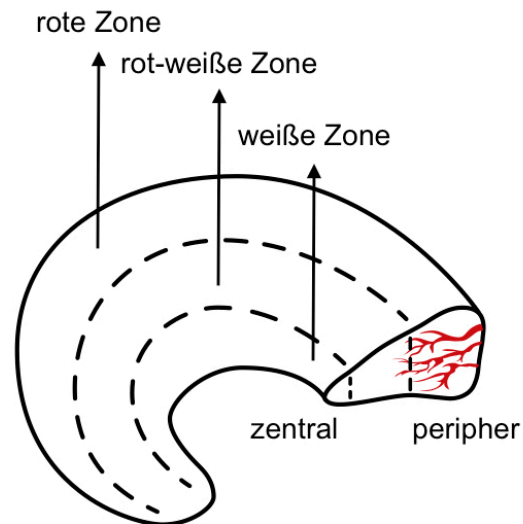


Abb. 2: Durchblutung des Meniskus nach Zonen

Morphologisch ist der Meniskus konvex geformt und ähnelt einem abgerundeten Halbmond (6). Er ist peripher dicker und wird nach zentral hin dünner (6). Er ist weiß bis grau, oberflächlich glatt und manuell schwer komprimierbar. Histologisch besteht der Meniskus aus Kollagenbündeln (11). Die Kollagenfasern verlaufen in der Peripherie zirkumferent und dienen der Stabilisierung (11). Im Inneren ziehen diese von zentral nach peripher, um die axialen Kräfte zu verteilen (Abb. 3) (11). Der Meniskus enthält Kollagen des Typs I, II, III, V, und VI, wobei 90 % der Kollagenfasern vom Typ I sind (5). Kollagenfasern des Typ II befinden sich vor allem im Inneren des Meniskus (intramural) (12, 13). Die avaskuläre Zone des Meniskus besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I (Col1) und II (Col2) (13). Kollagen Typ III (Col3) bildet weniger als 1 % der kollagenen Fasern (13). Der Kollagengehalt bildet 60 bis 70 % des Trockengewichts des Meniskus (5).

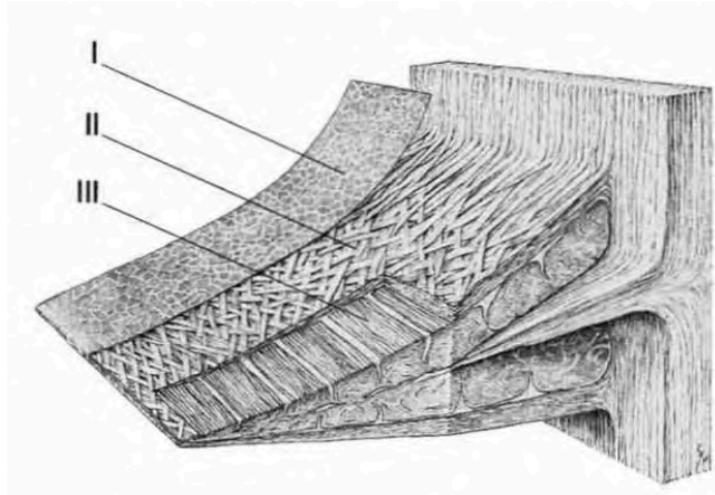


Abb. 3: Kollagenfaserstruktur des Meniskus: I dünne Kollagenfibrillen an der Oberfläche, II kreuzende Kollagenfaserbündel, III zirkulär angeordnete Kollagenfibrillenbündel mit vereinzelt radiären Kollagenfibrillen im Inneren, durchsetzt von lockerem Bindegewebe von der Gelenkkapsel. Aus (14) mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlags.

Zellulär besteht der Meniskus aus Fibrochondrozyten (5, 12) (Abb. 4). Im Inneren des Meniskus sind diese morphologisch groß und rund, während sie zur Oberfläche, nahe der Gelenkflächen und in der Peripherie ovaler bzw. fusiformer geformt sind, ähnlich Fibroblasten (Abb. 4) (5, 12, 15).

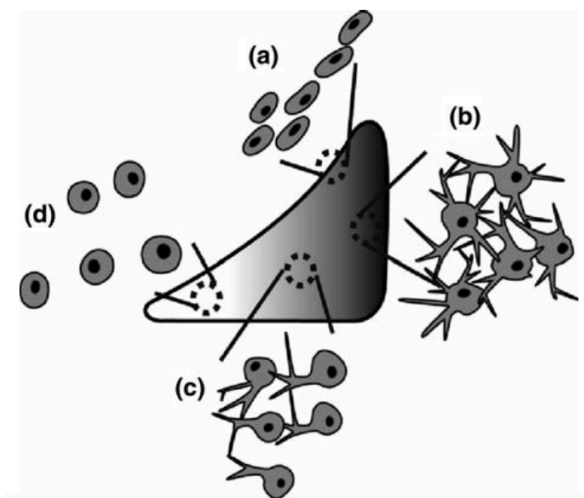


Abb. 4: Zellmorphologie des Meniskus: Längliche, dicht stehende Zellen an der Oberfläche (a). Fusiforme fibroblasten-ähnliche Zellen in der Peripherie (b). Weniger fusiforme Gestalt zum Inneren hin (c). Runde Fibrochondrozyten im Inneren der zentralen Region des Meniskus (d). Aus (4) mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

EINLEITUNG

Verletzungen des Meniskus sind häufig und können traumatisch als Meniskusriss (Abb. 5) z. B. zusammen mit Verletzungen des LCA, isoliert durch Verdrehungen oder Hyperextension im Kniegelenk oder als Meniskusläsion infolge degenerativer Prozesse bei meist älteren Patienten entstehen (5). Der *Meniscus medialis* ist aufgrund seiner Festigkeit am Tibiaplateau häufiger von Verletzungen betroffen (5). Meniskusverletzungen erhöhen das Risiko einer Gonarthroseentstehung (16). Aus diesem Grund ist die Wahl eines geeigneten Therapieverfahren essenziell. Dabei sind Kenntnisse über die Art und Lokalisation des Meniskusrisses entscheidend. Traumatische Meniskusrisse verlaufen meist vertikal, z. B. longitudinal (Sonderform: Korbhenkelriss), oder radiär (5, 17). Schräg- und Radiärrisse finden sich meist in der *Pars intermedia* (5, 17).

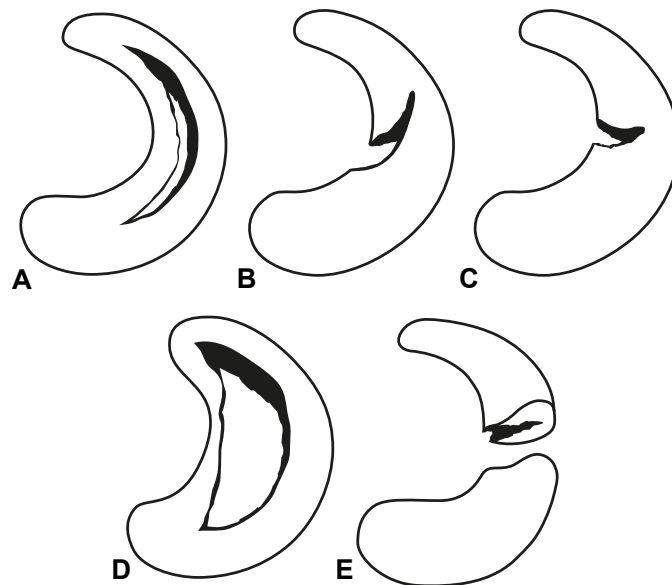


Abb. 5: Morphologie der Meniskusrisse: A Longitudinalriss, B Schrägriss, C Radiärriß, D Korbhenkelriss, E Horizontalriss

Die arthroskopische Nahtversorgung ist laut aktueller Leitlinie anzustreben (18), vor allem bei jüngeren Patienten und bei Patienten mit Gelenkblockaden (16, 18). Eine Meniskusteilresektion stellt eine weitere Therapieoption traumatischer Meniskusrisse dar. Diese kann ebenfalls gute Ergebnisse erzielen, jedoch wurden ein erhöhtes Arthrosiserisiko und eine geringere Rückkehr zum Aktivitätslevel wie vor der Verletzung beschrieben (18-21).

EINLEITUNG

Für die Naht von Meniskusrissen werden verschiedene, zum Teil modifizierte Techniken wie die All-inside-, Inside-out- oder Outside-in-Naht verwendet (22-24). Bei der Outside-in-Naht wird der Faden über eine Kanüle von peripher nach zentral durch den Meniskusriss geführt und mithilfe einer Schlinge, die meist über eine zweite Kanüle auch von peripher nach zentral eingebracht wurde, wieder nach peripher ausgeleitet und extraartikulär über der Kapsel verknotet (Abb. 6) (25). Welche Technik mit welchem Fixationssystem zum Einsatz kommt, richtet sich unter anderem nach Lokalisation des Risses und der Präferenz des Operateurs, wobei die verschiedenen Fixationssysteme sich bezüglich des klinischen Ergebnisses nicht signifikant unterscheiden (24, 26). In Deutschland werden Risse im Hinterhorn meist mit der All-inside-, Risse in der *Pars intermedia* mit der Inside-out- oder Outside-in- und Risse im Vorderhorn mit der Outside-in-Technik genäht (17).

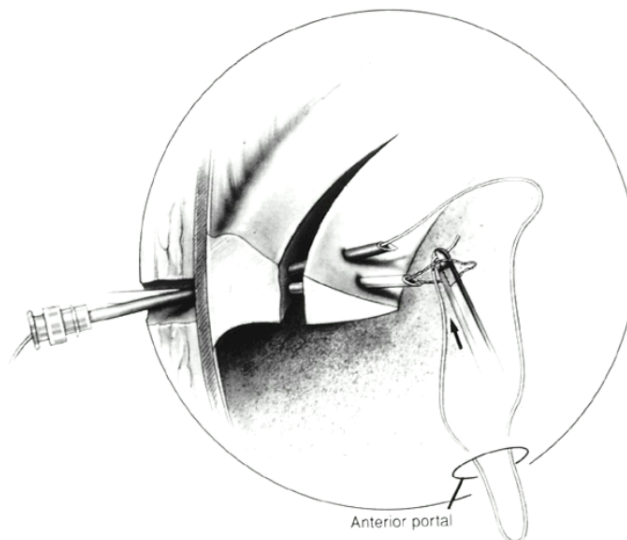


Abb. 6: Outside-In-Meniskusnaht. Aus (25) mit freundlicher Genehmigung von Rodeo et al., *Instr Course Lect*, 2000.

Die Erfolgsrate der Meniskusnaht liegt nach Analysen von Re-Arthroskopie-Studien bei etwa 75 % (27). Nach All-inside-Meniskusnaht zusammen mit einer LCA-Plastik heilten 84 % der Menisken vollständig und 12 % inkomplett (28). Nach inkompletter Meniskusheilung zeigten sich die Patienten klinisch symptomlos, sodass

EINLEITUNG

von einer Erfolgsrate von 96 % auszugehen ist (28). Jedoch erfolgte nur die Naht von Rissen der roten oder rot-weißen Zone (28). Meniskusrisse der avaskulären weißen Zone wurden partiell reseziert (28). In einer anderen Studie heilten alle longitudinalen Meniskusrisse der roten oder rot-weißen-Zone aus, nachdem sie mit einer modifizierten Outside-in-Technik genäht wurden (22). Interessanterweise haben Meniskusrisse, die bei gleichzeitiger Versorgung von LCA-Rupturen genäht wurden, eine höhere Heilungserfolgsrate (29). Möglich wäre, dass durch die Hämarthros-Entstehung aus dem Serum Signalmoleküle, z. B. Wachstumsfaktoren, freigesetzt werden, welche die Meniskusheilung verbessern. Diskutiert wird auch, ob das Alter der Meniskusverletzung zum Zeitpunkt der Naht eine Rolle spielt. In einer Studie zeigte sich innerhalb der ersten sechs Wochen eine deutlich höhere Heilungserfolgsrate (83 %) als zu einem späteren Zeitpunkt (52 %) (29). Eine zeitige Nahtversorgung kann womöglich das Arthroserisiko reduzieren (30). Das Versagen einer Meniskusnaht geht mit einer signifikant stärkeren Arthroseprogression einher als eine erfolgreiche Nahtversorgung (29).

Zahlreiche Therapieansätze zur Verbesserung der Meniskusheilung sind Gegenstand experimenteller Forschung. Neben mechanischen Methoden, wie z. B. dem Anrauen der Meniskusoberfläche und der den Meniskusriss umgebenden *Membrana synovialis* oder der Schaffung von Gefäßkanälen mit Kanüleneinstichen, wird die Applikation heilungsfördernder Blutbestandteile untersucht (10, 31). Die Implantation eines Fibrinclots in Stanzdefekte der avaskulären Zone des Meniskus von Hunden induzierte bei allen zwölf Tieren eine Defektheilung (32). Bereits nach drei Monaten beobachtete man eine vollständige Heilung durch Bildung von Faserknorpelgewebe ohne Gefäßneubildungen (32). Als Trägermaterial für Blutbestandteile kann ein Carrier, eine dreidimensionale und selbstauflösende Zellmatrix z. B. aus Kollagen, verwendet werden. Es wird vermutet, dass die Blutbestandteile Wachstumsfaktoren, Zytokine und Matrixbestandteile freisetzen und aktivieren und dadurch positive Effekte auf die Gewebeheilung haben. Welchen Einfluss diese Signalmoleküle auf die Meniskusheilung haben, ist noch weitgehend unklar.

Bei neuen Therapiemethoden steht besonders das plättchenreiche Plasma (PRP) im Fokus. Es handelt sich dabei um autologes Plasma, das Thrombozyten (Blutplättchen)

EINLEITUNG

in einer höheren Konzentration als im Vollblut enthält und durch Zentrifugation von Vollblut hergestellt wird (33). Thrombozyten sind essenziell an der Hämostase und Wundheilung beteiligt und setzen zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine frei (34).

Man unterscheidet zwischen plasma-basierten Herstellungsmethoden, die idealerweise nur Thrombozyten als zellulären Bestandteil isolieren, und dem Buffy-coat-System, bei dem das PRP neben den Thrombozyten auch Erythrozyten und Leukozyten enthält (33). Letzteres wird kritisch gesehen, da durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine die Leukozyten katabol wirken können (35-37). Daher könnte eine hohe Leukozytenkonzentration im PRP die anabole Wirkung der Thrombozyten negativ beeinflussen (35-37). Die Anzahl der Thrombozyten im PRP variiert je nach Herstellungsmethode- und Protokoll, wobei besonders die Stärke und Dauer der Zentrifugation eine wichtige Rolle spielen. Mit plasma-basierten Methoden erzielt man üblicherweise eine zwei- bis dreifache (300.000 – 500.000 Thrombozyten / μ l) und mit dem Buffy-coat-System eine drei- bis achtfache Thrombozytenkonzentration (500.000 – 1.500.000 Thrombozyten / μ l) verglichen mit Vollblut (33). Als Richtwert wurde für „therapeutisches humanes PRP“ eine Thrombozytenzahl von 1.000.000 / μ l empirisch festgelegt (38).

Nach erfolgreicher Herstellung des PRP kann dieses endogen, durch Koagelbildung nach Applikation ins Gewebe und Kontakt mit gewebeeigenem Col1 oder bereits durch die mechanische Wirkung der Zentrifugation aktiviert werden (33). Eine weitere Möglichkeit stellt die exogene Aktivierung durch Zugabe von Calciumchlorid und/oder Thrombin dar (33). Nach Aktivierung des PRP werden Wachstumsfaktoren und andere Signalmoleküle vornehmlich aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt (38). Die lokale Zugabe des PRP, z. B. in einen Meniskusriss, ist aufgrund der schnellen Koagelbildung und damit Aktivierung vorteilhafter für eine gezielte Freisetzung der Wachstumsfaktoren als eine intraartikuläre Injektion (33).

Im PRP wurden höhere Konzentrationen von FGF-2 (Fibroblast growth factor 2), VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) und IL-1 (Interleukin 1 alpha) als im normalen Plasma nachgewiesen, ebenso plasma-ähnliche Konzentrationen von IGF-1 (Insulin-like

EINLEITUNG

growth factor 1) (36, 39-46). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Sekretion der Wachstumsfaktoren nach Aktivierung des PRP über Tage ansteigt (47). Neben Wachstumsfaktoren konnten im PRP Adhäsionsmoleküle wie Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin-1 nachgewiesen werden (38, 48).

Zahlreiche Studien untersuchten die Wirkungen von PRP auf den Meniskus. *In vitro* wurde nach Kultivierung von Meniskuszellen mit PRP eine erhöhte Expression der Wachstumsfaktoren FGF-2, TGF- β und IGF-1 gesehen (49). Es konnte gezeigt werden, dass PRP die Meniskusheilung beim Kaninchen verbessert (42). Es stimulierte *in vitro* die Glycosaminoglykan-Synthese der Meniskuszellen und *in vivo* die Heilung von 1,5-mm-Stanzdefekten der avaskulären Zone (42). PRP scheint *in vivo* auch positive Effekte auf die Heilung weiterer muskuloskeletaler Gewebe zu haben. Im Schafmodell verbesserten intraartikuläre PRP-Injektionen die Heilung femoraler Knorpeldefekte (50). Im Kaninchen heilten femoropatellare Knorpeldefekte durch lokale Applikation von PRP in den Defekt besser (46). Bei Hunden stimulierte wachstumsfaktorreiches Plasma im Carrier *in vitro* die Zellproliferation und Kollagensynthese von Fibroblasten der Patellarsehne (51).

Einen weiteren wichtigen Forschungszweig zur Geweberegeneration stellt die Zelltherapie mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSC) dar. MSC sind undifferenzierte Knochenmarkszellen, welche die Fähigkeit besitzen, sich in Geweben mesenchymalen Ursprungs wie Fett, Knochen, Muskel oder Knorpel zu entwickeln (52). Um von mesenchymalen Stromazellen sprechen zu können, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein: MSC müssen plastikadhärent während der Kultivierung sein, spezifische Oberflächenantigene exprimieren und multipotent, d. h. *in vitro* chondrogen, adipogen und osteogen differenzierbar sein (52-54). An ovinen MSC des Knochenmarks konnten diese Kriterien ebenfalls nachgewiesen werden (55). Dabei zeigten sich diese den humanen MSC in der Morphologie und in den exprimierten Oberflächenmarkern sehr ähnlich (55). Zu den ovinen MSC-Oberflächenantigenen zählen unter anderem CD9+, CD29+, CD44+, CD54+, CD73+, CD90+, CD 105+, CD166+, CD45-, CD31- und CD14- (55, 56). Die Abkürzung MSC wird in der Literatur oft äquivalent für mesenchymale Stammzellen verwendet. Diese müssen jedoch darüber hinaus weitere Kriterien erfüllen,

EINLEITUNG

wie die Fähigkeit zur Zellerneuerung und Differenzierung in multiple Zelltypen *in vivo* (57). Erst bei Erfüllung dieser Zusatzkriterien kann von mesenchymalen Stammzellen gesprochen werden, andernfalls muss der Terminus mesenchymale Stromazelle verwendet werden (57).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Wirkung von MSC auf die Meniskusheilung. Im *In-vitro*-Organmodell an Ratten wurde beobachtet, dass MSC in avaskulären Meniskusdefekten proliferieren und die EZM-Bildung induzieren (58). Das Überleben der MSC konnte dabei bis acht Wochen nach der Implantation nachgewiesen werden (58). *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass MSC die Heilung muskuloskeletaler Gewebe wie Knorpel und Sehnen verbessern (59, 60). In einer *In-vivo*-Studie am Kaninchen bildete sich nach Teilresektion des *Meniscus medialis* und lokaler Applikation adipogen differenzierter MSC meniskusähnliches Reparaturgewebe aus Fibrochondrozyten in kollagenreicher EZM (61). Zudem reduzierte sich das Ausmaß der tibialen und femoralen Knorpeldestruktion (61). In einer weiteren Studie nach Meniskusteilresektion beim Kaninchen wurde nach intraartikulärer Injektion von Meniskusstammzellen mehr Reparaturgewebe gebildet und es wurden protektive Effekte auf den Gelenkknorpel beobachtet (62). In diesen Studien wurde am Kleintiermodell die Wirkung der Stammzellen untersucht, sodass fraglich bleibt, ob diese auch positive Effekte auf die Heilung von Meniskusrissen der avaskulären Zone im Großtiermodell haben.

Bisher konnte am Schwein gezeigt werden, dass nach Applikation von MSC mit Fibrinkleber 21 Meniskusrisse der avaskulären Zone makroskopisch vollständig durch Bildung von faserknorpelähnlichem Gewebe ausheilten (63). Fünf Meniskusrisse heilten inkomplett und nur zwei nicht aus (63). Jedoch zeigte das Defektgewebe deutlich schlechtere biomechanische Eigenschaften als das normales Meniskusgewebe (63). In einer anderen Studie am Schwein erzielten Mehrfachinjektionen von synovialen MSC eine makroskopische Heilung mit meniskusähnlichem Defektgewebe sechzehn Wochen nach Meniskusteilresektion (64). Auch im Ziegenmodell bildete sich infolge einer Injektion mit autologen MSC nach Entfernung des *Meniscus medialis* und Durchtrennung des LCA nach sechs Wochen ein Neomeniskus aus meniskusähnlichem Gewebe, zudem

EINLEITUNG

reduzierte sich das Ausmaß der degenerativen Kniegelenksveränderungen (65). Diese Ergebnisse demonstrieren das stark heilungsfördernde Potenzial der MSC.

Die Migration und Proliferation der MSC wird unter anderem durch die Wachstumsfaktoren des umgebenden Milieus beeinflusst. *In vitro* wurde beobachtet, dass sich MSC vermehrt nach Gefäßverletzung ansiedeln und Thrombozyten deren Migration stimulieren (66). Der von Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktor FGF-2 steigerte die Proliferation und Migration der MSC *in vitro* (66). Weiterhin erhöhten neben FGF-2 auch IGF-1 und PDGF- β die Proliferationsrate, während TGF- β 1 inhibitorische Effekte auf MSC zeigte (56). Es konnte nachgewiesen werden, dass MSC eine hohe Expression an FGF-2-, PDGF- β -, TGF- β - und IGF-1-Rezeptoren aufweisen (45). VEGF-Rezeptoren wurden auf MSC nicht detektiert (45). MSC mit erhöhter IGF-1-Expression verbesserten nachweislich die Heilung von Meniskusdefekten der avaskulären Zone von Ziegen und erzielten eine komplette Defektheilung (67). Der Wachstumsfaktor PDGF- β wirkte *in vitro* stimulierend auf die Migration von MSC (68). Die Aktivierung von MSC im Carrier durch TGF- β 1 stimulierte *in vitro* die chondrogene Differenzierung und erhöhte die Synthese von Kollagen II und Aggrecan (69). Es scheint also, als würde die Kombination von MSC mit Wachstumsfaktoren die heilungsfördernde Wirkung verstärken.

So konnte auch bereits gezeigt werden, dass PRP die Proliferation humaner und oviner mesenchymaler Stammzellen *in vitro* stimulierte (40, 45, 70, 71). Die chondrogene, adipogene und osteogene Differenzierung der MSC blieb dabei unter Zugabe von PRP erhalten (45). PRP stimulierte *in vitro* ebenfalls die chondrogene Differenzierung der MSC (72). Diese Studien lassen annehmen, dass das PRP eine positive Wirkung auf die MSC hat. In aktuellen Studien wird daher die Wirkung der Kombination dieser Blutbestandteile im Gewebe zu untersucht. Unseres Wissens gibt es bisher jedoch weder klinische noch tierexperimentelle Ergebnisse, ob die kombinierte Applikation auf das Meniskusgewebe der isolierten Zugabe überlegen ist.

Zu berücksichtigen sind neben möglichen Interaktionen zwischen dem PRP und den MSC auch die Einflüsse durch, im Gewebemilieu vorhandene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Matrixbestandteile wie z. B. Kollagene. Infolge eines Gewebetraumas

EINLEITUNG

werden diese Signalmoleküle von Gewebe- oder Blutzellen sezerniert und über Signalkaskaden deren Expression im Wundheilungsprozess reguliert. Über die Rolle dieser Signalmoleküle in der Meniskusheilung ist bisher wenig bekannt. Bisher untersuchte unseres Wissens keine Studie *in vivo* im Großtiermodell die Expression dieser Wachstumsfaktoren, Kollagene und Zytokine, weder nach Meniskusriss noch im gesunden Meniskus. Zudem ist nicht bekannt, inwieweit deren Expression durch die Zugabe von PRP und MSC verändert wird.

Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der Wundheilung ist der Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) oder auch Basic fibroblast growth factor genannt (bFGF). FGF-2 gehört zu einer Familie aus bislang 23 Signalmolekülen, die an Tyrosinkinase-Rezeptoren (FGFR1-FGFR4) epithelialer oder mesenchymaler Zellmembranen binden (73, 74). Zusätzlich weisen die FGFs eine hohe Affinität zu Proteoglykanen, Heparansulfatketten und Glykosaminoglykanen auf (74). Diese EZM-Bestandteile und der Ligand (FGF) binden an spezielle Domänen und initiieren nach Rezeptordimerisierung (durch Enzyme z. B. Kinasen) intrazelluläre Signalwege, wie die Aktivierung der Phospholipase C oder des FGFR 2 Substrats (74). FGF-2 befindet sich im Zytosol verschiedener Zelltypen wie z. B. Chondrozyten (75). Weiterhin wird ein extrazelluläres Reservoir vermutet, woraus FGF-2 bei Gewebeverletzungen freigesetzt wird (75).

Es wurden zahlreiche positive Effekte von FGF-2 im Wundheilungsprozess beschrieben. FGF-2 induziert Hypervaskularisation durch Neoangiogenese, stimuliert die Zellmotilität und steigert die Zellproliferation (76-78). So wurde nach Myokardinfarkt bei Ratten eine erhöhte FGF-2-Expression bei gleichzeitiger Angiogenese festgestellt (79). Bei Achillessehnenverletzungen im Rattenmodell führte die Injektion von FGF-2 zur Zellproliferation und Bildung von Col3 (78). Weiterhin heilten nach FGF-2-Applikation Knorpeldefekte der Femurkondylen von Kaninchen (80, 81). Es konnte gezeigt werden, dass FGF-2 nach mechanischen Verletzungen im Knorpel sezerniert wird und MMP (Matrix-Metalloproteinasen) sowie TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1) aktiviert, die den Gewebeumbau initiieren (75). Dies lässt vermuten, dass FGF-2 sowohl den EZM-Auf- als auch den -Abbau beeinflussen kann. Außerdem wurde eine

EINLEITUNG

chondroprotektive Wirkung von FGF-2 beschrieben, durch Unterdrückung des Aggrecan-abbauenden Enzyms ADAMTS-5 (82). Ein Einfluss von FGF-2 auf die Proteoglykanbildung im Knorpel wurde nicht festgestellt (75). Die Kombination von FGF-2 mit IGF-1 stimulierte die Proliferation humaner Chondrozyten des Gelenkknorpels (83). Zahlreiche *In-vitro*-Studien untersuchten den Einfluss von FGF-2 auf Meniskuszellen. FGF-2 stimulierte die Proliferation und EZM-Bildung oviner Meniskuszellen aus allen Zonen (84). In der avaskulären Zone erhöhte FGF-2 die Col1-, Col2A-(Kollagen Typ 2A-) und MMP-13-(Matrix-Metalloproteinase 13-) Expression und unterdrückte die Aggrecan- und MMP-2-(Matrix-Metalloproteinase 2-) Expression (85). Dagegen verminderte FGF-2 die Synthese von Col1 und Col2A in der vaskulären Zone (85). Dies lässt eine zonenabhängige Wirkung von FGF-2 auf den Gewebeumbau des Meniskus vermuten. Im Kaninchenmodell verstärkte FGF-2 die Zellproliferation in der avaskulären Zone und unter hypoxischen Bedingungen die Glykosaminoglykansynthese (86). Auf humane Meniskuszellen wirkte FGF-2 *in vitro* ebenfalls proliferativ und erhöhte die Synthese von Col2 und Proteoglykanen (87). Mehrfach konnte gezeigt werden, dass FGF-2 *in vitro* die Proliferation, Migration und auch Differenzierung von MSC stimuliert (45, 66, 88). Weiterhin förderte FGF-2 in Kombination mit TGF- β 1 *in vivo* im Mausmodell die Aktivierung von Stammzellen aus Knochen und peripherem Blut und steigerte deren Migration zur Wunde sowie die dortige Synthese von Col1 (89).

Neben FGF-2 spielen weitere Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) und Zytokine wie TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) und IL-1 α eine wichtige Rolle im Wundheilungsprozess. Beispielsweise wurden erhöhte Expressionen von FGF-2, TGF- β 1 und PDGF- β nach Verletzung des LCA und LCT von Kaninchen detektiert (90). FGF-2, VEGF und TNF- α konnten in der Synovialflüssigkeit und im infrapatellaren Fettgewebe von Patienten mit akuten Bandverletzungen und chronischen Knieveränderungen nachgewiesen werden (91). Die Wirkung dieser Signalmoleküle wurde in zahlreichen Studien untersucht. So wurde nachgewiesen, dass TGF- β 1 die Kollagensynthese fördert, VEGF Neoangiogenese induziert und PDGF- β Makrophagen rekrutiert und, genau wie IGF-1, die EZM-Bildung, vornehmlich von Glycosaminoglykanen, steigert (77, 92, 93). IGF-2 zeigte

EINLEITUNG

chondroprotektive Wirkung durch gesteigerte EZM-Synthese und Verminderung arthrotischer Gelenksveränderungen (94). *In-vitro*-Studien erforschten das Vorkommen und die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren im Meniskusgewebe. In Fibrochondrozyten humaner Menisken wurden unter anderem FGF-2, TGF- β 1, VEGF, IGF-1 und -2 sowie Kollagen Typ I – IV nachgewiesen (95). VEGF, IGF-1 und TGF- β stimulierten *in vitro* die Synthese von Col1 in ovinen Meniskuszellen der avaskulären Zone und inhibierten die Synthese von MMP-2 und Aggrecan (85). IGF-1 und TGF- β stimulierten zusätzlich die Col2A- und MMP-13-Synthese (85). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 neben der Kollagen- auch die Glycosaminoglykansynthese in Fibrochondrozyten des Kaninchenmeniskus stimuliert (96). Im ovinen Meniskus aktivierte TGF- β 1 die Proteoglykansynthese von Fibrochondrozyten aus allen Zonen (97). Im bovinen Meniskus stimulierte TGF- β 1 die Synthese von Proteoglykanen sogar dosisabhängig stärker als FGF-2 (98). Weiterhin steigert TGF- β 1 die Zellproliferation porciner Meniskuszellen *in vitro* (99). *In vivo* verbesserte TGF- β 1 die Heilung von Knorpeldefekten im Kaninchen nach zehn Wochen (69). Der Wachstumsfaktor PDGF- β förderte *in vitro* die Zellproliferation oviner Fibrochondrozyten des Meniskus und steigerte die Col1-Synthese (100). Die Isoform PDGF-AB stimulierte *in vitro* die Zellproliferation in allen Zonen des bovinen und ovinen Meniskus (101, 102). *In-vitro*-Zugabe von IGF-1 erhöhte die Proliferation und EZM-Bildung von Fibrochondrozyten aller Zonen des ovinen Meniskus, besonders der avaskulären Zone (103). Außerdem steigerte IGF-1 im bovinen Meniskus die Proteoglykansynthese und Zellmigration der avaskulären Zone (98, 102). IGF-2 erhöhte *in vitro* die Col1-Expression in ovinen Fibrochondrozyten des Meniskus (100). In *In-vivo*-Studien änderte sich die Expression von Wachstumsfaktoren nach Meniskusverletzungen (104, 105). Das Setzen eines Risses beeinflusste die Expression von TGF- β 1, VEGF-A, PDGF- β , IGF-1 und IL-1 β (Interleukin 1 beta) in der vaskulären und avaskulären Zone des Kaninchenmeniskus (104). In einer anderen Studie wurde VEGF sogar noch zehn Wochen nach Meniskusriss vermehrt in der avaskulären und vaskulären Zone exprimiert (105). Nach partieller medialer Meniskusresektion wurden erhöhte Konzentrationen von FGF-2 und TGF- β in der Synovialflüssigkeit von Patienten nachgewiesen (106).

