

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

Der Effekt der lokalen Applikation von  
thrombozytenreichem Plasma, mesenchymalen  
Stromazellen und ihrer Kombination auf die Heilung  
avaskulärer Meniskusrisse sowie auf TGF- $\beta$ 1 und FGF-2

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Raphael-Donatus Hein  
aus Stuttgart

Datum der Promotion: 16.06.2018

In memoriam

*Schläft ein Lied in allen Dingen,  
Die da träumen fort und fort,  
Und die Welt hebt an zu singen,  
Triffst du nur das Zauberwort.*

Joseph F. v. Eichendorff

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstracts</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
<b>2 Zielsetzungen und Hypothesen</b> .....	<b>25</b>
<b>3 Methodik</b> .....	<b>26</b>
3.1 Anästhesie und Operation .....	26
3.2 Herstellung des thrombozytenreichen Plasmas (PrP) .....	28
3.3 Manuelle Thrombozytenzählung.....	29
3.4 Stammzellentnahme und -kultur .....	30
3.5 Euthanasie und Probengewinnung .....	31
3.6 Histologie .....	32
3.7 Quantifizierung von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2.....	37
3.8 Statistische Analyse .....	41
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1 Thrombozytenkonzentration .....	42
4.2 Verlaufparameter.....	42
4.3 Makroskopische Heilung .....	43
4.4 Histologie .....	44
4.5 Immunhistochemie TGF- $\beta$ 1 .....	45
4.6 Quantifizierung von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2.....	49
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>52</b>
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
<b>8 Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>84</b>

<b>9 Lebenslauf.....</b>	<b>85</b>
<b>10 Vollständige Publikationsliste.....</b>	<b>86</b>
<b>11 Danksagung.....</b>	<b>87</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

A.	Arteria
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serumalbumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF-2	Fibroblast growth factor - 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
ICD	International statistical classification of diseases and related health problems
IGF-1	Insulin-like growth factor - 1
IHC	Immunhistochemie
IKDC	International knee documentation committee
IQR	Interquartilspanne (eng. <i>interquartile range</i> )
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAP	Latency associated peptide
Lig.	Ligamentum
Min.	Minute
Mio.	Million
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (eng. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stromazellen
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatpuffer (eng. <i>phosphate buffered saline</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p.o.	postoperativ

PrP	Thrombozytenreiches Plasma (engl. <i>platelet-rich plasma</i> )
ROI	<i>Region of interest</i>
RT-PCR	Reverse Tanskriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (eng. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
s.c.	subkutan
SDF-1	Stromal cell-derived factor - 1
TBS	TBS-Puffer (eng. <i>Tris-buffered saline</i> )
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor - alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 1:	Vaskularisierung und Zellpopulationen im humanen Meniskus.....	13
Abb. 2:	Zonierung des medialen und lateralen Meniskus nach Cooper.....	14
Abb. 3:	Verschiedene Formen von Meniskusverletzungen.....	16
Abb. 4:	Bioresorbierbarer, ankerähnlicher Haken zur temporären Meniskusrefixation.....	17
Abb. 5:	Darstellung der Meniskusnaht am Beispiel einer <i>outside-in</i> Naht.....	17
Abb. 6:	TGF-Signaltransduktionsweg.....	19
Abb. 7:	FGF-Signaltransduktionsweg.....	20
Abb. 8:	Als Interponat und Trägermaterial für die MSCs dienender Scaffold aus Kollagen.....	21
Abb. 9:	Operationssitus.....	27
Abb. 10:	Schematische Darstellung der PrP-Produktion.....	28
Abb. 11:	Defektverlauf und Aufteilung des Meniskus für die biochemische und (immun-)histologische Analyse.....	30
Abb. 12:	Schematische Darstellung eines operierten Meniskus mit Defektverlauf und <i>regions of interest</i> (ROI).....	35
Abb. 13:	Prinzip des Sandwich-ELISA.....	38
Abb. 14:	Thrombozytenkonzentration im Vollblut bzw. PrP.....	41
Abb. 15:	Aufsicht auf den <i>Meniscus medialis</i> acht Wochen postoperativ.....	42
Abb. 16:	<i>Meniscus medialis</i> acht Wochen postoperativ nach der Präparation..	42
Abb. 17:	Ergebnisse des histologischen Scorings.....	43
Abb. 18:	Anstiegsmediane und Einzelwerte pro Tier positiv gefärbter Zellen in Abhängigkeit der Therapiegruppe.....	44
Abb. 19:	Beispielhaft immunhistochemisch gegen TGF- $\beta$ 1 gefärbter Radiärschnitt eines <i>Meniscus medialis</i> .....	45
Abb. 20:	Relative Veränderung TGF- $\beta$ 1 positiver Zellen zwischen den operierten und kontralateralen Menisken.....	48
Abb. 21:	TGF- $\beta$ 1 Konzentration der Menisken der fünf Therapiegruppen.....	49
Abb. 22:	FGF-2 Konzentration der operierten als auch kontralateralen Menisken.....	50

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1:	Aufteilung der Behandlungsgruppen.....	26
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Expansionsmediums.....	29
Tabelle 3:	Ablauf der Rehydrierung bzw. des Entwässerns.....	31
Tabelle 4:	Items des Meniskuscores.....	32
Tabelle 5:	TBS-Puffer.....	33
Tabelle 6:	Chromogenpuffer.....	34
Tabelle 7:	Zusammensetzung des Lysepuffers.....	36
Tabelle 8:	Mediandauer der Ent- und Teilbelastung sowie Zeit bis zur Vollbelastung der fünf Therapiegruppen.....	42
Tabelle 9:	Einzelwerte und statistische Kennzahlen des histologischen Scorings.....	43
Tabelle 10:	Veränderung und Signifikanz TGF- $\beta$ 1 positiv gefärbter Zellen aller Zonen im Vergleich zu den kontralateralen Menisken.....	44
Tabelle 11:	Veränderung und Signifikanz der TGF- $\beta$ 1 positiv gefärbten Zellen der vaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken.....	46
Tabelle 12:	Veränderung und Signifikanz der TGF- $\beta$ 1 positiv gefärbten Zellen der läSIONSNAH - vaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken.....	46
Tabelle 13:	Anstieg und Signifikanz der TGF- $\beta$ 1 positiv gefärbten Zellen in der läSIONSNAH - avaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken.....	47
Tabelle 14:	Anstieg und Signifikanz der TGF- $\beta$ 1 positiv gefärbten Zellen der avaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken.....	47
Tabelle 15:	TGF- $\beta$ 1 Konzentration der operierten und kontralateralen Menisken..	49
Tabelle 16:	FGF-2 Konzentration der operierten und kontralateralen Menisken....	50



# ABSTRACTS

---

## Deutsche Version

**Einleitung:** Die inneren zwei Drittel (avaskulärer Anteil) des Meniskus weisen eine schlechtere Heilungsrate im Vergleich zum peripheren, vaskularisierten Drittel auf. In Tierversuchen konnte für thrombozytenreiches Plasma (PrP) und mesenchymale Stromazellen (MSCs) gezeigt werden, dass sie die Heilungstendenz avaskulärer Meniskuläsionen partiell verbessern, ohne jedoch konstant zur Heilung zu führen. Die kombinierte Anwendung von PRP + MSCs zeigte *in vitro* eine Potenzierung der Heilungseffekte. Eine wichtige Rolle wird hierbei (den im PrP besonders hoch konzentrierten) Wachstumsfaktoren zugeschrieben: Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) und Fibroblasten Growth Factor-2 (FGF-2) erhöhen u.a. die Produktion extrazellulärer Matrix, wirken aber auch als Signalmolekül auf MSCs. Das Ziel dieser Studie war es, den Effekt von PrP, MSCs und der Kombination aus beidem auf die Meniskusheilung und die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 zu untersuchen.

**Methodik:** Ein longitudinaler Riss wurde in den avaskulären Teil der Innenmenisken von 30 Schafen gesetzt und in fünf unterschiedlichen Therapieverfahren behandelt (n = 6 pro Gruppe): (1) Naht, (2) Scaffold, (3) Naht + Scaffold + PrP, (4) Naht + Scaffold + MSCs, und (5) Naht + Scaffold + PrP + MSCs. Die kontralateralen Menisken dienten als individuelle Referenz für die Untersuchung der Wachstumsfaktorveränderung. Nach acht Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die Heilung makroskopisch beurteilt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 mittels ELISA bestimmt. Radiäre Meniskusschnitte wurden immunhistochemisch gegen TGF- $\beta$ 1 gefärbt und positiv gefärbte Zellen in der vaskulären, periläsionalen und avaskulären Zone gezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxon - Tests sowie der Kruskal - Wallis - und Dunn - Tests überprüft. Das Signifikanzlevel betrug  $p \leq 0,05$ .

**Ergebnisse:** Makroskopisch ließ sich nach acht Wochen in keiner Gruppe eine Heilung nachweisen. Immunhistochemisch deutete sich in allen operierten Gruppen eine Zunahme von TGF- $\beta$ 1 positiven Zellen im Vergleich zu den kontralateralen Menisken an. Dies konnte mittels ELISA für die (2) Scaffold- und (3) PrP-Gruppe bestätigt werden. Die Konzentrationen von FGF-2 in der Naht- und PrP + MSC-Gruppe waren signifikant

verringert. Zwischen den Therapiegruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

**Schlussfolgerungen:** Weder die isolierte, lokale Applikation von PrP oder MSCs noch die Kombination aus beidem verbesserten die Heilung der avaskulären Meniskusrisse. Im Vergleich zu den nicht operierten Menisken ließen sich in den operierten Menisken, unabhängig von der Therapie, acht Wochen postoperativ erhöhte Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und verringerte Konzentration von FGF-2 immunquantitativ nachweisen.

## English version

**Introduction:** Tears of the inner two thirds (avascular zone) of the meniscus poorly heal compared to tears in the peripheral (vascular) third. Growth factors play an essential role for healing. Recently, animal studies furnished evidence for both platelet-rich plasma (PrP) and mesenchymal stromal cells (MSCs) to improve healing of meniscus tears in the avascular zone. Furthermore, *in vitro* studies showed that the combination of PrP and MSCs increased their positive effect on healing. One reason for the additive effect is that growth factors like Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), which are liberally available in platelets, stimulate synthesis of extracellular matrix and differentiation of MSCs. Furthermore, both growth factors have been identified to improve healing of meniscal tears. The aim of the present study was to evaluate the effect of PrP, MSCs and the combination of both on meniscal healing *in vivo* and to quantify levels of TGF- $\beta$ 1 and FGF-2.

**Methods:** In five groups, each with six sheep, a longitudinal tear in the avascular region of medial menisci was created and treated with: (1) suture, (2) suture + scaffold, (3) suture + scaffold + PrP, (4) suture + scaffold + MSCs, and (5) suture + scaffold + PrP + MSCs. Contralateral, healthy menisci served as reference for the individual difference in growth factor levels. Euthanasia was performed after eight weeks and macroscopic healing was evaluated. Levels of TGF- $\beta$ 1 and FGF-2 were quantified using an ELISA. Radial menisci slices were stained immunohistochemically (IHC) for TGF- $\beta$ 1, subdivided into vascular, perilesional and avascular zones and stained cells were counted. Statistical analysis was performed with Kruskal - Wallis -, Wilcoxon- and Dunn-Tests. Significance level was set to  $p \leq 0.05$ .

**Results:** Macroscopic healing was not observed in any group after eight weeks. IHC indicated an increase of TGF- $\beta$ 1 in every group, which was confirmed by ELISA for group (2) scaffold and (3) PrP. FGF-2 levels were decreased in every group compared to the contralateral menisci, but statistically significant only in group (1) suture and group (5) PrP + MSCs. No significant differences were found between the established treatment groups.

**Conclusion:** Neither PrP nor MSCs nor the combination of both improved healing of avascular meniscus tears. Increased levels of TGF- $\beta$ 1 were detected eight weeks after surgery whether PrP and/or MSCs were added or not. Levels of the anabolic growth factor

FGF-2 were decreased after eight weeks no matter whether MSCs and/or PrP were applied.

# 1 EINLEITUNG

---

Die zunehmende Beliebtheit von Sportarten mit einem hohen Verletzungsrisiko insbesondere der unteren Extremität (u.a. Fußball, Skifahren, Bouldern, Parcours) sowie die sich ständig verbessernde radiologische Diagnostik mittels MRT haben zu einer seit Jahren ansteigenden Zahl operativer Eingriffe am Kniegelenk geführt (1). Rund 45 % der Knieverletzungen imponieren als internes Kniegelenkstrauma (2). Untersuchungen an US-amerikanischen Highschool-Athleten zeigen eine Inzidenz von 5,9 Meniskusverletzungen pro 100.000 Sparteinsätzen (3). Epidemiologische Daten bezüglich der Beteiligung des *Meniscus medialis* schwanken zwischen 25 % und 75 % (2, 4). Damit liegen traumatische Verletzungen des medialen Meniskus an dritter Stelle nach einem (Teil-)Riss des *Lig. collaterale tibiale* sowie des *Lig. cruciatum anterius* (5). Daher ist eine Operation an den Menisken ein in Deutschland sehr häufig durchgeführter Eingriff. Im Jahr 2015 wurden in Deutschland rund 261.500 vollstationäre arthroskopische Operationen an den Gelenkknorpeln und den Menisken durchgeführt: 9.600 hiervon zur Versorgung eines akuten Meniskusrisses (ICD S83.2) und weitere 31.000 zur Behandlung einer Meniskusschädigung durch einen alten Riss oder eine alte Verletzung (ICD M23.2) (Daten aus der Datenbank des Statistischen Bundesamtes und der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2015, <http://www.gbe-bund.de>).

Anatomisch handelt es sich bei den *Menisci medialis et lateralis* um halbmondförmige, von peripher nach zentral keilförmig verlaufende Strukturen, welche zwischen der jeweiligen Femurkondyle und dem Tibiaplateau eingebettet sind. Der *Meniscus medialis* ist 40 bis 45 mm lang und etwa 27 mm breit. Damit ist er etwas größer als der *Meniscus lateralis* (Länge: 32 bis 35 mm, Breite: 26 bis 29 mm) (6). Die anterioren und posterioren Enden der Menisken (Meniskusvorder- und -hinterhorn) gehen in bandartige Strukturen über, welche das jeweilige Meniskushorn mit dem Tibiaplateau verbinden. Diese Meniskuswurzeln und der Bandapparat des Kniegelenks halten die Menisken insbesondere während der Bewegung in Position: Die tiefen Faseranteile des *Lig. collaterale tibiale* sind mit dem *Meniscus medialis* verbunden. Das *Lig. transversum genus* verbindet das vordere Horn des *Meniscus medialis* mit dem des *Meniscus lateralis*. Das Hinterhorn des *Meniscus lateralis* wird durch die inkonsistent angelegten *Ligg. meniscofemorale anterius et posterius* (Humphry - und Wrisberg - Band), welche vom Meniskushinterhorn zum *Condylus femoris medialis* ziehen, zusätzlich zur Wurzel stabilisiert (7).

Von großer therapeutischer Relevanz ist die Vaskularisierung der Menischi. Aus der *A. poplitea* gehen medial die *A. superior medialis genus* und *A. inferior medialis genus* ab und bilden medial einen perimeniskealen Kapillarplexus (8). Hiervon penetrieren Gefäßäste das Meniskusstroma und versorgen dieses mit Blut. Zusätzlich verlaufen an den meniskofemorale Bändern Kapillaräste, welche das Meniskusstroma an ihren Ansatzstellen penetrieren und kurze Gefäßäste in die Meniskusperipherie abgeben. Die Vaskularisierung des *Meniscus lateralis* ähnelt der des *Meniscus medialis* stark. Von der *A. inferior medialis genus* penetrieren kurze Äste das Meniskusstroma. Hierdurch haben die peripheren 10 bis 25 % des *Meniscus lateralis* Anschluss an das Gefäßsystem. Zusätzlich penetrieren im Bereich des anterioren und posterioren Meniskushorns kurze Gefäßäste aus der vaskularisierten *Membrana synovialis* das Meniskusstroma.

Histologisch unterscheidet man von peripher nach zentral zwischen einer vaskulären rot-roten Zone, einer variabel ausgebildeten rot-weißen Zone und einer avaskulären, zentralen, weiß-weißen Zone (8, Abb. 1). Finden sich nach der Geburt noch Gefäße in allen Meniskuszonen, nimmt diese Versorgung während des Wachstums ab (9). Im adulten Meniskus sind nur noch die peripheren 10 % (*Meniscus lateralis*) bzw. 25 % (*Meniscus medialis*) vaskularisiert. Somit erfolgt in der peripheren Zone die Versorgung mit Nährstoffen hauptsächlich über das Blut, wohingegen die avaskuläre Zone hauptsächlich *per diffusionem* mit Nährstoffen aus der Synovialflüssigkeit versorgt wird.

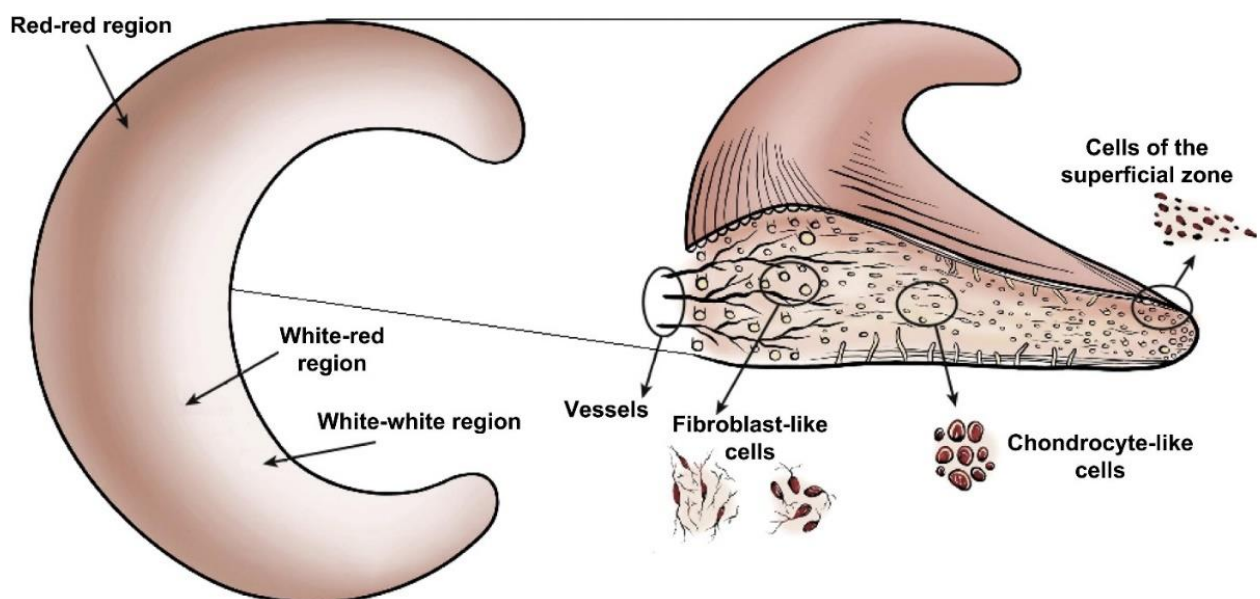


Abb. 1: Vaskularisierung und Zellpopulationen im humanen Meniskus (Mit freundlicher Genehmigung von Makris E *et al.*, Biomaterials, 2011 [10])

Zur klinischen Anwendung haben Cooper *et al.* auf Basis der Gefäßversorgung des Meniskus ein klinisch relevantes Klassifikationssystem etabliert (11). Es werden vier zirkumferent verlaufende Zonen abgegrenzt, Cooper Zone 0 entspricht dem meniskokapsulären Übergang, Zone 1 dem peripheren Drittel, Zone 2 der Übergangszone und Zone 3 der avaskulären, zentralen Zone. Die postero-anteriore Ausrichtung wird mit den Buchstaben A bis C angegeben (Abb. 2).

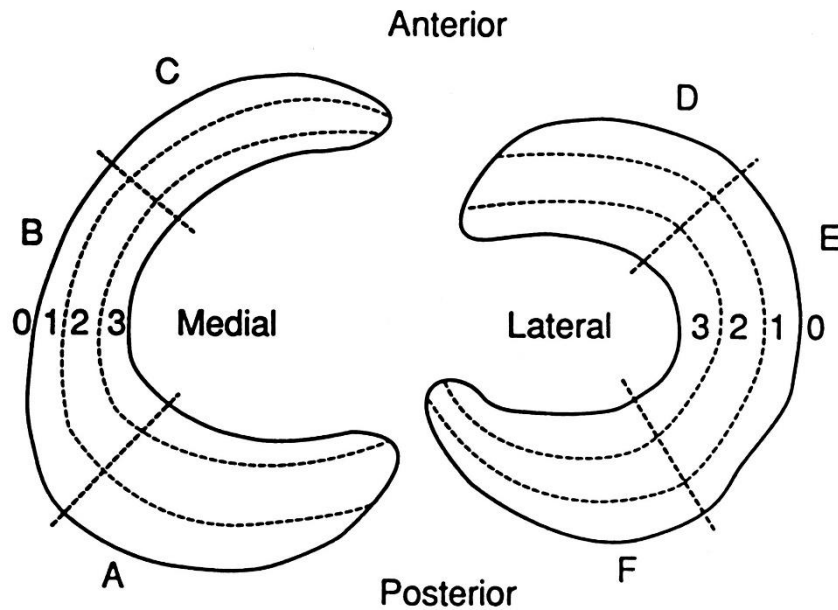


Abb. 2: Zonierung des medialen und lateralen Meniskus nach Cooper (mit freundlicher Genehmigung von van Trommel *et al.*, Am J Sports Med, 1998 [12])

Die Zonen unterscheiden sich auch histologisch. Die Zellen der vaskulären Zone weisen eine ovale, fusiforme Struktur auf und ähneln Fibroblasten (Abb. 1). Sie werden daher als Fibroblasten-ähnliche Zellen bezeichnet. Die EZM besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I, welches sich häufig in zugbelasteten Gewebe wie Sehnen nachweisen lässt (13). Die Zellen der avaskulären Zone imponieren eher rund und sind in EZM eingebettet. Da sich in dieser vor allem Aggrecan und Kollagen Typ II nachweisen lassen, ähnelt die innere Zone hyalinem Knorpel. Aus diesem Grund werden Zellen der avaskulären Zone als Fibrochondrozyten bzw. Chondrozyten-artige Zellen bezeichnet (10). Der Faserverlauf ist in mehrere Schichten aufgeteilt: Typ I Kollagenfasern verlaufen zum einen zirkumferent (parallel zur Meniskusperipherie) im Inneren des Meniskus. Oberflächlich verlaufen die Fasern eher radiär. Die strukturelle Integrität zwischen beiden Schichten wird durch eingebettete Verbindungsfasern ermöglicht (14).

Biochemisch bestehen etwa 28 % des Feuchtgewichts des Meniskus aus organischen Bestandteilen, dessen Hauptbestandteil Kollagen darstellt (75 %) (15). Als weitere Bestandteile der EZM folgen Glukosaminoglykane (GAGs), hier insbesondere Chondroitin-6-Sulfat und Dermatan-sulfat (10). Sie binden Wasser und ermöglichen es, die auf die Menisken einwirkenden tibiofemorale Kräfte zu absorbieren (s.u.).

Die Funktion eines Meniskus wird gerne mit der eines Kissens verglichen: Durch die hohe Ladungsdichte der negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen der GAGs wird osmotisch Wasser eingelagert und eine axiale Kraftabsorption der Menisken ermöglicht. Zusätzlich können durch die radiäre Faseranordnung axial einwirkende Kräfte in eine horizontale Ringspannung („*hoop stress*“) transformiert werden (10). Erst diese anatomische Besonderheit ermöglicht eine suffiziente Verteilung axial auftretender Spitzenkräfte (16).

Um die verschiedenen Formen der Meniskusrisse einzuteilen, werden diese unter anderem nach ihrer Verlaufsrichtung klassifiziert (17; 18):

- **Vertikale Risse**

- **Longitudinalriss:** Der Riss verläuft vertikal entlang der Ausrichtung der longitudinalen Meniskusfasern.
- **Radiärriss:** Der Riss verläuft vertikal radiär von zentral nach peripher und unterteilt das Gewebe in einen anterioren und posterioren Anteil. Als Sonderform gilt der Korbhenkelriss, bei dem der zentrale Anteil in die *Area intercondylaris* luxiert ist und durch den *Condylus femoris* an der Reposition gehindert wird.
- **Horizontalriss:** Der Riss verläuft horizontal von peripher nach zentral und unterteilt den Meniskus in einen superioren und inferioren Anteil.
- **Lappenriss (engl. „flap“):** Der Riss beginnt meist zentral und setzt sich bogenförmig in die Peripherie fort, ein Lappen ragt in das Gelenk hinein.
- **Komplexer Riss:** Der Riss verläuft in unterschiedlichen Ebenen und ist meist eine Kombination der vorangegangenen Risstypen.



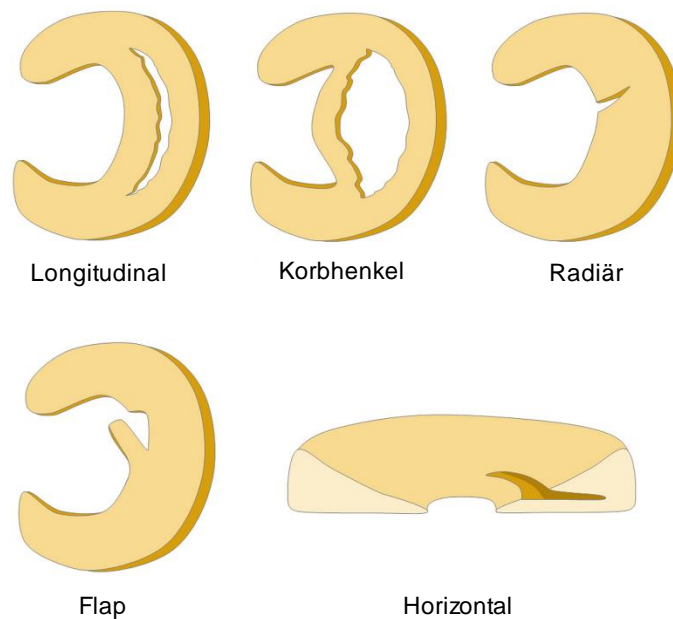


Abb. 3: Verschiedene Formen von Meniskusverletzungen  
(Mit freundlicher Genehmigung von Shannon NE *et al.*, J Biomech, 2015 [19])

Die Form und damit die zusammenhängende Ätiologie des Meniskusrisses spielen eine entscheidende Rolle für die Therapie. Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass Horizontalläsionen eher degenerativen Ursprungs sind, wohingegen traumatisch bedingte Meniskusverletzungen häufig als longitudinal oder radiär verlaufende Risse imponieren (20). Zur Therapie klinisch relevanter Meniskusrisse wurde in der Vergangenheit eine totale Meniskektomie propagiert. Diese zeigte eine kurzfristige klinische Besserung, führte jedoch zur vorzeitigen Gonarthrose (21, 22). Als schonenderes Verfahren wurde daraufhin fast ausschließlich eine partielle Meniskektomie durchgeführt. Auch diese zeigte sehr gute klinische Frühergebnisse: Sechs Monate nach einer partiellen Meniskektomie des medialen Meniskus konnte eine Verbesserung des IKDC-2000 Fragebogens von präoperativ 49,8 % auf 90,4 % sechs Monate postoperativ erreicht werden (23, 24). Ebenfalls gegenüber achtwöchiger intensiver Physiotherapie zeigte die partielle Meniskektomie bei traumatischen instabilen Meniskusrissen ihre Überlegenheit (25).

In den darauffolgenden Jahrzehnten zeigten jedoch mehrere radiologische Nachuntersuchungen, dass auch die partielle Meniskektomie, je nach Ausmaß der Resektion, das Risiko einer degenerativen Veränderung im Sinne einer Gonarthrose bis zu vervierfachen kann (17, 26). Biomechanische Untersuchungen verdeutlichten, dass

selbst eine partielle Meniscektomie den femoralen Auflagedruck im Vergleich zum gesunden Meniskus verdoppelt (27). Dies stellt eine mögliche Ursache für die beschleunigte Entwicklung einer Gonarthrose dar und limitiert den Langzeiterfolg einer partiellen Meniscektomie. Daraufhin wurden Verfahren entwickelt, welche durch eine Adaption der Wundränder die Heilung verbessern und die biomechanische Integrität des Meniskus wiederherstellen. Eine Refixation ist einerseits durch ankerähnliche Hakensysteme möglich (T-Fix, Meniscus Arrow, Abb. 4). Aufgrund der Möglichkeit einer Dislokation und des Auftretens von Knorpelschäden wird deren Einsatz jedoch aktuell nicht mehr empfohlen (29). Die Versorgung medialer Meniskusverletzungen erfolgt nun durch unterschiedliche Nahttechniken (*inside-out*, *outside-in* oder *all-inside*, Abb. 5). Zwischen den einzelnen Nahttechniken konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der klinischen Ergebnisse festgestellt werden (30). Insgesamt beträgt die Versagensrate der Refixation je nach Literatur 12 - 48 % (31, 32).



Abb. 4: Bioresorbierbarer, ankerähnlicher Haken zur temporären Meniskusrefixation (Conmed Linvatec, mit freundlicher Genehmigung von Stärke *et al.*, Arthroscopy, 2009 [28])

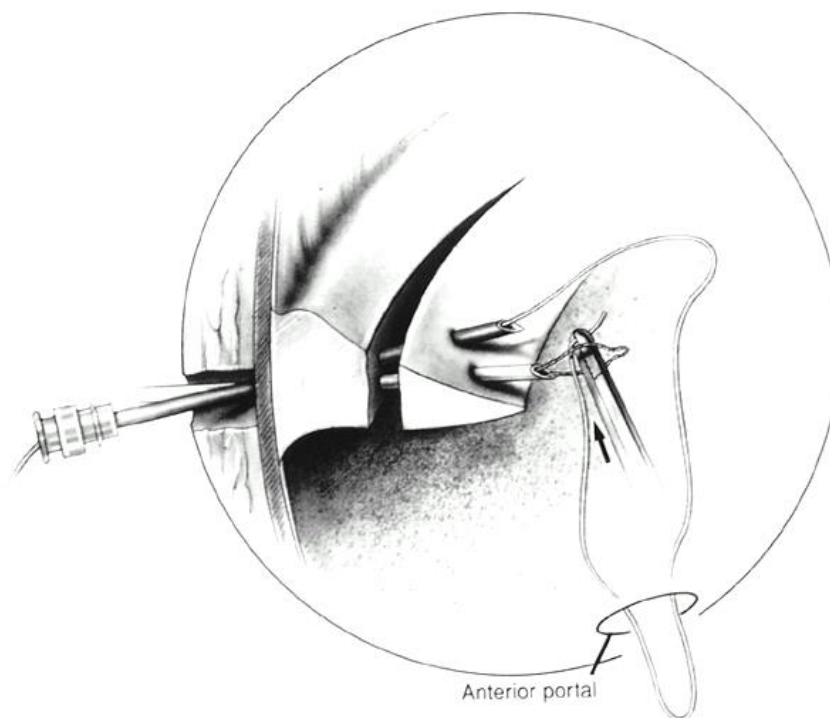


Abb. 5: Darstellung der Meniskusnaht am Beispiel einer *outside-in* Naht (mit freundlicher Genehmigung von Rodeo *et al.*, JBJS, 2000 [33])

Unabhängig von dem Therapieregime ist für den Behandlungserfolg einer Meniskusverletzung die Lokalisation des Risses entscheidend. Risse in der avaskulären Zone zeigen eine signifikant geringere Heilungsrate im Vergleich zu Rissen in der vaskulären Zone (34). Es wird davon ausgegangen, dass das bradytrophe Milieu der avaskulären Region hierfür verantwortlich ist (35). Weitere Ursachen für die hohe Spanne der Erfolgsrate sind neben einem unterschiedlich hohen Ausmaß an Begleitverletzungen und dem unterschiedlich langen Zeitraum zwischen Unfall und operativer Versorgung auch die unterschiedlichen Parameter, mit denen der Erfolg überprüft wurde (Rearthroscopie als Goldstandard vs. MRT-Untersuchungen, klinische Tests vs. Fragebögen zur Nachuntersuchung). Wurde der Erfolg medialer Meniskusnähte mittels Rearthroscopie untersucht, zeigte sich im Mittel eine Versagensrate von ca. 25 % (36). Es besteht also noch ein deutliches Potential, die Heilungsrate von Meniskusverletzungen, insbesondere in der avaskulären Zone, zu verbessern. Hierzu wurden auch mehrere bioregenerative Ansätze verfolgt, um die Heilungschance zu erhöhen. Zwei sehr gut untersuchte Ansätze hierzu sind zum einen die lokale Anwendung von plättchenreichem Plasma (PrP), zum anderen lokal applizierte mesenchymale Stromazellen (MSCs) (37, 38).

Für die Geweberegeneration ist das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren eine *conditio sine qua non*. Sie werden durch das in den Defekt einströmende Blut eingeschwenkt sowie durch lokale Zellen sezerniert und interagieren mit den lokalen Entzündungszellen und den umgebenden Stromazellen. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren zählen in Bezug auf die Meniskusheilung TGF- $\beta$ 1 und FGF-2, welche *in vitro* die Proteoglykansynthese medialer Meniskuszellimplantate verdoppelten und die Proliferationsrate von (Fibro-)Chondrozyten steigerten (39, 40). Für den erfolgreichen Ablauf einer Wundheilung sind jedoch nicht ein oder zwei Wachstumsfaktoren allein verantwortlich, vielmehr handelt es sich um eine Art konzertierte Aktion, bei der zu unterschiedlichen Zeitpunkten Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. Erstmals 1983 als Fibroblasten stimulierender Faktor beschrieben, ist TGF- $\beta$ 1 durch pleiotrope Effekte gekennzeichnet (41). Neben einer Rolle als ontogenetischer Gewebsmediator (42) nimmt TGF- $\beta$ 1 auch eine wichtige Funktion als induzierbarer Wachstumsfaktor im Rahmen der Wundheilung wahr (43). Aus biochemischer Sicht ist TGF- $\beta$ 1 ein Polypeptid, welches in seiner aktiven Form aus 112 Aminosäuren besteht. Es wird als Propeptid synthetisiert: N-terminal befindet sich das Latency Associated Peptide (LAP), mit dem TGF- $\beta$ 1 einen Komplex eingeht. Das LAP ist

kovalent an ein Bindungsprotein gebunden (Latent TGF- $\beta$ 1 Binding Protein [LTBP]), welches wiederum kovalent an Proteine der EZM gebunden ist (z. B. Fibronectin, siehe Abb. 6). Die EZM vieler Gewebe bildet somit eine Art Speicher für TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 bindet als Ligand an einen Typ II Rezeptor (T $\beta$ R-II). Der Komplex aus gebundenem Ligand und Rezeptor kann nun den Typ I Rezeptor (T $\beta$ R-I) rekrutieren und formiert den eigentlichen heterotetrameren TGF- $\beta$ 1-Rezeptor. Da der T $\beta$ R-II zugleich auch eine Kinaseaktivität aufweist, ist er in der Lage, den T $\beta$ R-I an Serinresten zu phosphorylieren. Der hierdurch aktivierte Rezeptor weist nun ebenfalls eine Kinaseaktivität auf und phosphoryliert das intrazellulär vorliegende Protein SMAD (44). Phosphoryliertes SMAD 2/3 rekrutiert intrazelluläres SMAD 4 und diffundiert daraufhin in den Zellkern. Dort bindet es mit einer Domäne an die Promotorregion von Genen der extrazellulären Matrix, unter anderem Kollagen Typ I und II, und induziert deren Translation.