EINLEITUNG

Eine weitere wichtige Gruppe von Signalmolekülen im Wundheilungsprozess bilden proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 α . Diese Zytokine werden sowohl im akuten als auch im chronischen Wundheilungsprozess vermehrt exprimiert (104, 107, 108). Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss und das Vorkommen von IL-1 und TNF- α im Meniskus untersuchen. *In vitro* supprimierten IL-1 und TNF- α im Serum die Zellproliferation im Zell- und Gewebemodell des porcinen Meniskus (99). Im Kontrast dazu stimulierte IL-1 in einer anderen Studie in geringer Dosis die Zellproliferation in der vaskulären Zone von bovinen Menisken (102). Weiterhin kam es unter Zugabe von IL-1 und TNF- α *in vitro* zur erhöhten Freisetzung von Glykosaminoglykanen und erniedrigter Col1A1-(Kollagen Typ 1A1-) und Col2A1-(Kollagen Typ 2A1-)Expression in der avaskulären Zone des ovinen Meniskus (109). Zudem verschlechterte die Zugabe von TNF- α und IL-1 *in vitro* die Heilung porciner Meniskusstanzdefekte (110). Ebenfalls *in vitro* verbesserte die Abwesenheit von IL-1 und TNF- α die Heilung porciner Meniskusdefekte der vaskulären Zone (111). Diese Ergebnisse lassen eine inhibitorische Wirkung dieser proinflammatorischen Zytokine auf die Meniskusheilung vermuten.

Am Ende eines erfolgreichen Wundheilungsprozesses steht die Bildung von Reparaturgewebe. Kollagene sind eine entscheidende Strukturkomponente im Reparaturgewebe und zudem Hauptbestandteil des Meniskusgewebes. Eine Zunahme der Kollagenproduktion im Heilungsprozess ist essenziell, um Reparaturgewebe mit guten biomechanischen Eigenschaften zu bilden. So konnte eine gesteigerte Kollagenproduktion vom Typ I und II bei der Meniskusheilung longitudinaler Risse der avaskulären Zone des Kaninchens nachgewiesen werden (112).

In Anbetracht der Studienlage zur vielversprechenden Wirkung des PRP und der MSC auf die Meniskusheilung ist es folgerichtig, im nächsten Schritt die Wirkung der Kombination beider auf die Meniskusheilung *in vivo* zu untersuchen. Kommt es womöglich zu einer Steigerung der bekannten positiven Effekte auf das Gewebe oder zu negativen Interaktionen? Können traumatische Meniskusrisse durch die Zugabe von PRP und MSC in Kombination heilen? Zur Schaffung einer besseren Vergleichbarkeit zum menschlichen Knie sollte dies unbedingt an einem Großtiermodell untersucht werden. Das Schaf als Großtiermodell weist in der Anatomie des Kniegelenks sowie der Struktur

EINLEITUNG

des Meniskus eine starke Ähnlichkeit zum Menschen auf (12, 113). Bislang gibt es zwar Studien zur morphologischen Heilung traumatischer Meniskusrisse im Kleintiermodell, jedoch mangelt es an Großtiermodellstudien. Unklar ist bislang zudem der Zusammenhang zwischen der morphologischen Meniskusheilung und der an der Heilung beteiligten Wachstumsfaktoren, Zytokine und Kollagene. Welche Signalmoleküle ändern nach Meniskusriss ihre Expression und tragen damit womöglich zur Heilung bzw. fehlenden Heilung bei? Welchen Einfluss hat die Zugabe von PRP und MSC auf diese Signalmoleküle? Die Ergebnisse könnten als Grundlage für neue Therapieansätze zur Heilung avaskulärer Meniskusrisse dienen.

2. ZIELSTELLUNG UND HYPOTHESEN

In dieser Arbeit soll, beispielhaft im Schafsmodell, der Einfluss der kombinierten lokalen Applikation von PRP und MSC auf die Heilung traumatischer Meniskusrisse in der avaskulären Zone untersucht werden. Es soll geprüft werden, ob sich nach Applikation dieser Blutbestandteile makroskopisch Heilungstendenzen zeigen und welchen Einfluss diese auf die mRNA-Expression wundheilungsrelevanter Wachstumsfaktoren (FGF-2, TGF- β 1, VEGF-A, PDGF- β , IGF-1, IGF-2), Zytokine (IL-1 α , TNF- α) und Kollagene (Col1A1, 1A2, 2A1) haben.

Dabei ergaben sich folgende Forschungshypothesen:

- 1) Die kombinierte Applikation von PRP und MSC verbessert die makroskopische Heilung im Gegensatz zur Naht allein, Naht mit Carrier oder der isolierten Zugabe von PRP oder MSC.
- 2) Nach kombinierter Applikation von PRP und MSC zeigen sich v. a. rissnah mehr FGF-2-positive Zellen und eine erhöhte mRNA-Expression von FGF-2 im operierten Meniskus als nach Naht allein, Naht mit Carrier oder der isolierten Zugabe von PRP oder MSC.
- 3) Die kombinierte Applikation von PRP und MSC führt zu einer erhöhten mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2 und der Kollagene 1A1, 1A2, 2A1 und zu einer verminderten mRNA-Expression der Zytokine IL-1 α , und TNF- α als nach Naht allein, Naht mit Carrier oder der isolierten Zugabe von PRP oder MSC.

3. MATERIALIEN

OP-und Narkose-Material

ACD-A Antikoagulanz	Charité Hausapotheke
Aluminium-Spray	MeproVet®, mepro, Vechta, Deutschland
Baytril®	Enrofloxacin, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Braunoderm®	Propan-2-ol, Povidon-Iod, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Carrier	Optimaix 3D Collagen Sponges, Matricel®, Herzogenrath, Deutschland
Ethibond® 2	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Ethilon® 0	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Falcon-Röhrchen	BD Falcon® Tubes, Becton Dickinson GmbH, Freiburg, Deutschland
Fentanyl-Plaster	Durogesic 50 µg / h, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Fentanyl®	Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Fentanylcitrat	Fentanyl®-Janssen, 3 – 6 µg / kg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Finadyne®	Flunixin, Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Forene®	Isofluran, Abbvie, Wiesbaden, Deutschland
Jonosteril®	1000 ml, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid	0,0746 g /ml, 1 mmol K ⁺ / ml, 1 mmol Cl ⁻ / ml, Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland
PDS® 3-0	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Punktionskanüle	Jamshidi®-Nadel, CareFusion, San Diego, Kalifornien, U.S.A.
Rimadyl®	Carprofen, Pfizer, Berlin, Deutschland
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Sprühverband	Opsite®-Spray, Smith & Nephew, Marl, Deutschland
Sterile Handschuhe	Peha-taft® plus puderfrei OP-Handschuhe, Hartmann, Heidenheim, Deutschland

MATERIALIEN

Strauss-Kanüle	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Trapanal®	Thiopental-Natrium 2,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Unacid®	Ampicillin + Sulbactam, Pfizer, Berlin, Deutschland
Venenverweilkanüle	Vasofix® Safety, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Vicryl® 0	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Vicryl® 2-0	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland

Antikörper, Enzyme und Kits

Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex)	Vectastain ABC-Kit AK-5000, Vector Lab. Inc, Burlingame, Kalifornien, U.S.A.
Chromogenes Substrat	Vector Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, SK 5100, Vector Lab. Inc, Burlingame, Kalifornien, U.S.A.
DNase I, RNase-free (1 U / µL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
FGF-2-Antikörper	251853, Abbiotec, San Diego, Kalifornien, U.S.A.
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sekundärantikörper	biotinyliertes Ziege Anti-Kaninchen IgG, BA-1000, Vector Lab. Inc, Burlingame, Kalifornien, U.S.A.
SYBR Green	IQ™SYBR® Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.

Chemikalien, Nährlösungen und Färbungen

Aqua destillatum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Herstellung siehe Herstelleranleitung
Bovines Albuminserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

MATERIALIEN

DEPC-Wasser 0,1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
DMEM Low Glucose	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Formalin 4 %	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
GlutaMax™ Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Hämatoxylin nach Harris	Harris' Hämatoxylinlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin nach Mayer	Mayers Hämalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCl (1 mol)	Chlorwasserstoff, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Histopaque® 1077	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Isopropanol/ 2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
NaCl	Natriumchlorid 6404, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH (2 mol)	Natriumhydroxid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Newborn Calf Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Normalserum	Normalserum Goat S1000, Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland
nukleasefreies Wasser	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.
Paraffin	Paraplast Plus®, Mc Cormick™ Scientific, Leica, Richmond, Virginia, U.S.A.
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.

MATERIALIEN

Phosphatpuffer	WALDECK GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
RNA-Stabilisierlösung	RNAlater™, QIAGEN, Valencia, Kalifornien, U.S.A.
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Safranin-O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Trizma Base T1503, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Tris-HCl	Trizma Hydrochloride HCLT 3253, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Trizollysatz	Trizol® Reagent, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, U.S.A.
Verdünnungsmedium	Antibody Diluent with background reducing components S3022, Dako Pathology Products, Hamburg, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Paris, Kentucky, U.S.A.

Puffer

PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,2:

- 100 ml Phosphatpuffer
- ad 1000 ml Aqua dest.

Tris-HCl-EDTA-Puffer, pH 8,0:

- 3,95 g 50 mM Tris-HCL
- 0,93 g 1 mM EDTA
- ad 50 ml Aqua dest.

Chromogenpuffer, pH 8,2:

- 3,96 g Tris-HCL
- 0,54 g Tris-Base
- 2,63 g NaCl
- ad 300 ml Aqua dest.

MATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien

96-well-Platte	ABgene® PCR Plates, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
C-Chip-Einweg-Zählkammer	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DNA LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eindeckgläser	Paul Marienfeld GmbH und KoKG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Falcons	BB Falcon® Tubes, Becton Dickinson GmbH, Freiburg, Deutschland
Fettstift	PAP-Pen, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Hitzebeständige well-Deckel	Ultra Clear Cap Strips, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Mikrotommesser	NH35HR, Feather®, Osaka, Japan
Objektträger	Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
PCR-Strip 0,2 ml	PCR Strip with attached optically clear cap low profile, 211-0339, VWR, Radnor, Pennsylvania, U.S.A.
Petrischale	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Skalpell	Feather®, Osaka, Japan
TC-Flasche T175, Standard	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Tissue-Tek®-Boxen	Sakura Finetek, Torrance, Kalifornien, U.S.A.

MATERIALIEN

Geräte und Laborgegenstände

Digitales Mikroskop	Leica DMRB, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland Axiocam MRc, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Einbettungsautomat	TP1020, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Duran Group, Wertheim, Deutschland
iCycler	iQ™5, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.
Kühlplatte	Cop 30 Cooling Plate, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Mechanischer Homogenisator	Ultra-Turrax®, IKA®-Werke, GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Messzylinder	Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Metall / Glas Mörser & Keramik Pistel	Spezialanfertigung der Charité Berlin
Mikrotom	Leica RM 2125, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
Misch-und Wärmeplatte	RCTbasic, IKA®-Werke, GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Nano-Drop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Peltier Thermal Cyler	PTC-200, MJ Research, St. Bruno, Quebec, Kanada
pH-Meta	Inolab®, WTW, Weilheim, Deutschland
Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Precellys Minilys®	Bertin Corp, Rockville, Maryland, U.S.A.
Reagenzgläser	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reagenzlashalter	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Vortex-Schüttler	Lab dancer, IKA®-Werke, GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Waage	M-Prove, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

MATERIALIEN

Wärmeblock	Thermomixer Compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wärmeschrank	Heraeus T12, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Leica HI1210, Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge	Rotixa RP, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland Modell 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Mikro22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4. METHODEN

4.1 Versuchstiere

Zur Durchführung dieser Studie wurden insgesamt 30 gesunde, weibliche, ca. zwei Jahre alte Merino-Mix-Schafe unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes operiert. Das Projekt wurde unter der Vorgangsnummer G0063/12 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales gestattet. Die Versuchstiere standen unter tierärztlicher Betreuung von Dr. med. vet. Tanja Schmidt und Nadja Goldbach.

Die Versuchstiere wurden eine Woche präoperativ in die Tierställe des tierexperimentellen Instituts der Charité – Universitätsmedizin Berlin (FEM) aufgenommen (Abb. 7) und untersucht. Beurteilt wurden Gewicht, Haut, Pansen, Euter, Gelenke, Klauen, Gebiss und das Gangbild. Zusätzlich erfolgte die Messung der Vitalparameter, der Körpertemperatur und des Gewichts. Im Verlauf wurden die Tiere im FEM täglich vom Tierpflegepersonal beaufsichtigt und versorgt.



Abb. 7: Merino-Mix-Schafe im Tierstall des tierexperimentellen Instituts der Charité – Universitätsmedizin Berlin (FEM)

4.2 Anästhesie

Die Anästhesie wurde von Dr. med. vet. Tanja Schmidt und Nadja Goldbach durchgeführt. Nach zwölfstündiger Nahrungskarenz wurden die Schafe für die Operation vorbereitet. Dazu wurde eine Vordergliedmaße rasiert und desinfiziert, um eine periphere Venenverweilkanüle in die *V. cephalica antebrachii* zu legen. Anschließend wurden nach Spülung der Kanüle mit physiologischer Kochsalzlösung zur Narkoseeinleitung 15 mg / kg Thiopental i. v. und zur Analgesie einmalig 2 mg / kg Carprofen s. c. injiziert. Für die Intubation wurde nach Erlöschen der Schutzreflexe ein Tubus der Größe 8,5 mm mittels Laryngoskop und Führungsdraht platziert und geblockt. Es wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran-Lachgasgemisch im Verhältnis 2:1 (bei Einleitung 1:2) mit 1,5 – 1,8 % Isofluran durchgeführt. Die Atemfrequenz betrug 10 – 12 Atemzüge / min bei einem Tidalvolumen von 10 – 20 ml/ kg, inspiratorischem Druck von 18 cm H₂O und expiratorisch von 5 cm H₂O. Nach erfolgreicher Intubation und suffizienter Beatmung wurde eine Pansensonde gelegt (Abb. 8). Für die Operation wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und postoperativ zum Entgasen in Bauchlage gelagert. Um Wundinfektionen vorzubeugen, wurde präoperativ einmalig eine Antibiose mit 2 g Ampicillin und 1 g Sulbactam i. v. verabreicht. Zur Analgesie wurde Fentanyl einmalig als Bolus präoperativ und intraoperativ alle 30 min 3 – 6 µg / kg i. v. verabreicht. Intraoperativ wurde i. v. Jonosteril® infundiert zur Volumengabe.

Zur postoperativen Schmerztherapie wurde nach Operationsende ein Fentanyl-Pflaster (1 – 2 µg / kg / h) auf die rasierte Innenseite der linken Vordergliedmaße appliziert und für drei Tage belassen. Die durchschnittliche Narkosedauer betrug 202 min (± 44 min).

METHODEN



Abb. 8: Schaf auf dem OP-Tisch: A Pansensonde, **B** Beatmungsschlauch, **C** O₂-Sättigungs-Messsonde, **D** Blutdruckmanschette, **E** periphere Venenverweilkanüle

4.3 Operation

Alle Operationen wurden von Prof. Dr. med. Sebastian Kopf durchgeführt. Ziel war es, einen 15 mm langen Riss in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* des rechten Hinterlaufs zu setzen. Die Schafe wurden narkotisiert (Abb.8) und in Rückenlage gesichert gelagert. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Gewicht der Schafe im Mittel 63,3 kg (Standardabweichung $\pm 5,2$ kg). Die Klauen wurden aus hygienischen Gründen mit einem Schutzverband umwickelt. Der rechte Hinterlauf wurde großflächig rasiert, dreimal mit Braunoderm® desinfiziert und steril abgedeckt.

Die Hautschnittführung erfolgte longitudinal, zentral über dem anterioren Knie. Sie wurde am proximalen Patellapol begonnen und nach distal zur *Tuberositas tibiae* fortgeführt. Nach Präparation der subkutanen Fettschicht wurde die *Bursa infrapatellaris subcutanea* durchtrennt. Die Eröffnung des Kniegelenks erfolgte über einen medialen parapatellaren Zugang. Der *Musculus vastus medialis*, der beim Schaf muskulär bis über die Patellamitte zieht, wurde am kurzen Sehnenansatz abgetrennt. Es folgte die Spaltung

METHODEN

der *Capsula articularis genu* medial der Patellarsehne von proximal nach distal. Der Hoffa-Fettkörper konnte nun vorsichtig nach lateral wegpräpariert werden. Das LCT wurde am *Epicondylus medialis femoris* ossär sorgfältig abgesetzt und mit zwei Ethibond®-2-Fäden angeschlungen. Durch Außenrotation und Flexion des Unterschenkels unter Verlagerung der Patella nach lateral wurde die Sicht auf den *Meniscus medialis* frei. Im anterioren Drittel des Meniskus wurde mit dem Skalpell ein ca. 15 mm langer, longitudinaler, transmuraler Schnitt in der avaskulären Zone gesetzt. Die Vollständigkeit des Risses wurde vorsichtig mit einem stumpfen, gebogenen Klemmchen geprüft (Abb. 9).

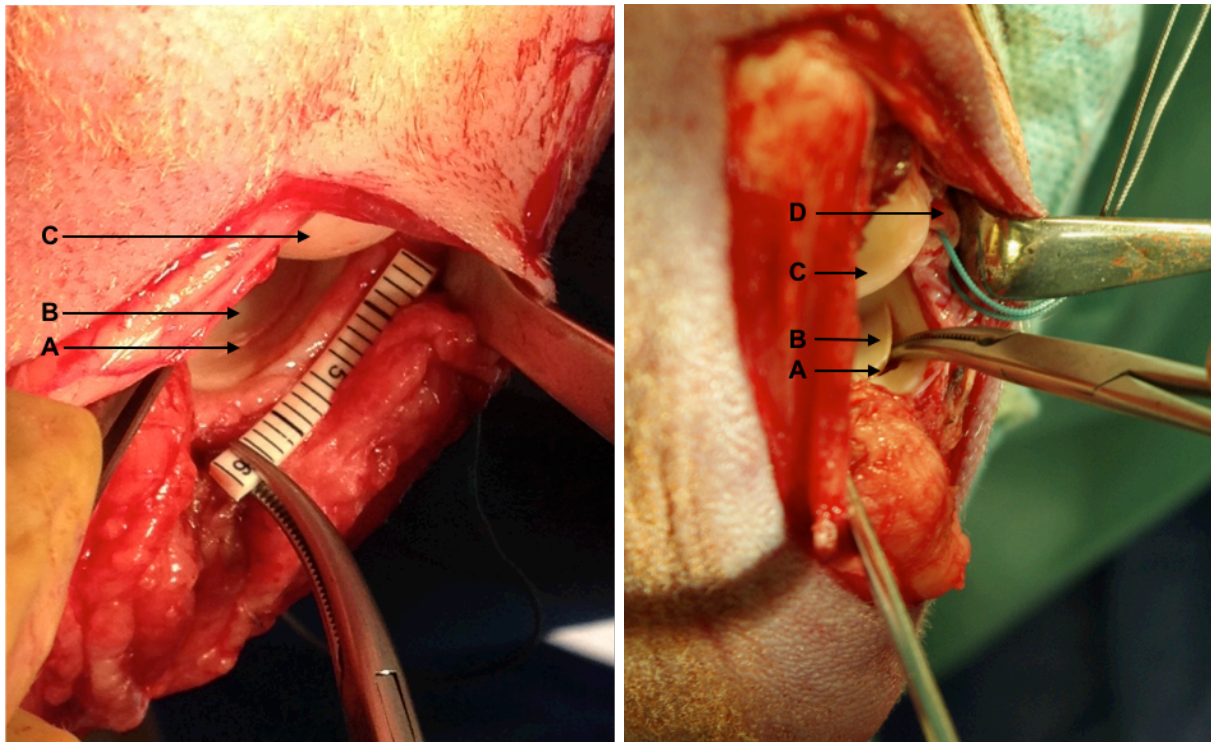


Abb. 9: Intraoperative Sicht auf den Meniskusriss: A Schnitt, B *Meniscus medialis*, C *Epicondylus medialis femoris*, D LCT (angeschlungen)
links Abmessung des Risses
rechts Prüfung der Vollständigkeit des Risses durch eine Klemme im Riss

Es wurden fünf Gruppen etabliert (Tab. 1). In allen Gruppen wurde der Meniskusriss in Outside-in-Technik mit zwei PDS®-3-0-Fäden genäht (Abb. 10). In Gruppe 1 (Naht-Gruppe) erfolgte ausschließlich eine Meniskusnaht. In Gruppe 2 (Carrier-

METHODEN

Gruppe) wurde ein Carrier aus Kollagen passgenau zugeschnitten (ca. 0,5 x 1,5 cm), sodass er im Riss platziert werden konnte. In Gruppe 3 (PRP-Gruppe) wurde der Carrier zunächst 1 min in einer Petrischale mit 0,5 ml des kurz zuvor entnommenen PRP bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss wurde er im Carrier implantiert und es wurden zusätzlich 0,5 ml PRP in den Riss gespritzt. Für Gruppe 4 (MSC-Gruppe) wurde der Carrier zuvor mit ca. 1,5 Mio. MSC inkubiert und in den Riss implantiert. Die MSC wurden ca. vier Wochen präoperativ aus dem Beckenkamm entnommen und kultiviert (siehe Kapitel 4.4.). In Gruppe 5 (PRP + MSC-Gruppe) wurde der Carrier mit MSC zusätzlich für 1 min in eine Petrischale mit 0,5 ml PRP gelagert und anschließend implantiert und es wurden zusätzlich 0,5 ml PRP in den Riss gespritzt.

Tab. 1: Schema der Behandlungsgruppen

Gruppe	Anzahl der Schafe	Therapie
1	6	Meniskusnaht
2	6	Meniskusnaht + Carrier
3	6	Meniskusnaht + Carrier + PRP
4	6	Meniskusnaht + Carrier + MSC
5	6	Meniskusnaht + Carrier + PRP + MSC

METHODEN

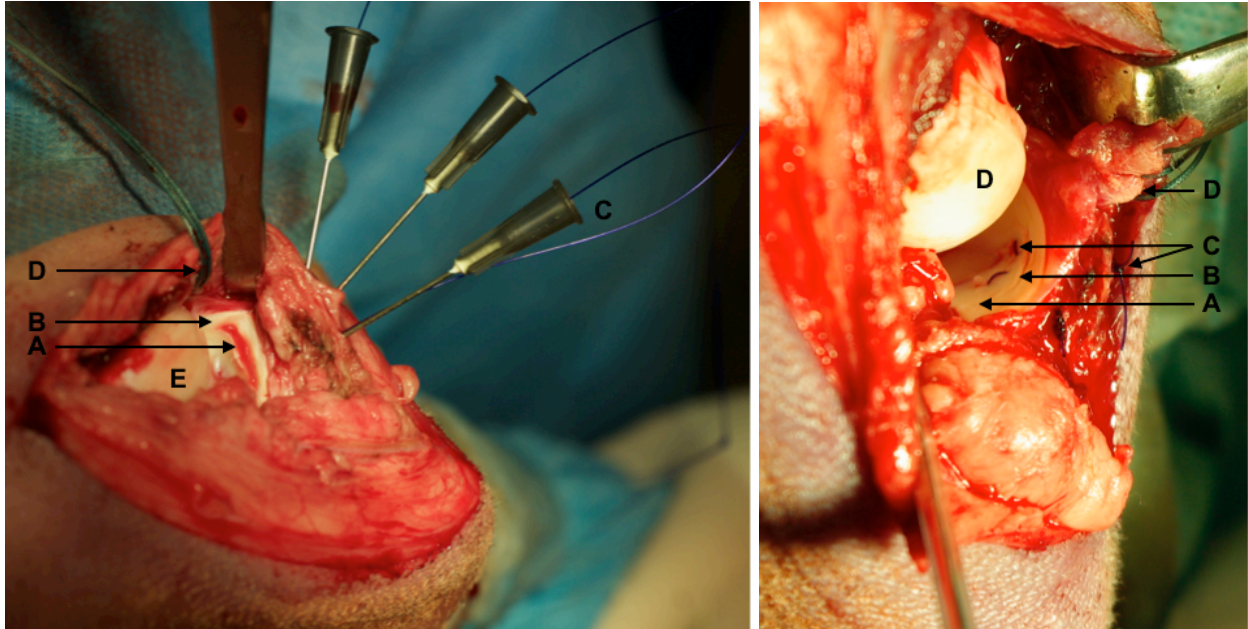


Abb. 10: Meniskusnaht in Outside-in-Technik: A Schnitt, B *Meniscus medialis*, C Faden für Outside-in-Technik, D LCT (angeschlungen), E *Epicondylus medialis femoris*,
links: Kanülen als Führungskanal für den Faden von medial nach lateral durch den Riss eingeführt
rechts Verknoten der beiden Fäden lateral

Danach wurde das LCT transossär am *Epicondylus medialis femoris* mit zwei Fäden Ethibond® 2 refixiert. Zur Naht der *Capsula articularis genu*, des *Musculus vastus medialis* und der *Fascia cruris* wurde jeweils Vicryl® 0 in Einzelknopftechnik verwendet. Die *Bursa infrapatellaris subcutanea* und die *Subcutis* wurden mit Vicryl® 2-0 verschlossen. Nach Wunddesinfektion erfolgte die Hautnaht mit Ethilon® 0 durch eine Rückstichnaht nach Donati. Abschließend wurde die Wunde mit Braunoderm® desinfiziert, ein Sprühverband sowie Aluminium-Spray aufgetragen und das Knie mit einem sterilen Baumwollverband umwickelt. Postoperativ konnten sich die Tiere im Gehege frei bewegen und entlasteten die operierte Gliedmaße spontan. Die operierte Gliedmaße wurde nicht geschient oder anderweitig in ihrem Bewegungsausmaß eingeschränkt. Die Operationsdauer betrug im Mittel 92 min (± 17 min).

4.4 Gewinnung und Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen

Die Entnahme des Knochenmarkaspirats zur Gewinnung der MSC erfolgte ca. vier Wochen vor der Operation des Meniskus. Nach Einleitung einer Inhalationsnarkose

METHODEN

wurden die Schafe in Bauchlage gebracht und präoperativ einmalig eine Antibiose mit 2 g Ampicillin und 1 g Sulbactam sowie einmalig 5 mg / kgKG Enrofloxacin zur Infektionsprophylaxe verabreicht. Zur intraoperativen Volumengabe wurde Jonosteril® i. v. verwendet. Der linke Beckenkamm wurde großflächig rasiert und desinfiziert. Nach steriler Abdeckung des Operationsgebietes wurde ein 2 cm langer Hautschnitt am Beckenkamm, ca. 2 cm dorsal der *Spina iliaca anterior superior*, gesetzt und bis auf das Periost freipräpariert. Eine Jamshidi®-Nadel wurde etwa 1 cm in die Spongiosa des Markraums vorgeschoben und mit einer 20-ml-Spritze langsam 15 ml Blut aspiriert (Abb. 11). Das gewonnene Aspirat wurde in mit 3 ml Heparin befüllte Falcon-Röhrchen umgefüllt, geschwenkt und auf Eis kühl gelagert. Nach der Entnahme wurde die Subkutis mit Vicryl®-2-0 verschlossen und die Wunde desinfiziert. Nach der Hautnaht in Einzelknopftechnik mit Ethilon®-0 erfolgte die Versiegelung der Wunde mit Aluminiumspray. Die Narkose dauerte im Mittel 90 min (\pm 20 min) und die MSC-Entnahme 29 min (\pm 12 min).

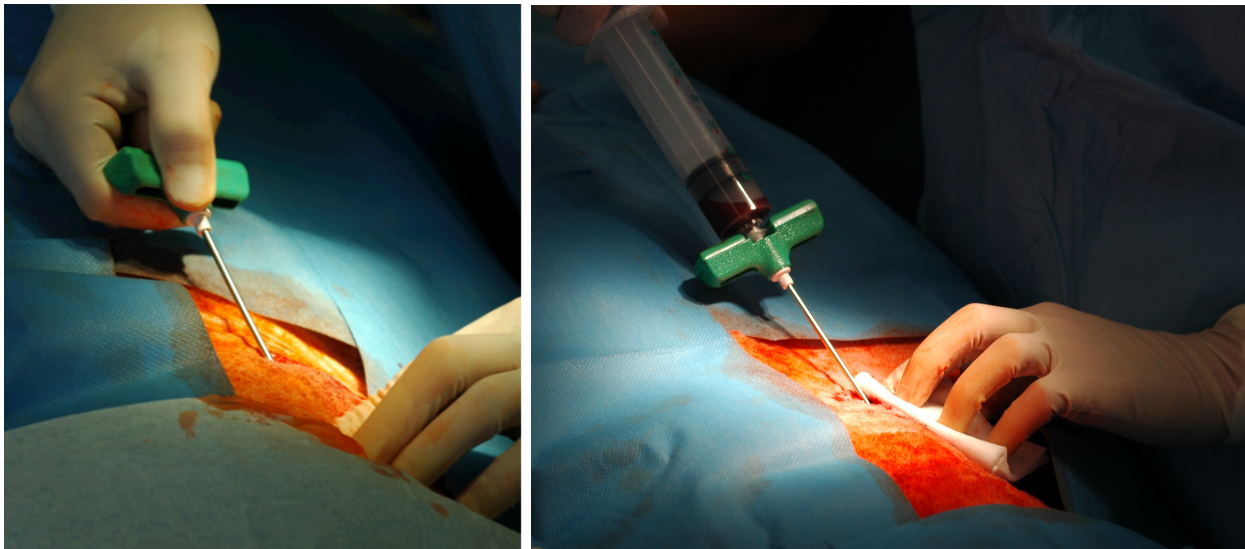


Abb. 11: Entnahme des Knochenmarkaspirats aus dem Beckenkamm

links intraspongiose Platzierung der Jamshidi®-Nadel

rechts Aspiration

Die Kultivierung der MSC wurde von Jasmin Rose unter Anleitung von Dr. rer. nat. Anke Dienelt im Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT) durchgeführt. Das entnommene Aspirat wurden unter sterilen Laborbedingungen

METHODEN

aufgereinigt, um nach drei Wochen 1,5 Mio. MSC aus 15 ml Blut zu kultivieren. Dazu wurde das Knochenmarkaspirat zunächst mit 25 ml PBS verdünnt, die Probe 3 s geschwenkt und 10 min bei 300 g gebremst zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge, Rotofix 32 Rotor 1624). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und zum Pellet 20 ml PBS gegeben. Die entstandene Zellsuspension wurde in einem Falcon-Röhrchen mit 100 µm Zellsieb gefüllt. Im Anschluss wurde die gesiebte Suspension in ein neues Falcon-Röhrchen mit 20 ml Histopaque® 1077 gegeben, ohne dass sich die Phasen vermischen. Das Falcon-Röhrchen wurde bei 400 g 30 min ungebremst zentrifugiert. Nach Zentrifugation bildete sich eine mittlere weiße Phase, die vorsichtig in ein neues Falcon-Röhrchen abpipettiert wurde. Nach Zugabe von 50 ml PBS erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 300 g für 10 min, diesmal gebremst. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet mit Expansionsmedium (500 ml DMEM Low Glucose, 50 ml fetales Kälberserum [FCS], 5 ml Penicillin / Streptomycin [P / S], 5 ml Glutamax) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (T-175) bei 36 °C und 5 % Sauerstoff im Inkubator gelagert. Das Expansionsmedium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Nach 7 bis 9 Tagen zeigten sich die Zellen plastikadhärent und bildeten Kolonien. Die Zellen wurden mikroskopisch nach Zelldichte, Zellzahl und Koloniebildung beurteilt und entsprechend die Passagierung durchgeführt von Phase 0 bis 4 oder 5, je nach Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen. Durch Trypsinierung wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst und jeweils 10^5 Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Qualität der MSC wurde anhand der ovinen Oberflächenmarker CD29+, CD44+, CD166+, CD11b-, CD31-, CD45- und CD14- in der Durchflusszytometrie (*engl. FACS = Fluorescent activated cell sorting*) analysiert (114). Die adipogene Differenzierung wurde *in vitro* mit einer Nile-Red- und DAPI-Färbung und die osteogene Differenzierung mit einer Alizarin-Rot-Färbung geprüft. Für die chondrogene Differenzierung wurde der Proteoglykangehalt ermittelt.

Nachdem die MSC die Passage 4 oder 5 erreicht hatten, wurden sie erneut trypsiniert. Am Operationstag wurden die MSC unter einer sterilen Bank auf den Carrier in eine Petrischale pipettiert. Nach 30 min wurde das MSC-Medium dazugegeben und die Zellen wurden zum Operationssaal transportiert. Dort wurde der Carrier mit MSC bis zur

METHODEN

Implantation für maximal 30 min im Wärmeschrank bei 36 °C gelagert. Kurz vor Implantation wurde dieser für 2 min in PBS gelegt, um das MSC-Medium auszuwaschen. Danach wurde der Carrier mit den MSC vorsichtig mit einer Pinzette aus der Petrischale (Abb. 12) entnommen und in den Riss platziert.