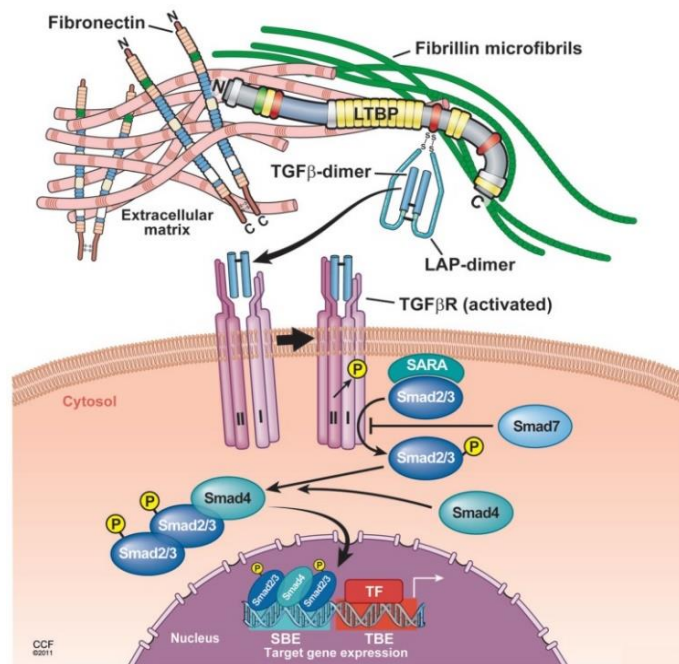


Abb. 6: TGF-Signaltransduktionsweg (mit freundlicher Genehmigung von Hayashi K *et al.*, Front Physiol, 2012 [45])

Neben TGF- $\beta$ 1 spielt auch FGF-2 eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktor im Rahmen der Meniskusheilung. FGF-2 ist der bedeutendste Vertreter seiner Familie der bisher 22 identifizierten *Fibroblast Growth Factors*, da er als einziger an alle vier FGF-Rezeptoren binden kann (46). FGF-2 ist ein Polypeptid aus 155 Aminosäuren und wird unter physiologischen Bedingungen nicht von Zellen sezerniert. Kommt es unter anderem durch Hypoxie oder mechanischen Stress zur Freisetzung von FGF-2, bindet dies an den

FGF-Rezeptor. Dieser ist im Gegensatz zum TGF- $\beta$  Rezeptor intrazellulär mit einer Tyrosinkinase gekoppelt. Die Bindung des Wachstumsfaktors führt somit zu einer zytosolischen Autophosphorylierung. Hierdurch können intrazelluläre Signalmoleküle an den Rezeptor binden und aktivieren unter anderem die RAS-Kinase. Deren Aktivierung initiiert den RAS-RAF-MAPKK-MAPK-Weg (Abb. 7). An dessen Ende kommt es zur Aktivierung des Proto-Onkogens c-FOS, welches in den Nucleus diffundiert und die Transkription proliferationsfördernder Gene hochreguliert. Mehrere Untersuchungen konnten *in vitro* zeigen, dass FGF-2 die Proliferationsrate humaner Meniskuszellen fördert und antiapoptotisch wirkt (48, 49). In einer Studie an ovinen Meniskuszellimplantaten konnte gezeigt werden, dass Zellen der avaskulären Zone auf die Zugabe von FGF-2 mit einer verstärkten Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrix reagierten (50).

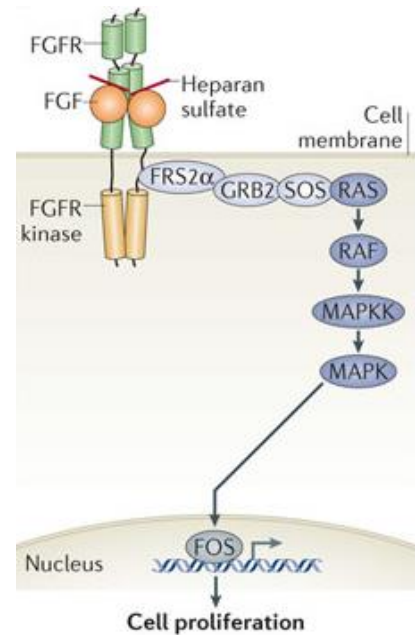


Abb. 7: FGF-Signaltransduktionsweg (Mit freundlicher Genehmigung von Goetz R *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2013 [47])

Eine vollständige Heilung von Meniskusrissen in der avaskulären Zone des *Meniscus medialis* konnte jedoch durch die alleinige Anwendung von Wachstumsfaktoren bisher nicht erreicht werden (51). Daher wurde in den vergangenen Jahren intensiv an Therapiealternativen geforscht. Bereits gegen Ende der 60er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden erstmals MSCs aus humanem Knochenmark isoliert (52). In den darauffolgenden Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass MSCs ein hohes regeneratives und parakrines Potential besitzen und sich adipogen, osteogen und chondrogen differenzieren können (53). Die Terminologie der MSCs wurde in einer Konsensuskonferenz neu festgelegt (54). Seitdem unterscheidet man mesenchymale Stammzellen, die *per definitionem* nur *in vivo* auftreten, von mesenchymalen Stromazellen. Hierunter versteht man Zellen, die Eigenschaften von Stammzellen besitzen (z. B. Differenzierungsfähigkeit in adipogene, chondrogene und osteogene Zelllinien), jedoch *in vitro* kultiviert wurden und als definierende Eigenschaft neben der angesprochenen Differenzierungsfähigkeit eine Plastikadhärenz sowie spezifische Oberflächenmarker aufweisen (55). Die Abkürzung MSC gilt weiterhin für beide Zelltypen. Man nimmt im Allgemeinen an, dass MSCs folgendermaßen zur Heilung beitragen können (56):

- MSCs **differenzieren** am Ort der Applikation in das Umgebungsgewebe und bilden einen „Reparaturkeim“.
- MSCs **ergänzen** ortsständige Stammzellen und verschieben das Zellgleichgewicht zumindest kurzfristig in Richtung Proliferation.
- MSCs **fusionieren** mit ortsständigen Zellen.
- MSCs **aktivieren** parakrin ortsständige bzw. lokal applizierte Stromazellen.

Die Fähigkeit oviner MSCs zur Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Zellreihen wurde bereits bestätigt (57). *In vitro* wurde nachgewiesen, dass die Zugabe von undifferenzierten, autologen MSCs zu Meniskuszellexplantaten zu einer Verstärkung der Synthese extrazellulärer Matrix führte (58). Neben der Möglichkeit, MSCs als Suspension intraartikulär zu injizieren, wurde auch die Möglichkeit untersucht, MSC-beladene Trägermaterialien lokal zu applizieren: Bei diesen Trägermaterialien handelt es sich um eine dreidimensionale Matrix aus Strukturproteinen (z. B. Hyaluronan, Kollagen), die als Gerüst für aus der Umgebung einwandernde oder applizierte Zellen dienen soll. Im Laufe der Heilung soll es zur Anheftung von Zellen an die Proteinstruktur kommen und im Anschluss zur Auflösung der Matrix. Erste *in vitro* Ergebnisse waren vielversprechend: Wurde zwischen zwei Schichten aus avaskulären, ovinen Meniskuszellen entweder nur ein Kollagen - Scaffold implantiert oder dieser vorher mit autologen, undifferenzierten MSCs besiedelt, zeigte der MSC-beladene Scaffold eine Verbesserung der zellulären Integration und der biomechanischen Belastbarkeit (34).

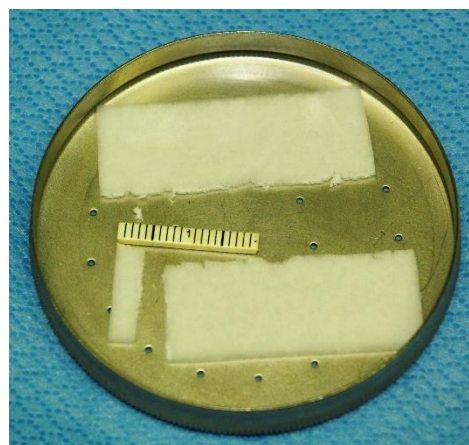


Abb. 8: Als Interponat und Trägermaterial für die MSCs dienender Scaffold aus Kollagen (links unten auf Defektgröße zugeschnittener Scaffold)

Ein weiterer Therapieansatz zur Verbesserung der Gewebeheilung ist der Einsatz von thrombozytenreichem Plasma (PrP). Hierbei handelt es sich um (autologes) Plasma, dessen Thrombozytenkonzentration durch Zentrifugation auf Werte oberhalb des jeweiligen Serumwertes erhöht wurde (59). Die wissenschaftliche Rationale hinter dem Einsatz von PrP stellt die Tatsache dar, dass Thrombozyten ein natürliches Reservoir an Wachstumsfaktoren als essentielle Kofaktoren der Heilung darstellen: Jeder humane Thrombozyt enthält zwischen 50 bis 80  $\alpha$ -Granula (60). Neben thrombogenen und inflammatorischen Zytokinen enthalten  $\alpha$ -Granula hochkonzentriert pro-angiogene sowie wundheilungsfördernde Proteine, darunter TGF- $\beta$ 1, FGF-2, VEGF, IGF-1 und PDGF (61). Außerdem enthält jeder Thrombozyt sog. *dense* Granula, in welchen unter anderem Adenosindi-/triphosphat, Calcium, Serotonin und Noradrenalin gespeichert sind (60). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von PrP in eine Kultur avaskulärer Kaninchenmeniskuszellen zu einer Verstärkung der Synthese extrazellulärer Matrix (z. B. Dekorin und Biglykan) führt (62). In derselben Studie wurde durch die *in vivo* Zugabe von PrP in einen Stanzdefekt der avaskulären Zone eine histologisch verbesserte Heilung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. Drei Faktoren definieren hauptsächlich den Charakter des PrP (63):

- **Thrombozytenkonzentration:** Ein optimaler Konzentrationsfaktor ist bisher nicht definiert, höhere Werte sind jedoch mit einer höheren Wachstumsfaktorkonzentration assoziiert (64). Zu hohe Konzentrationen scheinen jedoch wiederum adverse Effekte auf die Syntheseleistung mancher Zelltypen auszuüben (65).
- **Leukozytenkonzentration:** Variiert je nach Methodik, eine Verringerung im Vergleich zum nativen Blut ist tendenziell erwünscht, da Leukozyten (insbesondere neutrophile Granulozyten) den anabolen Effekt von PrP minimieren.
- **Aktivierung des PrP:** Zur Herstellung kann das Vollblut antikoaguliert werden. Dies verhindert eine vorzeitige Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten. Bei Applikation müssen die Thrombozyten aktiviert werden, was entweder durch endogen exprimiertes Kollagen Typ I oder durch exogen appliziertes Thrombin oder Calciumchlorid geschieht.

Marx *et al.* haben für die Humanmedizin den Begriff des „therapeutischen PrP“ geprägt und legen hierfür ein Minimum von 1.000.000 Thrombozyten pro Mikroliter



Plasma fest (66), allerdings ist diese Zahl nicht empirisch definiert. Dies entspricht im Durchschnitt einer Vervierfachung der Thrombozytenkonzentration in Bezug zum nativen humanen Serum. Diesen therapeutischen Bereich gemäß der Definition von Marx erreicht man jedoch nur durch zweimaliges Zentrifugieren (64). Theoretisch kann durch die Applikation von PrP und den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren der Heilungsprozess an folgenden Stellen moduliert werden (56):

- **Stimulation** des natürlichen Regenerationspotentials von Fibrochondrozyten
- **Aktivierung**, Proliferations- und Differenzierungsstimulation ortsständiger Stammzellen
- **Initiierung** der Angiogenese

PrP stellt im Vergleich zur lokalen Injektion rekombinanter Wachstumsfaktoren eine kostengünstige, autologe und einfach herzustellende Quelle heilungsfördernder Botenstoffe dar. Eine reproduzierbare, auch klinisch relevante Verbesserung der Heilung avaskulär verlaufender Meniskusrisse durch den alleinigen Einsatz von PrP konnte bisher jedoch nicht erreicht werden (67). Die Kombination von MSCs und PrP zeigte *in vitro* allerdings additive Effekte auf das Proliferationspotential von MSCs: Es konnte gezeigt werden, dass MSCs, welche in einem PrP-haltigen Medium kultiviert werden, eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zum Standardmedium aufweisen (68). Residente MSCs werden üblicherweise durch das lokale Mikromilieu in ihrem Funktionsstatus verändert: Wachstumsfaktoren, Chemokine, aber auch pro-apoptotische Signalmoleküle können über Oberflächenrezeptoren den Stoffwechsel der MSCs beeinflussen (69). Thrombozyten speichern in ihren  $\alpha$ -Granula unter anderem SDF-1a, ein Chemokin, welches über den CXCR4 Rezeptor mit MSCs kommuniziert und diese zur Migration anregt (60). Außerdem wurde festgestellt, dass PrP das Differenzierungspotential von MSCs zugunsten der chondrogenen Reihe verändert, ohne aber das adipogene oder osteogene Potential zu kompromittieren (70). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die simultane Applikation (MSCs + PrP) das Regenerationspotential im Vergleich zur isolierten Anwendung vergrößern könnte. Tierexperimentell oder gar klinisch wurde diese Hypothese in Bezug auf die Heilung von Meniskusverletzungen bisher jedoch nicht untersucht.



## 2 ZIELSETZUNGEN UND HYPOTHESEN

---

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von PrP, MSCs und der Kombination aus beidem auf die Heilung von Meniskusrissen in der avaskulären Zone zu untersuchen. Makroskopisch sollte die Heilung des Risses untersucht werden. Mit Hilfe immunquantitativer Methoden sollte analysiert werden, inwiefern die unterschiedlichen Therapien die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 beeinflussen.

Folgende Hypothesen wurden aufgestellt:

1. Die lokale Applikation der Kombination aus PrP + MSCs führt nach acht Wochen zu einer makroskopischen Verbesserung der Heilung avaskulärer Meniskusrisse im Vergleich zur isolierten Naht oder der Gabe von PrP oder MSCs.
2. Die lokale Applikation der Kombination aus PrP + MSCs führt nach acht Wochen zu einem stärkeren Anstieg der Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 im operierten Meniskus im Vergleich zur isolierten Naht oder der Gabe von PrP oder MSCs.

## 3 METHODIK

---

### 3.1 ANÄSTHESIE UND OPERATION

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

Die Operationen wurden in Intubationsnarkose durchgeführt. Über eine periphere Venenverweilkanüle wurden 15 mg / kg Körpergewicht (KG) Thiopental (Trapanal®, Inresa GmbH, Freiburg, Deutschland) appliziert und die Tiere nach dem Erlöschen der Schutzreflexe endotracheal intubiert. Aufrechterhalten wurde die Narkose anschließend mit 1,5 % Isofluran (Forene®, Abbvie, Wiesbaden, Deutschland) und einem Gemisch aus 33 % Sauerstoff und 67 % Lachgas. Zur Vermeidung von Wundinfektionen wurde direkt präoperativ eine Single-Shot Antibiose mit 3 mg Ampicillin und Sulbactam (Unacid®, Pfizer, Berlin, Deutschland) verabreicht. Die Analgesie erfolgte durch eine einmalige präoperative Gabe von 4 mg / kg KG Carprofen subkutan (s.c.) (Rimadyl®, Pfizer) und zusätzlich 3 bis 6 µg / kg KG Fentanyl (Fentanyl®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) präoperativ und intraoperativ alle 30 bis 45 Minuten. Um eine ausreichende postoperative Analgesie sicherzustellen und eine frühzeitige Belastung der operierten Gliedmaße zu ermöglichen, wurde an der Innenseite einer Vordergliedmaße ein Fentanylpflaster (1 bis 2 µg / kg KG / h, Durogesic 50 µg / h, Janssen-Cilag GmbH) auf ein zuvor geschorenes Areal appliziert. Zur Operationsvorbereitung wurde die rechte Hintergliedmaße großflächig geschoren, rasiert und mit Povidon-Iod (Braunoderm®, Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert. Nach der Lagerung in Rückenlage wurde das Operationsgebiet viermal mit Povidon-Iod desinfiziert und daraufhin steril abgedeckt. Die gesamte Operation erfolgte unter sterilen Kautelen.

Der Zugang zum Innenmeniskus erfolgte über einen parapatellären medialen Hautschnitt, der von proximal mittig der Patella bis nach distal zur *Tuberositas tibiae* verlief. Daraufhin wurde die *Bursa subcutanea infrapatellaris* scharf durchtrennt (welche beim Schaf im Vergleich zum Menschen deutlich größer ist) und hierdurch der Ansatz des *Musculus vastus medialis* dargestellt, welcher anschließend sehnig durchtrennt wurde. Nun wurde das *Cavum articulare* medial des *Lig. patellae* und der Patella von proximal nach distal eröffnet. Der Hoffa-Fettkörper wurde präpariert und nach lateral verdrängt. Im Anschluss wurde das *Lig. collaterale tibiale* vom *Epicondylus medialis*

*femoris* scharf abgetrennt und mit *Ethibond*® 2 angeschlungen. Durch eine Flexion und Außenrotation des Unterschenkels im Kniegelenk wurde der *Meniscus medialis* exponiert. In dessen anteriorem Drittel wurde mit einem Skalpell ein etwa 15 mm messender, longitudinaler Schnitt in der avaskulären Zone gesetzt. Die komplette Durchtrennung wurde mit einem Klemmchen überprüft. In fünf Gruppen wurde nun entweder der Riss ausschließlich mit einer *outside-in* Technik genäht (PDS® 3-0, Gruppe 1), zusätzlich ein Scaffold appliziert (Gruppe 2), ein beladener Scaffold mit 1 ml PrP (Gruppe 3) oder 1,5 Mio. MSCs (Gruppe 4) oder die Kombination aus PrP + MSCs (Gruppe 5) in den Defekt gegeben (Tabelle 1). Die Scaffoldgruppe (Gruppe 2) diente zur Identifikation möglicher Effekte des Scaffolds auf die Meniskusheilung und die Expression der Wachstumsfaktoren. Als Experimentalgruppen werden in dieser Arbeit die Gruppen 3, 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 1: Aufteilung der Behandlungsgruppen

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>Therapie</b>
<b>1</b>	6	<b>Naht</b>
<b>2</b>	6	Naht + <b>Scaffold</b>
<b>3</b>	6	Naht + Scaffold + <b>PrP</b>
<b>4</b>	6	Naht + Scaffold + <b>MSCs</b>
<b>5</b>	6	Naht + Scaffold + <b>PrP + MSCs</b>

Das *Lig. collaterale tibiale* wurde nach der Meniskusnaht mit den vorgelegten Fäden am *Epicondylus medialis femoris* refixiert. Sowohl die Kapsel als auch der *Musculus vastus medialis* und die Faszie wurden mit Vicryl® 0 genäht. Im Anschluss erfolgte die Naht der *Bursa subcutanea infrapatellaris* und der Subkutis mit Vicryl® 2-0. Die Kutis wurde mit Ethilon® 0 in Rückstichnaht nach Donati genäht. Die Wunde wurde mit Povidon-Iod desinfiziert und mit einem Sprühverband abgedeckt. Zum Schutz vor Verunreinigung wurde die Wunde großzügig mit Aluminiumspray abgedeckt (MeproVet®, mepro, Fechta, Deutschland). Nach der Ausleitung der Narkose konnten sich die Tiere sofort *ad libitum* bewegen. Es erfolgte keine Immobilisierung. Postoperativ wurden die Tiere für zwei Wochen täglich visitiert, eine klinische Inspektion der Wunde durchgeführt und das Gangbild beurteilt. Zur Analgesie erfolgte für die ersten drei postoperativen Tage die subkutane Injektion von 1,5 mg / kg KG Flunixin (Finadyne®, Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

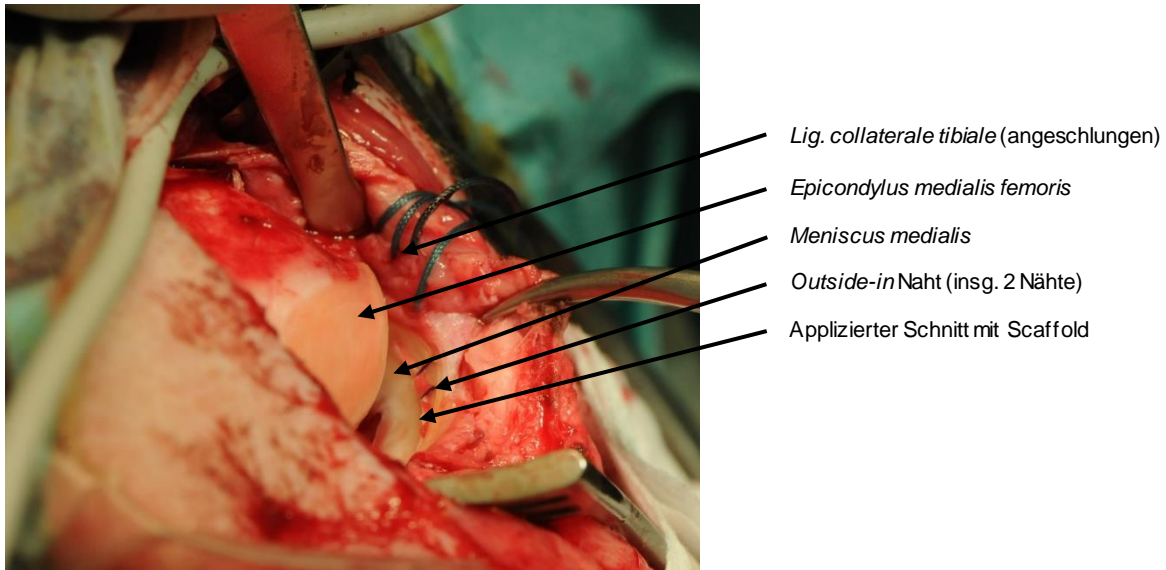


Abb. 9: Operationssitus. Es stellt sich das eröffnete Kniegelenk dar mit Aufsicht auf den medialen Meniskus nach Setzen eines 15 mm langen Schnitts, Implantation eines Scaffolds und *outside-in*-Naht. Lateral des medialen Femurkondylus ist das angeschlossene *Lig. collaterale mediale* abgebildet.