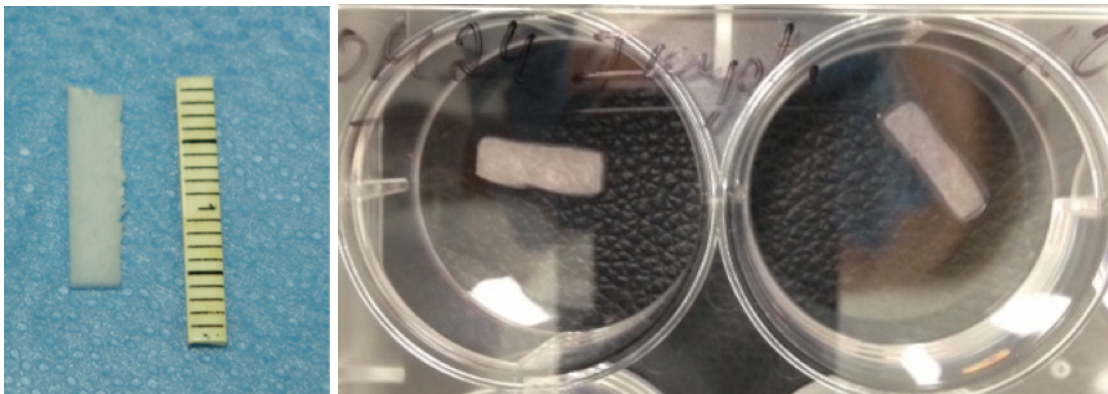


Abb. 12: Kollagencarrier
links nach Zuschnitt
rechts in Nährmedium mit kultivierten MSC

4.5 Produktion des plättchenreichen Plasmas

Ca. 20 min präoperativ wurde den Schafen der PRP- und PRP + MSC-Gruppe das Blut für die Herstellung des PRP entnommen. Dazu wurden in Narkose die linke *V. jugularis externa* mit einer großlumigen Strauss-Kanüle punktiert und vier 15-ml-Falcon-Röhrchen sowie ein EDTA-Röhrchen zur Vollblutanalyse abgenommen. Die Falcon-Röhrchen waren zuvor mit je 1,25 ml ACD-A Antikoagulanzen befüllt und anschließend mit 8,75 ml Blut auf 10 ml aufgefüllt worden. Die Proben wurden gekühlt ins Labor transportiert, wo die Herstellung des PRP nach einer modifizierten Methode von Sarkar und Kollegen erfolgte (115).

Zunächst wurden die Falcon-Röhrchen mit Vollblut für 10 min bei 840 g und 4 °C ungebremst zentrifugiert (Rotixa RP, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Die entstandene obere Phase mit Plasma, Thrombozyten und Leukozyten wurde abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt (Abb. 13) und die untere, dunkle Phase mit Erythrozyten verworfen. Die obere Phase (ca. 5 bis 6 ml) wurde erneut ungebremst bei 1250 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Danach entstand ein klares

METHODEN

Thrombozyten-Pellet am Boden der Falcon-Röhrchen. Der Überstand aus plättchenarmem Plasma wurde abgenommen, gesammelt und je 400 µl erneut auf die Pellets gegeben. Zur Resuspension der Pellets wurden die Proben mithilfe eines Vortex-Schüttlers durchmischt und anschließend in einem Falcon-Röhrchen zusammengeführt, sodass sich insgesamt ein PRP-Volumen von 1,6 ml (4 x 400 µl) ergab. Davon wurde 1 ml intraoperativ zur Vorkultivierung des Carriers (0,5 ml) und Injektion in den Riss (0,5 ml) verwendet. Die übrigen 400 µl dienten der manuellen Zählung der Thrombozyten im Labor.



Abb. 13: Schema der PRP-Herstellung

- links* zentrifugiertes Vollblut mit thrombozytenreicher Plasmaphase oben (hell) und erythrozytenreicher Phase unten (dunkel). Am Übergang beider Phasen befindet sich der Buffy-Coat, eine Schicht reich an Leukozyten und Thrombozyten.
- mittig* zentrifugierte, thrombozytenreiche Plasmaphase mit thrombozytenreichem Pellet am Boden
- rechts* Falcon-Röhrchen mit PRP nach Resuspension des Pellets mit Plasma

Die manuelle Zählung der Thrombozyten im Vollblut und PRP erfolgte unter 20-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop (Abb. 14). Alle Zählungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit von einer Person durchgeführt. Zudem wurden zuvor

METHODEN

Testzählungen von mehreren Untersuchern durchgeführt, um eine genaue zellmorphologische Erkennung der Thrombozyten sicherzustellen.

Die entnommene Blutprobe der jeweiligen Versuchstiere wurde bis zur Auszählung der Thrombozyten für wenige Minuten bei 4 °C gelagert. Die Probe wurde dann 15 s invertiert, und anschließend wurden 10 µl mit 90 µl PBS-Puffer gemischt (= 1:10-Verdünnung). Von der 1:10-Verdünnung wurden 10 µl erneut mit 990 µl PBS-Puffer vermischt (= 1:1000-Verdünnung). Alle Verdünnungen wurden 15 s invertiert und durch Auf- und Abpipettieren sowie einem Vortex-Schüttler gründlich vermischt. Im Anschluss wurden 10 µl der 1:1000-Verdünnung auf die C-Chip-Zählkammer gegeben und die Thrombozyten mikroskopisch ausgezählt.

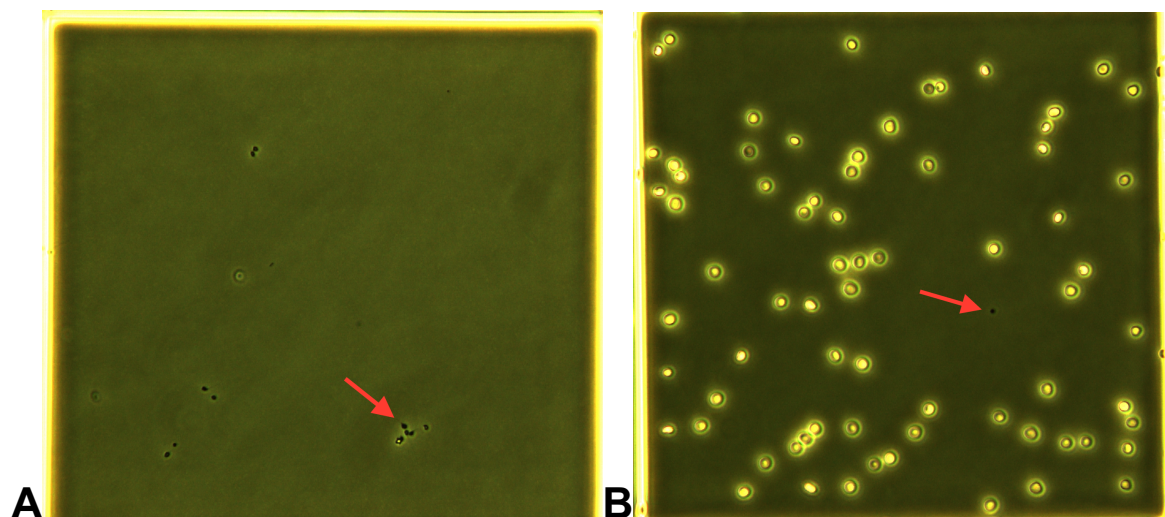


Abb. 14: C-Chip Zählkammer (20-fache Vergrößerung): A Thrombozyten im PRP (Pfeil: Agglutinierte Thrombozyten), **B** Vollblut (Pfeil: Thrombozyt)

Bei jeder Probe wurden die vier untersten horizontalen Kleinquadrate der vier großen Eckquadrate ausgezählt, also insgesamt sechzehn Kleinquadrate in jeder C-Chip-Zählkammer (Abb. 15). Von jeder Probe wurden insgesamt zwei Verdünnungen angesetzt, um die Genauigkeit der Zellzählung zu erhöhen. Es wurde der Mittelwert der vier Zählungen (der vier Kleinquadrate) pro Verdünnung gebildet und mit vier multipliziert, um den Wert für ein Großquadrat zu erhalten.

METHODEN

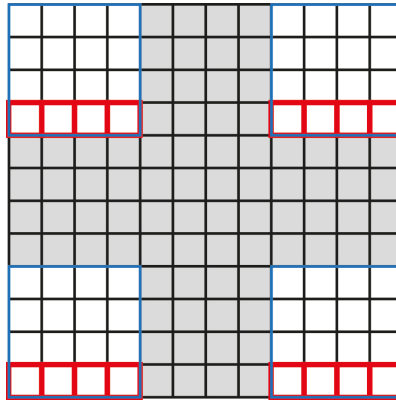


Abb. 15: Schematische Darstellung der Zählkammer

rot manuell ausgezählte Felder
blau Großquadrat

Die Thrombozytenzahl pro μl Blut wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Thrombozytenzahl} / \mu\text{l Blut} &= \text{Dilutionsfaktor} \times \text{Volumenfaktor} \times \left(\text{Thrombozyten} / \text{Großquadrat} \right) \\ &= 1000 \quad \times \quad 10 \quad \times \left(\text{Thrombozyten} / \text{Großquadrat} \right) \end{aligned}$$

4.6 Postoperative Betreuung und Euthanasie der Versuchstiere

Postoperativ erfolgte eine 14-tägige protokollierte Nachsorge der Tiere. In den ersten drei Tagen nach der Operation wurden die Tiere in einem Gatter mit zwei bis vier Tieren gehalten und erhielten einmal täglich eine subkutane Injektion mit dem nicht-steroidalen Antiphlogistikum Flunixin 1,5 mg / kg zur Analgesie. Außerdem erhielten die Tiere nach der Operation ein Fentanyl-Plaster (2 μg / kg / h) auf die rasierte Innenseite einer Vordergliedmaße, das drei Tage belassen wurde. Der Wundverband wurde am dritten postoperativen Tag entfernt. Bis zum 7. postoperativen Tag wurde täglich und bis zum 14. Tag alle zwei Tage das Gangbild beurteilt. Dabei wurde dokumentiert, ob die Tiere die operierte Gliedmaße entlasteten, teilbelasteten oder vollbelasteten. Zudem wurde die Operationswunde inspiziert und das operierte Gelenk auf mögliche Ergüsse oder Hämatome palpirt. Außerdem wurde die allgemeine äußere Erscheinung beurteilt und die rektale Körpertemperatur gemessen, um mögliche postoperative Infektionen zu erkennen. Am 10. postoperativen Tag wurden die Hautnähte entfernt. Ab dem 15.

METHODEN

postoperativen Tag wurden die Tiere für ca. sechs Wochen in einem Freilaufgehege gehalten. Einen Tag vor der Euthanasie wurden die Tiere wieder ins Institut gebracht und erneut das Gangbild des operierten Kniegelenks untersucht sowie der Allgemeinzustand beurteilt.

Die Euthanasie erfolgte am 56. Tag nach Operation. Die Tiere wurden mit 80 ml Thiopental-Natrium i. v. sediert und anschließend wurden 100 ml Kaliumchlorid i. v. injiziert, wodurch es zum Herzstillstand kam. Im Anschluss folgte die Inspektion, wobei zunächst die Hautnarbe und die Weichteilverhältnisse inspiziert wurden. Nach Rasur und Desinfektion des Kniegelenks wurden die ipsi- und kontralateralen *Menisci medialis* unter sterilen Bedingungen entnommen. Dazu wurde das Kniegelenk medial über eine longitudinale Inzision eröffnet und dann das LCT und das beim Schaf anatomisch dreigeteilte mediale, mittlere und laterale *Lig. patellae* durchtrennt. Die Kniegelenkscapsel wurde eröffnet sowie die Menge und Farbe der Synovialflüssigkeit begutachtet. Im nächsten Schritt wurden das LCA und LCP durchtrennt, um den *Meniscus medialis* besser entfernen zu können. Bei jedem Tier wurde der *Meniscus medialis* des rechten und zur Kontrolle der kontralaterale *Meniscus medialis* des linken Knies freipräpariert und vorsichtig entnommen. Die Menisken wurden im Anschluss auf einer sterilen Unterlage morphologisch untersucht. Dabei wurde das Ausmaß des Risses beurteilt, nach verbliebenem Nahtmaterial gesucht und auf sonstige morphologische Auffälligkeiten geachtet. Weiterhin wurden Proben vom Myokard und der Achillessehne für die Immunhistochemie entnommen. Das Myokard wurde als Positivprobe für den Nachweis von FGF-2 und die Achillessehne als Negativprobe ausgewählt, da dort eine starke bzw. schwache FGF-2-Färbung aufgrund immunhistochemischer Studien gesehen wurde (79, 116, 117). Nach der Euthanasie und Beendigung der Probenentnahme wurden die Kadaver fachgerecht entsorgt.

4.7 Makroskopische Beurteilung und Probenentnahme

Zur makroskopische Beurteilung des Heilungsgrades der Meniskusrisse wurde die Klassifikation nach Henning und Kollegen verwendet (10). Danach wurde die Heilung des vertikalen Bereichs des Risses in komplett (> 90 %), teilweise (50 bis 90 %) und nicht geheilt (< 50 %) unterteilt (10). Unter sterilen Bedingungen wurde der Riss auf

METHODEN

Durchgängigkeit und mögliches Reparaturgewebe untersucht. Nach der makroskopischen Beurteilung wurde der operierte Meniskus im Rissbereich in zwei gleichgroße Stücke geschnitten (Abb. 16), die für die Analyse der RT-PCR und Immunhistochemie verwendet wurden. Im kontralateralen Meniskus wurden zwei entsprechende Stücke in der gleichen Lokalisation entnommen (Abb. 16).

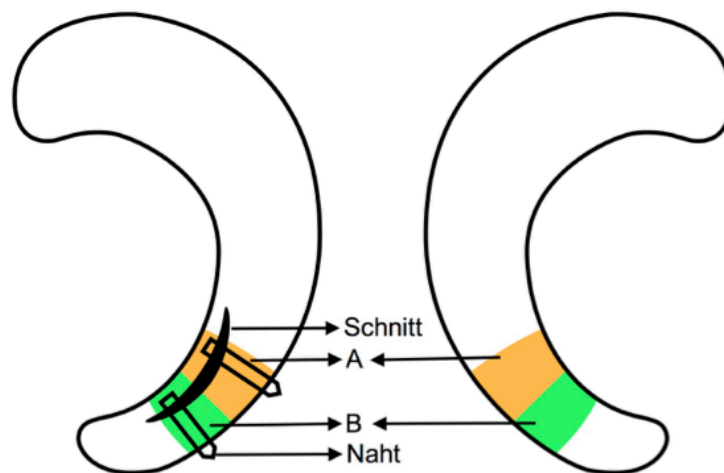


Abb. 16: Schematische Darstellung der Gewebeentnahme im Meniskus: A für die RT-PCR (orange), **B** für die Immunhistochemie (grün)
links operierter Meniskus
rechts kontralateraler Meniskus

Zur Aufarbeitung für die RT-PCR wurden die Meniskusstücke steril in ca. 3 mm große Stücke zerkleinert und in 15-ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden 2 ml RNA-Stabilisierlösung auf die Proben pipettiert, sodass diese vollständig benetzt waren. Auf Eis gelagert wurden die Proben umgehend zum Gefrierschrank transportiert und dort bei - 80 °C stehend bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Für die histologischen Analysen wurden das entsprechende Meniskusstück sowie die Proben von Myokard und Achillessehne in Tissue-Tek®-Boxen gelegt und in Schraubverschlussgläser mit 4 % Formaldehyd konserviert. Nach drei Tagen wurden die Proben 45 min unter Leitungswasser gespült und für sieben Tage in EDTA bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert. Das EDTA wurde alle drei Tage gewechselt, bis schließlich die Proben nach erneutem Spülen für 72 Stunden im Einbettungsautomat entwässert und paraffiniert wurden (Tab. 2).

METHODEN

Tab. 2: Protokoll Einbettungsautomat

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

Nach Programmende erfolgte die Einbettung der Proben in Paraffin. Dazu wurden die Menisken in kleine Metallboxen gelegt und diese mit 60 °C warmem Paraffin befüllt. Nach Erstarren des Paraffins konnten die fertigen Blöcke aus den Metallförmchen entnommen und Gewebeschnitte angefertigt werden.

4.8 Histologische Verfahren

Die Proben wurden im Julius Wolff Institut des Campus Virchow Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin histologisch angefertigt.

Herstellung der Gewebeschnitte

Die Paraffinblöcke mit den Gewebeproben des Meniskus, des Myokards und der Achillessehne wurden zunächst einige Minuten mit der Schnittseite auf eine - 10 °C temperierte Kühlplatte gelegt. Mit dem Mikrotom wurden im Anschluss von jedem Paraffinblock 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden für maximal 30 s vorsichtig zuerst in ein 10 °C kaltes, und dann in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt, um entstandene Falten zu glätten. Anschließend wurden die Paraffinschnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen und 24 h bei 37 °C im

METHODEN

Wärmeschrank inkubiert. Vor Beginn der histologischen Färbungen wurden die Proben zweimal für 10 min in Xylol entparaffiniert und in absteigenden Ethanollösungen rehydriert, je zweimal für 2 min in 100%igem und 2 min in 96%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol. Anschließend wurden die Gewebeschnitte kurz in Aqua destillata gelagert, bevor nach Färbeprotokoll fortgefahren wurde.

Hämatoxylin-Eosin Färbung /Safranin-O-Lichtgrün Färbung

Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Standardfärbung der Gewebeschnitte nach hausinternem Protokoll des Julius Wolff Instituts angefertigt. Dazu wurden die Gewebeschnitte nach Entparaffinierung und Rehydrierung für 7 min in Hämatoxylin nach Harris-Färbelösung gegeben und im Anschluss dreimal 10 s in Aqua destillata getaucht. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte kurz in HCL-Ethanol (0,25 %) verbracht und dann 10 min mit Leitungswasser gewässert. Für die Eosin-Färbung wurden die Gewebeschnitte dann drei- bis viermal für 5 s in Eosin-Färbelösung eingetaucht und danach zweimal 2 min in 96%igem Ethanol, zweimal 2 min in 100%igem Ethanol und zweimal 10 min in Xylol entwässert. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden im Anschluss mit Aquatex® unter einem Deckglas versiegelt.

Als zweite Standardfärbung wurde eine Safranin-O-Färbung nach hausinternem Protokoll des Julius Wolff Instituts durchgeführt. Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden für 8 min in Safranin-O-Färbelösung (1 g in 100 ml Aqua destillata) gegeben und drei- bis viermal für 5 s kurz mit Aqua destillata gespült. Danach wurden die Gewebeschnitte jeweils zweimal 3 min in 96%igem und 100%igem Ethanol und zweimal 5 min in Xylol getaucht. Mit Aquatex® benetzt, wurden die Gewebeschnitte mit Deckgläsern versiegelt.

4.9 FGF-2-Immunhistochemie

Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie basiert auf dem Prinzip der Antikörper-Antigen-Reaktion und dient der genauen Bestimmung der Lokalisation von Signalmolekülen (118). Im Gewebe befindliche Epitope des gesuchten Signalmoleküls werden im Idealfall spezifisch

METHODEN

vom Primärantikörper gebunden (118). Voraussetzung für die spezifische Bindung des Antikörpers ist eine hohe Aminosäuresequenzhomologie des Epitops (118). Polyklonale Antikörper können an verschiedene Epitope eines Antigens binden (118). Die Polyklonalität eines Antikörpers wird durch Injektion von zum Beispiel humanen Antigenen in eine bestimmte Tierspezies erzeugt, woraufhin im Serum Antikörper gebildet werden (118). Bindet ein Antikörper an gleiche Epitope verschiedener Antigene, so ist er kreuzreaktiv (118). Bevor ein Antikörper binden kann, müssen die Epitope z. B. enzymatisch oder durch Hitze demaskiert werden, um Membranvernetzungen und Formaldehydbindungen zu lösen (118). Nach dem Primärantikörper bindet der Sekundärantikörper, der bei der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Methode) mit Biotin markiert ist (118). Durch die Zugabe eines Substrates erzeugt der enzymmarkierte Avidin-Biotin-Komplex am Sekundärantikörper einen Farbumschlag (118).

FGF-2-Immunhistochemie

Da kein speziell anti-oviner Primärantikörper für FGF-2 verfügbar ist, wurde ein humaner Antikörper verwendet, der 100 % epitopsequenzhomolog zum Schaf ist (Tab. 3). Es wurde eine Positivkontrolle, also ein Gewebe, das FGF-2 in hohem Maß exprimiert, getestet, um die Kreuzreaktivität zu prüfen. Da FGF-2 immunhistochemisch in Myozyten und Endothelzellen des ovinen Myokards nachgewiesen wurde, diente dies als Positivkontrolle (79, 116). Ebenso wurde eine Negativkontrolle, also ein Gewebe, das FGF-2 nicht bzw. kaum exprimiert, getestet, um die Spezifität zu prüfen. Dafür wurde die Achillessehne untersucht, da dort bisher nur eine geringe FGF-2 beschrieben wurde (117). Zu Beginn der immunhistochemischen Färbung wurden die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte 10 s in Aqua destillata gelagert und dann zweimal 5 min in jeweils frischem PBS-Puffer gespült. Danach erfolgte die enzymatische Antigen-Demaskierung mit Proteinase K nach Protokoll von Abbiotec (LP 106-IHC). Dazu wurde ein Tris-HCl-EDTA-Puffer vorbereitet und 25 µl einer 20-mg-/ml-Lösung aus Proteinase K in Aqua destillata hinzugegeben. Je 100 µl des Puffers wurden auf die Gewebeschnitte pipettiert und in eine vorgewärmte Feuchtkammer bei 37 °C für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer abgestoppt. Um

METHODEN

unspezifische Bindungen des, von der Ziege gewonnenen Sekundärantikörpers zu blockieren, wurden die Gewebeschnitte mit je 100 µl eines 2%igen Ziegenserums bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Das Ziegenserum wurde im PBS-Puffer mit 2%igem bovinem Albuminserum verdünnt. Im Anschluss wurde der Primärantikörper FGF-2 1:100 mit Antibody Diluent verdünnt auf die Proben aufgetragen.

Tab. 3: Eigenschaften des verwendeten FGF-2-Antikörpers

Antikörper	FGF-2 (251853)
Firma	Abbotec, San Diego, Kalifornien, U.S.A.
Klonalität	polyklonal
Klasse	IgG
Zielspezies	Mensch
Herkunftspezies	Kaninchen
angegebene Kreuzreaktivität	Mensch, Maus, Ratte
Homologie zum Schaf	100 %
Anwendungsgebiet	Immunhistochemie mit Paraffin, ELISA, Western Blot
Vorbehandlung	Hitze-vermittelt mit Citratpuffer, enzymatisch (Proteinase K)
Verdünnung	1:100-1:500

Die Gewebeschnitte blieben im Anschluss über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Metallkammer. Die Gewebeschnitte wurden am folgenden Tag zweimal 5 min im PBS-Puffer gespült und anschließend 2 % des biotinylierten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers im PBS-Puffer mit 2%igem bovinem Albuminserum und 2%igem Ziegenserum aufgetragen. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte mit PBS-Puffer gespült und im Anschluss der Avidin-Biotin-Komplex mit gekoppelter alkalischer Phosphatase aufgetragen. Die Gewebeschnitte wurden für 50 min bei Raumtemperatur belassen. Der Komplex wurde aus 5 ml PBS-Puffer mit einem Tropfen Avidin und einem Tropfen Biotin 30 min vor dem Auftragen hergestellt. Nach der Inkubation wurden die Gewebeschnitte zweimal 5 min im PBS-Puffer gespült und anschließend zweimal 5 min mit einem Chromogen-Puffer inkubiert. Im Anschluss an das Auftragen des alkalischen Phosphats wurde die Entwicklung des Farbumschlags mikroskopisch beobachtet. Nach Erreichen der erwünschten Farbintensität der FGF-2-Färbung wurde die Reaktion durch zweimal 5 min Spülung mit PBS-Puffer abgestoppt. Danach wurden die Proben kurz in Aqua destillata gelagert. Zur Kontrastoptimierung

METHODEN

wurde auf die Gewebeschnitte für 2 min die Kernfärbung Hämatoxylin nach Mayer aufgetragen. Danach wurden die Gewebeschnitte 5 min mit kühlem Leitungswasser gewässert, um Farbreste auszuspülen. Mit Aquatex® benetzt, wurden die Gewebeschnitte durch Deckgläser versiegelt.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte unter einem digitalen Mikroskop fotografiert und für die anschließende Auswertung abgespeichert. Die fotografierten Gewebeschnitte des operierten und kontralateralen Meniskus von jedem Tier wurden mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop CS5, Adobe Systems, San José, Kalifornien U.S.A.) angeglichen. Dazu wurde das Foto des operierten Meniskus über das Foto des kontralateralen Meniskus gelegt (Abb. 17) und dessen Position durch Verschieben und Drehen der Form des operierten Meniskus angepasst (= Superimposition). Durch diese Superimposition ist es möglich, vergleichbare Regionen des operierten und kontralateralen Meniskus für die spätere Zellzählung zu verwenden, da so der Rissbereich auf den kontralateralen Meniskus übertragen wurde.

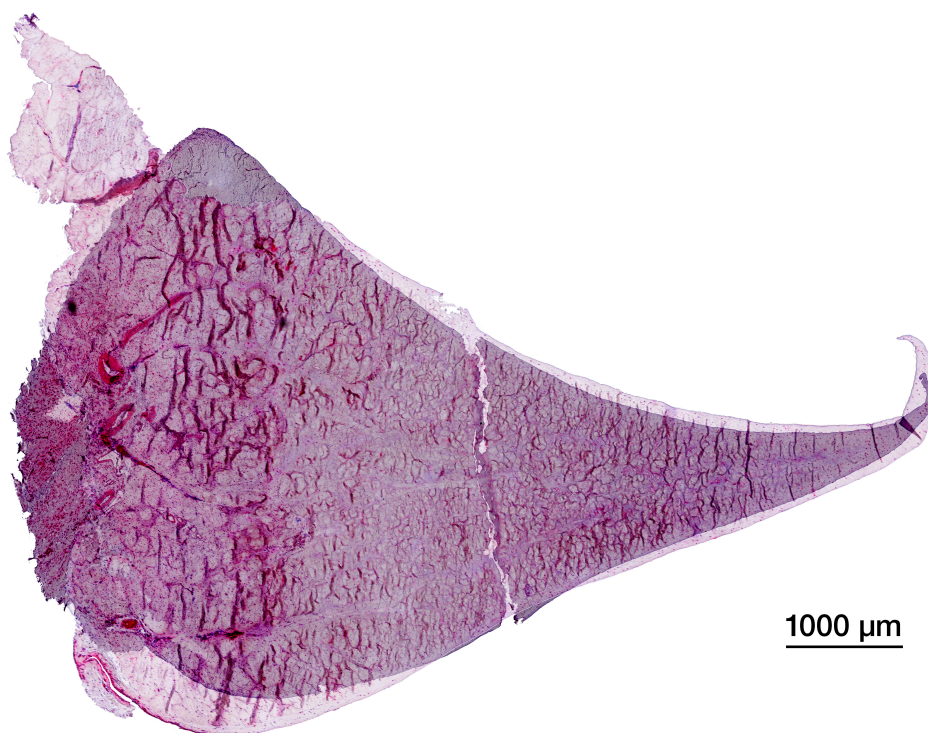


Abb. 17: Menisken nach Superimposition

vorn operierter Meniskus
hinten kontralateraler Meniskus

METHODEN

Nach der Superimposition wurden die Fotos des operierten und kontralateralen Meniskus mit einem histologischen Bildanalyseprogramm (ImageJ, Version 1.48v, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.) für die manuelle Zellzählung vorbereitet und anschließend die Zellen gezählt. Hierfür wurde zunächst eine Hilfslinie durch den Riss in der avaskulären Zone gezeichnet und diese im gleichen Winkel auf die avaskuläre Zone des kontralateralen Meniskus übertragen. Entlang der Hilfslinie wurden dann im operierten und kontralateralen Meniskus vergleichbare Regionen für die Zellzählung festgelegt. Es wurden hierfür insgesamt sechs Regionen (Regions of interest = ROIs) von peripher nach zentral definiert: vaskulär (Va), vaskulär rissfern (Rs2Va) und -nah (Rs1Va), avaskulär rissnah (Rs1Av) und -fern (Rs2Av) sowie avaskulär (Av). In jede dieser ROIs wurden bis zu fünf 500 x 500 µm große Quadrate platziert (Abb. 18 und 19), um möglichst viele Zellen auszählen zu können.

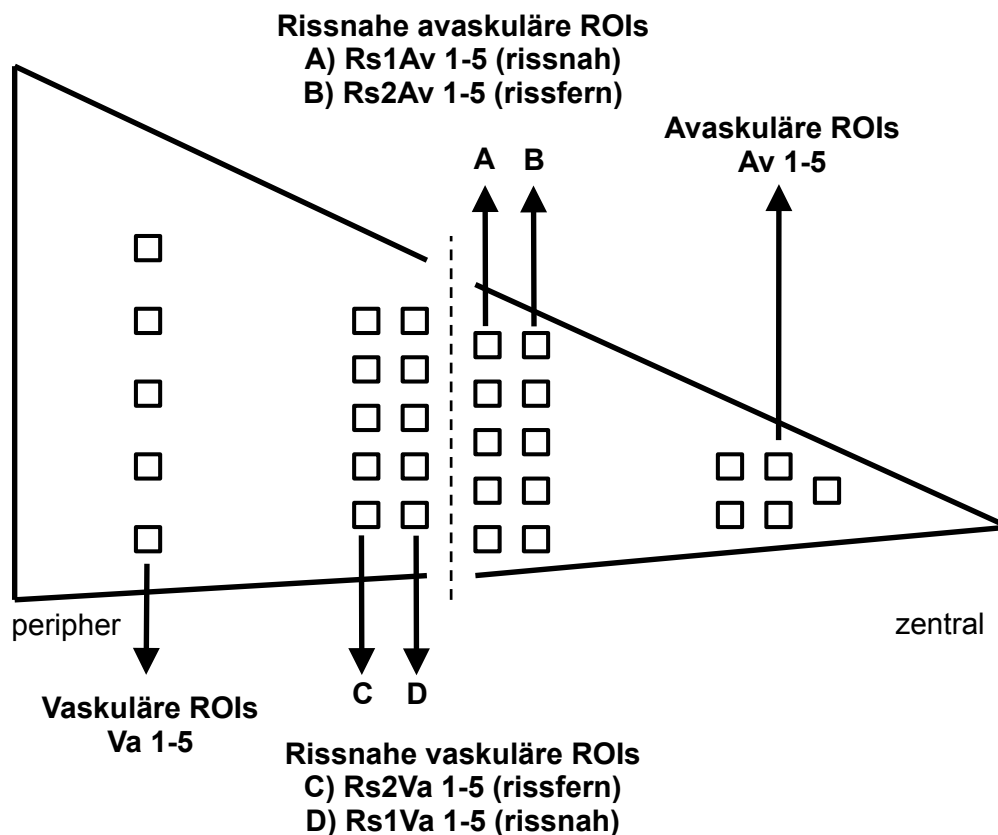


Abb. 18: Schema der ROIs des Meniskus

METHODEN

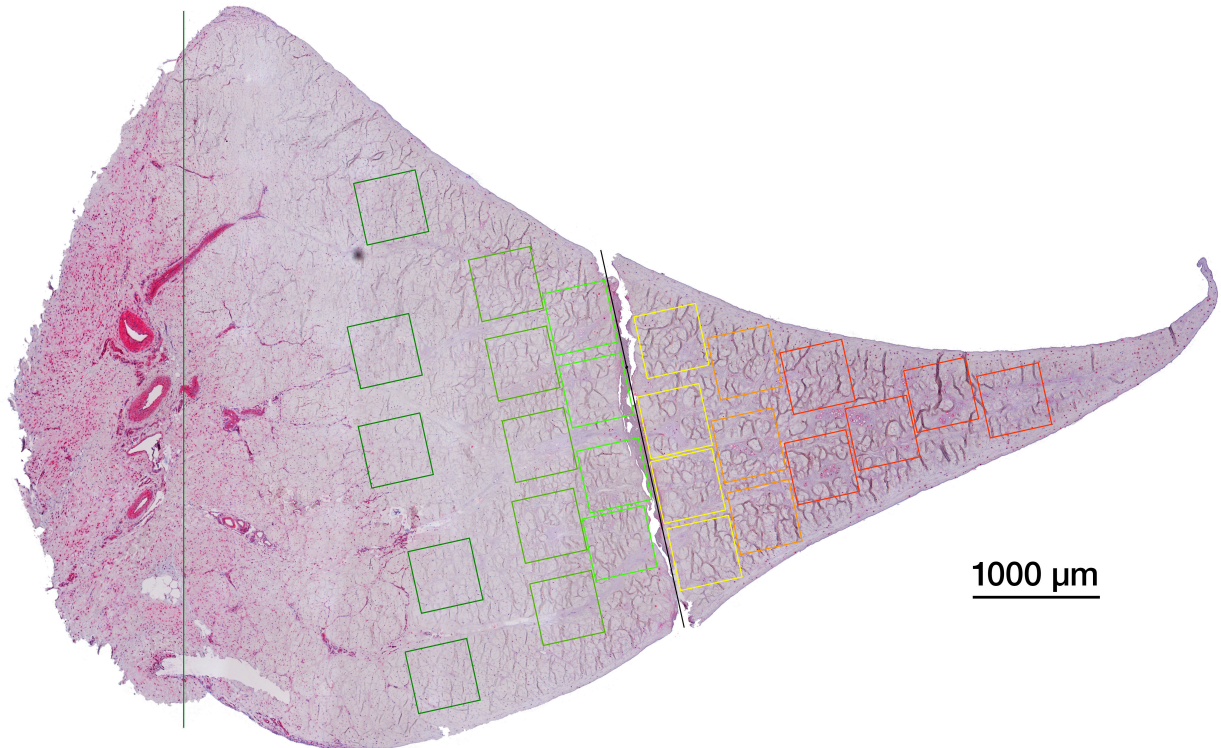


Abb. 19: Operierter Meniskus mit eingezeichneten ROIs (bunt)

Im Anschluss erfolgte die manuelle Auszählung aller gefärbten (FGF-2-positiven) und ungefärbten (FGF-2-negativen) Zellen in allen ROIs. In Vorversuchen beurteilten mehrere Untersucher die immunhistochemische Anfärbbarkeit, um FGF-2-positive Zellen eindeutig zu detektieren und so eine gute Interrater-Reliabilität zu erzielen. Für jede ROI wurde der Quotient (Ratio) aus gefärbten Zellen und der Gesamtzellzahl gebildet, um den prozentualen Anteil der FGF-2-positiven Zellen im operierten und kontralateralen Meniskus zu ermitteln. Dies ermöglichte Rückschlüsse auf eine Zu- oder Abnahme der Zellzahl der FGF-2-positiven Zellen in den operierten Menisken und verbessert die Intrarater-Reliabilität. Es wurden je nach Analyse die Mediane der entsprechenden Quotienten, z. B. aller ROIs für Aussagen über den gesamten Meniskus, gebildet. Um normalisierte Werte, d. h. die Veränderung der FGF-2-positiven Zellen zum kontralateralen, gesunden Meniskus zu erhalten, wurden die Werte des operierten durch den kontralateralen Meniskus dividiert.