### 3.2 HERSTELLUNG DES THROMBOZYTENREICHEN PLASMAS (PRP)

Die Herstellung des PrP erfolgte nach einem gering modifizierten, im Schafsmodell etablierten Verfahren nach Sarkar *et al.* (71). Aus insgesamt 40 ml Vollblut pro Tier wurden jeweils 1,6 ml PrP produziert.

Pro Tier wurden vier Falcon-Röhrchen mit jeweils 1,25 ml Acid-Citrate-Dextrose-A (ACD-A) als Antikoagulans vorbereitet und auf Eis gelagert. Die Blutentnahme von insgesamt 10 ml Vollblut pro Röhrchen (Antikoagulans + Blutprobe) erfolgte mit einer Strauss-Kanüle durch Punktion der *Vena jugularis externa*. Zusätzlich wurde ein Probe Vollblut mit EDTA als Antikoagulans zur Erstellung eines Blutbilds mit abgenommen, um die Thrombozytenkonzentration des jeweiligen Tieres im Vollblut zu bestimmen. Sofort nach der Blutabnahme wurde das abgenommene Vollblut zentrifugiert. In einem ersten Schritt wurden die vier mit Vollblut gefüllten Röhrchen für 10 Min. bei 840 g und 4 °C zentrifugiert (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Hierdurch setzten sich die Erythrozyten am Boden des Röhrchens ab. In der oberen Phase befanden sich die gelösten Thrombozyten und das Plasma. Im Übergang der beiden Phasen befanden sich die Leukozyten. Die obere Phase (Überstand) wurde in jedem Falcon vorsichtig mit einer Pipette aspiriert und in jeweils ein neues Falcon-Röhrchen gegeben. Die Überstände wurden anschließend für 10 Min. bei 1250 g und 4 °C ungebremst zentrifugiert. Hierdurch bildete sich am Boden ein Thrombozytenpellet und darüber blieb thrombozytenarmes

Plasma zurück. Das Plasma wurde dann aus jedem Röhrchen aspiriert und gesammelt. Zu jedem im Röhrchen verbliebenen Pellet wurden nun wieder 400 µl Plasma hinzugefügt und mit einem Vortexer resuspendiert. Die 4 x 400 µl Resuspensate wurden nun zusammengeführt und ergaben 1,6 ml PrP.

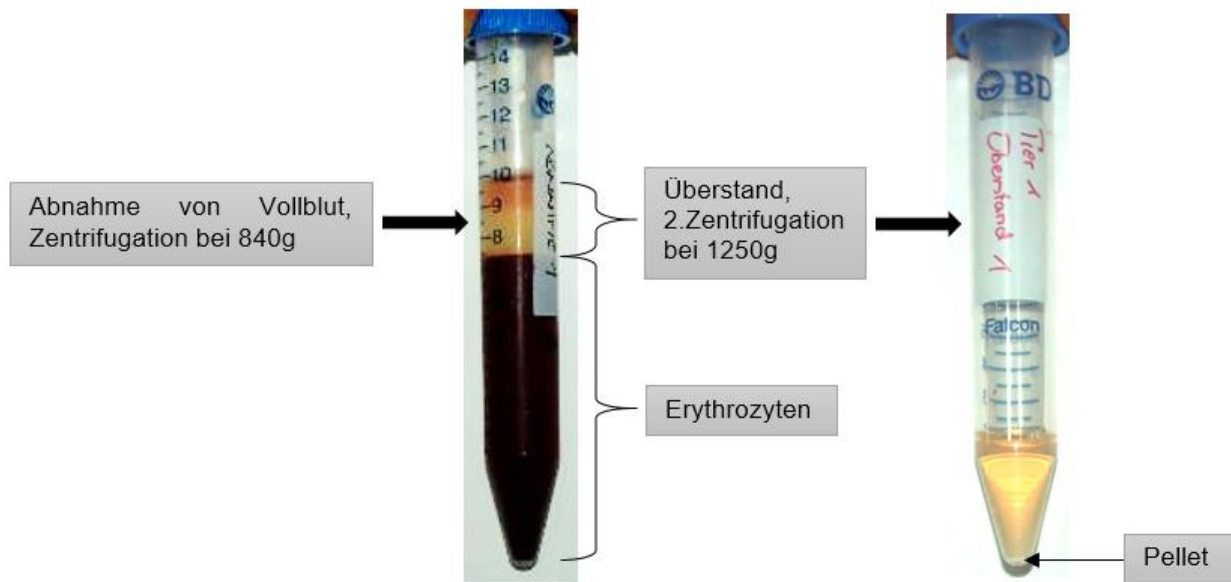


Abb. 10: Schematische Darstellung der PrP-Produktion. 10 ml Vollblut (antikoaguliert mit 1,25 ml ACD-A) wurden zunächst für 10 min bei 840 g zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen aus, eine erythrozytenreiche Phase am Grund des Probenröhrchens sowie eine thrombozytenreiche Phase darüber (auch als Überstand bezeichnet, links). Der Überstand wurde in ein neues Probenröhrchen pipettiert und erneut für 10 min bei 1250 g zentrifugiert. Die Thrombozyten sedimentierten nun am Boden des Probenröhrchens als Pellet (rechts). Jedes Pellet wurde mit 400 µl Plasma resuspendiert und ergab PrP.

### 3.3 MANUELLE THROMBOZYTENZÄHLUNG

Zur Bestimmung der Thrombozytenkonzentration im Vollblut und PrP wurde eine mikroskopische Thrombozytenzählung vorgenommen. Nach der Entnahme bzw. Produktion wurden die Proben bei 4 °C gelagert und schnellstmöglich mit PBS (1:1000, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) verdünnt. Auf den C-Chip (Biochrom GmbH) wurden anschließend 10 µl der verdünnten Probe verbracht und bei 20-facher Vergrößerung mikroskopisch Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten bestimmt. Aus den Zählungen der vier randständigen Unterquadrate wurde das arithmetische Mittel gebildet, vervierfacht um den Wert für ein Großquadrat zu erhalten und anschließend die Zellzahl anhand folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Thrombozyten}}{\mu\text{l Blut}} = \text{Dilutionsfaktor} \times \text{Volumenfaktor} \times \frac{\text{Zellen}}{\text{Großquadrat}}$$

$$= 1.000 \times 10.000 \times \frac{\text{Zellen}}{\text{Großquadrat}}$$

### 3.4 STAMMZELLENTNAHME UND -KULTUR

Die Entnahme der MSCs erfolgte aus dem rechten Beckenkamm über die *Crista iliaca* in Intubationsnarkose (Narkose siehe 3.1). Das Entnahmegebiet wurde großzügig geschoren, rasiert, gewaschen, desinfiziert und steril abgedeckt. Nach dem Hautschnitt über dem ventralen Anteil der *Crista iliaca* wurde scharf auf die *Crista* zupräpariert. Die Punktion des Markraums wurde mit einer Punktionskanüle (Jamshidi®-Nadel, CareFusion, San Diego, Kalifornien, U.S.A.) durchgeführt. Pro Tier wurden 15 ml Aspirat gewonnen und in heparinisierte Falcon-Röhrchen verbracht (1 ml Heparin für 15 ml Aspirat). Die Wunde wurde mit einer Subkutan- und Kutannaht (Ethilon® 0) verschlossen und das Operationsfeld mit Aluminiumspray (MeproVet®, mepro, Vechta, Deutschland) vor einer Wundinfektion geschützt.

Unter sterilen Bedingungen wurde das Knochenmarkaspirat mit 25 ml PBS verdünnt, invertiert und anschließend für 10 Min. bei 300 g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 20 ml PBS resuspendiert und die Zellsuspension in ein mit einem 100 µm Zellsieb bestückten Falcon verbracht. Zur Isolation der mononukleären Zellen hierzu nun wurden 20 ml Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) gegeben, ohne dass es zu einer Phasenvermischung kam. Im Anschluss wurde für 30 Min. bei 400 g ungebremst zentrifugiert (5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Es bildete sich eine mittlere, weiße Phase aus, welche nun aspiriert und in 50 ml PBS verdünnt wurde. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Min. bei 300 g. Anschließend wurde der Überstand

Tabelle 2: Zusammensetzung des Expansionsmediums

<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b> (D6046, Sigma Aldrich, Hamburg)	500 ml
<b>Fetales Kälberserum</b> (S0115, Biochrom)	50 ml
<b>GlutaMAX</b> (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)	5 ml
<b>Penicillin-Streptomycin</b> (# 15140122, Life Technologies)	5 ml

aspiriert, das Pellet mit 35 ml Expansionsmedium resuspendiert und die Suspension in eine Zellkulturflasche verbracht. Die Inkubation erfolgte bei 36 °C und 5 % Kohlendioxid. Alle drei bis vier Tage wurde das Expansionsmedium gewechselt. Nach morphologischer Beurteilung (Zellzahl, Zelldichte, Zell-Zell-Adhäsion, Koloniebildung) erfolgte das Auflösen und Verteilen der Zellverbände auf neue Zellkultur-flaschen (Passagierung).

Dazu wurden die Zellen durch eine Inkubation mit Trypsin (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und jeweils  $10^5$  Zellen in ein neues Inkubationsgefäß verbracht. Zur Qualitätskontrolle der kultivierten MSCs wurde jede Zellreihe auf ihre Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung sowie die Expression spezifischer Oberflächenmarker analysiert (57). Die Etablierung und Durchführung der Kultivierung und Differenzierung der MSCs waren Bestandteil einer weiteren Promotionsarbeit. Die Darstellung der Methodik erfolgt an dieser Stelle aus Vollständigkeitsgründen und zum besseren Verständnis.

Die Reimplantation der MSCs wurde je nach Proliferationsgeschwindigkeit in Passage vier oder fünf durchgeführt. Dazu wurden die MSCs erneut trypsiniert und 1,5 Mio. Zellen unter sterilen Bedingungen auf den Scaffold (Optimaix 3D Collagen Sponges, Matricel, Herzogenrath, Deutschland) pipettiert. Dieser bietet den Zellen eine optimale Adhäsionsoberfläche und erlaubt die Ausbildung zelleigener extrazellulärer Matrix (72). Bis zur Implantation wurden die MSCs im Scaffold anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.5 EUTHANASIE UND PROBENGEWINNUNG

56 Tage nach der Operation wurden die Tiere mit 0,2 mg / kg KG Thiopental sediert und der Kreislaufstillstand mit 60 ml (1 mmol / ml) Kaliumchlorid (Fresenius KgaA, Bad Homburg, Deutschland) herbeigeführt. Anschließend wurde der operierte und der kontralaterale *Meniscus medialis* unter aseptischen Bedingungen präpariert und die makroskopische Heilung nach Henning *et al.* eingeschätzt (73): Die Unterteilung erfolgte in keine Heilung (< 50 % verheilt), partielle (> 50 % bis 90 % verheilt) und komplette Heilung (> 90 % verheilt). Dann wurde das Gewebe um die Läsion herum zur weiteren Analyse entnommen (Abb. 11). Für die (Immun-)Histologie wurde eine Probe bis zur weiteren Verarbeitung für 3 Tage bei Raumtemperatur in 4 %-iger Formaldehydlösung (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert. Für die immunquantitative Untersuchung wurde ein zweiter Teil des Meniskus zur Verbesserung der späteren Aufarbeitung im Mörser noch im Sektionssaal in etwa  $2 \text{ mm}^3$  messende Würfel

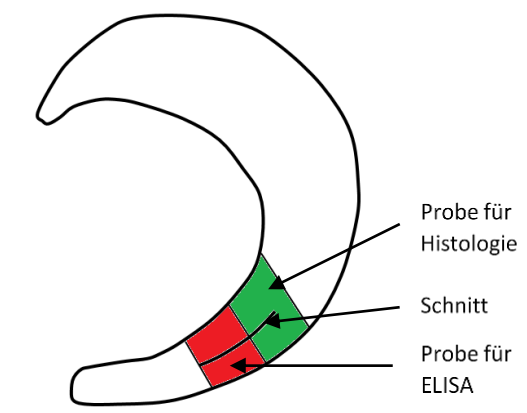


Abb. 11: Defektverlauf und Aufteilung des Meniskus für die biochemische (rot) und (immun-)histologische Analyse (grün)

zerkleinert und anschließend zur Hemmung der Proteolyse in Kryoröhrchen (Nalgene®, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, U.S.A) in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.6 HISTOLOGIE

#### Anfertigen von Gewebeschnitten, Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die entnommenen Menisken wurden nach dreitägiger Fixierung zur Enthärtung für sieben Tage in EDTA (Herbeta Arzneimittel) bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgten eine maschinelle Entwässerung der Proben (TP1020 Programm 3, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und die Einbettung in flüssigem Paraffin (Paraplast Plus®, Leica). Die Schnittseite der Paraffinblöckchen wurde daraufhin auf einer Kühlplatte (Medite Cop 30, Burgdorf, Deutschland) auf -10 °C abgekühlt. Mit Hilfe eines Microtoms (RM2125, Leica) wurden aus den Blöckchen 4 µm messende, radiäre Einzelschnitte produziert. Diese wurden in einem 45 °C warmen Wasserbad erwärmt, auf die Objektträger (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific) aufgezogen und nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C bei Raumtemperatur gelagert. Zur Vorbereitung der Färbungen wurden die Paraffinschnitte nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

Tabelle 3: Ablauf der Rehydrierung bzw. des Entwässerns

<b>Entparaffinieren und Rehydrieren</b>	
Xylol 1	10 Min.
Xylol 2	10 Min.
100 % Ethanol 1	2 Min.
100 % Ethanol 2	2 Min.
96 % Ethanol	2 Min.
80 % Ethanol	2 Min.
70 % Ethanol	2 Min.
Aqua dest.	Kurz

Rehydrieren
Entwässern

Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (Merck) nach folgendem Protokoll:

- |                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| 1. Hämatoxylin nach Harris     | 7 Min.             |
| 2. Spülen in <i>Aqua dest.</i> | 3x kurz eintauchen |
| 3. HCl-Alkohol                 | kurz eintauchen    |
| 4. Leitungswasser              | 10 Min.            |
| 5. Eosin                       | 3x kurz eintauchen |



Im Anschluss wurden die gefärbten Schnitte wieder entwässert (Tabelle 3) und anschließend mit Aquatex (Merck) und Deckgläsern (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland) eingedeckelt. Die histologische Auswertung der Standardfärbung erfolgte auf Basis eines an die vorliegenden Bedingungen angepassten Scores nach Ishida *et al.* (62). Ziel war es, mikroskopisch die Heilung zu evaluieren und die einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen. Für *in vivo* Experimente traumatischer Meniskusrisse ist einzig der Score nach Ishida *et al.* etabliert (62). Er untersucht das Vorhandensein von Regenerationsgewebe und die Adaption an das umgebende Gewebe, das Vorkommen von Fibrochondrozyten und die Anfärbbarkeit mit Safranin-O. In einer Übersichtsarbeit wurde darauf hingewiesen, dass wesentliche Punkte wie die Verteilung und Orientierung der Kollagenfasern im Ishida - Score fehlen und ergänzt werden sollten (74). Aus diesem Grund wurden zusätzliche Punkte aus dem Pauli - Score (75) eingefügt, welcher stärker Veränderungen aus dem umliegenden Gewebe abbildet, wie zum Beispiel die zelluläre oder bindegewebige Antwort auf ein Trauma (Veränderung der Zellzahl oder Clusterbildung, Kollagengewebearchitektur). Gesunde, kontralaterale Menisken (k) wiesen die maximal mögliche Punktzahl von 16 auf (Tabelle 4). Untersucht wurde in allen Menisken die Region um den artifiziellen Riss getrennt voneinander sowohl auf der vaskulären (v) als auch auf der avaskulären Seite (a).