4.10 Quantitative Real-Time RT-PCR

Die Proben wurden unter Anleitung von Dr. rer. nat. Anke Dienelt im Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies – BCRT auf dem Gelände des Campus Virchow Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin untersucht.

Prinzip der RT-PCR

Mit der Real-Time RT-PCR kann die relative Expression der mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) eines Zielgens in Bezug zu einem Referenzgen (Housekeeping-Gen), das in jeder Zelle mit Zellkern exprimiert wird, ermittelt werden (119). In dieser Studie wurde als Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) gewählt, da es ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Glykolyse ist und darüber hinaus eine Rolle in der DNA- und RNA-Reparatur spielt (120). Um die relative mRNA-Expression bestimmen zu können, wird zunächst die RNA (Ribonukleinsäure) aus den Zielzellen isoliert und mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Die cDNA wird enzymatisch durch die Taq-Polymerase mit phosphorylierten Nukleosiden vervielfältigt. Durch die Zugabe eines Farbstoffes (SYBR Green) kann während der RT-PCR die gebildete Doppelstrang-DNA als PCR-Produkt gemessen werden. Das detektierte Fluoreszenzsignal steigt proportional zur gebildeten Doppelstrang-DNA an.

RNA-Isolation

Aus dem Meniskusgewebe ließen sich nur geringe RNA-Mengen isolieren. Dies lag vor allem an der Hypozellularität des Gewebes und der schwierigen Homogenisation aufgrund der hohen Gewebefestigkeit. Um ausreichend RNA aus dem Meniskusgewebe isolieren zu können, wurden in Vorversuchen verschiedene mechanische Homogenisationsmethoden getestet (Mörsern, Mörsern und Precellys Minilys®, Precellys Minilys®). Dabei konnte mit einem speziell angefertigten Mörser aus Glas und einem Stößel aus Keramik (siehe Abb. 20, rechts) unter Stickstoff-Vereisung des Meniskusgewebes die größte RNA-Menge isoliert werden.

Zu Beginn wurden die Meniskusproben aller operierten und kontralateralen

METHODEN

Menisken aus dem Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Nach Abguss der RNA-Stabilisierlösung wurden die Proben steril mit einer Pinzette in eine Petrischale überführt, zerkleinert und in den Mörser gegeben. Mörser und Stößel waren zuvor und nach jeder Probe mit zuerst 100%igem Ethanol, dann mit 70%igem Ethanol und anschließend mit DEPC-Wasser gespült worden. Mit einer stickstofffesten Kelle wurde zur zerkleinerten Probe Flüssigstickstoff gegeben, sodass die Proben thermisch erhärteten. Kurz bevor der Stickstoff verdampfte, wurden die Proben maximal 15 min lang durch kräftige Auf- und Abwärtsbewegungen mit dem Stößel homogenisiert, bis eine grobpulvrige Konsistenz erreicht wurde (siehe Abb. 20, links).



Abb. 20: Speziell angefertigter Mörser zur Homogenisation des Meniskusgewebes

links Mörser und Pistill

rechts Meniskusfragmente im Mörser nach Zerkleinerung

Mit einem sterilen Spatel wurden die Proben in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizollysät gegeben und 15 s invertiert. Im Anschluss wurden die Probe erneut mechanisch mittels des Ultra-Turrax® homogenisiert, um verbliebene gröbere Gewebefragmente zu zerkleinern. Nach 5 min Zentrifugation (Mikro 22 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei 4 °C und 15.000 g wurde die obere, flüssige Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß abpipettiert und auf insgesamt 1000 µl Trizol aufgefüllt.

Im Anschluss erfolgte die RNA-Isolation nach hausinternem Protokoll des Julius Wolff Instituts. Dazu wurden zunächst 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben

METHODEN

wurden 15 s geschwenkt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: eine obere Phase mit RNA, die Interphase mit Proteinen und die untere Phase mit DNA. Die obere, klare Phase wurde abgenommen und in ein neues RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und der Rest verworfen. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol wurde das Reaktionsgefäß viermal invertiert, dann 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und im Anschluss 10 min zentrifugiert bei 15.000 g und 4 °C. Der flüssige Überstand wurde abgenommen, sodass nur das weißliche Pellet mit RNA am Boden des Reaktionsgefäßes verblieb. Dieses wurde erst mit 1 ml 70%igem Ethanol und anschließend mit 1 ml 100%igem Ethanol gewaschen. Nach jeder Ethanolzugabe wurden die Proben jeweils 15 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert und die Flüssigkeit bis auf das Pellet abpipettiert. Mit offenem Deckel wurden die Proben für 10 min unter dem Abzug zum Trocknen gelagert. Im Anschluss wurde das Pellet mit RNA in 15 µl nukleasefreiem Wasser suspendiert. Die Probe wurde dazu 5 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert und im Wärmeblock Thermomixer Compact bei 50 °C und 650 rpm für 5 min durchmischt. Die RNA-Menge wurde im Anschluss aus je 1 µl jeder Meniskusprobe mit einem Nano-Drop-Spektrophotometer bestimmt. Die Proben wurden bis zur cDNA-Synthese bei - 80 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Nach dem Auftauen der RNA-Proben auf Eis erfolgte der DNA-Verdau mit einer RNase-freien DNase nach Protokoll von Thermo Scientific. Für 10 µl Volumen wurden 1 µl DNase, 1 µl 10-facher Puffer mit Magnesiumchlorid, die berechnete RNA-Menge und DEPC-Wasser in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 2 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Danach wurden die Proben für 30 min bei 37 °C im Wärmeblock Thermomixer Compact inkubiert. Im Anschluss wurde zur Probe 1 µl 50 mM EDTA gegeben und diese nach kurzer Zentrifugation 10 min bei 65 °C im Wärmeblock inkubiert. Die RNA-Menge wurde erneut spektrophotometrisch ermittelt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Protokoll des iScript cDNA Synthesis Kit. Dazu wurde die RNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese enzymatisch durch die

METHODEN

Taq-Polymerase vervielfältigt. Es wurde eine Zielkonzentration von 10 ng RNA / μ l Totalvolumen festgelegt.

Für die Herstellung der cDNA wurde ein Totalvolumen von 20 μ l pro Probe angestrebt. Für jede Probe wurden 1 μ l iScript Reverse Transcriptase und 4 μ l iScript Reaction Mix zum Mastermix zusammen pipettiert. Die Menge an RNA und nukleasefreiem Wasser wurde berechnet, um die Zielkonzentration von 10 ng RNA / μ l Probe zu erreichen. Der Mastermix und die RNA wurden kurz bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. In ein 0,2-ml-PCR-Strip-Reaktionsgefäß wurden für jede Probe zuerst das nukleasefreie Wasser, dann der Mastermix und zuletzt die RNA pipettiert. Zwischen diesen Schritten wurde die Probe jeweils 1 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert, um die Bestandteile gut zu durchmischen. Die Reaktionsgefäße wurden dann im Peltier Thermal Cycler für 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert und im Anschluss bis zur RT-PCR bei - 20 °C gelagert.

Quantitative Real-Time RT-PCR mit SYBR Green

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression der untersuchten Signalmoleküle des Meniskusgewebes wurden Primer mit Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) erstellt und hinsichtlich ihrer Effizienz getestet (Tab. 4). Es wurden Primer für die Gene FGF-2, TGF- β , PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2, TNF- α , IL-1 α , Col1A1, Col1A2 und Col2A1 verwendet. GAPDH wurde als Normalisierungsgen zur Bestimmung der relativen mRNA-Expressionen dieser Signalmoleküle aller operierten und kontralateralen Menisken (n = 60) verwendet.

Tab. 4: Primer mit Sequenzen, Produktlänge und Effizienz. Fwd = forward Primersequenz, Rev = reverse Primersequenz

Primer	Gen Name	Sequenz	Produktlänge (bp)	Effizienz
GAPDH	Glycerinaldehyde 3-phosphate	Fwd 5' - GACCCCTTCATTGACCTTCA - 3' Rev 5' - GATCTCGCTCCTGGAAGATG - 3'	142	1,95
FGF-2	Fibroblast growth factor 2	Fwd 5' - GTGCAAACCGTTACCTTGCT - 3' Rev 5' - ACTGCCAGTTCGTTTCAGT - 3'	165	1,99

METHODEN

TGF- β	Transforming growth factor beta1	Fwd 5' - CACGTGGAGCTGTACCAGAA - 3' Rev 5' - AACTGAACCCGTTGATGTCC - 3'	223	2,10
PDGF- β	Platelet-derived growth factor beta	Fwd 5' - ACGCTAACTTCCTGGTGTGG - 3' Rev 5' - CTTCTTCTTCCGCACGATCT - 3'	146	2,04
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A	Fwd 5' - ATTTTCAAGCCGTCCTGTGT - 3' Rev 5' - TATGTGCTGGCTTTGGTGAG - 3'	251	2,15
IGF-1	Insulin-like growth factor 1	Fwd 5' - GTTGGTGGATGCTCTCCAGT - 3' Rev 5' - ACATCTCCAGCCTCCTCAGA - 3'	152	2,13
IGF-2	Insulin-like growth factor 2	Fwd 5' - CATCGTGGAAGAGTGTGCTT - 3' Rev 5' - TGCTTCCAGGTGTCAGATTG - 3'	168	2,06
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Fwd 5' - TTGTTCCCTCACCCACACCAT - 3' Rev 5' - ATCCCAAAGTAGACCTGCCC - 3'	242	2,14
IL-1 α	Interleukin 1 α	Fwd 5' - CGATGATGACCTGGAAGCCA - 3' Rev 5' - TTGATTGAGGGCGTCGTTCA - 3'	148	2,21
Col1A1	Collagen 1A1	Fwd 5' - AGGGACCCAAAGGAGACACT - 3' Rev 5' - TCCAGGAAGTCCAGGTTGTC - 3'	95	2,16
Col1A2	Collagen 1A2	Fwd 5' - TGGATTGACCCTAACCAAGG - 3' Rev 5' - GGGTGCCACCATTGATAGTT - 3'	175	2,04
Col2A1	Collagen 2A1	Fwd 5' - CGTCACCTACCACTGCAAGA - 3' Rev 5' - CGGTGTATGTGAACCTGCTG - 3'	134	2,22

Zunächst wurde für jeden Primer eine Gebrauchslösung aus 80 μ l RNA-freiem Wasser und je 10 μ l des *Reverse*- und *Forward*-Primers in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß hergestellt und diese 15 s zentrifugiert. Für jeden Primer wurde ein Primer-Mastermix aus 2 μ l Primer Gebrauchslösung pro *well* und 12,5 μ l des iScript SYBR® Green Supermix pro

METHODEN

well zusammen pipettiert. Die Anzahl der *wells* wurden zuvor berechnet. Weiterhin wurde der DNA-Mastermix mit 10,5 µl pro *well*, bestehend aus 1 µl DNA und 9,5 µl nukleasefreiem Wasser, in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß angesetzt, kurz mit einem Vortex-Schüttler vermischt und für ca. 30 Sekunden bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. In die entsprechenden *wells* einer 96-*well*-Platte wurden zuerst 14,5 µl Primer-Mastermix und dann 10,5 µl DNA-Mastermix gegeben. Jeder Primer wurde im Triplet (3 *wells*) analysiert und je eine Wasserprobe mit 10,5 µl mitgetestet, um die Qualität der Primer sicherzustellen. Die 96-*well*-Platte wurde mit einem hitzebeständigen Deckel versehen, 1 min bei 500 rpm zentrifugiert und im iCycler zur quantitativen Analyse inkubiert:

Denaturierung:		95 °C	3 min
40 Zyklen:	Denaturierung	94 °C	15 s
	Amplifikation	62,8 °C	45 s
	Signalaufnahme	72 °C	30 s
Schmerzkurve:		bis 94 °C	
Kühlung:		15 °C	

4.11 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel® 2011 (Version 14.6.5., Microsoft Corporation, Richmond, Virginia, U.S.A.) und dem Statistikprogramm Prism® (Version 7.0.a, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, U.S.A.). Eine Normalverteilung wurde bei einer Anzahl von sechs Tieren pro Gruppe ausgeschlossen und nicht-parametrische Tests verwendet. Mit Blick auf das Signifikanzniveau wurden $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,01$ als hochsignifikant festgelegt. Es erfolgte eine Statistikberatung in der Charité – Universitätsmedizin Berlin bei Prof. Dr. med. Dirk Stengel.

Die mediane Dauer der postoperativen Belastungsart wurden anhand des Friedman-Tests verglichen. Die mediane Thrombozytenkonzentration im PRP und Vollblut mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

Die Auswertung und Präsentation der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgte anhand der Mediane und der interquartilen Spanne (IQR, 25. bis 75. Quartile). Zunächst wurden die einzelnen ROIs innerhalb der operierten und kontralateralen Menisken mit dem Friedman-Test verglichen und als Post-hoc-Analyse der Dunn-Test für Mehrfachvergleiche angewandt. Zum Vergleich der jeweiligen ROIs der operierten und der kontralateralen Menisken wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest verwendet. Für die Analyse zwischen den Gruppen wurden die Ergebnisse der operierten Menisken normalisiert zu den gesunden, kontralateralen Menisken verwendet. Hierzu wurde jeweils das Ergebnis (Mediane) des operierten durch das Ergebnis des gesunden, kontralateralen Meniskus dividiert und mit 100 multipliziert. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison als Post-hoc-Analyse.

Die Analyse der RT-PCR erfolgte anhand der Berechnung der Delta-delta-Ct-Werte nach der Pfaffl-Methode unter Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen (119). Dabei wurden die Delta-Ct-Werte von GAPDH (Referenzgen) zur Normalisierung verwendet. Die Delta-Ct-Werte der operierten Menisken jeder Gruppe wurden zu den gepoolten, d. h. dem Mittelwert der Delta-Ct-Werte der kontralateralen Menisken aller Gruppen, normalisiert. Für die Analyse der relativen mRNA-Expression innerhalb der Gruppen, also zwischen den operierten und kontralateralen Menisken, wurde ein

METHODEN

paarweiser t-Test (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Die relative mRNA-Expression zwischen den Gruppen wurde mittels 2-way ANOVA und Tukey-Test für Mehrfachvergleiche ermittelt. Die Ergebnisse der PCR wurden als relative mRNA-Expression präsentiert, d. h. die Delta-Ct-Werte der operierten wurden mit denen der gepoolten kontralateralen Menisken ins Verhältnis gesetzt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Makroskopische Beurteilung

In der makroskopischen Beurteilung zeigte sich in keiner Gruppe eine teilweise oder komplette Meniskusheilung (Abb. 21).

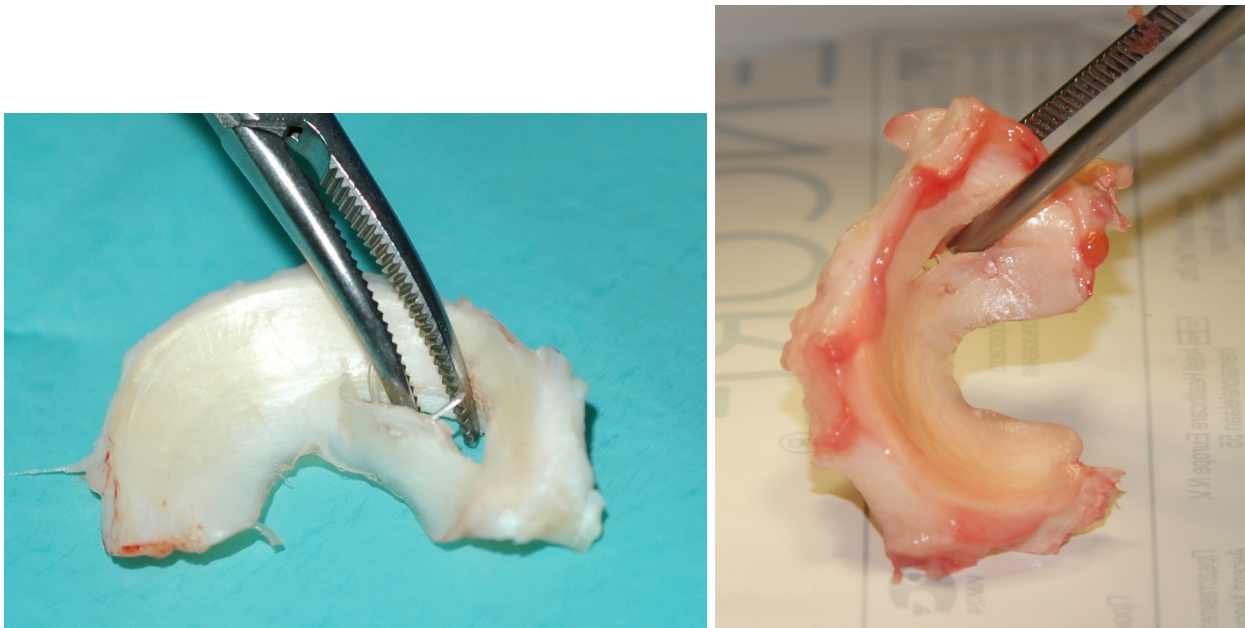


Abb. 21: Meniskus mit Riss *ex situ* und sichtbarem Fadenmaterial im Riss
links aus der Carrier-Gruppe
rechts aus der Naht-Gruppe

Bei allen Schafen zeigten sich reizfreie Narben- und Weichteilverhältnisse. Das bei der initialen Meniskusoperation ossär abgesetzte und dann refixierte LCT war bei allen Schafen angewachsen. In der Naht-Gruppe wiesen zwei Tiere einen geringen serösen Kniegelenkserguss auf. In der Carrier-Gruppe zeigte ein Tier einen geringen und ein weiteres Tier einen deutlichen serösen Kniegelenkserguss. In der PRP-Gruppe hatten zwei Tiere einen geringen serösen Kniegelenkserguss und bei vier Tieren war noch Nahtmaterial im Meniskus vorhanden. In der MSC-Gruppe zeigten zwei Tiere einen mäßigen serösen Kniegelenkserguss und bei zwei Tieren wurde noch Nahtmaterial im Meniskus gefunden. In der PRP + MSC-Gruppe wurde bei drei Tieren ein mäßiger seröser Kniegelenkserguss festgestellt und bei drei Tieren befand sich noch Nahtmaterial im Meniskus. In keinem Meniskusriss wurden Rückstände des implantierten Carriers gefunden. Die entnommenen Proben aus Myokard und Achillessehne waren makroskopisch unauffällig.

ERGEBNISSE

5.2 Versuchstierparameter

Postoperativ zeigten die Schafe keine klinischen Auffälligkeiten. Es gab keinen Anhalt für eine systemische oder lokale Infektion im Wundbereich und kein Tier hat postoperativ an Gewicht verloren.

Die mittlere Dauer der postoperativen Belastungsart (Tage der vollständigen Entlastung, Teilbelastung und bis zur Vollbelastung) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen ($p > 0,05$). In der PRP- und PRP + MSC-Gruppe belasteten die Tiere jedoch tendenziell schneller wieder voll als in der Naht-, Carrier- und MSC-Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz (Tab. 5).

Tab. 5: Dauer der postoperativen Belastung der operierten Gliedmaße (Mediane)

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

5.3 Zellzahlen im plättchenreichen Plasma (PRP)

Die Gesamtzahl der Thrombozyten im PRP betrug im Median 910.000 Thrombozyten / μl (IQR 725.625 – 1.191.250 Thrombozyten / μl) und war im Median 2,72-fach höher als im Vollblut mit 335.000 Thrombozyten / μl (IQR 255.000 – 396.875 Thrombozyten / μl). In der PRP-Gruppe (Abb. 22) wurden die Thrombozyten um den Faktor 2,75 angereichert, auf 810.000 Thrombozyten / μl (IQR 496.875 – 1.292.500 Thrombozyten / μl) verglichen mit 293.750 / μl im Vollblut (IQR 219.375 – 477.500 Thrombozyten / μl). In der PRP + MSC-Gruppe (Abb. 22) wurden im PRP im Median 987.500 Thrombozyten / μl (IQR 847.000 – 1.398.750 Thrombozyten / μl) nachgewiesen, was einer 2,84-fach höheren Konzentration im Median entspricht als im Vollblut mit

ERGEBNISSE

347.500 Thrombozyten / μl (IQR 304.375 – 455.625 / μl). Die Anreicherung war in beiden Gruppen im PRP signifikant höher als im Vollblut ($p = 0,0312$). In beiden Gruppen waren neben den Thrombozyten nur vereinzelt andere Zellen mikroskopisch erkennbar (PRP-Gruppe 0 Zellen / μl , PRP + MSC-Gruppe 1.250 Zellen / μl).

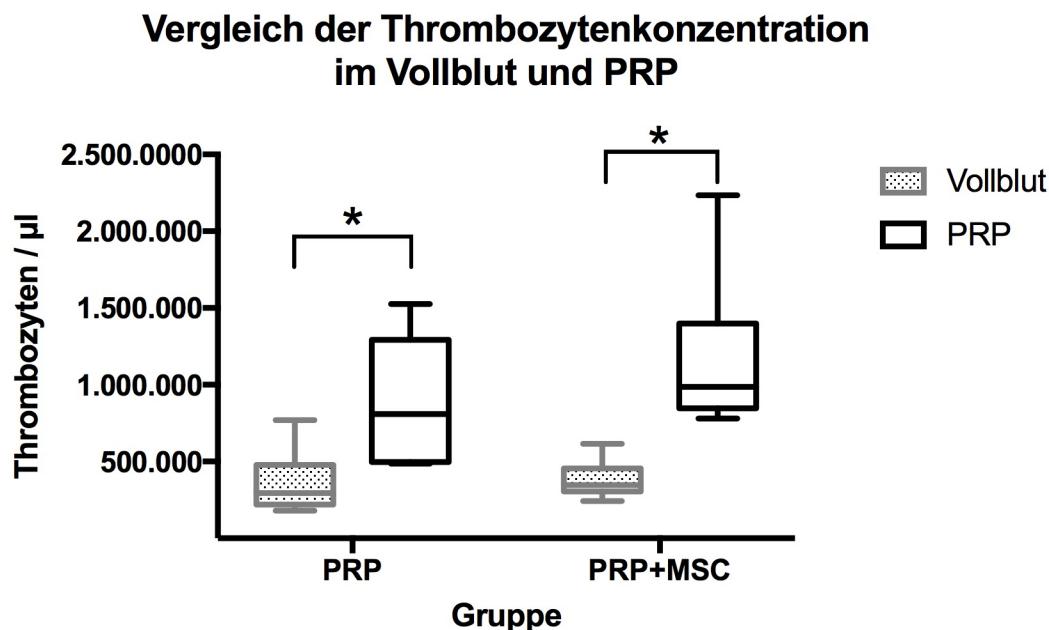


Abb. 22: Thrombozytenkonzentration im Vollblut und im PRP in den PRP- und PRP + MSC-Gruppen. Dargestellt sind die Mediane mit IQR. * = $p < 0,05$, signifikant.

5.4 Histologie

Hämatoxylin-Eosin-Färbung /Safranin-O-Lichtgrün-Färbung

In den Übersichtsfärbungen zeigte sich in allen operierten Menisken ein vollständiger Risspalt ohne durchgängige Gewebebrücken. In allen operierten Menisken, außer bei einem Tier in der Carrier-Gruppe, zeigte sich Reparaturgewebe an den Rissrändern. In der vaskulären Zone aller Menisken konnten Gefäße nachgewiesen werden, jedoch bei keinem Meniskus rissnah oder in der avaskulären Zone. Weiterhin waren in der vaskulären Zone zahlreiche fusiforme Fibrochondrozyten und in der avaskulären Zone homogen verteilte runde Fibrochondrozyten sichtbar. Zur tibialen und femoralen Oberfläche des Meniskus waren die Fibrochondrozyten fusiformer geformt.

ERGEBNISSE

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigten sich die Zellkerne der Fibrochondrozyten und Endothelzellen der vaskulären Zone blau angefärbt. Das Zytoplasma und das kollagene Bindegewebe des Meniskus färbten sich rot an (Abb. 23).

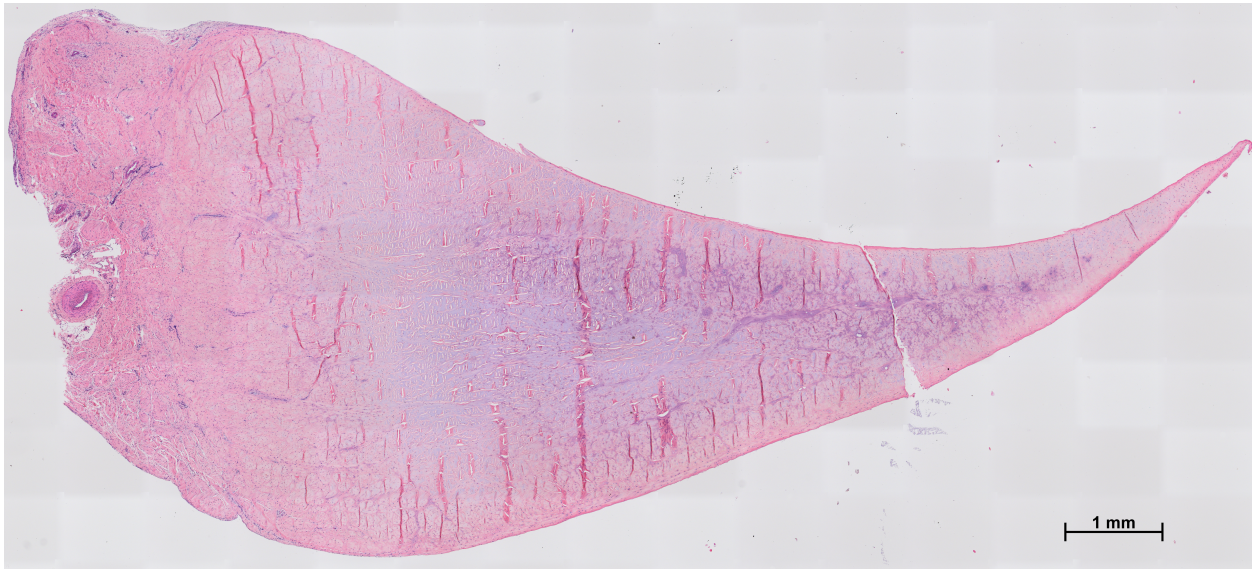


Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines operierten Meniskus der PRP-Gruppe mit sichtbarem Riss (10-fache Vergrößerung)

In der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung färbten sich Knorpelanteile im Inneren des Meniskus teilweise rot. Das Bindegewebe färbte sich grün, die Zellkerne der Fibrochondrozyten schwarz und das Zytoplasma weiß bis blass-grün an (Abb. 24). Das Reparaturgewebe im Risspalt färbte sich ebenfalls grün an.

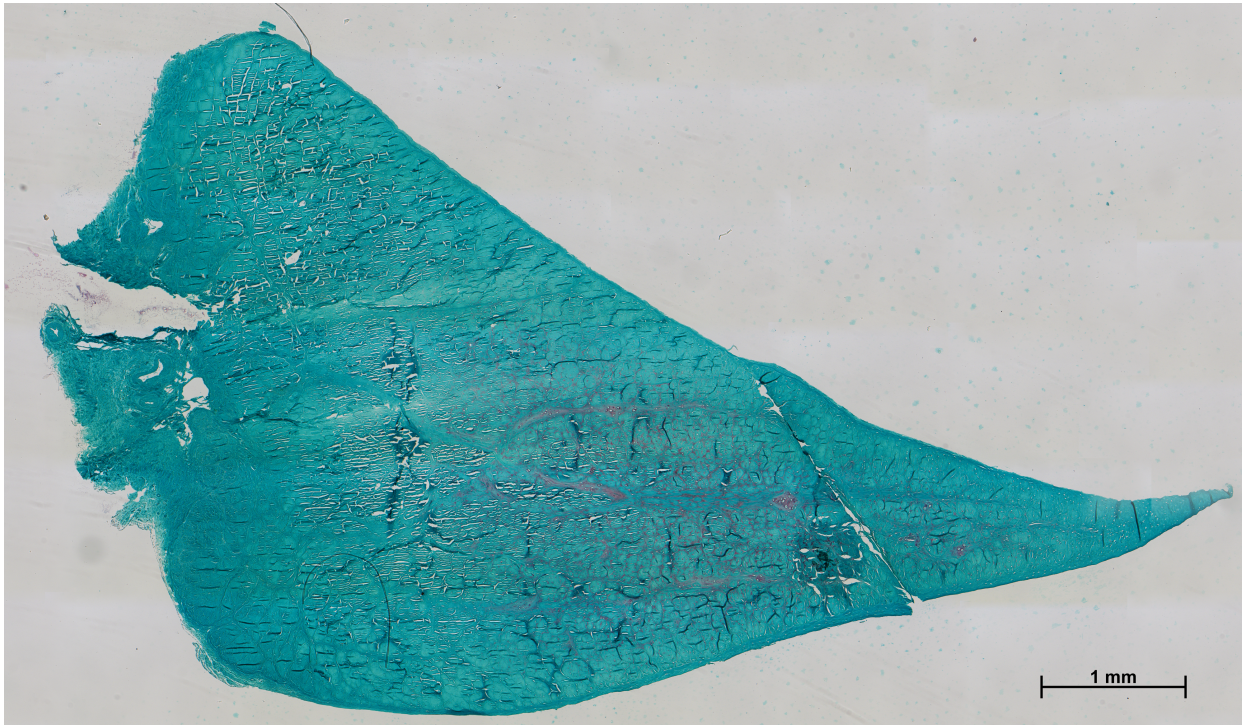


Abb. 24: Safranin-O-Lichtgrün-Färbung eines operierten Meniskus der MSC-Gruppe mit sichtbarem Riss (10-fache Vergrößerung)

Betrachtete man die Zellularität am Rissbereich (ROIs Rs1Va+Rs1Av), so konnte in keiner Gruppe eine signifikante Änderung der Zellzahl zwischen den operierten und kontralateralen Menisken festgestellt werden (Abb. 25, Tab. 6). In den operierten Menisken der PRP + MSC-Gruppe wurden rissnah signifikant höhere Gesamtzellzahlen (mediane Zellzahl 862; $p = 0,0264$) als rissnah in den operierten Menisken der Naht-Gruppe (mediane Zellzahl 376) nachgewiesen. Zwischen den anderen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied in der rissnahen Gesamtzellzahl der operierten Menisken gesehen.