Tabelle 4: Items des Meniskusscores

<b>Beschaffenheit Rissränder</b>	Punkte	<b>Gewebetyp Rissränder</b>	Punkte
Intakt	3	„meniscus-like tissue“	3
Geringe Destruktion	2	Fibrokartilaginäres Gewebe	2
Mittelgradige Destruktion	1	Fibröse Matrix	1
Hochgradige Destruktion	0	Diffuse Degeneration	0
<b>Periläsionale Zellzahl</b>		<b>Reparationsgewebe</b>	
Vergleichbar nativer Meniskus	3	Voll adaptiert	3
Hyperzellulär	2	Teilweise adaptiert	2
Hypozellulär	1	Vorhanden	1
Azellulär	0	Nicht vorhanden	0
<b>Dominierender Zelltyp</b>		<b>Faserorganisation</b>	
Fibrochondrozyten	2	Kollagenfasern abgrenzbar und organisiert	2
Fibroblastenartige Zellen	1	Kollagenfasern abgrenzbar, nicht organisiert	1
Mononukleäre Zellen	0	Kollagenfasern nicht abgrenzbar	0

Zum Ausschluss intra- und interindividueller Beobachterunterschiede wurde das Scoring zweifach im Abstand von sechs Wochen von einem Untersucher durchgeführt und anschließend von einem weiteren Untersucher erneut bewertet.

### Immunhistochemie TGF- $\beta$ 1

Für die immunhistochemische Anfärbung von TGF- $\beta$ 1 in ovinen Menisken war bisher kein Färbeprotokoll etabliert. Dieses wurde daher vor der Durchführung des Versuchs etabliert. Es wurden die optimalen Konzentrationen der einzelnen Antikörper und Sera bestimmt und die Zuverlässigkeit des Primärantikörpers an ovinen Gewebeproben überprüft. Da für ovines Lungengewebe das Vorhandensein von TGF- $\beta$ 1 bereits nachgewiesen werden konnte, dienten Lungengewebeschnitte als Positivkontrolle (76). Als Negativkontrolle wurden Schnitte oviner Achillessehne verwendet, da TGF- $\beta$ 1 in gesunden ovinen Achillessehnen bisher nicht nachgewiesen werden konnte (77).

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte im Anschluss an die Rehydrierung (Tabelle 3) zweimal für fünf Minuten in TBS-Puffer gespült. Zur Demaskierung des Epitops wurden die Gewebe nun mit Trypsin (0,01 %, 10 mg Trypsin ad 100 ml TBS) vorbehandelt. Dazu wurden pro Schnitt etwa 100  $\mu$ l Trypsinlösung auf das Gewebe pipettiert

Tabelle 5: TBS-Puffer (ad 1 l *Aqua dest.*) pH 7,8

<b>Tris-Hydrogenchlorid</b> (HCLT 3253, Sigma-Aldrich)	6,6 g
<b>Tris-Base</b> (T1503, Sigma-Aldrich)	0,9 g
<b>Natriumchlorid</b> (Na <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> 1064, Merck)	8,78 g

und für 30 Min. in einer Feuchtkammer bei 37 °C inkubiert. Die Vorbehandlung wurde durch zweimaliges Spülen in TBS-Puffer für jeweils fünf Minuten beendet. Um eine unspezifische Bindung des in der Ziege produzierten Sekundärantikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte daraufhin mit verdünntem Ziegen-Normalserum (1:100, Goat S1000, Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland) bei Raumtemperatur für 30 Min. inkubiert. Daraufhin wurden die Gewebeproben über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Anti-human Kaninchen-TGF- $\beta$ , sc-146, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Der Antikörper wurde mit einem eigenen Verdünnungsmedium (1:50, Antibody Diluent S3022, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst zweimal fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen und daraufhin für 30 Min. bei Raumtemperatur mit dem enzymmarkierten Zweitantikörper

(Anti-Kaninchen aus der Ziege, Vector Lab. Inc, Burlingame, Kalifornien, U.S.A, Verdünnung 1:50 mit 2 % Ziege Normalserum) inkubiert. Die Schnitte wurden nach zweimaligem Waschen in TBS-Puffer für 50 Min. mit einem AB-Komplex, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, bei Raumtemperatur inkubiert (Vectastain ABC-Kit, Vector Lab). Nach erneutem Waschen im TBS-Puffer (zweimal fünf Minuten) wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten mit einem Chromogenpuffer inkubiert, um das Gewebe an den alkalischen pH des chromogenen Substrats zu gewöhnen.

Tabelle 6: Chromogenpuffer (ad 300 ml Aqua dest.) pH 8,2

<b>Tris-HCL</b>	3,96 g
<b>Tris-Base</b>	0,54 g
<b>Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup></b>	2,63 g

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem chromogenen Substrat (SK5100, Vector) inkubiert und unter mikroskopischer Sichtkontrolle entwickelt. Zum Beenden der chromogenen Reaktion wurden die Schnitte abschließend für fünf Minuten in TBS gespült und bis zum nächsten Färbeschritt in *Aqua dest.* aufbewahrt. Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wurde bei allen Schnitten eine Kernfärbung durchgeführt. Es zeigte sich, dass es bei einer Kernfärbung mit Methylgrün zu einer Auswaschung des Antikörper-Farbsubstrat-Komplexes kam, sodass auf eine schonendere Kernfärbung mit Hämatoxylin zurückgegriffen wurde. Dazu wurden die Objektträger mit den Gewebeproben für zwei Minuten in Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Merck) inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte zur Blaufärbung für etwa zehn Minuten in Leitungswasser inkubiert und im Anschluss eingedeckelt.

### **Auswertung der (immun-)histologischen Färbung**

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden digital mikroskopiert, fotografiert und archiviert. Die weitere Analyse erfolgte mit ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.). Der Rissverlauf wurde dargestellt und sein Winkel vermessen, um den Verlauf in den kontralateralen Menisken superimponieren zu können (s.u.). Parallel zum Defekt liegende *regions of interest* (ROI) mit einer Fläche von 500 µm x 500 µm wurden folgendermaßen definiert (Abb. 12): 5 ROI in der vaskulären Zone (Va<sub>1-5</sub>), 10 ROI peripher des Defekts im vaskulären Bereich (LS2Va<sub>1-5</sub> und LS1Va<sub>1-5</sub>), 10 ROIs zentral der Läsion im avaskulären Bereich (LS1Av<sub>1-5</sub> und LS2Av<sub>1-5</sub>) und 5 ROIs in der avaskulären Meniskuszone (Av<sub>1-5</sub>).

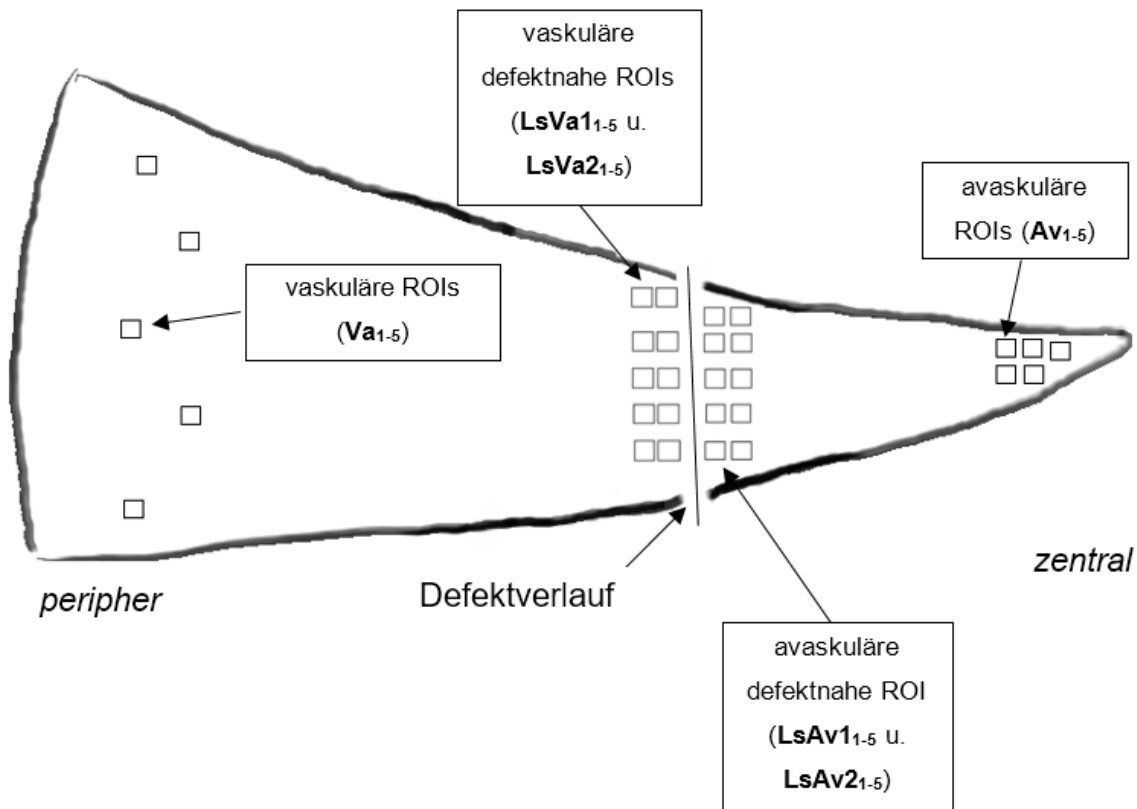


Abb. 12: Schematische Darstellung eines operierten Meniskus mit Defektverlauf und *regions of interest* (ROI). Pro Meniskus wurden 30 ROI etabliert, 5 ROI in der peripher-vaskulären Zone (Va), zweimal 5 ROI auf der vaskulären Seite der Läsion (LsVa1, LsVa2), zweimal 5 ROI auf der avaskulären Seite der Läsion (LsAv1, LsAv2) sowie 5 ROI in der zentral-avaskulären Zone.

Die rot angefärbten, TGF- $\beta$ 1 positiven Areale, konnten nicht zuverlässig automatisiert von den blau-violett angefärbten Nuklei unterschieden werden. Daher wurde eine manuelle Zellzählung durchgeführt. Hierfür wurden zunächst in jeder ROI der operierten Menisken die gefärbten und nicht gefärbten Meniskuszellen gezählt und für jede Zone (vaskulär, periläsional vaskulär, periläsional avaskulär, avaskulär) die Summen ermittelt. Anschließend wurde für jede Zone der Quotient aus gefärbten und nicht gefärbten Zellen pro Zone gebildet (Anfärbungsquotient, pro Meniskus und Tier ergeben sich somit 4 Quotienten). Nun wurde der nicht operierte Meniskus auf den jeweils operierten Meniskus superimponiert und hierdurch die ROIs der operierten Menisken an den gleichen Ort auf den nicht operierten Menisken gelegt. Anschließend wurden auch hier die gefärbten und nicht gefärbten Zellen gezählt und der Quotient gebildet. Zum intraindividuellen Vergleich wurden nun aus dem prozentualen Anteil angefärbter Zellen der operierten Menisken (angefärbte Zellen operierter Menisken geteilt durch die Summe aller Zellen in den definierten ROIs) und dem Anteil angefärbter Zellen der kontralateralen

Menisken (angefärbte Zellen kontralateraler Menisken geteilt durch die Summe aller Zellen in den definierten ROIs) ein Quotient gebildet. Kontralaterale Menisken waren dadurch stets als 100 % definiert und somit Färbeartefakte abgemildert. Hieraus ließ sich nun ableiten, ob es zu einer Zu- oder Abnahme TGF- $\beta$ 1 positiver Zellen in den operierten Menisken gekommen war.

Zuerst wurde die Veränderung aller ROIs (n = 30) jedes operierten Meniskus in Bezug zum jeweils kontralateralen Meniskus gruppenspezifisch untersucht. Im Rahmen einer Subanalyse wurde anschließend betrachtet, ob es Unterschiede in der Zunahme positiv gefärbter Zellen zwischen der vaskulären, periläsionalen und avaskulären Zone gab.

### 3.7 QUANTIFIZIERUNG VON TGF- $\beta$ 1 UND FGF-2

Zur Quantifizierung von TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 in den gewonnenen Proben wurden Gewebshomogenisate hergestellt und anschließend die darin enthaltene Menge an Wachstumsfaktoren mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits gemessen. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen humanem und ovinem TGF- $\beta$ 1 bzw. FGF-2 konnte auf ein anti-humanes Kit zurückgegriffen werden, dessen Einsatz auch schon im Schafsmodell verifiziert worden war (78). Vor der Versuchsdurchführung wurden jedoch Kits mehrerer Hersteller anhand von Positiv- (Lungengewebe) und Negativkontrollen (Achillessehngewebe) getestet. Eingesetzt wurden für TGF- $\beta$ 1 (Quantikine ELISA Kit, DB100B, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, U.S.A) und für FGF-2 (Quantikine ELISA Kit, DFB50, R&D Systems) die Kits mit reproduzierbaren Ergebnissen.

#### Herstellung der Homogenisate und Proteinextraktion

Das Vorgehen zur Proteinextraktion aus Meniskusgewebe war bereits beschrieben und wurde in dieser Studie angewandt (79). Die gefrorenen Menisken (- 80 °C) wurden mit einem eigens dafür hergestellten Metallmörser unter repetitiver Zugabe von flüssigem Stickstoff manuell pulverisiert. Anschließend wurde das Meniskuspulver gewogen, in

Tabelle 7: Zusammensetzung des Lysepuffers (ad 30 ml PBS). Nach laborinternen Standards wurde eine Protease-Inhibitortablette in 2 ml PBS gelöst.

<b>Proteinaseinhibitor-Lösung</b> (cOplete Mini, Roche Diagnostics Deutschland GmbH)	1,2 ml
<b>Triton X-100</b> (T8787, Sigma-Aldrich)	30 $\mu$ l
<b>PMSF 250 mM</b> (P7626, Sigma-Aldrich)	30 $\mu$ l

Lysepuffer überführt (1 ml Lysepuffer pro 100 mg Meniskus) und für 15 Min. bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 15 Min. bei 17.900 g zentrifugiert, der Überstand bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei - 80 °C gelagert. Eine Probe konnte in der MSC-Gruppe aufgrund der geringen Proteinmenge nicht ausgewertet werden, hier ist abweichend n = 5.

### **Messung der Proteinkonzentration**

Um die Menge an Wachstumsfaktoren zwischen den einzelnen Proben vergleichen zu können, setzt man die ermittelte Konzentration an Wachstumsfaktor in Bezug zu der Gesamtproteinkonzentration in jeder Probe. Die Messung der Gesamtproteinkonzentration in den aufgearbeiteten Proben erfolgte mit dem Coomassie-Assay (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, U.S.A), welcher auf dem Bradford-Test basiert (80). Kationische und polare Seitenketten der in Lösung vorliegenden Proteine binden an den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 (CBBG) und bilden Komplexe. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs auf 595 nm und die Proteinkonzentration kann photometrisch bestimmt werden. Zur Kalibrierung wurde eine Standardreihe aus BSA (bovines Serumalbumin, A-7906, Sigma-Aldrich) entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet.

### **Messprotokoll:**

1. Verdünnung der Proben 1:5 mit PBS
2. Für eine Dreifachbestimmung wurden jeweils 10 µl der verdünnten Probe bzw. BSA in eine 96-Well-Platte pipettiert
3. Zugabe von 300 µl Coomassie-Reagenz pro Well
4. Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur
5. Messung der Absorption bei 595 nm im Photometer

## Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem ELISA-Verfahren können geringste Proteinmengen (Hormone, Wachstumsfaktoren etc.) kolorimetrisch nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht auf einer mehrstufigen Antigen - Antikörperreaktion, an deren Ende die Bindung eines Farbstoffs gekoppelt ist. Die Menge des gebundenen Farbstoffs korreliert mit der Konzentration der gelösten und zu quantifizierenden Substanz und kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Bei der Sandwich - ELISA - Technik ist ein monoklonaler Antikörper (*Capture*-Antikörper) am Boden der *Wells* fixiert (Abb. 13-1). Der in den aufgearbeiteten Proben gelöste Wachstumsfaktor bindet durch mehrere Epitope als Antigen an den *Capture*-Antikörper und bildet eine stabile Antigen - Antikörperbindung (Abb. 13-2). Durch mehrmaliges Waschen werden die überschüssigen, nicht gebundenen Bestandteile entfernt und nun ein polyklonaler Zweitantikörper (*Detection*-Antikörper) hinzugefügt. Dieser bindet an ein anderes Epitop der zu quantifizierenden Substanz und ist zusätzlich mit Meerrettichperoxidase (HRPO) gekoppelt (Abb. 13-3). Nun wird ein farbloses chromogenes Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) hinzugegeben (Abb. 13-4). Die gebundene HRPO führt jetzt zu einem Farbumschlag des Substrats. Dieser ist proportional zur enthaltenen Menge der zu quantifizierenden Substanz. Die Reaktion wird durch Zugabe von Salzsäure beendet und die Farbe schlägt nach gelb um. Die Extinktion wird mit einem Photometer gemessen und die Konzentration des Wachstumsfaktors in den Proben anhand einer Standardkurve errechnet.

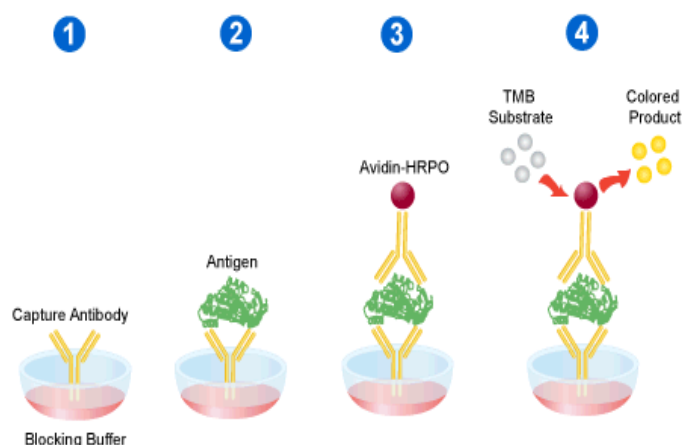


Abb. 13: Prinzip des Sandwich-ELISA. (1) Ein Antikörper gegen das Zielprotein ist an der Platte fixiert. Das gelöste Zielprotein bindet an den Antikörper (2) und ein Avidin-gekoppelter Zweitantikörper an eine zweite Domäne des Proteins (3). Durch Zugabe eines Chromogens kommt es zum Farbumschlag (4).

Die Bestimmung der Wachstumsfaktorkonzentration erfolgte mit einem gegen humanes TGF- $\beta$ 1 bzw. FGF-2 gerichteten ELISA-Kit. Alle Reagenzien wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Als Kontrollmenisken dienten die jeweiligen kontralateralen Menisken, als Positiv- und Negativkontrolle wurden entsprechend dem Protokoll aufgearbeitete Proben oviner Lunge und Achillessehne verwendet. Zur Bestimmung der Konzentration von TGF- $\beta$ 1 mussten die Proben vor dem Immunassay gemäß Herstellerprotokoll aktiviert werden: Durch die Zugabe von Salzsäure (HCl, 09057, Merck) wurde die Bindung des LAP an TGF- $\beta$ 1 aufgebrochen, sodass die Gesamtmenge des Wachstumsfaktors bestimmt wurde („Aktivierung“ der Probe).