ERGEBNISSE

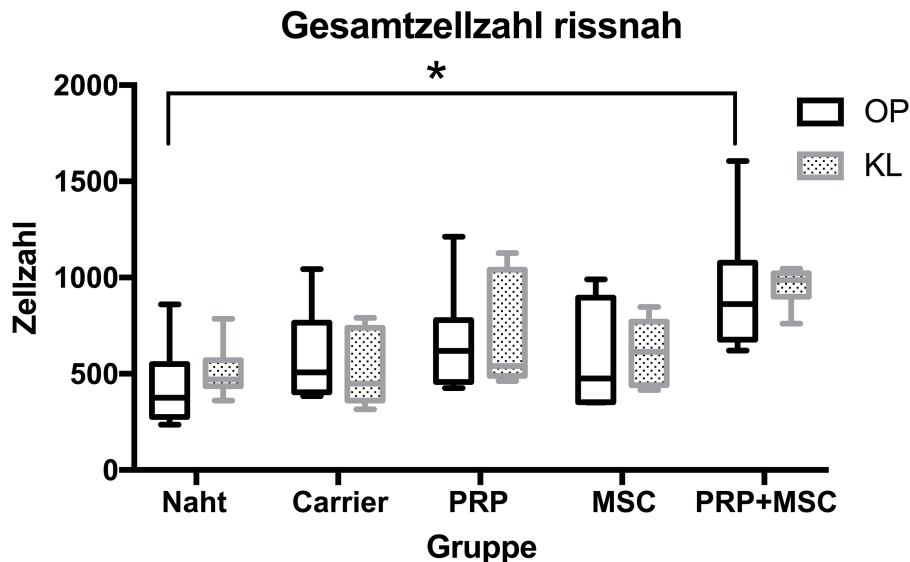


Abb. 25: Gesamtzellzahl in den rissnahen ROIs (Rs1Va+Rs1Av) der operierten (OP) und kontralateralen Menisken (KL). Dargestellt sind die Mediane mit IQR. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 6: Gesamtzellzahlen der operierten (OP) und kontralateralen (KL) Menisken

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
OP	376	508	619	475	862
Median (IQR)	(276 - 550)	(404 - 765)	(458 - 779)	(352 - 895)	(678 - 1077)
KL	471	449	540	614,5	988
Median (IQR)	(435 - 571)	(361 - 739)	(489 - 1040)	(441 - 771)	(901 - 1022)
Mediane Differenz (KL - OP)	124	- 45	- 46	241	143
Signifikanz OP vs. KL	$p = 0,44$	$p = 0,56$	$p > 0,99$	$p = 0,84$	$p = 0,44$

5.5 FGF-2-Immunhistochemie

Die verwendete FGF-2-Antikörperfärbung zeigte in allen Zonen des Meniskus positive gefärbte Fibrochondrozyten (Abb. 26). Dabei färbte sich das Plasma der Fibrochondrozyten und der Gefäßendothelzellen in der vaskulären Zone des Meniskus rot an (Abb. 26, links).

ERGEBNISSE

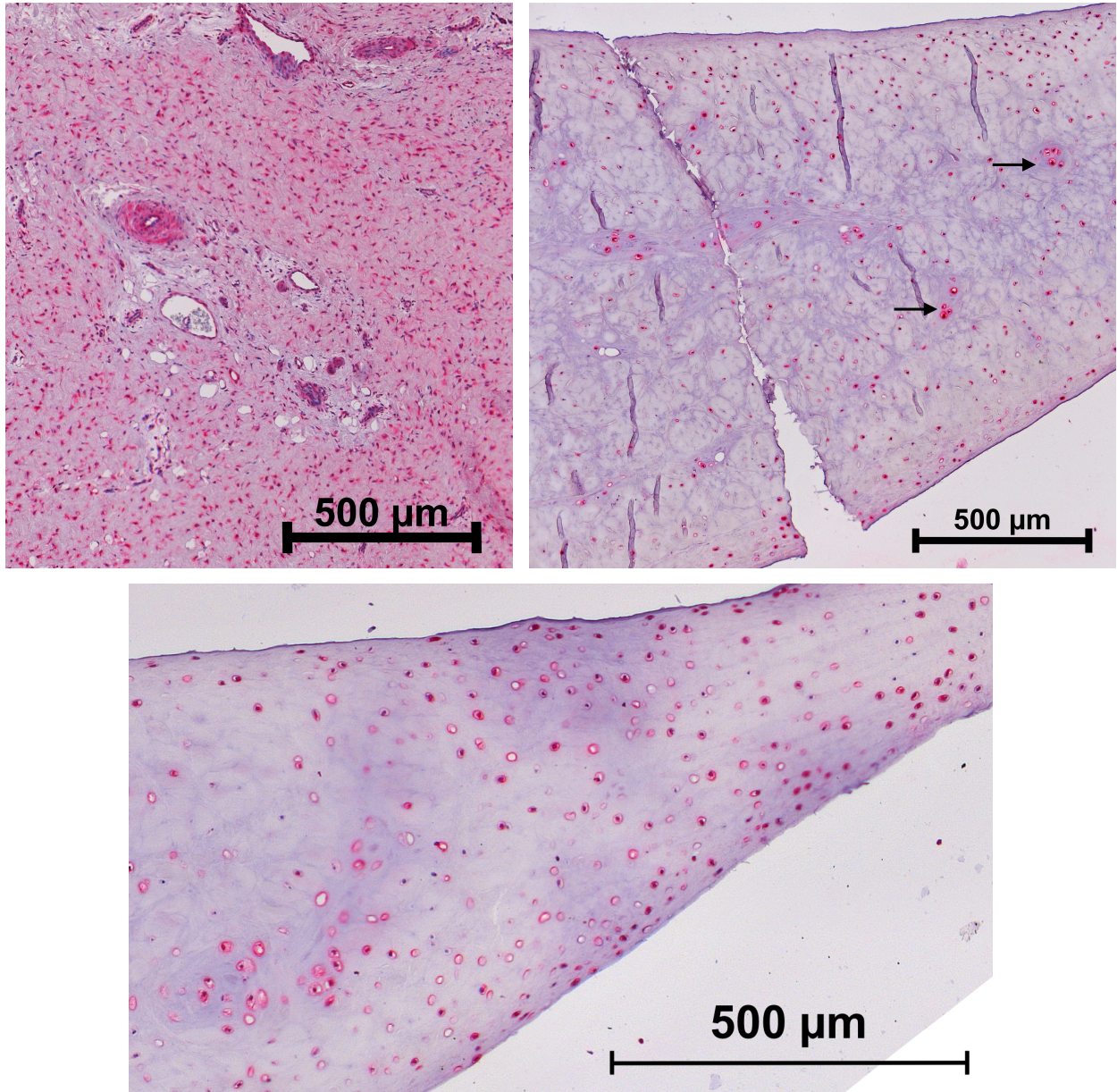


Abb. 26: FGF-2(1:100)-Färbung eines operierten Meniskus der PRP + MSC-Gruppe (10-fache Vergrößerung)

links vaskuläre Zone mit FGF-2-positivem Gefäßendothel und Fibrochondrozyten
rechts rissnah, Pfeile: FGF-2-positive Fibrochondrozyten,
unten avaskuläre Zone mit zahlreichen FGF-2-positiven ovalen Fibrochondrozyten

ERGEBNISSE

Das ovine Myokardgewebe als Positivkontrolle zeigte wie erwartet eine starke FGF-2-Anfärbung der Myozyten und des Gefäßendothels, jedoch keine Anfärbung im Fett und im umgebenden lockeren Bindegewebe (Abb. 27, rechts).

Die Achillessehne als Negativkontrolle zeigte keine FGF-2-Anfärbung (Abb. 27, links).

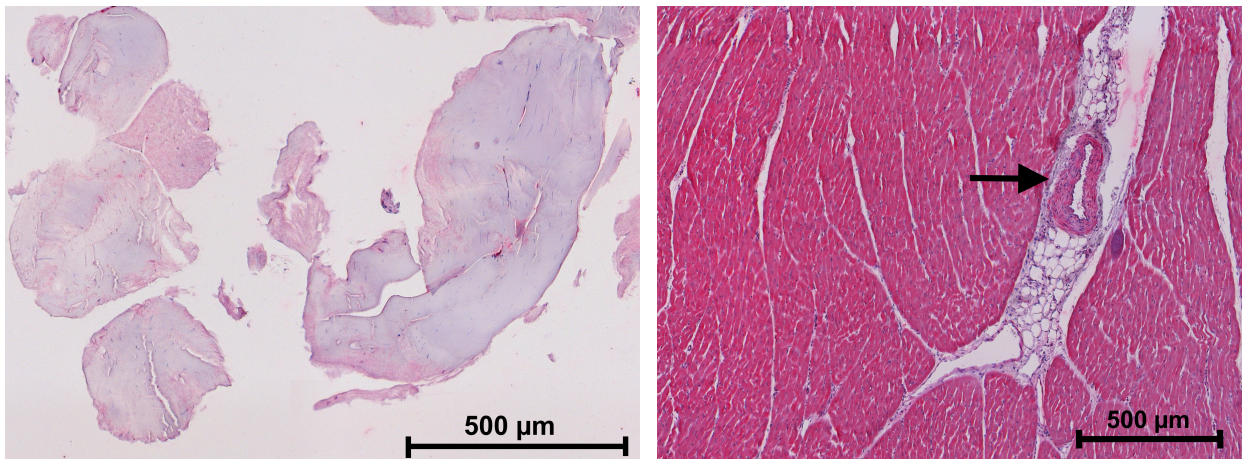


Abb. 27: FGF-2(1:100)-Färbung (10-fache Vergrößerung) von Achillessehne und Myokard

links Achillessehne, FGF-2-negativ

rechts Myokard mit FGF-2-positiven Myozyten und Endothelzellen, Pfeil: Arteriole

In der Betrachtung des gesamten Meniskus, d. h. der Anzahl der FGF-2-positiven Zellen aller Regionen, zeigte sich in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tab. 7). Zwischen den Gruppen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p > 0,99$). Grafisch ließ sich die Tendenz ableiten, dass in den operierten Menisken der PRP- und PRP + MSC-Gruppe eher weniger und in der Carrier-Gruppe eher mehr FGF-2-positive Zellen vorhanden sind als in den kontralateralen Menisken (Abb. 28).

ERGEBNISSE

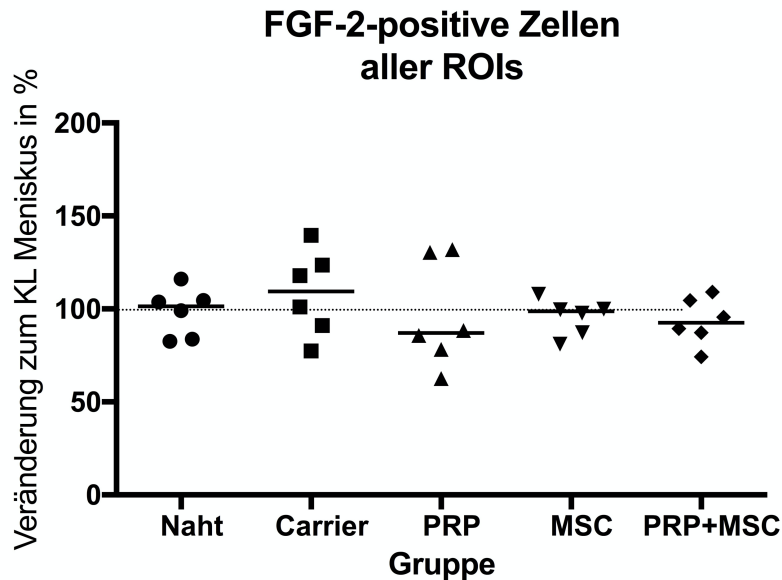


Abb. 28: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen aller ROIs der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 7: FGF-2-positiv Zellen aller ROIs der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
Median in % (IQR)	100 (84 – 107)	107 (87 – 127)	85 (75 – 133)	100 (93 – 107)	96 (78 – 110)
Differenz in % OP vs. KL	0	+ 7	- 15	0	- 4
Signifikanz OP vs. KL	$p = 0,84$	$p = 0,44$	$p = 0,84$	$p > 0,99$	$p = 0,56$

Für den Vergleich der einzelnen Regionen des Meniskus innerhalb der Gruppen wurden die ROIs Rs2Va und Rs1Va zu vaskulär rissnah und Rs1Av und Rs1Av zu avaskulär rissnah zusammengefasst. Dadurch erhielt man eine größere Fläche und damit mehr auszählbare Zellen im vaskulären bzw. avaskulären Bereich um den Riss. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl FGF-2-positiver Zellen vaskulär rissnah und avaskulär rissnah innerhalb der Gruppen ($p > 0,05$). Grafisch waren in allen Regionen der PRP- und PRP + MSC-Gruppe tendenziell weniger FGF-2-positiv Zellen als in den kontralateralen Menisken (Abb. 29). In der Carrier-Gruppe ließ sich

ERGEBNISSE

grafisch die Tendenz ableiten, dass in jeder Region eher mehr FGF-2-positive Zellen als im kontralateralen Meniskus sind (Abb. 29).

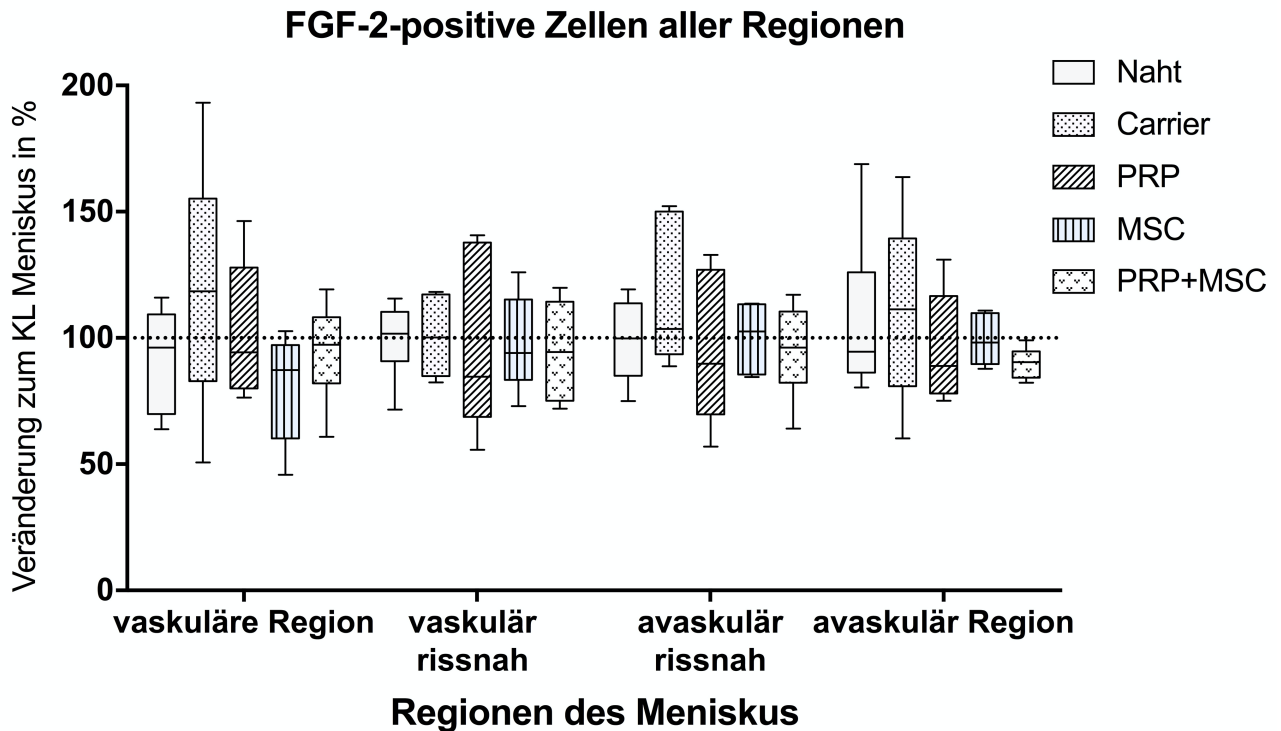


Abb. 29: Veränderung FGF-2-positiver Zellen in den einzelnen Regionen der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. Dargestellt sind pro Gruppe und Region die Mediane (horizontale Linie) mit IQR. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Um die FGF-2-positiven Zellen unmittelbar im Rissbereich zu analysieren, wurden die ROIs Rs1Va und Rs1Av zusammengefasst und die Mediane gebildet. Es zeigte sich in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied in der Anzahl FGF-2-positiver Zellen im Rissbereich verglichen mit den kontralateralen Menisken (Tab. 8) und ebenfalls nicht im Gruppenvergleich ($p > 0,99$). Grafisch zeigten sich rissnah tendenziell mehr FGF-2-positive Zellen in den operierten Menisken der Carrier- und MSC-Gruppe. In der PRP und PRP + MSC-Gruppe zeigten sich rissnah in den operierten Menisken eher weniger Zellen FGF-2-positiv als in den kontralateralen Menisken, jedoch nicht signifikant (Abb. 30).

ERGEBNISSE

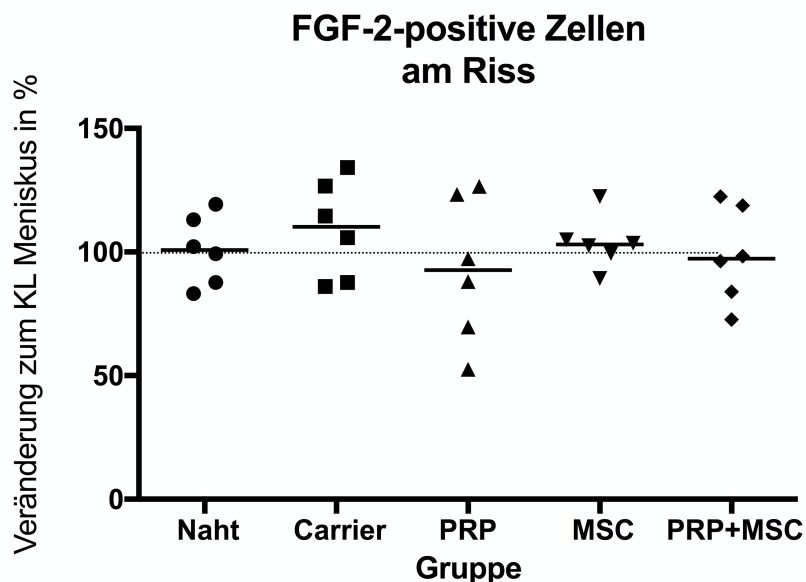


Abb. 30: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen am Riss (Rs1Va + Rs1Av) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 8: FGF-2-positive Zellen am Riss (Rs1Va + Rs1Av) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
Median in % (IQR)	101 (87 – 115)	110 (87 – 129)	93 (65 – 124)	103 (97 – 109)	97 (81 – 120)
Differenz in % OP vs. KL	+ 1	+ 10	- 7	+ 3	- 3
Signifikanz OP vs. KL	$p = 0,84$	$p = 0,31$	$p = 0,56$	$p = 0,44$	$p = 0,84$

Für die Analyse der FGF-2-positiven Zellen rissnah vaskulär wurden die ROIs Rs1Va und Rs2Va zusammengefasst und die Mediane gebildet. Es zeigte sich in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied der FGF-2-positiven Zellen rissnah vaskulär zwischen operierten und kontralateralen Menisken. In der PRP-, MSC- und PRP + MSC-Gruppe ließ sich grafisch eine verminderte Anzahl FGF-2-positiver Zellen ableiten (Abb. 31), jedoch nicht signifikant (Tab. 9). Zwischen den Gruppen zeigte sich rissnah vaskulär keine signifikant unterschiedliche Anzahl FGF-2-positiver Zellen ($p > 0,99$).

ERGEBNISSE

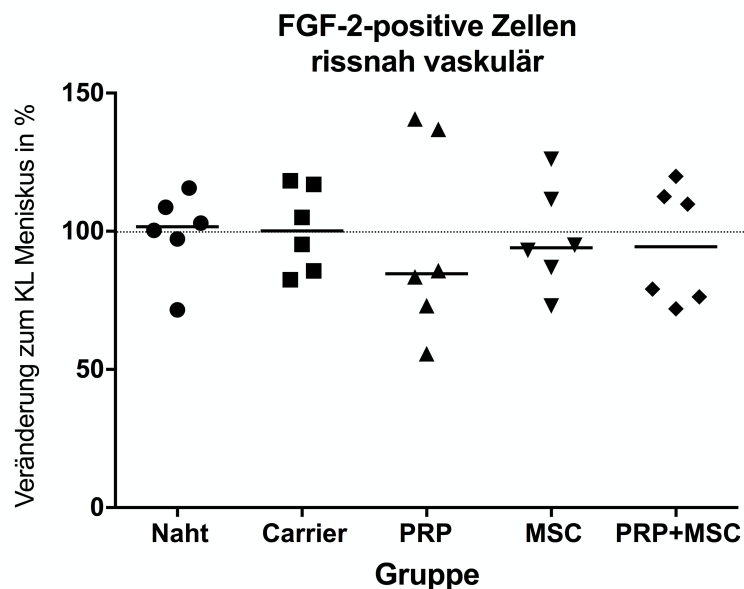


Abb. 31: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen rissnah vaskulär (Rs1Va + Rs2Va) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 9: FGF-2-positive Zellen rissnah vaskulär (Rs1Va + Rs2Va) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
Median in % (IQR)	102 (91 – 110)	100 (85 – 117)	85 (69 – 138)	94 (83 – 115)	94 (75 – 114)
Differenz in % OP vs. KL	+ 2	0	- 15	- 6	- 6
Signifikanz OP vs. KL	$p = 0,69$	$p = 0,84$	$p = 0,84$	$p = 0,69$	$p = 0,44$

Für die Analyse der FGF-2-positiven Zellen rissnah avaskulär wurden die ROIs Rs1Av und Rs1Av zusammengefasst und die Mediane gebildet. In keiner Gruppe konnte eine signifikante Veränderung der Anzahl FGF-2-positiver Zellen zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tab. 10) oder zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ($p > 0,99$). Grafisch waren in der PRP- und PRP + MSC-Gruppe eher weniger FGF-2-positiv Zellen als in den kontralateralen Menisken (Abb. 32). Die Carrier- und MSC-Gruppe wiesen grafisch eher mehr FGF-2-positiv Zellen auf (Abb. 32).

ERGEBNISSE

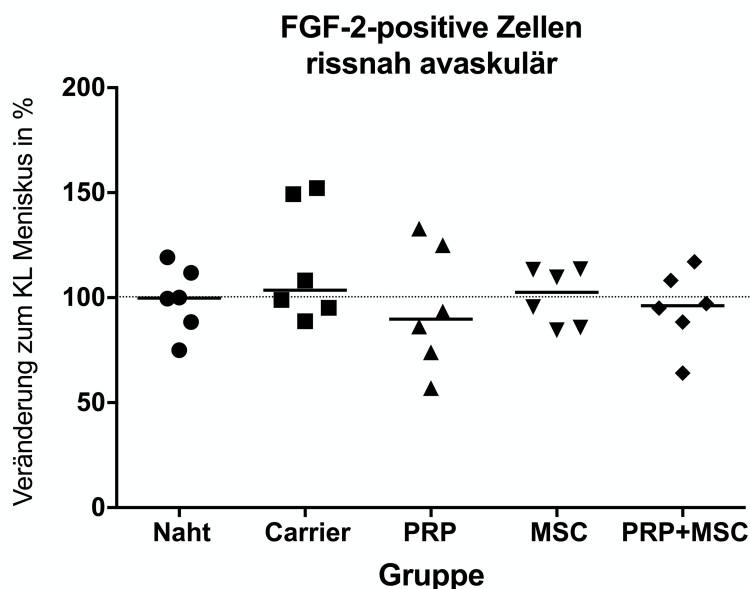


Abb. 32: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen rissnah avaskulär (Rs1Av + Rs1Av) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 10: FGF-2-positive Zellen rissnah avaskulär (Rs1Av + Rs1Av) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
Median in % (IQR)	100 (85 – 114)	104 (94 – 150)	90 (70 – 127)	103 (86 – 113)	96 (82 – 110)
Differenz in % OP vs. KL	0	+ 4	- 10	+ 3	- 4
Signifikanz OP vs. KL	$p > 0,99$	$p = 0,57$	$p = 0,69$	$p = 0,84$	$p = 0,69$

In der vaskulären Region (ROIs Va) zeigte sich die Anzahl FGF-2-positiver Zellen zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (Tab. 11) und zwischen den Gruppen nicht signifikant verändert ($p > 0,99$, Carrier-Gruppe vgl. MSC-Gruppe $p = 0,3650$). Grafisch ließ sich die Tendenz ableiten, dass in der Naht-, PRP-, MSC- und PRP + MSC-Gruppe eher weniger und in der Carrier-Gruppe hingegen mehr Zellen FGF-2-positiv waren als in den kontralateralen Menisken (Abb. 33).

ERGEBNISSE

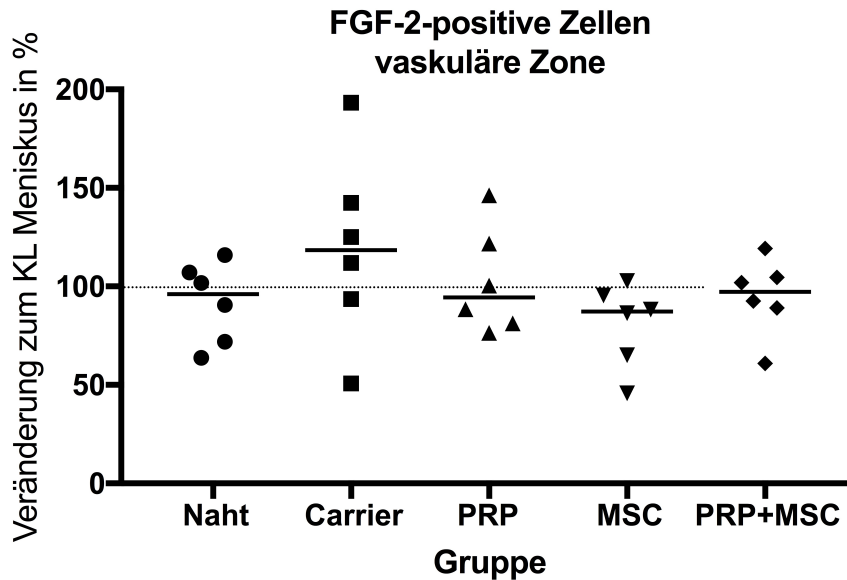


Abb. 33: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen vaskulär (Va) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 11: FGF-2-positiv Zellen vaskulär (Va) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
Median in % (IQR)	96 (70 – 109)	119 (83 – 155)	94 (80 – 128)	87 (60 – 97)	97 (82 – 108)
Differenz in % OP vs. KL	- 4	+ 19	- 6	- 13	- 3
Signifikanz OP vs. KL	$p = 0,56$	$p = 0,44$	$p > 0,99$	$p = 0,62$	$p = 0,69$

In der avaskulären Region (ROIs Av) der PRP + MSC-Gruppe zeigten sich signifikant weniger FGF-2-positiv Zellen im operierten Meniskus als im kontralateralen Meniskus ($p = 0,03$, Tab. 12). In der Naht-, PRP- und MSC-Gruppe zeigte sich grafisch, jedoch nicht signifikant, eine verminderte und in der Carrier-Gruppe eine erhöhte Anzahl FGF-2-positiv Zellen verglichen mit den kontralateralen Menisken (Abb. 34). Dabei zeigte sich in der PRP-Gruppe tendenziell die niedrigste Anzahl FGF-2-positiv Zellen. Zwischen den Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,99$).

ERGEBNISSE

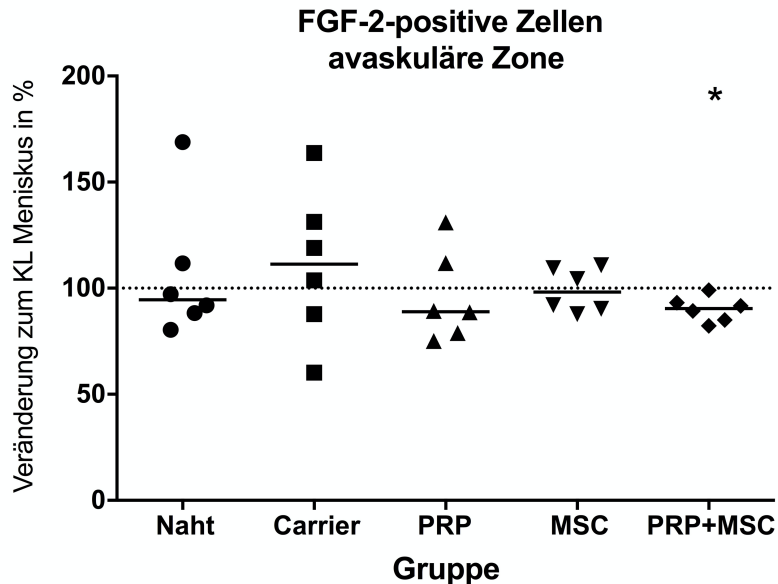


Abb. 34: Prozentuale Anzahl FGF-2-positiver Zellen avaskulär (Av) der operierten Menisken, normalisiert zu den kontralateralen Menisken. KL = kontralateraler Meniskus = 100 %, horizontal gepunktete Linie. * = $p < 0,05$ Signifikanz zu den kontralateralen Menisken bzw. operierten Menisken einer anderen Gruppe.

Tab. 12: FGF-2-positive Zellen avaskulär (Av) der operierten Menisken (OP) normalisiert zu den kontralateralen Menisken (KL)

Gruppe	Naht	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
Median in % (IQR)	95 (86 – 126)	111 (81 – 139)	89 (78 – 117)	98 (90 – 110)	91 (84 – 95)
Differenz in % OP vs. KL	- 5	+ 11	- 11	- 2	- 9
Signifikanz OP vs. KL	$p > 0,99$	$p = 0,56$	$p = 0,84$	$p = 0,84$	$p = 0,03^*$

5.6 Quantitative Bestimmung der relativen mRNA-Expression (RT-PCR)

Anhand der Ct-Werte der RT-PCR wurde die relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren, Zytokine und Kollagene in den operierten Menisken normalisiert zur mRNA von GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken ermittelt.

Die mRNA-Expression des Wachstumsfaktors **FGF-2** war in allen Gruppen hochsignifikant herunterreguliert, das Minimum fand sich in der PRP + MSC-Gruppe

ERGEBNISSE

(Abb. 35, Tab. 13). Zwischen den Gruppen zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied in der FGF-2-mRNA-Expression ($p > 0,99$).

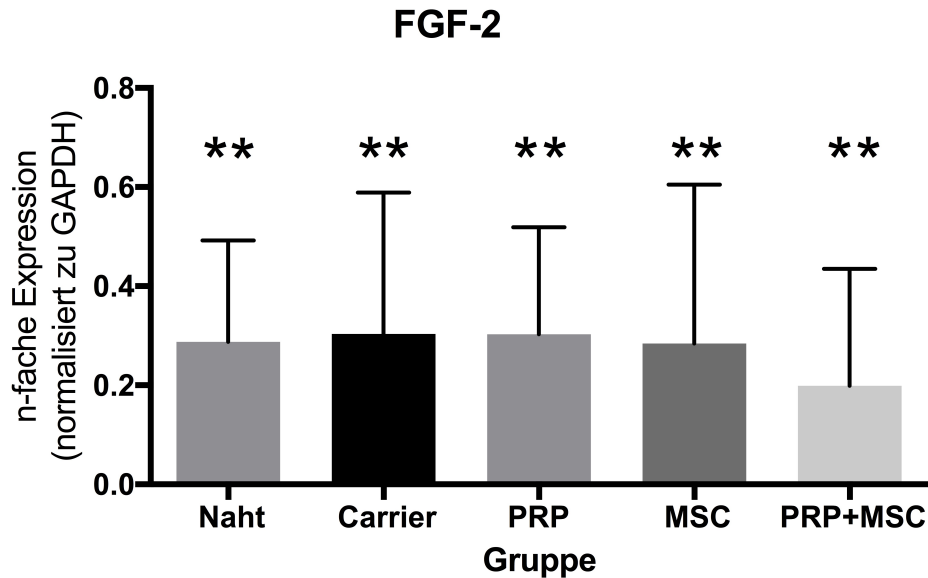


Abb. 35: Relative FGF-2-mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. ** = $p < 0,01$ hochsignifikant zu den kontralateralen Menisken.

Tab. 13: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der FGF-2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Angegeben ist die Signifikanz zu den kontralateralen Menisken: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. OP = operierte Menisken. KL = kontralaterale Menisken.

Gruppe	Naht-	Carrier	PRP	MSC	PRP + MSC
FGF-2 relative mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$ MW \pm STABW)	0,2 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3	0,2 \pm 0,2
Signifikanz OP vs. KL	0,002**	0,005**	0,002**	0,002**	0,002**

Die relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren **TGF- β 1**, **PDGF- β** , **VEGF-A**, **IGF-1** und **IGF-2** war zwischen den Gruppen nicht signifikant verändert ($p > 0,99$, Abb. 36).

Im Vergleich der mRNA-Expression dieser Wachstumsfaktoren zwischen den operierten und kontralateralen Menisken der jeweiligen Gruppe ergaben sich signifikante

ERGEBNISSE

Unterschiede (Abb. 36, Tab. 14): **TGF- β 1** war in den operierten Menisken der Carrier-Gruppe hochsignifikant herunterreguliert ($p = 0,005^{**}$) verglichen mit den kontralateralen Menisken. Grafisch ließ sich die Tendenz ableiten, dass TGF- β 1 in der MSC-Gruppe ($p = 0,05$) und in PRP + MSC-Gruppe ($p = 0,57$) ebenfalls vermindert exprimiert wurde (Abb. 36). In der Naht- und PRP-Gruppe lag das Expressionslevel über dem der kontralateralen Menisken, jedoch nicht signifikant ($p = 0,57$ und $p > 0,99$). **PDGF- β** zeigte sich in der MSC- und PRP-Gruppe hochsignifikant herunterreguliert ($p = 0,002^{**}$), während es grafisch in allen anderen Gruppen tendenziell leicht hochreguliert war (Abb. 36), mit Maximum in der Nahtgruppe ($p = 0,57$), gefolgt von der Carrier-Gruppe ($p = 0,08$) und PRP + MSC-Gruppe ($p = 0,05$). **VEGF-A** zeigte keine signifikant veränderte relative mRNA-Expression in den operierten Menisken aller Gruppen verglichen mit den kontralateralen Menisken. Grafisch war die relative mRNA-Expression von VEGF-A in der Naht-, Carrier- und PRP-Gruppe ($p > 0,99$; $p = 0,08$; $p = 0,36$; Abb. 36) eher erhöht und in der MSC- und PRP + MSC-Gruppe eher vermindert ($p = 0,05$; $p = 0,08$; Abb. 36). Die relative mRNA-Expression von **IGF-1** war in keiner Gruppe signifikant verändert, jedoch grafisch analysiert in allen Gruppen erhöht exprimiert (Abb. 36). Eine stark hochregulierte relative IGF-1-mRNA-Expression ließ sich dabei in den operierten Menisken der PRP- und PRP + MSC-Gruppe erkennen ($p = 0,05$; $p = 0,08$) sowie eine eher leicht erhöhte relative mRNA-Expression in der Naht-, Carrier- und MSC-Gruppe ($p = 0,08$; $p = 0,36$; $p = 0,036$) verglichen mit den kontralateralen Menisken. Der Wachstumsfaktor **IGF-2** war ebenfalls in allen außer in der MSC-Gruppe tendenziell leicht vermehrt exprimiert, verglichen mit den kontralateralen Menisken, jedoch nicht signifikant (Abb. 36). Das niedrigste relative IGF-2-mRNA-Expressionslevel ließ sich grafisch in der MSC-Gruppe ($p = 0,05$) ableiten, gefolgt von der PRP + MSC-Gruppe ($p = 0,57$), der PRP-Gruppe ($p > 0,99$), Carrier-Gruppe ($p = 0,57$) und Naht-Gruppe ($p = 0,08$).

ERGEBNISSE

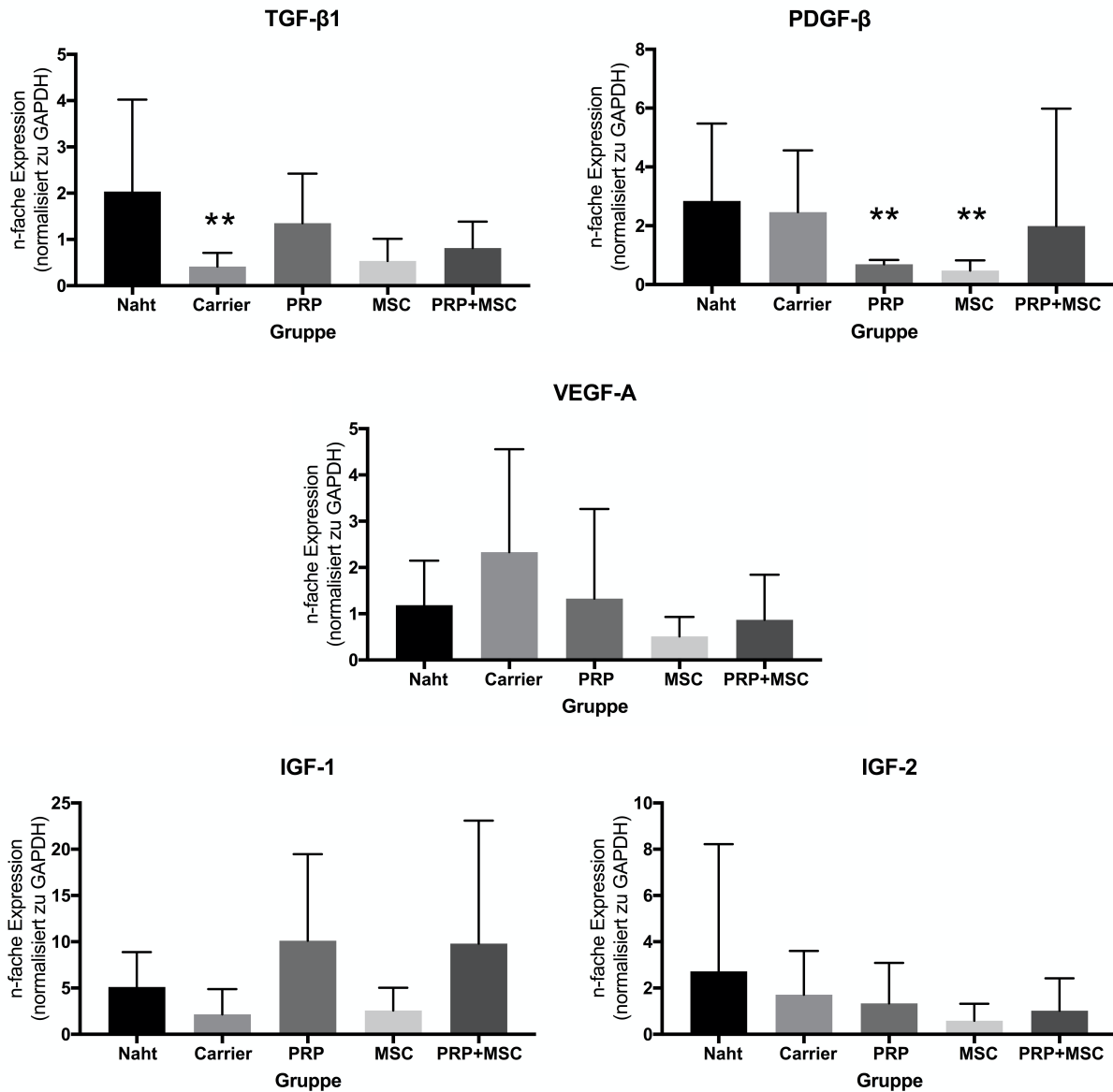


Abb. 36: Relative mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. ** = $p < 0,01$ hochsignifikant zu den kontralateralen Menisken.

Tab. 14: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Wachstumsfaktoren normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Angegeben ist die Signifikanz zu den kontralateralen Menisken: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Wachstumsfaktor relative mRNA- Expression	TGF-β1	PDGF-β	VEGF-A	IGF-1	IGF-2

ERGEBNISSE

($\Delta\Delta\text{CT MW} \pm \text{STABW}$)					
Naht-Gruppe	2,0 \pm 2,0 p = 0,057	2,8 \pm 2,6 p = 0,57	1,2 \pm 1,0 p > 0,99	5,1 \pm 3,8 p = 0,08	2,7 \pm 5,5 p = 0,08
Carrier-Gruppe	0,4 \pm 0,3 p = 0,005**	2,5 \pm 2,1 p = 0,08	2,3 \pm 2,2 p = 0,08	2,2 \pm 2,7 p = 0,36	1,7 \pm 1,9 p = 0,57
PRP-Gruppe	1,4 \pm 1,1 p > 0,99	0,7 \pm 0,2 p = 0,002**	1,3 \pm 1,9 p = 0,3636	10,1 \pm 9,3 p = 0,05	1,3 \pm 1,8 p > 0,99
MSC-Gruppe	0,5 \pm 0,5 p = 0,05	0,5 \pm 0,4 p = 0,002**	0,5 \pm 0,4 p = 0,05	2,6 \pm 2,5 p = 0,36	0,6 \pm 0,7 p = 0,05
PRP + MSC-Gruppe	0,8 \pm 5,6 p = 0,57	2,0 \pm 4,0 p = 0,05	0,9 \pm 1,0 p = 0,08	9,8 \pm 13,3 p = 0,08	1,0 \pm 1,4 p = 0,57

Betrachtet man die Zytokine TNF- α und IL-1 α , so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Expression zwischen den Gruppen ($p \geq 0,99$; Abb. 37). TNF- α zeigte sich in den operierten Menisken der Naht-, PRP- und MSC-Gruppe hochsignifikant herunterreguliert verglichen mit den kontralateralen Menisken ($p = 0,002^{**}$; $p = 0,005^{**}$; $p = 0,002^{**}$; Tab. 15). Grafisch betrachtet war TNF- α in der Carrier- und PRP + MSC-Gruppe eher hochreguliert ($p = 0,057$; $p = 0,05$; Abb. 37). Die relative mRNA-Expression von IL-1 α war in keiner Gruppe zwischen den operierten und kontralateralen Menisken signifikant verändert. IL-1 α zeigte sich grafisch in der Naht-, Carrier- und PRP-Gruppe und maximal in der PRP + MSC-Gruppe hochreguliert ($p = 0,20$; $p = 0,08$; $p > 0,99$; $p = 0,36$; Abb. 37). In der MSC-Gruppe war das relative IL-1 α -mRNA-Expressionslevel grafisch eher vermindert ($p = 0,05$; Abb. 37).

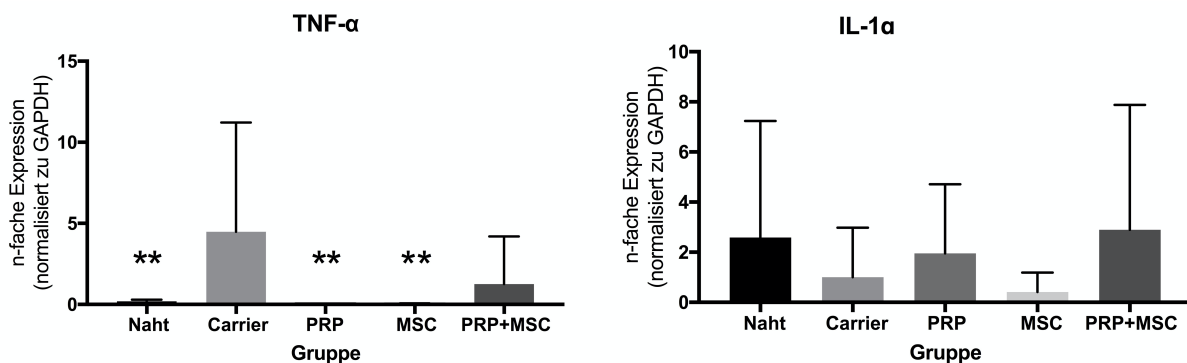


Abb. 37: Relative mRNA-Expression der Zytokine ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. ** = $p < 0,01$ hochsignifikant zu den kontralateralen Menisken.

ERGEBNISSE

Tab. 15: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Zytokine normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Angegeben ist die Signifikanz zu den kontralateralen Menisken: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Zytokin relative mRNA- Expression ($\Delta\Delta\text{CT MW} \pm \text{STABW}$)	TNF- α	IL-1 α
Naht-Gruppe	0,2 \pm 0,1; $p = 0,0022^{**}$	2,6 \pm 4,7; $p = 0,20$
Carrier-Gruppe	4,5 \pm 6,7; $p = 0,57$	1,0 \pm 2,0; $p = 0,08$
PRP-Gruppe	0,03 \pm 0,02; $p = 0,005^{**}$	2,0 \pm 2,8; $p > 0,99$
MSC-Gruppe	0,04 \pm 0,03; $p = 0,0022^{**}$	0,4 \pm 0,8; $p = 0,05$
PRP + MSC-Gruppe	1,5 \pm 3,2; $p = 0,48$	3,0 \pm 5,0; $p = 0,36$

Die relative mRNA-Expression von **Col1A1** war in der PRP-Gruppe hochsignifikant hochreguliert ($p = 0,002^{**}$, Tab. 16). In der Naht-, MSC- und PRP + MSC-Gruppe zeigte sich Col1A1 tendenziell hochreguliert, jedoch nicht signifikant ($p = 0,36$; $p = 0,05$; $p = 0,36$; Abb. 38). Die Carrier-Gruppe präsentierte grafisch eine starke Hochregulation von Col1A1, wdie zwar nicht zum kontralateralen Meniskus signifikant war ($p = 0,36$; Abb. 38), jedoch hochsignifikant zu allen anderen Gruppen ($p < 0,0001^{**}$; Abb. 38). Die relative mRNA-Expression des Kollagens **Col1A2** war in den operierten Menisken der PRP-Gruppe hochsignifikant maximal erhöht ($p = 0,002^{**}$) und in der MSC-Gruppe ebenfalls hochsignifikant erhöht ($p = 0,002^{**}$) verglichen mit den kontralateralen Menisken (Tab. 16, Abb. 38). Grafisch, jedoch nicht signifikant, zeigte sich Col1A2 ebenfalls tendenziell in der Naht- und PRP + MSC-Gruppe ($p = 0,36$; $p = 0,05$; Abb. 38). und leicht in der Carrier-Gruppe ($p = 0,36$; Abb. 38) hochreguliert. Zwischen den Gruppen war die relative Col1A2-mRNA-Expression nicht signifikant verändert ($p \geq 0,40$; Abb. 38). Die relative mRNA-Expression von **Col2A1** zeigte in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung zwischen operierten und kontralateralen Menisken (Tab. 16; Abb. 38). Grafisch war Col2A1 in der Naht- und Carrier-Gruppe leicht vermindert ($p = 0,36$; $p = 0,48$) und in der PRP-, MSC- und PRP + MSC-Gruppe leicht erhöht exprimiert ($p > 0,99$; $p = 0,36$; $p = 0,57$). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Col2A1-mRNA-Expression ($p > 0,99$, Abb. 38).

ERGEBNISSE

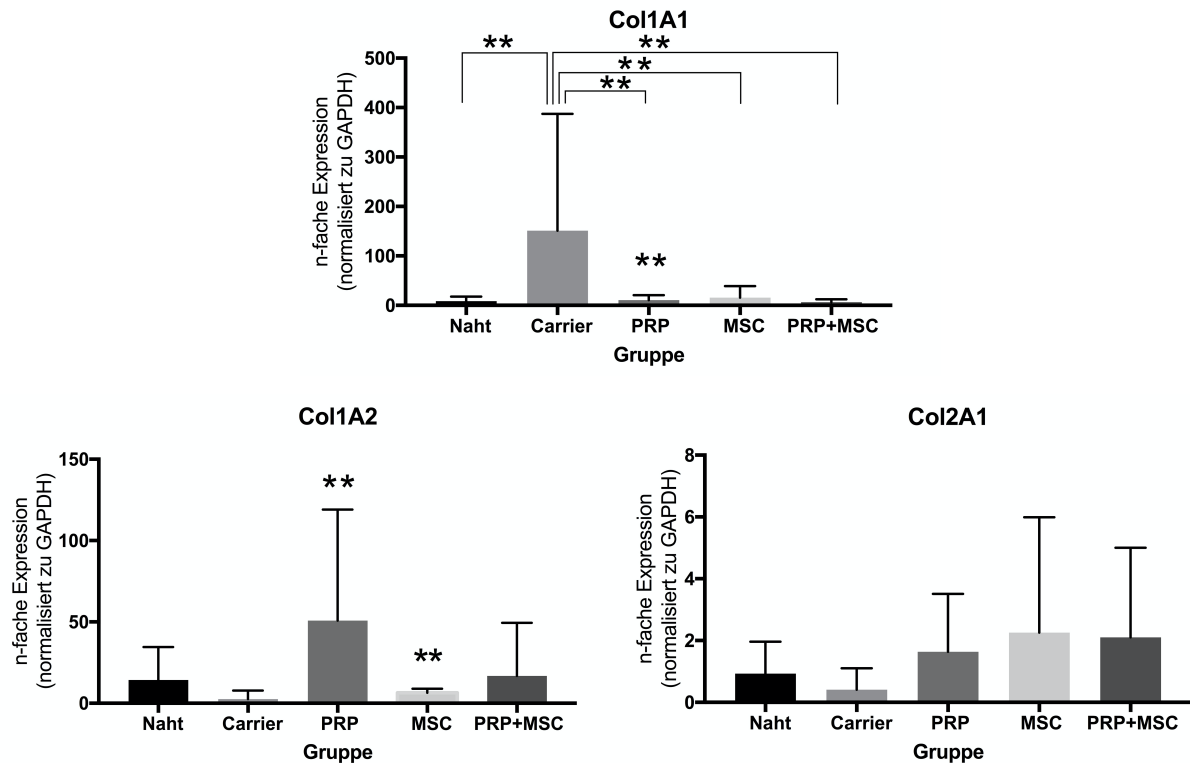


Abb. 38: Relative mRNA-Expression der Kollagene ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Dargestellt ist die Signifikanz * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ zu den kontralateralen Menisken oder zwischen den Gruppen (eckige Klammern).

Tab. 16: Mittelwerte \pm Standardabweichungen (MW \pm STABW) der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Kollagene normalisiert zu GAPDH und den gepoolten kontralateralen Menisken. Angegeben ist die Signifikanz zu den kontralateralen Menisken: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Kollagen relative mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$ MW \pm STABW)	Col1A1	Col1A2	Col2A1
Naht-Gruppe	8,6 \pm 9,2 p = 0,36	14,3 \pm 20,2 p = 0,36	0,9 \pm 1,0 p = 0,36
Carrier-Gruppe	150,9 \pm 236,4 p = 0,36	2,6 \pm 5,2 p = 0,36	0,4 \pm 0,7 p = 0,48
PRP-Gruppe	10,7 \pm 9,8 p = 0,002**	50,8 \pm 68,2 p = 0,002**	1,6 \pm 1,9 p > 0,99
MSC-Gruppe	15,5 \pm 23,6 p = 0,05	6,4 \pm 2,6 p = 0,002**	2,3 \pm 3,7 p = 0,36
PRP + MSC-Gruppe	6,3 \pm 5,8 p = 0,36	16,8 \pm 32,7 p = 0,05	2,1 \pm 2,9 p = 0,57

6. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie führte die lokale Applikation von PRP in Kombination mit MSC in Meniskusrisse der avaskulären Zone entgegen der Hypothese zu keiner makroskopischen Heilung. Somit ist die kombinierte Applikation von PRP und MSC der Meniskusnaht allein oder der isolierten Zugabe von PRP und MSC nicht überlegen. Der Effekt der kombinierten Applikation von PRP und MSC wurde unseres Wissens nach bis dato nicht *in vivo* am Meniskus untersucht. Dass die kombinierte Applikation von PRP und MSC heilungsfördernde Effekte hat, konnte jedoch bereits *in vivo* am Knochen- und Knorpelgewebe nachgewiesen werden (72, 121, 122). Am Schafmodell verbesserte die Applikation von PRP und MSC im Kollagencarrier die Knochenheilung, Vaskularisation und Integration des Allotransplantats im Knochen verglichen mit der alleinigen Implantation des Allotransplantats (121). Die Injektion von PRP und MSC in Knochendefekte von Hunden steigerte die Bildung und histologische Qualität des Knochengewebes verglichen mit der alleinigen PRP-Injektion (122). Im Mausmodell konnte die Knorpelheilung nach Injektion von adipogenen MSC verstärkt werden, wenn diese in PRP vorkultiviert wurden (72). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Injektion von PRP und Muskel-Stammzellen die Knorpelheilung von Ratten stärker stimuliert als die alleinigen PRP-Injektion (123). Das Defektgewebe war jedoch nach vier und zwölf Wochen histologisch nicht signifikant besser als nach alleiniger Injektion von Stammzellen (123). Diese Studie verdeutlicht das heilungsfördernde Potenzial der MSC.

Trotz noch mangelnder *In-vivo*-Studien und laufender Grundlagenforschung wurden MSC bereits in humanen Fallstudien bei degenerativen Kniegelenksveränderungen intraartikulär injiziert und lieferten teils vielversprechende Ergebnisse wie eine Schmerzverbesserung und Zunahme des Meniskusvolumens (124, 125). Aufsehen erregte ein, vor Kurzem von der FDA (Food and Drug Administration) veröffentlichter Bericht, laut dem zwölf Patienten nach für die Indikation nicht zugelassener intraartikulärer Stammzellinjektion eine bakterielle Infektion erlitten und hospitalisiert waren (126). Dabei sollte aber unbedingt berücksichtigt werden, dass unzureichend eingehaltene Hygienemaßnahmen ursächlich für diese Infektionen sein können. In den U.S.A. wurden Stammzellen bereits klinisch zur Therapie verschiedener Krankheitsbilder angewandt (127). Jedoch kam es in den letzten Jahren dabei zu

DISKUSSION

schweren Komplikationen, wobei unter anderem vier Patienten nach intraokulärer Injektion erblindeten (127). Um einen weiteren Missbrauch von Stammzellen zu vermeiden, erließ die FDA kürzlich eine einstweilige Verfügung, welche die Anwendung von Stammzellen regulieren soll (127). Die zahlreichen Komplikationen verdeutlichen, dass die klinische Anwendung von MSC potenziell schwere Folgen haben kann. Umso notwendiger sind eine ausreichende Studienlage und Erfahrung im Umgang mit den MSC, bevor diese zur Therapie im klinischen Alltag etabliert werden.

In mehreren *In-vivo*-Studien konnten MSC bereits die Meniskusheilung durch Bildung von meniskusähnlichem Defektgewebe verbessern (63, 128). Knochenmarksstammzellen verbesserten die Heilung longitudinaler Meniskusrisse der rot-weißen Zone beim Hund (129). So heilten nach zwölf Wochen sechs von acht Meniskusrissen komplett aus, während ohne Stammzellzugabe nur drei von sechs Rissen ausheilten (129). Beim Schwein heilten durch Applikation von MSC mit Fibrinkleber und anschließender Naht 75 % der Meniskusrisse makroskopisch nach acht Wochen vollständig aus – jedoch mit einer schlechten biomechanischen Stabilität (63). In der Kontrollgruppe heilten durch Fibrinkleber und Naht allein ca. 36 % der Meniskusrisse inkomplett, jedoch keiner vollständig aus (63). Nach *Pars-Intermedia*-Resektion des Kaninchenmeniskus heilten acht von elf Menisken durch Implantation chondrogen vorkultivierter MSC im Hyaluron-Kollagencarrier und anschließender Naht aus (128). Dagegen heilten nur zwei von elf Defekten nach alleiniger Carrier-Implantation und Naht nach zwölf Wochen (128). Auch im Schafmodell heilten nach Implantation undifferenzierter autologer MSC im Kollagencarrier und anschließender Naht 60 % der Meniskusrisse der avaskulären Zone (130). Dagegen heilte durch alleinige Naht und Naht mit Carrier-Implantation keiner der Risse nach 13 Wochen (130). Interessanterweise zeigte auch nach Implantation von MSC im Kollagencarrier keiner der Risse eine Heilung nach 24 Wochen (130). Möglicherweise war das Defektgewebe zu labil, um über längere Zeit zu bestehen. Im klinischen Teil der Studie wurde bei fünf Patienten mit Rissen (drei Korbhenkelrisse, ein Korbhenkelriss mit Radiärriss und ein vertikaler Lappenriss) der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* ebenfalls MSC im Kollagencarrier implantiert (130). Nach zwölf Monaten kam es zur klinischen Besserung bei drei Patienten (130). In

DISKUSSION

zwei Fällen versagte die Therapie jedoch nach 15 Monaten aufgrund erneuter Beschwerden, woraufhin eine partielle Meniskusresektion durchgeführt wurde (130). In einer weiteren klinischen Studie wurden Meniskusrisse verschiedener Morphologie und Lokalisation zunächst genäht, dann der Meniskus mit einer implantierten Kollagen-Hülle umwickelt und im Anschluss lokal Knochenmarksaspirat der Tibiaepiphyse injiziert (131). 86 % der Patienten zeigten eine klinisch signifikante Verbesserung der Alltagsaktivität und Beschwerden nach 2-Jahres Follow-up (131, 132). Zu bedenken sind die teils schweren postoperativen Komplikationen in dieser Studie: Ein Patient erlitt ein Kompartment-Syndrom und ein Patient eine Kniegelenksfibrose (131). Bei zwei weiteren Patienten versagte die Therapie und es erfolgte eine partielle Meniskusresektion (131, 132). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass das Knochenmarksaspirat direkt appliziert wurde, sodass die Quantität und Qualität der potenziell enthaltenen Stammzellen nicht bekannt waren.

In der vorliegenden Studie konnte die isolierte Applikation autologer MSC die Meniskusheilung nicht verbessern. Es wurden undifferenzierte MSC verwendet, sodass nicht beurteilt werden kann, ob beispielsweise chondrogen vordifferenzierte MSC die Meniskusheilung verbessert hätten. Interessanterweise stellte man aber in einer *In-vitro*-Studie fest, dass undifferenzierte MSC im Kollagencarrier eine bessere Integration in avaskuläres Meniskusgewebe aufwiesen als chondrogen vordifferenzierte MSC (133). Andererseits konnte zuvor an chronischen Knorpelstanzdefekten oviner Femurkondylen und an avaskulären Rissen des Kaninchenmeniskus gezeigt werden, dass chondrogen differenzierte MSC im Hydrogel- bzw. Hyaluron-Carrier den undifferenzierten MSC bezüglich der Qualität des gebildeten Defektgewebes überlegen waren (59, 134). Zwar kam es im Schafmodell sowohl durch undifferenzierte als auch durch chondrogen differenzierte MSC zu einer Defektdeckung nach sechs Monaten, jedoch war nur das Defektgewebe der Gruppe mit chondrogen differenzierten MSC einem hyalinen Knorpel ähnlich (59). Im Kaninchenmeniskus heilten longitudinale Risse der avaskulären Zone unbehandelt, nur genäht und nach zusätzlicher Implantation eines Hyaluron-Kollagencarriers nicht aus (134). Die Zugabe von PRP führte nach zwölf Wochen ebenfalls zu keiner Heilung, nur zur Bildung vereinzelter Fasern zwischen den

DISKUSSION

Rissrändern (134). Dagegen kam es nach Implantation undifferenzierter MSC zur Bildung von faserknorpelartigem Defektgewebe mit meniskusähnlichen Zellen (134). Eine fast vollständige Heilung mit meniskusähnlichem Gewebe wurde interessanterweise durch Implantation chondrogen vorkultivierter MSC erreicht (134). Diese Studien lassen annehmen, dass chondrogen vorkultivierte MSC den undifferenzierten MSC in der Meniskusheilung überlegen sein könnten. Weiterhin förderten chondrogen vorkultivierte MSC im Kollagencarrier die Heilung zirkulärer Defekte der avaskulären Zone des Kaninchenmeniskus *in vivo* durch Bildung von meniskusähnlichem Füllgewebe (47). PRP im Kollagencarrier dagegen verbesserte die Heilung avaskulärer Stanzdefekte in der gleichen Studie nicht (47). Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere Kaninchenstudie, dass nicht-vorkultivierte MSC im Hyaluroncarrier den chondrogen-vorkultivierten MSC in der Heilung avaskulärer Stanzdefekte der Pars intermedia des Meniskus deutlich überlegen sind (135). Es kam zur vollständigen Defektfüllung mit histologisch meniskusähnlichem Reparaturgewebe (135). Interessanterweise verbesserte PRP im Hyaluroncarrier auch in dieser Studie die Meniskusheilung nicht (135).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass MSC eine stärkere heilungsfördernde Wirkung als PRP haben. Interessant zu wissen wäre, welchen Einfluss die kombinierte Applikation von PRP und MSC in diesen Studien auf die Heilung gehabt hätte. In der vorliegenden Studie wurde dies untersucht. Dabei wurde vermutet, dass die kombinierte Applikation von PRP und MSC in einem Kollagencarrier die Meniskusheilung verbessert. Leitend war dabei die Idee, dass durch diese Blutbestandteile Wachstumsfaktoren freigesetzt, Zellen in der Umgebung stimuliert und die Zellproliferation und EZM-Bildung des Meniskus angeregt werden könnten. Es wurde vermutet, dass die Kombination beider Komponenten zu einer Verstärkung dieser Effekte führen könnte. So konnte mikroskopisch im Rissbereich der PRP + MSC-Gruppe dieser Studie eine signifikant höhere Zellzahl nachgewiesen werden als im Rissbereich der operierten Menisken der Naht-Gruppe. Dies lässt eine gesteigerte Zellproliferation oder -migration im Rissbereich vermuten. Es wurde bereits *in vitro* eine Zunahme der Zellproliferation oviner Fibrochondrozyten des Meniskus nach Zugabe der Wachstumsfaktoren FGF-2, PDGF- β , TGF- β 1 und IGF-1 gesehen (100). Da diese Wachstumsfaktoren in erhöhten

DISKUSSION

Konzentrationen im PRP erhalten sind, sollte die Zugabe dessen die Zellproliferation demnach fördern (36, 39-46). Bereits gezeigt werden konnte, dass PRP die Zellproliferation *in vitro* stimuliert, durch Vorbehandlung eines Carriers mit 1 – 1,3 Mio. Thrombozyten / μl und erst anschließender Besiedlung mit humanen Chondrozyten (136). Diese Carrier wiesen eine höhere Anzahl an Chondrozyten auf als nicht mit PRP vorbehandelte (136). In der gleichen *In-vivo*-Studie wurden Mäusen humane Meniskusfragmente der avaskulären Zone subkutan implantiert und zwischen diesen gestanzten Fragmenten ein Carrier mit besiedelten Chondrozyten platziert (136). Die Vorbehandlung des Carriers mit PRP verbesserte die Meniskusheilung, sodass von 16 implantierten Meniskusfragmenten sechs vollständig heilten, neun partiell und eins nicht (136). Dagegen heilten in der Gruppe ohne Vorbehandlung mit PRP nur vier Menisken inkomplett und zwölf nicht zusammen (136).