#### **Aktivierungsprotokoll:**

1. Zugabe von 20  $\mu$ l 1 mol HCl pro 100  $\mu$ l unverdünnter Probe
2. Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur
3. Neutralisierung der Probe mit 20  $\mu$ l 1,2 mol / 0,5 mol HEPES

Die aktivierten Proben wurden im Anschluss unmittelbar für den ELISA verwendet. Zur Kalibrierung des ELISAs diente eine Standardreihe vorverdünnter Proben der Wachstumsfaktoren.

#### **ELISA Protokoll:**

1. In jedes *Well* wurden 50  $\mu$ l *Assay Diluent* pipettiert
2. Zugabe von 50  $\mu$ l der aktivierten Probe bzw. des Standards
3. Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
4. Aspiration des *Well*inhalts, viermaliges Waschen mit Waschpuffer
5. Zugabe von 100  $\mu$ l TGF- $\beta$ 1 bzw. FGF-2 Konjugat pro *Well*
6. Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
7. Aspiration und Waschen wie in Schritt 4
8. Zugabe von 100  $\mu$ l Substratlösung pro *Well*
9. Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer
10. Zugabe von 100  $\mu$ l Stopplösung pro *Well*
11. Messung der optischen Dichte bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 540 nm



### **3.8 STATISTISCHE ANALYSE**

Aufgrund der Gruppengröße ( $n = 6$ ) wurde die statistische Signifikanz ausschließlich mit nicht-parametrischen Testverfahren überprüft, da von nicht-normal verteilten Ergebnissen ausgegangen wurde. Alle Angaben enthalten den Median und das 25. bzw. 75. Quartil (IQR). Veränderungen innerhalb einer Gruppe (zwischen operierten und kontralateralen Menisken) wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test für gepaarte Stichproben analysiert. Für Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurde ein nicht-parametrischer Mehrfachvergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test und bei signifikanten Unterschieden eine post-hoc Analyse (Dunn-Test) durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,05$  für signifikante und  $p \leq 0,01$  für sehr signifikante Ergebnisse. Die Analyse erfolgte mit Prism® (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, U.S.A.).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 THROMBOZYTENKONZENTRATION

In der PrP-Gruppe lag der Median der Thrombozytenkonzentration im Vollblut bei 293.750 /  $\mu\text{l}$  (IQR 219.375 – 477.500 /  $\mu\text{l}$ ) im Vergleich zu 810.000 /  $\mu\text{l}$  (496.875 – 1.293.000 /  $\mu\text{l}$ ) im PrP. Dies entspricht einer Anreicherung im Median um den Faktor 1,93 (1,60 - 2,37;  $p = 0,0313$ ).

In der PrP + MSC-Gruppe lag der Median der Thrombozytenkonzentration im Vollblut bei 347.500 /  $\mu\text{l}$  (304.375 – 455.625 /  $\mu\text{l}$ ) und im PrP bei 987.500 /  $\mu\text{l}$  (847.500 – 1.399.000 /  $\mu\text{l}$ ). Der Anstieg betrug im Median 3,15 (2,56 – 3,50) und war signifikant ( $p = 0,0313$ ; Abb. 14).

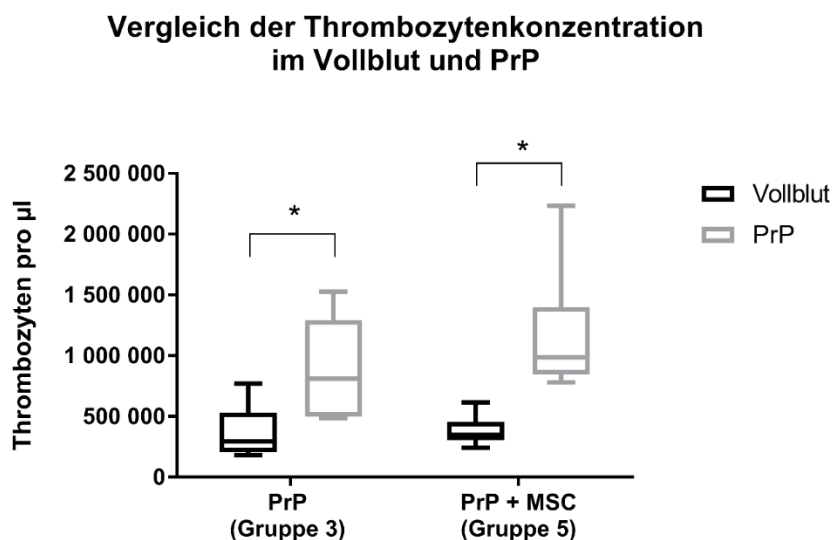


Abb. 14: Thrombozytenkonzentration im Vollblut bzw. PrP der Experimentalgruppen. \* =  $p \leq 0,05$

### 4.2 VERLAUFSPARAMETER

Das Gewicht der Versuchstiere zum OP-Zeitpunkt betrug im Median 62,1 kg (IQR 58,9 - 67,1 kg). Postoperativ ließ sich kein Gewichtsverlust feststellen. Zwischen den Behandlungsgruppen ließen sich Unterschiede in der Dauer bis zur vollständigen Belastung der operierten Gliedmaße feststellen. Tiere, die einen Scaffold mit PrP oder der Kombination aus PrP + MSC appliziert bekamen, belasteten die operierte Gliedmaße

tendenziell am schnellsten wieder vollständig (2 Tage p.o., Tabelle 8). Im Vergleich zur Naht- oder Scaffold-Gruppe war dies jedoch statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Tabelle 8: Mediandauer (Tage) der Ent- und Teilbelastung sowie Zeit bis zur Vollbelastung der fünf Therapiegruppen.

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

### 4.3 MAKROSKOPISCHE HEILUNG

In keiner Behandlungsgruppe konnte nach 56 Tagen eine komplette oder partielle makroskopische Heilung nachgewiesen werden (Abb. 16, Abb. 15).

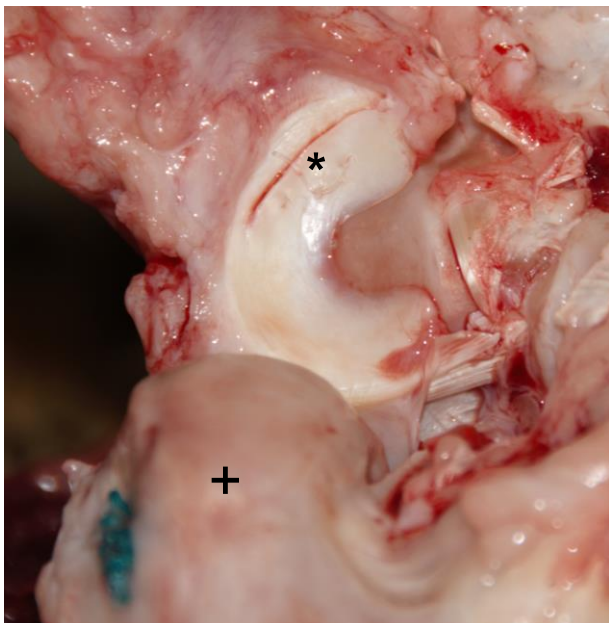


Abb. 16: Aufsicht auf den *Meniscus medialis* nach Eröffnung des Kniegelenks acht Wochen postoperativ. Der intraoperativ applizierte Riss (\*) ist noch deutlich zu erkennen. + = *Epicondylus medialis femoris*

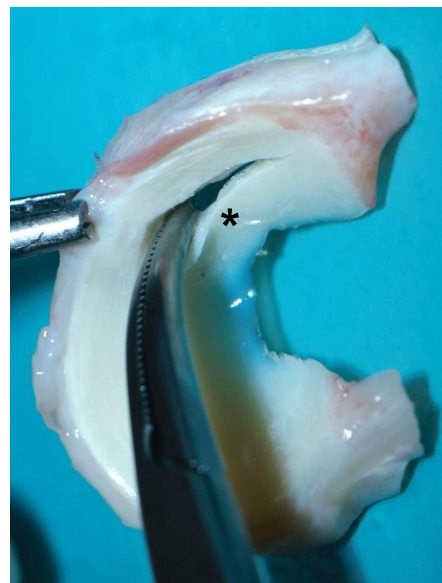


Abb. 15: Beispielhafter *Meniscus medialis* acht Wochen postoperativ nach der Präparation. Gut zu sehen ist der nicht verheilte, intraoperativ applizierte Riss (\*), welcher mühelos mit einer Klemme sondiert werden kann.

## 4.4 HISTOLOGIE

Sowohl auf der vaskulären (v) wie auch auf der avaskulären (a) Seite neben dem Riss waren die Ergebnisse des Evaluationsbogens der histologischen Schnitte acht Wochen postoperativ in allen Regionen signifikant verringert im Vergleich zum möglichen Maximalwert (k, Tabelle 9). Dies verdeutlicht die fehlende Adaption der Wundränder und deren Destruktion. Innerhalb der fünf Therapiegruppen konnte zwischen der vaskulären und avaskulären Region weder statistisch noch graphisch ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Zwischen den fünf Therapiegruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied, auch graphisch konnte keine Tendenz abgeleitet werden, die auf eine stärkere Abnahme einer Gruppe im Vergleich zu den anderen hindeutete (Abb. 17).

Tabelle 9: Einzelwerte und statistische Kennzahlen des histologischen Scorings. Für jede Gruppe sind die Scoringresultate und Differenzen der vaskulären (v) und avaskulären (a) Region zum nicht operierten, kontralateralen Meniskus (k, Scoringwert 16) sowie untereinander dargestellt. \*\* =  $p \leq 0,01$ .

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

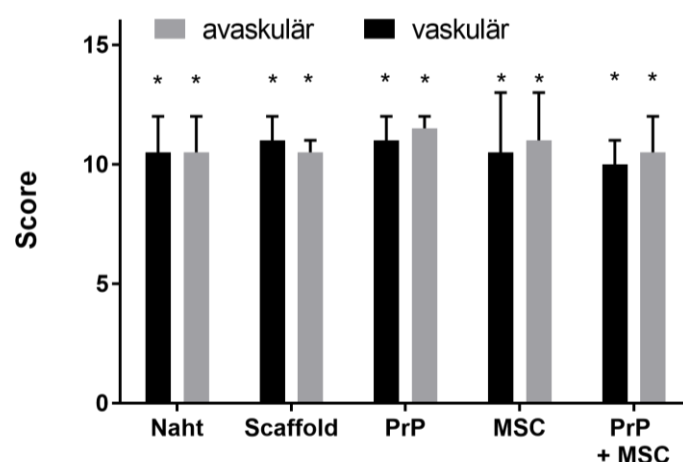


Abb. 17: Ergebnisse des histologischen Scorings. Dargestellt sind pro Gruppe der Median des Scoringwerts der jeweils operierten Menisken (n=6) sowohl auf der vaskulären als auch auf der avaskulären Seite neben dem artifiziell gesetzten Riss. Maximalwert = 16 (gesunder Meniskus). \* = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Maximalwert ( $p \leq 0,05$ )

## 4.5 IMMUNHISTOCHEMIE TGF-β1

Vergleicht man die Anfärungsquotienten aller ROIs der operierten mit den kontralateralen Menisken, wurde in allen fünf Behandlungsgruppen eine signifikante Zunahme der TGF-β1 gefärbten Zellen in den operierten Menisken festgestellt (Tabelle 10, Abb. 18).

Tabelle 10: Veränderung und Signifikanz TGF-β1 positiv gefärbter Zellen aller Zonen im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (n = 6). OP = operierte Menisken, KL = kontralaterale Menisken.

	Gruppe 1 (Naht)	Gruppe 2 (Scaffold)	Gruppe 3 (PrP)	Gruppe 4 (MSC)	Gruppe 5 (PrP + MSC)
<b>Veränderung Median [%] (IQR)</b>	+ 24,5 (12,0 – 58,8)	+ 14,5 (8,8 – 22,8)	+ 46,5 (30,8 – 77,5)	+ 65,0 (11,8 – 84,5)	+ 72,0 (20,0 – 108,5)
<b>Signifikanz OP Menisken – KL Menisken</b>	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031

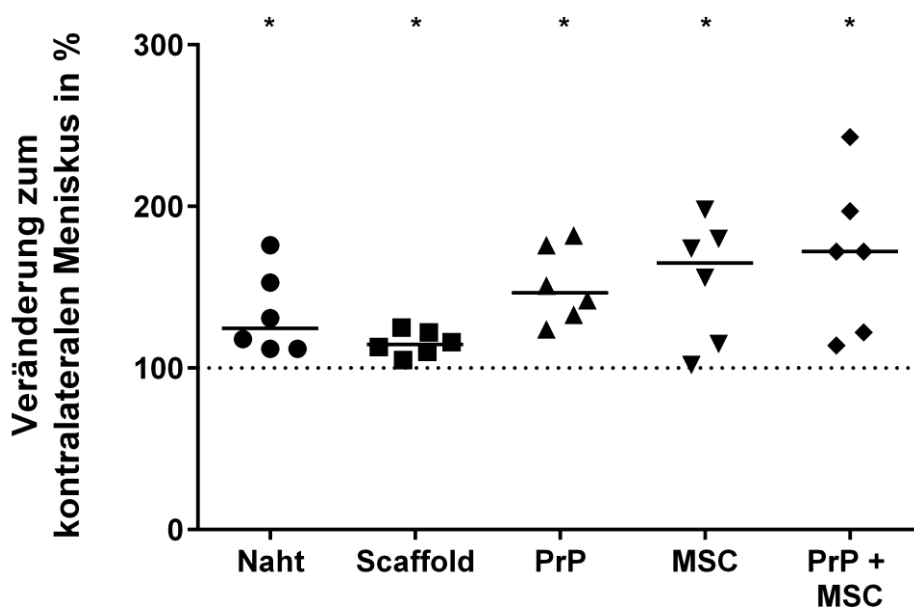


Abb. 18: Anstiegsmediane und Einzelwerte pro Tier (n = 6) positiv gefärbter Zellen in Abhängigkeit der Therapiegruppe. Die gepunktete Linie entspricht dem Anfärungsquotienten der kontralateralen Menisken (= 100 %). \* =  $p \leq 0,05$ , signifikanter Anstieg zu den kontralateralen Menisken

Zwischen den fünf Gruppen ließ sich ein statistischer Unterschied in der Zunahme TGF-β1 positiver Zellen nicht nachweisen ( $p = 0,0781$ ). Graphisch war jedoch der Trend

zu erkennen, dass in der PrP-, MSC- und PrP + MSC-Gruppe der Median positiv gefärbter Zellen im Vergleich zur Naht- oder Scaffold-Gruppe erhöht war (Abb. 18). In der PrP + MSC-Gruppe ließ sich tendenziell der stärkste Anstieg TGF feststellen (+ 72 %, IQR 20 – 108,5 %). In der Scaffold-Gruppe wurde ein Anstieg TGF- $\beta$ 1 gefärbter Zellen im Vergleich zu den nicht operierten Menisken von 14,5 % (IQR 8,8 – 22,8 %,  $p < 0,005$ ) festgestellt, dieser lag somit noch unter dem der Naht-Gruppe (+ 24,5 %, IQR 12,0 – 58,8 %,  $p \leq 0,01$  zu den kontralateralen Menisken).

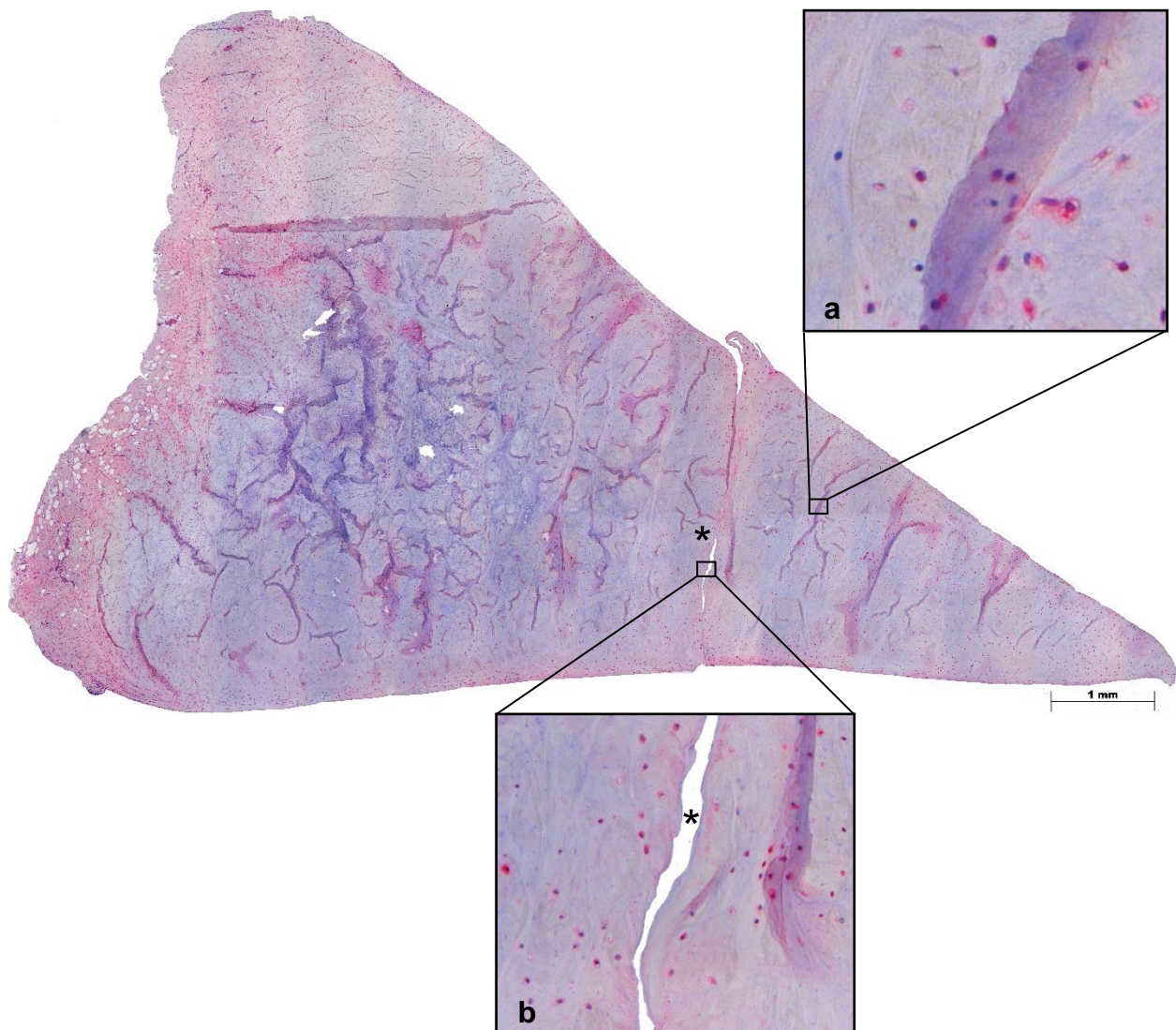


Abb. 19: Beispielhaft immunhistochemisch gegen TGF- $\beta$ 1 gefärbter Radiärschnitt eines *Meniscus medialis* aus der MSC - Gruppe. Zu erkennen ist auch acht Wochen postoperativ der intraoperativ applizierte Riss (\*). Bildausschnitt a (oben rechts) zeigt beispielhaft positiv gefärbte Zellen (rot) sowie nicht gefärbte Zellen (blau). Bildausschnitt b (unten) zeigt den nicht verheilten Riss, in dem sich acht Wochen postoperativ kein Scaffold mehr nachweisen lässt.