Kontrovers diskutiert wird, welche Thrombozytenkonzentration des PRP optimal für die Förderung der Gewebeheilung geeignet ist. In zahlreichen Studien wurden unterschiedliche Konzentrationen untersucht. Es wurde ein „therapeutischer“ Bereich von 1.000.000 Thrombozyten / μl im PRP definiert (38). Die Applikation der „therapeutischen“ Konzentration verbesserte die Heilung von Stanzdefekten der avaskulären Zone des Meniskus von Kaninchen nach zwölf Wochen (42). Dagegen hatte die Implantation von „therapeutischem“ PRP mit einem Kollagencarrier auf die Heilung oviner Knorpeldefekte keinen Einfluss (115). Am Schafmodell heilten sogar osteochondrale Defekte der Femurkondylen durch Kollagen-Hydroxylapatit-Carrier allein signifikant besser als durch die zusätzliche Zugabe von PRP (39). Eine signifikant verbesserte Knorpeldefektdeckung beim Schaf konnte nach Injektion von PRP mit doppelter Thrombozytenkonzentration im Vergleich zum Vollblut festgestellt werden (50). Womöglich ist die optimale „therapeutische“ Konzentration je nach Gewebeart unterschiedlich. In dieser Studie wurde eine mediane Thrombozytenkonzentration von 910.000 Thrombozyten / μl erzielt, was einer 2,7-fachen Konzentration des Vollblutes entspricht. Zu berücksichtigen ist auch, dass die Konzentration der Thrombozyten im Blut intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegt (137). In der vorliegenden Studie wurden Thrombozytenwerte im Vollblut von 180.000 – 770.000 Thrombozyten / μl gemessen.

DISKUSSION

Neben der Konzentration der Thrombozyten variiert auch die Leukozytenanzahl im PRP je nach Herstellungsmethode. Es wurde festgestellt, dass leukozytenarmes und -reiches PRP ähnliche Konzentrationen von Wachstumsfaktoren enthalten, jedoch im leukozytenreichen PRP signifikant mehr proinflammatorische Zytokine wie z. B. TNF- α und IL-1 β vorhanden sind (37). *In vivo* konnte leukozytenreiches PRP die Heilung horizontaler Meniskusrisse von Kaninchen nicht verbessern (138). Fraglich bleibt allerdings, ob leukozytenarmes PRP die Heilung verbessert hätte. Intraartikulär injiziertes leukozytenarmes PRP nach Kreuzbandverletzung im Kaninchenmodell wirkte chondroprotektiver als leukozytenreiches PRP (37). Um mögliche katabole Effekte der Leukozyten auf die Thrombozyten, die MSC und auf die potenziell sezernierten Wachstumsfaktoren zu reduzieren, wurde in dieser Studie leukozytenarmes PRP verwendet. Möglicherweise haben jedoch neben den Leukozyten auch andere Bestandteile des PRP eine katabole Wirkung. Es wurden negative Effekte durch das PRP auf die EZM-Bildung nachgewiesen (49). *In vitro* wurde beispielsweise nach Kultivierung von Meniskuszellen mit PRP eine verminderte Bildung von Col2 und Aggrecan durch Aktivierung von MMP beobachtet (49). *In vivo* zeigte sich sogar eine gesteigerte Proteoglykanolyse nach PRP-Applikation mit Fibrinkleber in zirkuläre Defekte der avaskulären Zone des Kaninchenmeniskus (49). Durch eine gesteigerte Col1-Synthese kam es zwar zur Bildung von Narbengewebe, dieses war dem Meniskusgewebe jedoch histologisch nicht ähnlich (49).

Die erwünschte anabole Wirkung des PRP wird vor allem durch die Wirkung der sezernierten Wachstumsfaktoren vermutet (36, 39-43). In der Vergangenheit wiesen bereits zahlreiche Studien erhöhte Wachstumsfaktorkonzentrationen im PRP nach, sodass in der aktuellen Studie keine erneute Quantifizierung der Wachstumsfaktoren erfolgte (36, 39-43). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die Konzentration der Wachstumsfaktoren im PRP interindividuell und zeitlich intraindividuell variiert (40, 43, 137). Auch die Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren ist für die Wirkung im Gewebe relevant. Es wurde nachgewiesen, dass die Wachstumsfaktoren des PRP bereits innerhalb von Minuten während der Gerinnung der Thrombozyten ausgeschüttet werden (38). Daher sollte das PRP unmittelbar nach der Herstellung appliziert werden,

DISKUSSION

um die Wirkung der Wachstumsfaktoren im Gewebe sicherzustellen. Aus diesem Grund wurde das PRP in dieser Studie innerhalb weniger Minuten in den Riss gegeben und zeitgleich die mikroskopische Auszählung der Thrombozyten begonnen. Dennoch wurden bereits nach wenigen Minuten vereinzelt Agglutinate detektiert, die sich im Gegensatz zu automatischen Zählmethoden mikroskopisch manuell gut auszählen ließen. Auf eine exogene Aktivierung des PRP wurde in dieser Studie verzichtet, da das PRP auch endogen durch Col1 aktiviert werden kann (33). Durch die direkte Zugabe des PRP in den Meniskusriss kommt es sowohl mit dem platzierten Kollagencarrier als auch mit Col1 des Meniskugewebes in Kontakt, sodass eine Aktivierung erfolgen kann (5).

In der vorliegenden Studie führte die alleinige und mit MSC kombinierte Zugabe von PRP zu keiner verbesserten Meniskusheilung longitudinaler Risse der avaskulären Zone. Auch am Kaninchen konnte die Applikation von PRP mit einem Hyaluron-Kollagencarrier die Heilung von Meniskusstanzdefekten und nahtversorgten longitudinalen Meniskusrissen der avaskulären Zone nicht verbessern (47). Nach drei Monaten waren die Stanzdefekte und Risse sowohl in der PRP mit Carrier als auch in der Kontrollgruppe nur mit Carrier partiell mit faserigem Narbengewebe gefüllt (47).

Nicht nur MSC, sondern auch PRP wurden bereits am Menschen klinisch angewandt. Aufgrund vielversprechender experimenteller Ergebnisse zur PRP-Wirkung wurde dies sogar zur Therapie von Meniskusrissen eingesetzt. In einer Fall-Kontroll-Studie an 17 Patienten wurde das PRP vor der Nahtversorgung in horizontale, bis zur avaskulären Zone reichende Meniskusrisse appliziert (139). Nach 24 Monaten zeigte sich eine klinische Verbesserung des Schmerzes und der sportlichen Aktivität im Vergleich zur Therapie durch eine alleinige Naht (139). Bei einem Patienten musste jedoch im Verlauf eine partielle Meniskusresektion vorgenommen werden und es kam zu einer weiteren schweren Komplikation: Ein Patient entwickelte eine septische Arthritis, woraufhin eine Re-Arthroskopie mit Lavage und Langzeit-Antibiotikatherapie erfolgen musste (139). Bevor es zur breiten klinischen Anwendung vom PRP kommt, sollte dies zunächst ausreichend am Tiermodell getestet werden, um Kenntnisse über die Wirkung und mögliche Risiken zu erhalten.

DISKUSSION

In dieser Studie wurde ein Riss in der avaskulären Zone des Meniskus gesetzt – und damit in der Zone mit dem schlechtesten Heilungspotenzial (9). Wie entscheidend die Lokalisation des Meniskusrisses das Heilungspotenzial beeinflusst, veranschaulicht eine Studie am Kaninchenmeniskus, in der nach zehn Wochen 90 % der longitudinalen Meniskusrisse in der vaskulären Zone heilten, jedoch kein Riss in der avaskulären Zone (105). Eine weitere Kaninchenstudie bestätigt diese Ergebnisse, dort zeigte kein nahtversorgter longitudinaler Meniskusriss der avaskulären Zone Heilungstendenzen, weder nach 28 noch nach 84 Tagen (140). Ebenfalls am Kaninchenmeniskus heilten trotz Zugabe von PRP oder FGF-2 nur 25 bis 50 % der peripheren Anteile von horizontalen Meniskusrissen, jedoch nicht die avaskulären Anteile des Risses (138, 141). Berücksichtigt werden sollte jedoch, dass Horizontalrisse meist degenerativer Ursache sind, im Gegensatz zu den meist traumatischen Longitudinalrissen (5, 17). Diese Studien verdeutlichen, dass die Heilung avaskulärer Meniskusrisse stark limitiert ist.

Die Verbesserung der Durchblutung stellt demnach einen essenziellen Therapieansatz in der Meniskusheilung dar. Bei Hunden wurde, von einem longitudinalen Meniskusriss der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* ausgehend, zusätzlich ein transmuraler Radiärriss nach peripher gesetzt (31). Nach zehn Wochen zeigte sich in diesen Rissen fibröses Narbengewebe, das jedoch unorganisierte Kollagenfasern enthielt (31). In den longitudinalen Meniskusrissen ohne zusätzlichen Radiärriss bildete sich kein Narbengewebe aus (31). Beachtet werden sollte jedoch, dass ein zusätzlicher Radiärriss aufgrund der Durchtrennung von longitudinalen Kollagenfasern wahrscheinlich mit einer Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften einhergeht. Ähnliche Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie am Hund demonstriert werden (142). Dort wurde nach Vorbohrung ein Rohr aus resorbierbarem Material von peripher bis in einen longitudinalen Meniskusriss der avaskulären Zone gesetzt und der Riss anschließend genäht (142). Nach zwölf und 24 Wochen heilten vier von neun Rissen komplett und fünf partiell, während in der Gruppe nur mit Bohrung und Meniskusnaht bei keinem Tier eine Heilung festgestellt werden konnte (142). Jedoch waren 21 % der rohrbehandelten Menisken biomechanisch nicht belastbar und zudem dislozierte bei vier von 29 Tieren das eingesetzte Rohr (142). Am Schafmodell heilten longitudinale und

DISKUSSION

horizontale Meniskusrisse nach Implantation eines synovialen Lappens in den Riss und anschließender Naht aus (143). Nach drei Monaten wurde kollagenarmes Knorpelgewebe im Riss gesehen, während die longitudinalen Risse nach alleiniger Naht keinen Heilungsansatz zeigten (143). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Heilung longitudinaler Meniskusrisse der avaskulären Zone durch eine verbesserte Durchblutung, z. B. mechanisch durch Kanäle oder Gewebebrücken zwischen der vaskulären und avaskulären Zone, verbessert werden kann.

Grundvoraussetzung für die Durchführung einer experimentellen *In-vivo*-Studie zur Meniskusheilung ist die Wahl eines geeigneten Tiermodells. Das Schaf wurde aufgrund verschiedener Parameter für diese Studie ausgewählt. Verglichen mit anderen Tiermodellen, z. B. dem Kaninchen, weist der ovine Meniskus eine hohe Ähnlichkeit zum humanen auf (12, 113). Die Menisken beider Spezies zeigen eine hohe Übereinstimmung in der Anatomie, Struktur der Blutgefäße, Zusammensetzung der kollagenen Matrix und in der Zellularität (12, 113). Darüber hinaus liegen vergleichbare biomechanische Eigenschaften vor (144). Weiterhin bestehen anatomisch geeignete Voraussetzungen für die Blutgewinnung aus der *V. jugularis externa* zur Herstellung des PRP sowie für die Entnahme des Knochenmarkspirats aus dem Beckenkamm zur Isolation der MSC.

Auf eine postoperative Immobilisierung oder Belastungseinschränkung wurde in dieser Studie verzichtet, da dies keinen Vorteil gegenüber einer frühen uneingeschränkten Belastung und Bewegung nach Meniskusnaht zeigte (145, 146). In einer anderen ovinen Studie dagegen heilten nach sechs Wochen zwar nur zwei von zwölf nahtversorgten longitudinalen Meniskusrissen der avaskulären Zone durch Bildung von Fasergewebe aus, interessanterweise waren jedoch beide Menisken von Tieren aus der Gruppe mit postoperativer Immobilisation (146). Jedoch zeigten alle Menisken unabhängig von der postoperativen Mobilisation eine um 50 % reduzierte biomechanische Belastbarkeit verglichen mit den gesunden Menisken (146). Bei postoperativ mobilisierten Hunden wurde nach Meniskusnaht von Rissen der vaskulären Zone ein signifikant höherer Kollagengehalt im Rissbereich nachgewiesen als bei den immobilisierten Hunden nach zehn Wochen (147). Diese Studie bestätigt die Annahme, dass eine frühe Mobilisation vorteilhafter für die Meniskusheilung ist.

DISKUSSION

Hinzu kommt die unterschiedliche biomechanische Belastung je nach Art des Risses. Es wäre denkbar, dass kleinere Defekte wie z. B. Stanzdefekte eher heilen, da diese höchstwahrscheinlich biomechanisch weniger belastet werden und zudem weniger Reparaturgewebe gebildet werden muss. So heilten in einer Studie Stanzdefekte der avaskulären Zone des Kaninchenmeniskus nach PRP-Zugabe durch Ausbildung von Fasergewebe, jedoch keinem Meniskusgewebe (42, 49). Dagegen konnte am Schaf gezeigt werden, dass nahtversorgte longitudinale Risse in der *Pars intermedia* des Meniskus auch nach bis zu sechs Monaten weder makroskopische noch mikroskopische Heilungstendenzen zeigen (143). Möglicherweise ist ein longitudinaler Riss einer höheren biomechanischen Belastung ausgesetzt als zum Beispiel ein Stanzdefekt und die Heilung dadurch zusätzlich beeinträchtigt.

Nicht nur biomechanische Eigenschaften, sondern auch der Therapiezeitraum hat einen Einfluss auf die Heilung von Meniskusverletzungen. Es muss diskutiert werden, ob der in dieser Studie gewählte Therapiezeitraum von acht Wochen ausreichend war, um makroskopische Heilungstendenzen sehen zu können. Bei der Heilung avaskulärer Meniskusrisse beim Schwein erwies sich ein Therapiezeitraum von acht Wochen als optimal, da es darüber hinaus zu keiner weiteren makroskopischen Veränderung kam (63). Im Kontrast dazu wurde bei Hunden nach Setzen eines longitudinalen Meniskusrisses mit zusätzlichem Radiärriss erst nach zehn Wochen eine vollständige Defektfüllung mit fibrovaskulärem Narbengewebe gesehen (31). Da bei den Tieren ohne zusätzlichen Radiärriss auch nach zehn Wochen kein Narbengewebe sichtbar war, spielt die Verbesserung der Durchblutung, wie hier durch den zusätzlichen Radiärriss, vermutlich die entscheidende Rolle (31). Dies zeigt jedoch auch, dass nach mechanischer Verbesserung der Durchblutung ein längerer Therapiezeitraum von mindestens zehn Wochen gewählt werden sollte. Ob ein längerer Therapiezeitraum auch nach lokaler Zugabe von PRP und MSC vorteilhafter wäre, bleibt fraglich.

Neben der makroskopischen und histologischen Beurteilung der Meniskusrisse wurde der Einfluss von PRP und MSC auf molekularer Ebene untersucht. Dazu wurde das endogene Vorkommen von bestimmten Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Kollagenen im gesunden und verletzten Meniskus analysiert. Es gibt bisher keine

DISKUSSION

Erkenntnisse darüber, wie die kombinierte Zugabe von PRP und MSC die Expression dieser Signalmoleküle im Meniskus verändert. Es wäre möglich, dass das PRP und die MSC Wachstumsfaktoren freisetzen oder deren Synthese im Gewebe stimulieren. Diese anabolen Signalmoleküle könnten beispielsweise die Zellproliferation fördern und die katabole Wirkung von Zytokinen inhibieren.

Die vorliegende Arbeit fokussierte sich insbesondere auf den Nachweis des Wachstumsfaktors FGF-2 in der Meniskusheilung. Entgegen der Hypothese wurde im Rissbereich keine signifikant erhöhte Anzahl FGF-2-positiver Zellen gesehen. Es zeigte sich eher die Tendenz, dass in allen Zonen der PRP + MSC-Gruppe weniger FGF-2-positiver Zellen als im kontralateralen Meniskus vorhanden waren. Signifikant weniger FGF-2-positiv Zellen konnten jedoch nur in der avaskulären Zone des operierten Meniskus verglichen mit dem kontralateralen Meniskus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kombination aus PRP und MSC das FGF-2 Vorkommen im Meniskus sogar negativ beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde unseres Wissens FGF-2 erstmals immunhistochemisch im ovinen Meniskus nachgewiesen und somit Kenntnisse über das Vorkommen dieses Wachstumsfaktors im Meniskusgewebe erlangt. Es wurde ein 100 % sequenzhomologer anti-humaner Primärantikörper verwendet. Da dieser eine spezifische Anfärbung zeigte, wurde kein weiterer Primärantikörper getestet. Zur Etablierung der FGF-2-Immunhistochemie wurden unterschiedliche Primärantikörperverdünnungen und Gewebepreparierungen (thermisch durch Erhitzen und enzymatisch durch Proteinase K) getestet. Um eine spezifische Bindung des Primärantikörpers zu gewährleisten, wurde bei jeder Färbung eine Positiv- und Negativkontrolle mitgefärbt. Dazu wurde das Myokard und die Achillessehne verwendet, da an beiden Gewebearten bereits FGF-2-Antikörperfärbungen durchgeführt wurden (79, 116, 117). Die FGF-2-positiven Zellen des operierten und kontralateralen Meniskus wurden manuell ausgezählt, da eine automatische Auszählung aufgrund unzureichender Kontrastunterschiede der Zellkerne und -plasmen zwischen Antikörper- und Gegenfärbung nicht möglich war.

Zur Quantifizierung von FGF-2 und der anderen untersuchten Signalmoleküle im Meniskus wurde zusätzlich eine Real-Time RT-PCR zur Ermittlung der relativen mRNA-

DISKUSSION

Expression durchgeführt. Um ausreichend RNA isolieren zu können, wurden verschiedene mechanische Methoden zur Homogenisation des Meniskusgewebes getestet. Insgesamt konnten jedoch aufgrund der hohen Festigkeit des Meniskusgewebes nur geringe RNA-Mengen gewonnen werden, sodass eine initial angedachte separate Analyse der vaskulär und avaskulär des Risses liegenden Anteile des Meniskus nicht durchgeführt werden konnte.

Interessanterweise war die relative mRNA-Expression des Wachstumsfaktors FGF-2 in allen Gruppen signifikant vermindert verglichen mit den kontralateralen Menisken. Nach kombinierter Anwendung von PRP und MSC wurde sogar die niedrigste relative mRNA-Expression von FGF-2 gemessen und nicht, wie eingangs vermutet, die höchste Expression. Acht Wochen nach Meniskusriss steigerte demnach weder PRP, MSC noch die kombinierte Applikation die endogene relative FGF-2-mRNA-Expression im verletzten Meniskus. Dass FGF-2 ebenfalls in der Naht-Gruppe vermindert war, könnte bedeuten, dass FGF-2 im chronischen Heilungsprozess weniger gebildet oder die Bildung sogar inhibiert wird. Am Kaninchenmeniskus war jedoch weder nach neun, noch nach 28 oder 84 Tagen die mRNA-Expression von FGF-2 signifikant verändert nach Naht eines longitudinalen Risses in der avaskulären Zone (140). Fraglich bleibt jedoch, ob FGF-2 eher im akuten Heilungsprozess eine Rolle spielt. Nach Myokardinfarkt im Rattenmodell zeigte FGF-2 am Übergang vom Myokard- zum Infarktgewebe initial einen Anstieg und normalisierte sich bis Tag 14 wieder (79). Die FGF-2-Injektion in Patellarsehnendefekte von Ratten steigerte nach sieben Tagen die Zellproliferation und Bildung von Col3, jedoch nicht 14 Tage nach Injektion (78). Dies lässt vermuten, dass FGF-2 innerhalb der ersten Tage nach Trauma die stärkste Wirkung auf das Gewebe hat. In chronischen Hautwunden wurde eine signifikant verminderte FGF-2- und VEGF-Expression und eine erhöhte Expression der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β festgestellt im Vergleich zu akuten Hautwunden und normaler Haut (108). Es wäre möglich, dass diese Zytokine mit FGF-2 oder auch anderen Wachstumsfaktoren interagieren und deren Expression womöglich inhibieren. So zeigten beispielsweise mit FGF-2 kultivierte Fibrochondrozyten *in vitro* eine stärkere Zellproliferation bei Abwesenheit vom Serum im Medium (84).

DISKUSSION

Die Wirkung von FGF-2 hängt vermutlich auch von der Freisetzungskinetik ab. In einer *In-vitro*-Organkultur des bovinen Meniskus zeigte eine kurzzeitige Zugabe von FGF-2 einen besseren Effekt auf die Gewebeintegration als eine kontinuierliche Kultivierung mit FGF-2 (148). Ob die exogene Zugabe von FGF-2 die Meniskusheilung von Rissen der avaskulären Zone verbessert, ist unklar. Am Kaninchen heilten durch Applikation von FGF-2 und einem Hydrogel zwar die peripheren 25 % eines horizontalen Meniskusrisses, jedoch wurden kaum Heilungsansätze im Übergang des Risses zur avaskulären Zone festgestellt (141). In einer *In-vitro*-Studie am humanen Meniskus wurde durch vektoriellen Gentransfer die FGF-2-Expression in den Fibrochondrozyten erhöht (149). Dabei zeigte sich *in situ* eine signifikante Steigerung der Zellproliferation und Abnahme der Dicke und Breite von Meniskusrissen der avaskulären Zone, jedoch interessanterweise keine Steigerung der EZM-Synthese (149). Nicht nur auf das Meniskusgewebe scheint FGF-2 heilungsfördernd zu wirken. So heilten beispielsweise auch Knorpeldefekte der Femurkondylen von Kaninchen acht Wochen nach FGF-2-Applikation in einer Fibrinmatrix (81).

Neben FGF-2 wurden in dieser Studie weitere bedeutende Signalmoleküle der Wundheilung untersucht. Die relative mRNA-Expression dieser Wachstumsfaktoren TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1 und IGF-2 war in der PRP + MSC-Gruppe weder zwischen operierten und kontralateralen Menisken, noch im Vergleich mit den anderen Gruppen signifikant verändert, sodass die initiale Hypothese einer erhöhten Expression nicht bestätigt werden konnte. Die kombinierte Applikation von PRP und MSC hatte demnach in dieser Studie keinen nachweisbareren Einfluss auf die mRNA-Expression dieser Wachstumsfaktoren nach acht Wochen. Die mRNA-Expression dieser Wachstumsfaktoren war auch in der Kontrollgruppe mit alleiniger Meniskusnaht nicht signifikant verändert.

Dass die Expression dieser Wachstumsfaktoren nach Setzen eines longitudinalen Meniskusrisses der avaskulären Zone sowohl zeitlich als auch innerhalb der Zonen des Meniskus variiert, bewies eine Kaninchenstudie (104). In dieser wurde die Expression mehrerer Wachstumsfaktoren und Zytokine im zeitlichen Verlauf nach longitudinalem Meniskusriss der avaskulären Zone untersucht (104). Dabei wurde vaskulär eine Woche

DISKUSSION

postoperativ eine verminderte PDGF- β - und TGF- β 1-Expression nachgewiesen (104). Zudem wurde zwei Wochen postoperativ avaskulär eine erhöhte VEGF-A- und vaskulär eine erhöhte IGF-1-Expression gemessen (104). Interessanterweise waren die Expressionslevel aller Wachstumsfaktoren bereits drei Wochen und auch 120 Tage nach Setzen eines Risses nicht mehr signifikant verändert, verglichen mit dem Ausgangsniveau vor Setzen des Risses (104). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expressionslevel dieser Wachstumsfaktoren nach einem Therapiezeitraum von acht Wochen womöglich ebenfalls ähnlich dem Ausgangsniveau sind. Zu bedenken ist jedoch, dass in der aktuellen Studie das Expressionslevel nur zum Zeitpunkt von acht Wochen untersucht wurde und der gesunde Meniskus als Referenz galt, sodass keine Aussagen über die Expression im verletzten Meniskus im zeitlichen Verlauf möglich sind.

Betrachtet man die Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und PDGF- β , so waren diese in der PRP + MSC-Gruppe nicht signifikant verändert exprimiert und auch keine eindeutigen Tendenzen ableitbar. Eine Studie am Kaninchen untersuchte die TGF- β 1 und PDGF-Expression nach Anrauen der Oberfläche und Setzen eines longitudinalen Risses in der avaskulären Zone des Meniskus (107). In der ersten Woche zeigte sich eine dreifache TGF- β 1-Expression an der femoralen Oberfläche und am Riss, die danach bis zur achten Woche postoperativ rasch abfiel (107). Die Expression von PDGF nahm postoperativ an der femoralen Oberfläche stark zu, mit Maximum nach zwei Wochen, und fiel danach wieder ab (107). Am Riss hingegen war nur eine Woche postoperativ eine leichte Zunahme von PDGF messbar (107). Dies könnte darauf hindeuten, dass TGF- β 1 und auch PDGF vor allem in der Akutphase der Wundheilung hochreguliert werden und deren Synthese gegebenenfalls mechanisch durch Anrauen stimuliert werden kann. Zu bedenken ist, dass in der Kontrollgruppe dieser Studie ebenfalls ein Riss in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* gesetzt wurde, ohne jedoch die femoralen Oberfläche des Meniskus anzurauen. Daher sind keine Rückschlüsse über die Expression der Wachstumsfaktoren zwischen verletztem und gesundem Meniskus möglich. Gegen die Hochregulation von PDGF in der Akutphase der Wundheilung spricht eine Studie an Patienten, bei der direkt nach partieller medialer Meniskusresektion eine verminderte PDGF-Konzentration gemessen wurde (106). Interessanterweise wurde

DISKUSSION

aber direkt nach LCA-Rekonstruktion eine erhöhte PDGF-Konzentration gemessen (106).

Der Wachstumsfaktor VEGF-A war in der PRP + MSC-Gruppe dieser Arbeit nicht signifikant verändert exprimiert. Bislang konnte gezeigt werden, dass VEGF nach Meniskusriss in der avaskulären Zone des Kaninchenmeniskus vermehrt nachweisbar ist (105). Die Expression nahm im Verlauf nach einer, zwei, fünf und zehn Wochen ab (105). Am Kaninchenmeniskus zeigte sich nach Naht eines longitudinalen Risses in der avaskulären Zone keine signifikant veränderte mRNA-Expression von VEGF und IGF-1, weder nach neun, noch nach 28 oder 84 Tagen (140). Interessanterweise scheint das PRP eine inhibitorische Wirkung auf VEGF-A zu haben, denn *in vitro* wurde eine verminderte VEGF-A-Sekretion nach Kultivierung von adipogenen MSC mit PRP gesehen (72). Inwieweit VEGF-A den Heilungsprozess im Meniskus fördert, ist ungewiss. Am Schafmodell wurde nach Meniskusnaht von Rissen der avaskulären Zone mit VEGF-beschichteten Fäden bei keinem der 18 Tiere eine Heilung gesehen (150). Dagegen heilten nach Naht mit unbeschichteten Fäden die Menisken von drei Tieren vollständig und von drei Tieren partiell (150). Die Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2 waren in der PRP + MSC-Gruppe nicht signifikant verändert exprimiert. Interessanterweise war IGF-1 in der PRP und PPR+MSC-Gruppe grafisch am stärksten exprimiert, jedoch nicht signifikant. Dabei zeigten Studien, dass IGF-1 im Gegensatz zu den anderen Wachstumsfaktoren im PRP nicht signifikant höher als im normalem Plasma nachweisbar ist (40).

Im Wundheilungsprozess spielen neben den anabolen Wachstumsfaktoren auch proinflammatorische Zytokine eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie zwei wichtige katabole Zytokine, TNF- α und IL-1 α , untersucht. Es wurde initial die Hypothese aufgestellt, dass diese in der PRP + MSC-Gruppe vermindert exprimiert werden, da eine inhibitorische Wirkung der anabolen Wachstumsfaktoren vom PRP auf diese Zytokine vermutet wurde. Tatsächlich war die mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 α in der PRP + MSC-Gruppe nicht signifikant verändert. TNF- α zeigte sich jedoch in der Naht-, PRP- und MSC-Gruppe signifikant vermindert. Im Synovialgewebe von Ratten inhibierten FGF-2 und die Kombination aus TGF- β 1/IGF-1/FGF-2 die

DISKUSSION

Expression von TNF- α (151). Leider gibt es bislang keine Studien zur endogenen Expression von TNF- α im Meniskusgewebe. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit chronischen Meniskusrissen (älter als drei Monate) wurden erhöhte TNF- α -Konzentrationen gemessen (152). Vermutlich wird TNF- α also eher im chronischen Wundheilungsprozess gebildet. IL-1 α war in der PRP + MSC-Gruppe tendenziell leicht erhöht, jedoch nicht signifikant. In einer Kaninchenstudie stieg IL-1 α nach Anrauen der Meniskusoberfläche und Setzen eines longitudinalen Risses in der avaskulären Zone am ersten postoperativen Tag stark an und fiel direkt am Riss bis zur zweiten Woche stark ab, während es an der femoralen Oberfläche noch bis zur achten Woche postoperativ deutlich erhöht war (107). Die starke Abnahme der IL-1 α -Expression am Riss innerhalb von zwei Wochen lässt vermuten, dass dieses Zytokin eher in der akuten Phase der Meniskusheilung ausgeschüttet wird. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine weitere Kaninchenstudie, bei der am ersten postoperativen Tag nach Setzen eines longitudinalen Meniskusrisses in der avaskulären Zone die IL-1 β -Expression vaskulär und avaskulär signifikant anstieg und dann rasch wieder abnahm, sodass bereits nach zwei Wochen das Ausgangsniveau in etwa erreicht war (104). Jedoch wurde die IL-1 β untersucht, sodass unklar ist, ob die IL-1 α -Expression ein ähnliches Expressionsmuster gezeigt hätte.

In der aktuellen Studie wurde zudem die Expression der Kollagene Col1A1-, Col1A2- und Col2A1 untersucht, da diese wichtige EZM-Bestandteile des Meniskusgewebes darstellen. Wie initial in der Hypothese angenommen, zeigte sich die Col1A1-, Col1A2- und Col2A1-mRNA-Expression in der PRP + MSC-Gruppe tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant. Col1A2 war dabei tendenziell am höchsten exprimiert, jedoch nur in der PRP- und MSC-Gruppe signifikant höher exprimiert als im kontralateralen Meniskus. *In vitro* wurde eine signifikante Zunahme der Col1-Synthese oviner Fibrochondrozyten des Meniskus nach Zugabe von FGF-2, PDGF- β , TGF- β 1, IGF-1 und IGF-2 nach 20 Tagen gesehen (100). Auch immunhistochemisch zeigte sich unter Zugabe dieser Wachstumsfaktoren eine Zunahme von Col1 und dagegen eine Abnahme von Col2 nach 39 Tagen (100). In der aktuellen Studie zeigte sich in keiner Gruppe eine signifikant veränderte Col2A1-mRNA-Expression. Vermutlich wird Col2 im

DISKUSSION

Heilungsprozess weniger beeinflusst, da es nur einen kleinen Kollagenanteil im Meniskus ausmacht (5). Den Hauptanteil des Kollagens im Meniskus bildet mit 90 % Col1 (5). Interessanterweise zeigte sich Col1A1 signifikant erhöht exprimiert in der Carrier-Gruppe verglichen allen anderen Gruppen. Zum einen bildet dieses Kollagen den Hauptbestandteil des verwendeten Carriers. Eine Verminderung verglichen mit der Naht-Gruppe könnte sich durch das Fehlen des Carriers in dieser erklären. Fraglich bleibt jedoch, warum Col1A1 auch in der PRP-, MSC-, und PRP + MSC-Gruppe verringert ist, trotz Vorhandensein des Carriers.

In dieser Studie gibt es zahlreiche Limitationen, die beachtet werden müssen. Es wurde mit dem Skalpell ein Riss in die avaskuläre Zone des Meniskus gesetzt und dieser direkt im Anschluss genäht. Es sollte eine Vergleichbarkeit zu humanen Meniskusrissen erzielt werden, jedoch entstehen diese meist durch ein Trauma mit Kniegelenksdistorsion und werden nicht unmittelbar genäht. Es existiert demnach kein vernünftiges Modell, um einen Meniskusriss durch Kniedistorsion ohne Verletzung weiterer Strukturen zu erzeugen. Zudem hätte eine zweizeitige Versorgung des Meniskusrisses einen weiteren operativen Eingriff unter der Belastung einer Narkose zur Folge. Demnach können diese Bedingungen aus ethischen Gründen in keinem Tiermodell erfüllt werden. Daher muss beachtet werden, dass die gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt Rückschlüsse auf humane Therapieverfahren erlauben. Zudem müssen beim Menschen Faktoren wie Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen, vor allem degenerative Kniegelenkserkrankungen, berücksichtigt werden. Die Versuchstiere dieser Studie waren ähnlich alt, weiblich und klinisch gesund ohne Hinweise auf Vorerkrankungen. Aufgrund des gewählten Großtiermodells musste jedoch aus ethischen und organisatorischen Gründen auf eine höhere Fallzahl verzichtet werden. Zur statistischen Analyse wurden daher bei niedriger Fallzahl ($n = 6$ pro Gruppe) nicht-parametrische Testverfahren verwendet. Weiterhin muss beachtet werden, dass inter- und intraindividuelle Faktoren wie z. B. die Thrombozytenzahl im Blut oder die postoperative Mobilität und Belastung die Signifikanz der erhobenen Ergebnisse beeinflussen. Die postoperative Belastung der operierten Gliedmaße wurde in dieser Studie nicht eingeschränkt. Damit entsteht eine Mehrbelastung auf den Meniskus des kontralateralen Knies, der als Referenz für die

DISKUSSION

Analysen verwendet wurde, sodass auch ein Einfluss dieser Mehrbelastung auf die lokale Zellproliferation und Expression der Wachstumsfaktoren dort denkbar wäre. Zudem müssen auch systemische Effekte der lokalen PRP- und MSC-Applikation in Betracht gezogen werden, die jedoch durch die Wahl des kontralateralen Meniskus als Referenz relativiert wurden. Weiterhin muss beachtet werden, dass in dieser Studie ausschließlich der Therapiezeitraum von acht Wochen untersucht wurde. Demnach beziehen sich die makroskopischen, histologischen und quantitativen Ergebnisse dieser Studie auf diesen festen Zeitpunkt und erlauben keine Aussagen über einen zeitlichen Verlauf. Ferner muss berücksichtigt werden, dass neben der immunhistochemischen Analyse die relative mRNA-Expression der Signalmoleküle untersucht wurde, d. h. die Expression in Bezug zu einem Referenzgen (GAPDH) ermittelt wurde. Somit ist keine Aussage über die absolute Expression oder über die Proteinmenge möglich.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die kombinierte lokale Applikation von PRP und MSC konnte die Meniskusheilung eines Longitudinalrisses in der avaskulären Zone nach acht Wochen nicht verbessern. Die alleinige Applikation von PRP und MSC konnte die Meniskusheilung ebenfalls nicht verbessern. In keiner Gruppe zeigte sich eine makroskopische Heilung. In allen Gruppen war der Wachstumsfaktor FGF-2 in den operierten Menisken signifikant vermindert, was für einen chronischen Wundheilungsprozess spricht. Die lokale Applikation von PRP + MSC führte zu keiner signifikanten Änderung der Expressionslevel von TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2, TNF- α , IL-1 α , Col1A2 und Col2A1 zwischen den Therapiegruppen und im Vergleich zum kontralateralen Meniskus.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Steinbrück K. Epidemiologie von Sportverletzungen-25-Jahres-Analyse einer sportorthopädisch-traumatologischen Ambulanz. *Sportverletzung· Sportschaden*. 1999;13(02):38-52.
2. Majewski M, Susanne H, Klaus S. Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study. *Knee*. 2006;13(3):184-188.
3. Johnson DL, Swenson TM, Livesay GA, Aizawa H, Fu FH, Harner CD. Insertion-site anatomy of the human menisci: gross, arthroscopic, and topographical anatomy as a basis for meniscal transplantation. *Arthroscopy*. 1995;11(4):386-394.
4. Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. The Knee Meniscus: A Complex Tissue of Diverse Cells. *Cell Mol Bioeng*. 2009;2(3):332.
5. Greis PE, Bardana DD, Holmstrom MC, Burks RT. Meniscal injury: I. Basic science and evaluation. *J Am Acad Orthop Surg*. 2002;10(3):168-176.
6. Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2012;4(4):340-351.
7. Gupte CM, Smith A, Jamieson N, Bull AM, Thomas RD, Amis AA. Meniscomfemoral ligaments--structural and material properties. *J Biomech*. 2002;35(12):1623-1629.
8. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem* [Figure A, p. 448]. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2014.
9. Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*. 1982;10(2):90-95.
10. Henning CE, Lynch MA, Clark JR. Vascularity for healing of meniscus repairs. *Arthroscopy*. 1987;3(1):13-18.
11. Beaupre A, Choukroun R, Guidouin R, Garneau R, Gerardin H, Cardou A. Knee menisci. Correlation between microstructure and biomechanics. *Clin Orthop Relat Res*. 1986(208):72-75.
12. Chevrier A, Nelea M, Hurtig MB, Hoemann CD, Buschmann MD. Meniscus structure in human, sheep, and rabbit for animal models of meniscus repair. *J Orthop Res*. 2009;27(9):1197-1203.
13. Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res*. 1987;16(4):343-356.
14. Petersen W, Tillmann B. [Structure and vascularization of the knee joint menisci]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 1999;137(1):31-37.
15. McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*. 1990(252):8-18.

LITERATURVERZEICHNIS

16. Englund M, Roemer FW, Hayashi D, Crema MD, Guermazi A. Meniscus pathology, osteoarthritis and the treatment controversy. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(7):412-419.
17. Engstrom B. Current Concepts in Meniscal Repair. ISAKOS Congress. 2015;Advances in the Management of Knee Pathology Pre-Course | Meniscus (Symposia).
18. Becker R, Buchner M, Frosch K-H, Losch A, Niemeyer P, Siebert CH, für Orthopädie BdF, für Arthroskopie B, DKG DK, für Physiotherapie–physio DV. S2k-Leitlinie Meniskuserkrankung.
19. Burks RT, Metcalf MH, Metcalf RW. Fifteen-year follow-up of arthroscopic partial meniscectomy. *Arthroscopy*. 1997;13(6):673-679.
20. Chatain F, Robinson AH, Adeleine P, Chambat P, Neyret P. The natural history of the knee following arthroscopic medial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2001;9(1):15-18.
21. Stein T, Mehling AP, Welsch F, von Eisenhart-Rothe R, Jager A. Long-term outcome after arthroscopic meniscal repair versus arthroscopic partial meniscectomy for traumatic meniscal tears. *Am J Sports Med*. 2010;38(8):1542-1548.
22. Cho JH. A Modified Outside-in Suture Technique for Repair of the Middle Segment of the Meniscus Using a Spinal Needle. *Knee Surg Relat Res*. 2014;26(1):43-47.
23. Ahn JH, Kim SH, Yoo JC, Wang JH. All-inside suture technique using two posteromedial portals in a medial meniscus posterior horn tear. *Arthroscopy*. 2004;20(1):101-108.
24. Ahn JH, Wang JH, Oh I. Modified inside-out technique for meniscal repair. *Arthroscopy*. 2004;20 Suppl 2:178-182.
25. Rodeo SA. Arthroscopic meniscal repair with use of the outside-in technique. *Instr Course Lect*. 2000;49:195-206.
26. Kalliakmanis A, Zourntos S, Bousgas D, Nikolaou P. Comparison of arthroscopic meniscal repair results using 3 different meniscal repair devices in anterior cruciate ligament reconstruction patients. *Arthroscopy*. 2008;24(7):810-816.
27. Kopf S, Stärke C, Becker PDR. Klinische Ergebnisse nach Meniskusnaht. *Arthroskopie*. 2011;24(1):30-35.
28. Ahn JH, Lee YS, Yoo JC, Chang MJ, Koh KH, Kim MH. Clinical and second-look arthroscopic evaluation of repaired medial meniscus in anterior cruciate ligament-reconstructed knees. *Am J Sports Med*. 2010;38(3):472-477.

LITERATURVERZEICHNIS

29. Tengrootenhuysen M, Meermans G, Pittoors K, Van Riet R, Victor J. Long-term outcome after meniscal repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(2):236-241.
30. Pujol N, Barbier O, Boisrenoult P, Beaufils P. Amount of meniscal resection after failed meniscal repair. *Am J Sports Med.* 2011;39(8):1648-1652.
31. Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med.* 1983;11(3):131-141.
32. Arnoczky SP, Warren RF, Spivak J. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70(8):1209-1217.
33. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 2012;28(7):998-1009.
34. Stellos K, Kopf S, Paul A, Marquardt JU, Gawaz M, Huard J, Langer HF, editors. *Platelets in regeneration.* Semin Thromb Hemost; 2010: © Thieme Medical Publishers.
35. McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1033-1042.
36. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sport Med.* 2011;39(10):2135-2140.
37. Yin W-J, Xu H-T, Sheng J-G, An Z-Q, Guo S-C, Xie X-T, Zhang C-Q. Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte-and platelet-rich plasma in treating rabbit knee osteoarthritis. *Med Sci Mon Int Med J Exp Clin Res.* 2016;22:1280.
38. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489-496.
39. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G, Martin I, Marcacci M. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:220.
40. Cho HS, Song IH, Park S-Y, Sung MC, Ahn M-W, Song KE. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. *Korean J Lab Med.* 2011;31(3):212-218.

LITERATURVERZEICHNIS

41. Fallouh L, Nakagawa K, Sasho T, Arai M, Kitahara S, Wada Y, Moriya H, Takahashi K. Effects of autologous platelet-rich plasma on cell viability and collagen synthesis in injured human anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(18):2909-2916.
42. Ishida K, Kuroda R, Miwa M, Tabata Y, Hokugo A, Kawamoto T, Sasaki K, Doita M, Kurosaka M. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue eng*. 2007;13(5):1103-1112.
43. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(6):1502-1508.
44. Harrison S, Vavken P, Kevy S, Jacobson M, Zurakowski D, Murray MM. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sport Med*. 2011;39(4):729-734.
45. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):228-236.
46. Sun Y, Feng Y, Zhang C, Chen S, Cheng X. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop*. 2010;34(4):589-597.
47. Zellner J, Taeger CD, Schaffer M, Roldan JC, Loibl M, Mueller MB, Berner A, Krutsch W, Huber MK, Kujat R. Are applied growth factors able to mimic the positive effects of mesenchymal stem cells on the regeneration of meniscus in the avascular zone? *BMRI*. 2014;2014.
48. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci*. 2008;13:3532-3548.
49. Lee H-R, Shon O-J, Park S-I, Kim H-J, Kim S, Ahn M-W, Do SH. Platelet-Rich Plasma Increases the Levels of Catabolic Molecules and Cellular Dedifferentiation in the Meniscus of a Rabbit Model. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):120.
50. Milano G, Deriu L, Passino ES, Masala G, Manunta A, Postacchini R, Saccomanno MF, Fabbriciani C. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy*. 2012;28(5):688-701.
51. Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, Kern A, Ratcliffe A, Gardner KL. Growth factor-rich plasma increases tendon cell proliferation and matrix synthesis on a synthetic scaffold: an in vitro study. *Tissue Engineering Part A*. 2009;16(3):1021-1029.

LITERATURVERZEICHNIS

52. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999;284(5411):143-147.
53. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
54. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):419-425.
55. Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, Biewener A, Zwipp H. 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-An*. 2010;46(7):624-634.
56. McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):324-333.
57. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A, International Society for Cellular T. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-395.
58. Izuta Y, Ochi M, Adachi N, Deie M, Yamasaki T, Shinomiya R. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *The Knee*. 2005;12(3):217-223.
59. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, Josten C, Bader A, Marquass B. Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sport Med*. 2010;38(9):1857-1869.
60. Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Use of Bone Marrow Stromal Cells for Tendon Graft-to-Bone Healing Histological and Immunohistochemical Studies in a Rabbit Model. *Am J Sport Med*. 2004;32(2):321-327.
61. Qi Y, Yang Z, Ding Q, Zhao T, Huang Z, Feng G. Targeted transplantation of iron oxide-labeled, adipose-derived mesenchymal stem cells in promoting meniscus regeneration following a rabbit massive meniscal defect. *Exp Ther Med*. 2016;11(2):458-466.
62. Shen W, Chen J, Zhu T, Yin Z, Chen X, Chen L, Fang Z, Heng BC, Ji J, Chen W. Osteoarthritis prevention through meniscal regeneration induced by intra-articular injection of meniscus stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(14):2071-2082.

LITERATURVERZEICHNIS

63. Dutton A, Choong P, Goh JC, Lee E, Hui J. Enhancement of meniscal repair in the avascular zone using mesenchymal stem cells in a porcine model. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(1):169-175.
64. Hatsushika D, Muneta T, Nakamura T, Horie M, Koga H, Nakagawa Y, Tsuji K, Hishikawa S, Kobayashi E, Sekiya I. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014;22(7):941-950.
65. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3464-3474.
66. Langer HF, Stellos K, Steingen C, Frohofer A, Schönberger T, Krämer B, Bigalke B, May AE, Seizer P, Müller I. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Cell Cardiol.* 2009;47(2):315-325.
67. Zhang H, Leng P, Zhang J. Enhanced meniscal repair by overexpression of hIGF-1 in a full-thickness model. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(12):3165-3174.
68. Phipps MC, Xu Y, Bellis SL. Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PLoS one.* 2012;7(7):e40831.
69. Diao H, Wang J, Shen C, Xia S, Guo T, Dong L, Zhang C, Chen J, Zhao J, Zhang J. Improved Cartilage Regeneration Utilizing Mesenchymal Stem Cells in TGF- β 1 Gene-Activated Scaffolds. *Tissue Engineering Part A.* 2009;15(9):2687-2698.
70. Goedecke A, Wobus M, Krech M, Münch N, Richter K, Hölig K, Bornhauser M. 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.* 2011;5(8):648-654.
71. Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch K-H. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2008;189(5):317-326.
72. Van Pham P, Bui KH-T, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL-C, Le DM, Duong TD, Nguyen TD, Le VT. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):91.
73. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601.

LITERATURVERZEICHNIS

74. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235-253.
75. Vincent T, Hermansson M, Bolton M, Wait R, Saklatvala J. Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury. *P Natl Acad Sci Usa.* 2002;99(12):8259-8264.
76. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang C-Q, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2002;61(5):1714-1728.
77. Zakine G, Martinod E, Fornes P, Sapoval M, Barritault D, Carpentier AF, Chachques JC. Growth factors improve latissimus dorsi muscle vascularization and trophicity after cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):549-554.
78. Chan BP, Fu S-c, Qin L, Lee K-m, Rolf CG, Chan K-m. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand.* 2000;71(5):513-518.
79. Zhao T, Zhao W, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Acidic and basic fibroblast growth factors involved in cardiac angiogenesis following infarction. *Int J Cardiol.* 2011;152(3):307-313.
80. Argun M, Oner M, Guney A, Halici M, Temizyurek O, Canoz O. The healing of full-thickness articular cartilage defects in rabbits: successful results with fibroblast growth factor. *Eklemler Hastalik Cerrahisi.* 2010;21(3):147-152.
81. Ishii I, Mizuta H, Sei A, Hirose J, Kudo S, Hiraki Y. Healing of full-thickness defects of the articular cartilage in rabbits using fibroblast growth factor-2 and a fibrin sealant. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(5):693-700.
82. Chia SL, Sawaji Y, Burleigh A, McLean C, Inglis J, Saklatvala J, Vincent T. Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(7):2019-2027.
83. Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2005;52(12):3910-3917.
84. Tumia NS, Johnstone AJ. Promoting the proliferative and synthetic activity of knee meniscal fibrochondrocytes using basic fibroblast growth factor in vitro. *Am J Sport Med.* 2004;32(4):915-920.

LITERATURVERZEICHNIS

85. Esparza R, Gortazar AR, Forriol F. Cell study of the three areas of the meniscus: effect of growth factors in an experimental model in sheep. *J Orthop Res.* 2012;30(10):1647-1651.
86. Gunja NJ, Athanasiou KA. Additive and synergistic effects of bFGF and hypoxia on leporine meniscus cell-seeded PLLA scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4(2):115-122.
87. Adesida AB, Grady LM, Khan WS, Hardingham TE. The matrix-forming phenotype of cultured human meniscus cells is enhanced after culture with fibroblast growth factor 2 and is further stimulated by hypoxia. *Arthritis Res Ther* 2006;8(3):R61.
88. Cai T-Y, Zhu W, Chen X-S, Zhou S-Y, Jia L-S, Sun Y-Q. Fibroblast growth factor 2 induces mesenchymal stem cells to differentiate into tenocytes through the MAPK pathway. *Mol Med Rep.* 2013;8(5):1323-1328.
89. Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF- β and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation.* 2012;35(1):138-142.
90. Lee J, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D. Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Iowa Orthop J.* 1998;18:19.
91. Ushiyama T, Chano T, Inoue K, Matsusue Y. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(2):108-112.
92. Pierce G, Berg JV, Rudolph R, Tarpley J, Mustoe T. Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol.* 1991;138(3):629.
93. Puetzer JL, Brown BN, Ballyns JJ, Bonassar LJ. The effect of IGF-I on anatomically shaped tissue-engineered menisci. *Tissue Engineering Part A.* 2013;19(11-12):1443-1450.
94. Uchimura T, Foote AT, Smith EL, Matzkin EG, Zeng L. Insulin-Like Growth Factor II (IGF-II) Inhibits IL-1 β -Induced Cartilage Matrix Loss and Promotes Cartilage Integrity in Experimental Osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2015;116(12):2858-2869.
95. Hoberg M, Uzunmehmetoglu G, Sabic L, Reese S, Aicher W, Rudert M. Charakterisierung von humanen Meniskuszellen. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete.* 2006;144(02):172-178.
96. Pangborn CA, Athanasiou KA. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1184-1190.

LITERATURVERZEICHNIS

97. Collier S, Ghosh P. Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis and cartilage*. 1995;3(2):127-138.
98. Imler SM, Doshi AN, Levenston ME. Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2004;12(9):736-744.
99. Riera KM, Rothfusz NE, Wilusz RE, Weinberg J, Guilak F, McNulty AL. Interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 and integrative meniscal repair: influences on meniscal cell proliferation and migration. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6):R187.
100. Stewart K, Pabbruwe M, Dickinson S, Sims T, Hollander A, Chaudhuri J. The effect of growth factor treatment on meniscal chondrocyte proliferation and differentiation on polyglycolic acid scaffolds. *Tissue eng*. 2007;13(2):271-280.
101. Tumia NS, Johnstone AJ. Platelet derived growth factor-AB enhances knee meniscal cell activity in vitro. *The Knee*. 2009;16(1):73-76.
102. Bhargava MM, Attia ET, Murrell GA, Dolan MM, Warren RF, Hannafin JA. The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sport Med*. 1999;27(5):636-643.
103. Tumia N, Johnstone A. Regional regenerative potential of meniscal cartilage exposed to recombinant insulin-like growth factor-I in vitro. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(7):1077-1081.
104. Ibán MÁR, Melero NC, Martinez-Botas J, Ortiz A, Heredia JD. Growth factor expression after lesion creation in the avascular zone of the meniscus: A quantitative PCR study in rabbits. *Arthroscopy*. 2014;30(9):1131-1138.
105. Becker R, Pufe T, Kulow S, Giessmann N, Neumann W, Mentlein R, Petersen W. Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(7):1082-1087.
106. De Girolamo L, Galliera E, Volpi P, Denti M, Dogliotti G, Quaglia A, Cabitza P, Romanelli MC, Randelli P. Why menisci show higher healing rate when repaired during ACL reconstruction? Growth factors release can be the explanation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(1):90-96.
107. Ochi M, Uchio Y, Okuda K, Shu N, Yamaguchi H, Sakai Y. Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing. *Arthroscopy*. 2001;17(7):724-731.

LITERATURVERZEICHNIS

108. Jiang L, Dai Y, Cui F, Pan Y, Zhang H, Xiao J, Xiaobing F. Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing. *Spinal Cord*. 2014;52(2):145-151.
109. Fuller E, Smith M, Little C, Melrose J. Zonal differences in meniscus matrix turnover and cytokine response. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;20(1):49-59.
110. McNulty AL, Moutos FT, Weinberg JB, Guilak F. Enhanced integrative repair of the porcine meniscus in vitro by inhibition of interleukin-1 or tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum*. 2007;56(9):3033-3043.
111. Hennerbichler A, Moutos FT, Hennerbichler D, Weinberg JB, Guilak F. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha inhibit repair of the porcine meniscus in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007;15(9):1053-1060.
112. He W, Liu Y-J, Wang Z-G, Guo Z-K, Wang M-X, Wang N. Enhancement of meniscal repair in the avascular zone using connective tissue growth factor in a rabbit model. *Chinese Med J-Peking*. 2011;124(23):3968-3975.
113. Osterhoff G, Löffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P. Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *The Knee*. 2011;18(2):98-103.
114. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017;37(2):163-176.
115. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, Kinzl L, Ignatius A. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*. 2006;27(9):1817-1823.
116. Kardami E, Fandrich RR. Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J Cell Biol*. 1989;109(4):1865-1875.
117. Heisterbach PE, Todorov A, Flückiger R, Evans CH, Majewski M. Effect of BMP-12, TGF- β 1 and autologous conditioned serum on growth factor expression in Achilles tendon healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(10):1907-1914.
118. Lang G. *Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2013;2 270-291.
119. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45-e45.
120. Kosova AA, Khodyreva SN, Lavrik OI. Role of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) in DNA Repair. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(6):643-654.

LITERATURVERZEICHNIS

121. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, Guzzardella G, Martini L, Cenacchi A, Di Maggio N. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;435:62-68.
122. Dehghan MM, Eslaminejad MB, Motallebizadeh N, Halan JA, Tagiyar L, Soroori S, Nikmahzar A, Pedram M, Shahverdi A, Mehrjerdi HK. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with platelet-rich plasma accelerate distraction osteogenesis in a canine model. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2015;17(2):243.
123. Mifune Y, Matsumoto T, Takayama K, Ota S, Li H, Meszaros LB, Usas A, Nagamune K, Gharaibeh B, Fu FH. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013;21(1):175-185.
124. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Med Hypotheses*. 2008;71(6):900-908.
125. Vangsness CT, Farr J, Boyd J, Dellaero DT, Mills CR, LeRoux-Williams M. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(2):90-98.
126. Perkins KM. Notes from the Field: Infections After Receipt of Bacterially Contaminated Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cell Products for Other Than Hematopoietic or Immunologic Reconstitution—United States, 2018. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2018;67.
127. Wan W, McGinley L. FDA wins groundbreaking case against for-profit stem cell company. *The Washington Post*. June 4, 2019.
128. Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, Yoo J. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(2):445-455.
129. Abdel-Hamid M, Hussein MR, F. Ahmad A, Elgezawi EM. 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*. 2005;86(2):117-123.
130. Whitehouse MR, Howells NR, Parry MC, Austin E, Kafienah W, Brady K, Goodship AE, Eldridge JD, Blom AW, Hollander AP. 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*. 2016.
131. Piontek T, Ciemnienska-Gorzela K, Szulc A, Slomczykowski M, Jakob R. All-arthroscopic technique of biological meniscal tear therapy with collagen matrix. *Pol Orthop Traumatol*. 2012;77:39-45.

LITERATURVERZEICHNIS

132. Piontek T, Ciemniowska-Gorzela K, Naczek J, Jakob R, Szulc A, Grygorowicz M, Slomczykowski M. Complex Meniscus Tears Treated with Collagen Matrix Wrapping and Bone Marrow Blood Injection: A 2-Year Clinical Follow-Up. *Cartilage* 2016;7(2):123-139.
133. Pabbruwe MB, Kafienah W, Tarlton JF, Mistry S, Fox DJ, Hollander AP. Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant. *Biomaterials*. 2010;31(9):2583-2591.
134. Zellner J, Hierl K, Mueller M, Pfeifer C, Berner A, Dienstknecht T, Krutsch W, Geis S, Gehmert S, Kujat R. Stem cell-based tissue-engineering for treatment of meniscal tears in the avascular zone. *J Biomed Mater Res B*. 2013;101(7):1133-1142.
135. Zellner J, Mueller M, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, Nerlich M, Hennemann B, Koller M, Prantl L, Angele M. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(4):1150-1161.
136. Kwak HS, Nam J, Lee Jh, Kim HJ, Yoo JJ. Meniscal repair in vivo using human chondrocyte-seeded PLGA mesh scaffold pretreated with platelet-rich plasma. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014.
137. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, Arciero RA, Beitzel K. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(4):308-316.
138. Shin KH, Lee H, Kang S, Ko YJ, Lee SY, Park JH, Bae JH. Effect of Leukocyte-Rich and Platelet-Rich Plasma on Healing of a Horizontal Medial Meniscus Tear in a Rabbit Model. *Biomed Res Int*. 2015;2015:179756.
139. Pujol N, De Chou ES, Boisrenoult P, Beaufile P. Platelet-rich plasma for open meniscal repair in young patients: any benefit? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(1):51-58.
140. Lee C, Tasto J, Healey R, Sano S, Amiel D. Radiofrequency stimulation for potential healing of meniscal injuries in the avascular zone. *Am J Orthoped (Belle Mead, NJ)* 2014;43(12):E292-298.
141. Narita A, Takahara M, Sato D, Ogino T, Fukushima S, Kimura Y, Tabata Y. Biodegradable gelatin hydrogels incorporating fibroblast growth factor 2 promote healing of horizontal tears in rabbit meniscus. *Arthroscopy*. 2012;28(2):255-263.
142. Cook JL, Fox DB. A novel bioabsorbable conduit augments healing of avascular meniscal tears in a dog model. *Am J Sport Med*. 2007;35(11):1877-1887.
143. Ghadially F, Wedge J, Lalonde J. Experimental methods of repairing injured menisci. *J Bone Joint Surg Br*. 1986;68(1):106-110.

LITERATURVERZEICHNIS

144. Joshi MD, Suh JK, Marui T, Woo SLY. Interspecies variation of compressive biomechanical properties of the meniscus. *J Biomed Mater Res A*. 1995;29(7):823-828.
145. Barber FA. Accelerated rehabilitation for meniscus repairs. *Arthroscopy*. 1994;10(2):206-210.
146. Guisasola I, Vaquero J, Forriol F. Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;395:227-233.
147. Dowdy PA, Miniaci A, Arnoczky SP, Fowler PJ, Boughner DR. The effect of cast immobilization on meniscal healing: an experimental study in the dog. *Am J Sport Med*. 1995;23(6):721-728.
148. Ionescu LC, Lee GC, Huang KL, Mauck RL. Growth factor supplementation improves native and engineered meniscus repair in vitro. *Acta biomaterialia*. 2012;8(10):3687-3694.
149. Cucchiaroni M, Schetting S, Terwilliger E, Kohn D, Madry H. rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and α -SMA expression in human meniscal lesions. *Gene Ther* 2009;16(11):1363-1372.
150. Petersen W, Pufe T, Stärke C, Fuchs T, Kopf S, Neumann W, Zantop T, Paletta J, Raschke M, Becker R. The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2007;127(4):235-240.
151. Osiecka-Iwan A, Moskalewski S, Hyc A. Influence of IGF1, TGF β 1, bFGF and G-CSF/M-CSF on the mRNA levels of selected matrix proteins, cytokines, metalloproteinase 3 and TIMP1 in rat synovial membrane cells. *Folia Histochem et Cyto* 2016.
152. Bigoni M, Turati M, Sacerdote P, Gaddi D, Piatti M, Castelnuovo A, Franchi S, Gandolla M, Pedrocchi A, Omeljaniuk RJ. Characterization of synovial fluid cytokine profiles in chronic meniscal tear of the knee. *J Orthop Res*. 2017;35(2):340-346.

9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Janine Schrödter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „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)“ (engl.: *The effect of locally applied platelet-rich plasma and mesenchymal stroma cells on meniscal healing of avascular tears by analyzing important growth factors of wound healing [FGF-2, TGF- β 1, PDGF- β , VEGF-A, IGF-1, IGF-2], catabol cytokines [TNF- α , IL-1 α] and collagens [Col1A1, 1A2, 2A1]*) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoreninnen und Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Kapitel 10. Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der gemeinsamen Erklärung (siehe Kapitel 10. Anteilserklärung) mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

22.01.2020

.....

Unterschrift der Doktorandin

10. PUBLIKATIONEN: KONGRESSVORTRÄGE- UND POSTER

Schrödter J., Scheffler S., Becker R., Dienelt A., Goldbach N., Kopf S.: *Immunhistochemischer Nachweis von bFGF am Meniskus*. 1. Posterpreis, 31. Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA), September 18-20, 2014, Innsbruck, Austria

Hein R., Schrödter J., Schmidt T., Korus G., Kopf S.: *Detektion und Quantifizierung des Transforming Growth Factor beta in ovinen Menisken mittels Immunhistochemie*. 31. Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA), September 18-20, 2014, Innsbruck, Austria

Schrödter J., Hein R., Dienelt A., Schmidt T., Becker R., Scheffler S., Haas N., Kopf S.: *Der Einfluss von plättchenreichem Plasma und mesenchymalen Stammzellen auf FGF in Meniskuläsionen – eine Studie am Schafmodell*. 32. Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA), September 17-19, 2015, Dresden, Germany

Hein R., Schrödter J., Dienelt A., Schmidt T., Becker R., Scheffler S., Perka C., Kopf S.: *The effect of platelet-rich plasma, mesenchymal stem Cells and the combination of both on meniscal healing and TGF- β and FGF*. 32. Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA), September 17-19, 2015, Dresden, Germany

Schrödter J., Hein R., Dienelt A., Goldbach N., Becker R., Scheffler S., Haas N., Schmidt T., Kopf S.: *Der Einfluss von plättchenreichem Plasma (PrP) und mesenchymalen Stammzellen auf FGF in Meniskuläsionen - eine Studie am Schafmodell*. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), October 20-23, 2015, Berlin, Germany

Hein R., Schrödter J., Dienelt A., Schmidt T., Becker R., Scheffler S., Perka C., Kopf S.: *The effect of platelet-rich plasma, mesenchymal stem cells and the combination of both on meniscal healing and FGF*. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), October 20-23, 2015, Berlin, Germany

Hein R., Schrödter J., Dienelt A., Schmidt T., Becker R., Scheffler S., Haas N., Kopf S.: *The effect of platelet-rich plasma, mesenchymal stem cells and the combination of both on meniscal healing and TGF- β* . Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), October 20-23, 2015, Berlin, Germany

11. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst meinem Betreuer und Doktorvater Professor Dr. med. Sebastian Kopf für die langjährige, sehr gute Betreuung. Neben der Assistenz in den zahlreichen Operationen dieser Studie fanden regelmäßige Treffen unserer Arbeitsgruppe zum wissenschaftlichen Austausch statt und er ermöglichte uns die Teilnahme an zahlreichen wissenschaftlichen Kongressen zur Vorstellung unseres Forschungsprojektes in ganz Deutschland.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Perka und Prof. Dr. Georg Duda, die mir diese Promotion am Julius Wolff Institut und dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie des Campus Virchow Klinikums der Charité ermöglichten. Es war eine große Freude, Teil dieses großen Teams von Wissenschaftlern zu sein und in den zahlreichen modern ausgestatteten Laboren arbeiten zu dürfen.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der AG Kopf. Durch unsere Veterinärmedizinerinnen Dr. med. vet. Tanja Schmidt, Nadja Goldbach und Dr. med. vet. Elisabeth Huber war diese Studie erst möglich. Dank ihres Engagements und ihrer Anleitung erhielt ich einen spannenden Einblick in den fachgerechten Umgang mit Versuchstieren. An dieser Stelle möchte ich den Tierpflegerinnen und -pflegern der tierexperimentellen Einrichtung des Virchow Klinikums meinen Dank aussprechen für die liebevolle Betreuung und Pflege unserer Versuchstiere.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen Raphael-Donatus Hein und meiner Kollegin Jasmin Rose für die gegenseitige Unterstützung und hervorragende Teamarbeit während der letzten Jahre. Nur durch unsere gute Organisation bei der Vor- und Nachbereitung der Operationen, Probenverarbeitung, der Nachsorge der Tiere sowie bei der jeweiligen Laborarbeit war diese Studie durchführbar.

Mein großer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius Wolff Instituts, allen voran Dr. rer. nat. Anke Dienelt. Ohne ihr ausdauerndes Engagement in der Vermittlung von wissenschaftlichem Hintergrundwissen und in der Durchführung der PCR wäre das wissenschaftliche Arbeiten nicht möglich gewesen. Durch ihre Hilfe wuchs meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten und bereitete mir die tägliche Arbeit im Labor große Freude.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Gabriela Korus für die Einarbeitung und unermüdliche Unterstützung bei der Immunhistochemie. Niemand hätte mich besser während der histologischen Laborarbeit begleiten können.

Ein weiterer großer Dank geht an Dr. rer. medic. Franka Klatte-Schulz, Dr.-Ing. Andrea Sass, Dr. rer. medic. Janosch Schoon, Zienab Kronbach und Mario Thiele für die Hilfe bei der PCR und in der Bildanalyse.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Torsten und Petra Schrödter. Sie haben mir nicht nur mein Studium überhaupt erst ermöglicht, sondern mich während der vielen Jahren meiner Dissertation stets unterstützt, motiviert und ermutigt. Ich bedanke mich bei meinem Bruder Ronny Schrödter, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Andreas Igel für die Unterstützung und Motivation beim Schreiben der Dissertation. Ich danke allen meinen Freunden für jegliche Unterstützung in den letzten Jahren, ohne deren Ablenkung in der Freizeit ein solch großes und arbeitsintensives Forschungsprojekt nicht möglich gewesen wäre.