## Subanalyse der vaskulären, läSIONsnahen und avaskulären Zonen

Die Analyse der einzelnen Zonen der Menisken ergab in der vaskulären Zone der PrP- sowie in der MSC-Gruppe eine statistisch signifikante Zunahme TGF-β1 positiv gefärbter Zellen im Vergleich zu den kontralateralen Menisken ( $p \leq 0,05$ , Tabelle 11).

Tabelle 11: Veränderung und Signifikanz der TGF-β1 positiv gefärbten Zellen der vaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (n = 6). OP = operierte Menisken, KL = kontralaterale Menisken.

	Gruppe 1 (Naht)	Gruppe 2 (Scaffold)	Gruppe 3 (PrP)	Gruppe 4 (MSC)	Gruppe 5 (PrP + MSC)
<b>Veränderung Median [%] (IQR)</b>	+ 35,9 (- 37 – 63,3)	- 11,0 (- 57 – 18,6)	+ 85,7 (10,2 – 160,9)	+ 79,6 (49,3 – 118,19)	+ 207,3 (25,2 – 285,1)
<b>Signifikanz OP Menisken - KL Menisken</b>	0,436	0,563	0,031	0,031	0,063

Zwischen den Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl positiv gefärbter Zellen ( $p = 0,0111$ ). Es zeigten sich signifikant mehr TGF-β1 gefärbte Zellen in der PrP + MSC-Gruppe im Vergleich zur MSC-Gruppe (+ 218,3 %;  $p = 0,026$ ). Die graphische Analyse verdeutlicht dies, zudem lässt sich die Tendenz zu einem stärkeren Anstieg TGF-β1 positiver Zellen in allen drei Experimentalgruppen im Vergleich zur Naht- oder Scaffold-Gruppe ermitteln (Abb. 20).

In der läSIONsnah – vaskulären Zone aller Experimentalgruppen ließ sich eine signifikante Zunahme TGF-β1 positiver Zellen im Vergleich zum kontralateralen Meniskus nachweisen ( $p \leq 0,05$ , Tabelle 12).

Tabelle 12: Veränderung und Signifikanz der TGF-β1 positiv gefärbten Zellen der läSIONsnah - vaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (n = 6). OP = operierte Menisken, KL = kontralaterale Menisken.

	Gruppe 1 (Naht)	Gruppe 2 (Scaffold)	Gruppe 3 (PrP)	Gruppe 4 (MSC)	Gruppe 5 (PrP + MSC)
<b>Veränderung Median [%] (IQR)</b>	+ 33,5 (- 3,3 – 52,0)	+ 18,7 (- 9 – 31,0)	+ 62,7 (18,1 – 128,8)	+ 49,5 (- 1,4 – 82,6)	+ 78,2 (31,1 – 144,1)
<b>Signifikanz OP Menisken - KL Menisken</b>	0,064	0,092	0,001	0,027	0,002

Der Vergleich zwischen den Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,011$ ). Der Mehrfachvergleich zwischen den Gruppen zeigte, dass sich signifikant

mehr positiv gefärbte Zellen in der PrP + MSC-Gruppe im Vergleich zur Scaffold-Gruppe nachweisen ließen (+ 59,2 %, p = 0,02). Zwischen den anderen Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Rate positiv gefärbter Zellen. Aus der Graphik lässt sich jedoch eine tendenzielle Zunahme TGF-β1 positiver Zellen in allen drei Experimentalgruppen im Vergleich mit der Naht- und Scaffoldgruppe ableiten (Abb. 20).

In der läsionsnah – avaskulären Zone konnte in allen Gruppen eine signifikante Erhöhung TGF-β1 positiver Zellen im Vergleich zu den kontralateralen Menisken nachgewiesen werden (p ≤ 0,05, Tabelle 13, Abb. 20).

Tabelle 13: Anstieg und Signifikanz der TGF-β1 positiv gefärbten Zellen in der läsionsnah - avaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (n = 6). OP = operierte Menisken, KL = kontralaterale Menisken.

	<b>Gruppe 1</b> (Naht)	<b>Gruppe 2</b> (Scaffold)	<b>Gruppe 3</b> (PrP)	<b>Gruppe 4</b> (MSC)	<b>Gruppe 5</b> (PrP + MSC)
<b>Veränderung Median [%] (IQR)</b>	+ 53,2 (40,8 – 66,3)	+ 14,5 (11,9 – 69,8)	+ 59,5 (19,6 – 105,0)	+ 59,2 (18,9 – 96,3)	+ 60,5 (41,6 – 84,0)
<b>Signifikanz OP Menisken - KL Menisken</b>	0,002	0,001	0,001	0,003	0,001

Zwischen den fünf Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05). Auch graphisch lässt sich keine Tendenz zu einer stärkeren Zunahme positiv gefärbter Zellen in einer Gruppe ableiten (Abb. 20).

In der avaskulären Zone war die Anzahl TGF-β1 positiv gefärbter Zellen im Median in der Naht- und MSC-Gruppe statistisch signifikant zu den kontralateralen Menisken erhöht (p = 0,031). Auch in den anderen Therapiegruppen zeigten sich tendenziell vermehrt TGF- β1 positive Zellen, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 20).

Tabelle 14: Anstieg und Signifikanz der TGF-β1 positiv gefärbten Zellen der avaskulären Zone im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (n = 6). OP = operierter Meniskus, KL = kontralateraler Meniskus.

	<b>Gruppe 1</b> (Naht)	<b>Gruppe 2</b> (Scaffold)	<b>Gruppe 3</b> (PrP)	<b>Gruppe 4</b> (MSC)	<b>Gruppe 5</b> (PrP + MSC)
<b>Veränderung Median [%] (IQR)</b>	+ 29,0 (13,0 – 58,0)	+ 0,4 (- 3,0 – 40,3)	+ 27,0 (- 7,0 – 52,3)	+ 82,0 (39,8 – 96,7)	+ 39,1 (- 35,0 – 141,5)
<b>Signifikanz OP Menisken - KL Menisken</b>	0,031	0,688	0,219	0,031	0,438



Im Vergleich zwischen den Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Graphisch zeigte sich jedoch, dass der Anteil positiv gefärbter Zellen im Vergleich zu den kontralateralen Menisken in der MSC – Gruppe im Median tendenziell am stärksten anstieg (+ 82 %, IQR 39,8 – 96,7, Abb. 18). Auffallend ist zudem die breite Streuung der Ergebnisse in der PrP + MSC-Gruppe (Median + 39,1 %, IQR - 35,0 - 141,5 %).

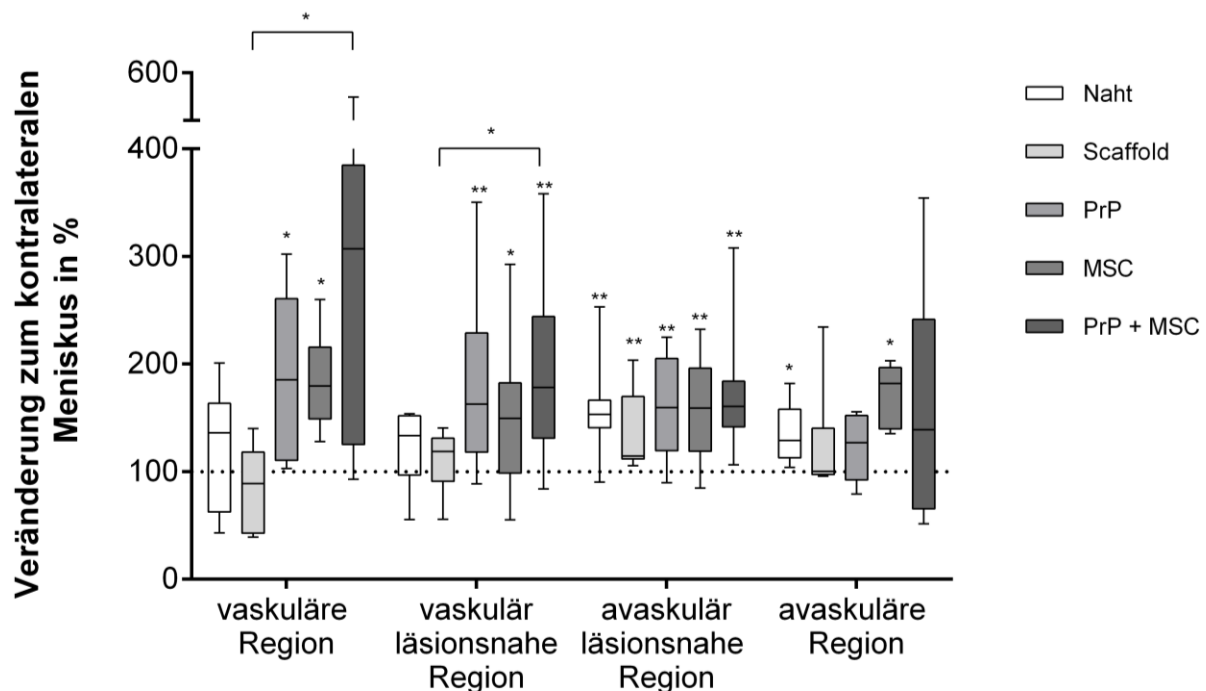


Abb. 20: Relative Veränderung TGF-β1 positiver Zellen zwischen den operierten und kontralateralen Menisken (pro Gruppe n=6). Dargestellt ist die prozentuale Zu- oder Abnahme positiv gefärbter Zellen pro Gruppe im Vergleich zu den kontralateralen Menisken (100%, gepunktete Linie). Horizontale Linien zeigen pro Gruppe und Region den Median an. \* = p ≤ 0,05, \*\* = p ≤ 0,01.

#### 4.6 QUANTIFIZIERUNG VON TGF-β1 UND FGF-2

Alle dargestellten Daten sind im Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe abgebildet.

Beim Vergleich der Konzentration von **TGF-β1** in den operierten Menisken mit den kontralateralen Menisken zeigten sich graphisch in allen operierten Gruppen eine erhöhte Konzentration von TGF-β1 in den operierten Menisken (Abb. 21). Dieser Anstieg war jedoch nur signifikant in der Scaffold- (+ 77,4 pg / mg Protein, IQR 61,5 – 258,2 pg / mg Protein; p = 0,031) und PrP-Gruppe (+ 134,6 pg / mg Protein, IQR 63,9 – 165,7 pg / mg Protein; p = 0,031).

Im Vergleich untereinander zeigten die fünf Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von TGF-β1 ( $p > 0,05$ ). Tendenziell zeigte sich der größte Anstieg in der PrP + MSC-Gruppe (+ 235,7 pg / mg Protein, IQR 4,1 – 291,5 pg / mg Protein, Tabelle 15). Innerhalb der Scaffold-Gruppe deutete sich eine geringere Zunahme von TGF-β1 im Vergleich zu den anderen Gruppen an (+ 77,4 pg / mg Protein).

Tabelle 15: TGF-β1 Konzentration der operierten (OP) und kontralateralen (KL) Menisken (n = 6). Mediandifferenz = Differenz zwischen den TGF-β1 Medianen der operierten und kontralateralen Menisken.

pg TGF / mg Protein	Naht-Gruppe		Scaffold-Gruppe		PrP-Gruppe		MSC-Gruppe		PrP + MSC-Gruppe	
	OP	KL	OP	KL	OP	KL	OP	KL	OP	KL
<b>Median [%]</b>	886	674,3	1058	856,3	878,8	758,4	702,1	524,1	768,3	644,6
<b>IQR [%]</b>	664,2	597,9	689,7	620,6	699,1	536,3	637,6	453,2	688,6	477,7
<b>Mediandifferenz [%] (IQR)</b>	940,1	735	1133	960,3	1222	1128	961,6	657,2	916,9	714,5
<b>Signifikanz zum KL Meniskus</b>	152,1 (29,7 – 272,7)		77,4 (61,5 – 258,2)		134,6 (63,9 – 165,7)		178 (114,8 – 373,9)		235,7 (4,1 – 291,5)	
	0,094		0,031		0,031		0,063		0,094	

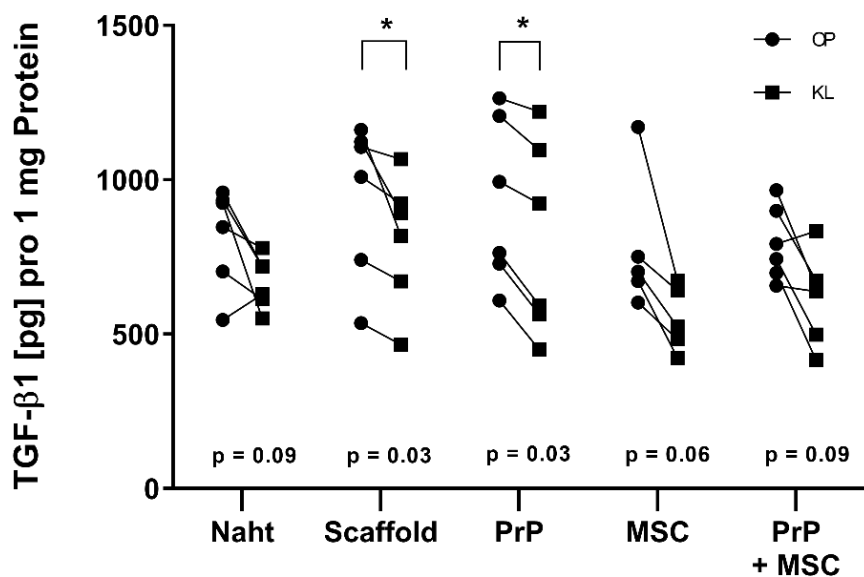


Abb. 21: TGF-β1 Konzentration der Menisken der fünf Therapiegruppen, sowohl operiert (OP, Kreis) als auch kontralateral (KL, Quadrat). Der jeweils korrespondierende kontralaterale Meniskus ist durch eine Linie verbunden. \* =  $p \leq 0,05$ .

Bezüglich der Konzentration von **FGF-2** ließ sich tendenziell in allen fünf Gruppen eine geringere Konzentration von FGF-2 in den operierten Menisken ableiten (Abb. 22).

In der Naht- (Median - 1257 mg / mg Protein, IQR - 1415 – -471 mg / mg Protein) und PrP + MSC-Gruppe (Median - 711,4 mg / mg Protein, IQR - 2357 – -290 mg / mg Protein) war diese Abnahme signifikant im Vergleich zu den kontralateralen Menisken ( $p = 0,031$ ).

Beim Vergleich der Konzentrationsveränderungen von FGF-2 zwischen den fünf Therapiegruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ , Tabelle 16). Graphisch zeichnete sich die stärkste Abnahme von FGF-2 in der PrP-Gruppe ab (Median - 2214 pg / mg Protein, IQR - 3612 – + 371 pg / mg Protein), am geringsten sank die Konzentration in der MSC-Gruppe (Median - 430,3 pg / mg Protein, IQR - 1120 – + 15 pg / mg Protein).

Tabelle 16: FGF-2 Konzentration der operierten (OP) und kontralateralen (KL) Menisken ( $n = 6$ ). Mediandifferenz = Differenz zwischen den FGF-2 Medianen der operierten und kontralateralen Menisken.

pg FGF-2 / mg Protein	Naht-Gruppe		Scaffold-Gruppe		PrP-Gruppe		MSC-Gruppe		PrP + MSC-Gruppe	
	OP	KL	OP	KL	OP	KL	OP	KL	OP	KL
<b>Median</b>	2648	3703	2081	3317	2094	4035	2283	2817	2585	3516
<b>IQR [%]</b>	2318	3477	1932	2524	1644	2977	1851	2214	1993	2833
	3181	4001	2695	4649	2671	5672	3214	3904	3342	4918
<b>Mediandifferenz [%] (IQR)</b>	-1257 (-1415 – -471)		-1135 (-2545 – +478)		-2214 (-3612 – +371)		-430,3 (-1120 – +15)		-711,4 (-2357 – -290)	
<b>Signifikanz zum KL Meniskus</b>	0,031		0,219		0,156		0,189		0,031	

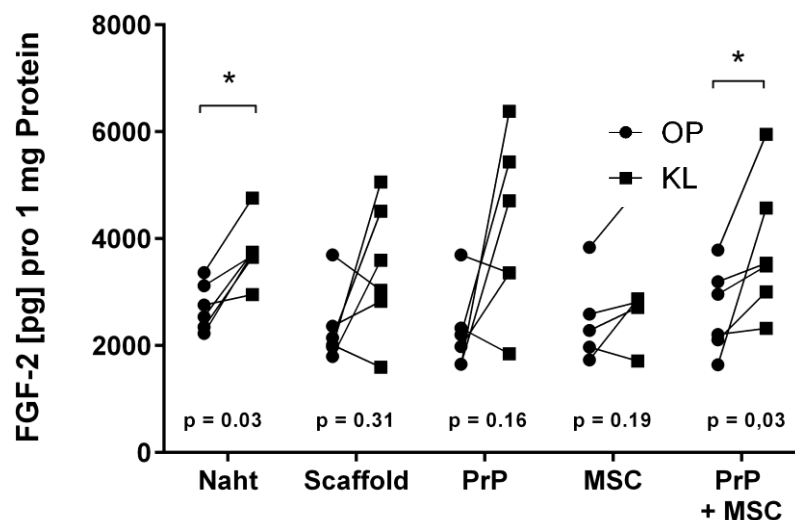


Abb. 22: FGF-2 Konzentration der operierten (OP, Kreis) als auch kontralateralen Menisken (KL, Quadrat). Der jeweils korrespondierende kontralaterale Meniskus ist durch eine Linie verbunden. \* =  $p \leq 0,05$ .

## 5 DISKUSSION

---

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Studie ist, dass weder durch die kombinierte lokale Applikation von PrP + MSCs noch durch die jeweils alleinige Applikation *in vivo* nach acht Wochen eine makroskopische Heilung von Meniskusrissen in der avaskulären Zone erzielt wurde. Somit wird die erste Hypothese abgelehnt.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Untersuchungen zum alleinigen Einsatz von PrP bei der Meniskusheilung zeigten ein Potential, die Heilung avaskulär verlaufender Meniskusrisse zu verbessern. So konnten in einem Kaninchenmodell Hinweise darauf gefunden werden, dass die Applikation von PrP in einen avaskulären, 1,5 mm messenden Meniskusstanzdefekt zu einer erhöhten Anzahl an Fibrochondrozyten und extrazellulärer Matrix führte (62). Bereits nach vier Wochen konnte deutliches Reparaturgewebe abgegrenzt werden. Dem widersprechen die Resultate dieser Arbeit, in der auch nach acht Wochen makroskopisch keine Heilungstendenz ausgemacht werden konnte. Eine mögliche Ursache für die kontroversen Ergebnisse beim Einsatz von PrP kann in der uneinheitlichen Definition des Therapeutikums PrP liegen. Die Autoren der zitierten Studie erreichten eine 4,89-fache Anreicherung der Thrombozyten im PrP verglichen mit dem Normalblut (1.044.500 /  $\mu$ l im PrP verglichen mit 213.300 /  $\mu$ l im Normalblut). Für die vorliegende Arbeit wurde PrP jedoch als Plasma definiert, dessen Thrombozytenkonzentration oberhalb der des individuellen Vollblut-Referenzwerts lag. Es wird kontrovers diskutiert, welche Thrombozytenkonzentration einen optimalen Effekt auf den Heilungsprozess hat. Teilweise wird der Einsatz möglichst hoher Konzentrationen empfohlen (81). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass eine sehr hohe Konzentration an Thrombozyten negative Effekte auf die Heilung hat. So konnte für Tenozyten gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen (> 2.000.000 /  $\mu$ l) von Thrombozyten im PrP die Migrations-, Proliferations- und Kollagenproduktionsrate herabsetzen (82). Mehrere Autoren empfehlen daher nach neueren Untersuchungen im Humanen eine Konzentration der Thrombozyten im PrP um das Zwei- bis Dreifache im Vergleich zum Vollblut, da sich dadurch die besten klinischen Heilungsergebnisse erzielen ließen (83-85). Eine weitere Empfehlung bezieht sich nicht auf die Thrombozytenkonzentration im PrP im Vergleich zum Vollblut, sondern empfiehlt eine Thrombozytenkonzentration > 1.000.000 /  $\mu$ l unabhängig von der Vollblutkonzentration (66). Dies wurde von den Autoren als

„therapeutisches PrP“ bezeichnet. Dieser von Marx *et al.* geprägte Begriff bezieht sich jedoch nur auf eine Anwendung im Humanen und berücksichtigt nicht die teilweise sehr geringe Thrombozytenkonzentration im ovinen Blut. Mit der beschriebenen dualen Zentrifugation wurde in dieser Studie eine durchschnittliche Konzentration der Thrombozyten um den Faktor 2,8 erreicht. Damit liegt das gewonnene PrP in den Grenzen des postulierten Konzentrationsoptimums. In der Studie von Sarkar *et al.*, deren Methode zur Gewinnung von ovinem PrP dieser Studie zu Grunde gelegt wurde, wurde eine Anreicherung von Thrombozyten im PrP um den Faktor 3,5 erreicht (71). Beschrieben ist aber auch hier eine relativ große Thrombozytenkonzentrationsspanne von 423.000 /  $\mu\text{l}$  bis 1.695.000 /  $\mu\text{l}$ . Im Rahmen der kritischen Frage nach der optimalen Thrombozytenkonzentration zeigten sich bereits in den Voruntersuchungen starke intra- und interindividuelle Thrombozytenkonzentrationschwankungen. Dieses Phänomen ist auch im humanmedizinischen Bereich bekannt (86). Außerdem zeigte sich eine Abnahme der messbaren Thrombozytenkonzentration, je länger der Zeitraum zwischen der Entnahme und der Konzentrationsmessung ausfiel. Dies erforderte eine rasche Konzentrationsbestimmung vor der Applikation. Hierbei sollte die Zeit zwischen Blutabnahme, PrP-Gewinnung und Zellzählung möglichst kurz sein, um eine Degranulation der Thrombozyten (Verklumpung) zu verhindern, da sonst eine sichere Zellzählung nicht mehr gewährleistet ist. Zur Vermeidung einer Agglutination wurde zusätzlich ACD-A eingesetzt, welches eine vorzeitige und unkontrollierte Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten verhindert. Im Vergleich aller verfügbaren Antikoagulantien bei der Gewinnung von PrP wird der Einsatz von ACD-A empfohlen (87). Eine automatisierte Zählung direkt im Anschluss an die Entnahme war logistisch nicht realisierbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die manuelle Zählung der Thrombozyten im PrP der automatisierten Methode gleichwertig ist (88) und daher alternativ angewandt werden kann.

Neben der Konzentration der Thrombozyten wird dem Anteil an Leukozyten im PrP eine wichtige Bedeutung beigemessen. Zwar deuten die Ergebnisse einiger Studien darauf hin, dass leukozytenreiches PrP positive Effekte auf die Freisetzungskinetik von TGF- $\beta$  aufweist (89). Dies wäre prinzipiell auch für den gewählten Versuchsaufbau erwünscht. Jedoch zeigten weitere Studien, dass leukozytenreiches PrP durch den Gehalt an Matrixmetalloproteasen einen negativen Einfluss auf die Geweberegeneration und somit auf den Heilungsprozess hat und die positive Wirkung der Thrombozyten konterkariert (90). Um außerdem potentiell negative Auswirkungen der Leukozyten auf

die Vitalität der MSCs in dieser Studie zu minimieren, wurde ein Protokoll für leukozytenarmes PrP verwendet. Dieses konnte durch eine doppelte Zentrifugation hergestellt werden. Neben Leukozyten kann auch ein umgebendes inflammatorisches Milieu einen Einfluss auf die Wirkung von PrP haben. In einer *in vitro* Studie an Kaninchenmeniskuszellen, deren Ergebnisse erst nach Abschluss der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche publiziert wurden, wurde der Einfluss von PrP auf die Expressionsrate von Kollagen Typ I und II sowie Aggrecan untersucht (91). Zur Simulation eines Milieus, wie es nach einer Meniskusverletzung im Kniegelenk vorherrscht, wurden die Zellen zusätzlich durch Zugabe von IL-1 $\alpha$  einem inflammatorischen Reiz ausgesetzt. Die alleinige Kultivierung der Zellen in einem PrP-haltigen Medium führte zu verringerter Expression von Kollagenen und Aggrecan. Die Zugabe von PrP zu IL-1 $\alpha$  vorbehandelten Zellen führte zu einer signifikant niedrigeren Konzentration von Kollagen- und Aggrecan-mRNA im Vergleich zur Kultivierung ohne PrP. Die Autoren schlussfolgerten, dass zum einen PrP die Heilungskapazität von Meniskuszellen herabsetzt. Außerdem werden durch hohe Konzentrationen kataboler Enzyme, wie z. B. IL-1 $\alpha$ , die negativen Effekte von PrP potenziert. In derselben Studie wurde PrP in einen Stanzdefekt von Kaninchenmenisken appliziert. Die histologische Analyse nach vier und acht Wochen zeigte eine fibröse Füllung des Defekts. Vitale Meniskuszellen hingegen konnten nicht identifiziert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugabe von PrP in ein Milieu mit katabolen Stressoren (inflammatorische Enzyme, Hypoxie, Bradytrophie) die Heilungswahrscheinlichkeit verringert. Dies ist im Rahmen von Meniskusverletzungen kontraproduktiv.

Ein weiterer Einflussfaktor auf den Effekt von PrP auf Meniskuszellen stellt dessen Aktivierung dar. Auf eine zusätzliche exogene Aktivierung des PrP vor der Applikation (zum Beispiel durch Calcium) wurde in dieser Studie verzichtet. Es ist bekannt, dass die Anwesenheit von Kollagen Typ I ausreicht, um Thrombozyten zur Degranulation anzuregen und zur Wachstumsfaktorfreisetzung zu führen (63). Da in der vorliegenden Studie sowohl durch den zugefügten Riss Kollagenfasern freigelegt wurden als auch die Matrix des verwendeten Scaffolds aus Kollagen Typ I bestand, wurde der Aktivierungsreiz auf Thrombozyten als ausreichend erachtet. Dies entspricht zudem den bereits publizierten Ergebnissen zweier *in vivo* Studien, in denen der Einfluss von PrP auf die Heilung von Meniskusläsionen untersucht wurde. In beiden Fällen wurde auf eine Aktivierung des PrP durch exogene Mittel wie z. B. Calcium verzichtet (62; 92).

Trotz der heterogenen Ergebnisse aus Tierversuchen wird PrP klinisch bereits eingesetzt (93, 94). Bisher fehlen randomisiert kontrollierte Studien für den Einsatz bei Meniskusverletzungen. Lediglich in einer Fall-Kontroll-Studie bei degenerativen horizontalen Läsionen von Patienten unter 35 Jahren, welche bis in die avaskuläre Zone reichten, konnte eine statistisch signifikant höhere radiologische Heilungstendenz durch die intraoperative Zugabe von PrP festgestellt werden (83). Klinisch zeigte sich hier eine signifikante Verbesserung in den beiden KOOS Unterfragebögen „Schmerz“ und „Sport“ für die mit PrP behandelten Patienten. In den anderen Unterfragebögen des KOOS und im IKDC Fragebogen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die signifikante Wirkung von PrP auf Knieschmerzen bei Meniskusrissen, aber auch bei gonarthrotischem Knie, konnte mehrfach gezeigt werden (95, 83): In einer Fall-Kontroll-Studie mit 34 Patienten wurde 15 Patienten (43 %) ein PrP-Hydrogel in einen Meniskusriss eingenäht und bei den restlichen Patienten auf eine Applikation verzichtet. Es zeigte sich durchschnittlich 32 Monate postoperativ eine signifikante Schmerzreduktion und eine erhöhte Belastbarkeit bei Patienten, welchen PrP appliziert wurde. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie muss jedoch erwähnt werden, dass es sich bei den untersuchten Patienten nicht um vollständig avaskulär verlaufende Läsionen handelte, sondern nur um Defekte, welche primär in der vaskulären Zone lagen und ggf. in die avaskuläre Zone hinein reichten. Die Verwendung von PrP in der klinischen Praxis hat demzufolge bereits begonnen. Wissenschaftlich bewiesen ist bisher jedoch nur eine schmerzlindernde Wirkung von PrP (83), nicht jedoch seine Heilungswirkung im Humanen.

Als weitere Möglichkeit zur Optimierung der relativ hohen Versagensrate im Rahmen der Heilung von avaskulär verlaufenden Meniskusverletzungen wurden MSCs diskutiert. Die in der Literatur beschriebenen Resultate bei der lokalen Applikation von MSCs sind allerdings inhomogen, was unter anderem an der Verwendung unterschiedlicher Herkunftsgewebe liegen kann. Generell sind MSCs aus mehreren Ursprüngen zu gewinnen, die am häufigsten verwendete Quelle stellt jedoch wie auch in dieser Studie das Knochenmark (engl. *bone marrow*, BM) dar (96). In einer Studie an Kaninchenmenisken konnte gezeigt werden, dass die Applikation von BM-MSCs in einen Meniskusriss zur Ausbildung von fibrocartilaginärem Bindegewebe führte (97). Zeitgleich zeigten sich aber auch degenerative Veränderungen an den Gelenkknorpeln. Im Vergleich zu der vorliegenden Studie wurden die Tiere zu mehreren Zeitpunkten (6, 12 und 24 Wochen postoperativ) untersucht. Es zeigte sich erst 24 Wochen postoperativ ein

gut in die Umgebung integriertes, fibrocartilaginäres Bindegewebe. Bei einigen Tieren konnte allerdings sogar eine unerwünschte Knorpelhypertrophie beobachtet werden. Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe, welche MSCs in einen avaskulär verlaufenden Riss im Ziegenmodell applizierte (98). Hier kam es vier Monate postoperativ zu keiner makroskopischen Heilung. Ein wesentlicher Unterschied bestand jedoch in der Art der Applikation der MSCs. In der Studie an Ziegenmenisken wurden die MSCs zu einem autologen Fibrinkoagel hinzugefügt und anschließend in den Meniskusriss appliziert. Sowohl die Arbeitsgruppe, welche tendenziell positive Effekte beim Einsatz von MSCs nachweisen konnte, als auch in der hier vorliegenden Studie, wurden die MSCs jedoch auf einem Kollagen-Scaffold implantiert. Der Einsatz und die Auswahl eines Scaffolds sind kritische Punkte in der Therapie von Meniskuläsionen: Die alleinige Applikation eines Kollagen-Scaffolds in einen Riss in der avaskulären Zone von Menisken zeigte in dieser Studie keinen Einfluss auf die makroskopische Heilung. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie an Kaninchenmenisken: Hier zeigten sich sechs und zwölf Wochen nach der Implantation eines unbeladenen Scaffolds histologisch darin lediglich fibröses Gewebe, eine biomechanische Stabilität oder gar eine Heilung konnten nicht nachgewiesen werden (99). In dem verwendeten Scaffold konnten jedoch zum einen bis zu vier Wochen nach Implantation vitale MSCs nachgewiesen werden (72). Zum anderen wurde für den verwendeten Scaffold eine Toleranz gegenüber dynamischer Kompression ohne Dimensionsveränderungen *in vitro* nachgewiesen, nach etwa acht bis zehn Wochen hatte sich dieser allerdings aufgelöst (100). Die wichtigste Funktion von Scaffolds besteht jedoch darin, als „Gerüst“ für implantierte Zellen zu dienen. Wenn sich der Scaffold acht Wochen postoperativ wie in der eben erwähnten Studie nicht mehr histomorphologisch nachweisen lässt, fehlte den applizierten MSCs diese Möglichkeit der lokalen Adhäsion. Dies kann eine Ursache dafür darstellen, dass die Applikation eines MSC-beladenen Scaffolds in der vorliegenden Untersuchung nicht zu einer Verbesserung der makroskopischen Heilung führte.

Neben der Auswahl des Carriers scheint die Vordifferenzierung der MSCs eine entscheidende Rolle zu spielen: Applizierte man einen Scaffold beladen mit undifferenzierten MSCs in einen artifiziell verletzten Kaninchenmeniskus, bildete sich vollständig in das umgebende Gewebe integriertes Reparaturgewebe aus. Wurden die MSCs in einem chondrogenen Medium vordifferenziert, kam es zu einer stärkeren Ausbildung von Reparaturgewebe. Dieses war jedoch nur teilweise in das umliegende Gewebe integriert, insbesondere bei Implantation in die avaskuläre Zone (101). Die



Autoren empfahlen, vordifferenzierte MSCs in Gewebe zu implantieren, welche einer hohen biomechanischen Belastung ausgesetzt sind (99). Da diese Implantate im Rahmen der chondrogenen Differenzierung deutlich aushärten, verbleiben sie möglicherweise länger am Ort des Defekts. Insgesamt beurteilen die Autoren die Ergebnisse der alleinigen Applikation von MSCs in einen Defekt des medialen Meniskus als nicht zufriedenstellend, da bei bis zu 25 % der operierten Tiere eine vollständige Heilung ausblieb. Außerdem war die biomechanische Belastbarkeit der geheilten Menisken stets geringer im Vergleich zu den gesunden Menisken (102). Sowohl durch die zitierte Arbeitsgruppe als auch in der hier durchgeführten Untersuchung wurden pro Tier circa 1,5 Mio. MSCs appliziert. Unterschiede hingegen bestanden in der Wahl des Tiermodells (Kaninchen vs. Schaf) und der Art des applizierten Defekts (Stanzdefekt vs. Rissdefekt, s.u.).

Die Kernaussage der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stellt jedoch dar, dass auch die kombinierte lokale Applikation von PrP + MSCs *in vivo* nach acht Wochen nicht zu einer Heilung avaskulär verlaufender Meniskusrisse führte. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu *in vitro* Arbeiten, welche additive Effekte im Sinne einer verstärkten Proliferation von MSCs und erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix bei der kombinierten Applikation von PrP und MSCs zeigen konnten (68, 69). Wurde jedoch die Kombination von PrP + MSCs *in vivo* bei ovinen Beugesehnenverletzungen untersucht, zeigten sich keine synergistischen Effekte (103). Die Autoren applizierten flüssiges PrP (Thrombozytenkonzentration im Durchschnitt 882.000 pc /  $\mu$ l) und MSCs in einen artifiziellen Beugesehnenriss. Im Anschluss wurde das Ergebnis sowohl mit der alleinigen Applikation von PrP oder MSCs als auch mit einer Kontrollgruppe ohne Applikation verglichen. Es zeigte sich, dass die kombinierte Anwendung von PrP + MSCs keine synergistischen Effekte auf die Sehnenheilung ausübte. Der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix besteht sowohl in Sehnen (104) wie auch im Meniskus aus Kollagen. Während in Sehnen Kollagen Typ I dominiert, variiert in Menisken die Kollagenverteilung je nach Region (105). In der vaskulären Zone findet sich hauptsächlich Kollagen Typ I, in der avaskulären Zone jedoch Kollagen Typ II (10). Auf zellulärer Ebene finden sich in Sehnen außerdem hauptsächlich Tenozyten, wohingegen im Meniskus Fibrochondrozyten dominieren. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die isolierte Anwendung von PrP oder MSCs das Heilungsvermögen auch von Sehnen verbesserte, sodass ein Vergleich mit dem Meniskus prinzipiell möglich ist (106, 107). Allerdings injizierten die Autoren der zitierten Studie Stammzellen, welche aus dem

Vollblut gewonnen wurden, wohingegen in der vorliegenden Arbeit MSCs aus dem Knochenmark lokal auf einem Scaffold appliziert wurden. Im Gegensatz dazu konnten positive Ergebnisse bei der kombinierten klinischen Anwendung von PrP + MSCs bei der Anwendung an Knorpeldefekten erreicht werden, die aufgrund einer Varusfehlstellung entstanden waren (108). Im Rahmen einer hohen tibialen Osteotomie wurde bei 23 bzw. 21 Patienten entweder nur PrP oder zusätzlich MSCs intraartikulär appliziert. Zum Zeitpunkt der Metallentfernung zeigte die Gruppe mit der kombinierten Anwendung eine signifikant höhere Rate an Knorpelbildung im Vergleich mit der alleinigen Applikation von PrP. Hierbei wurden Stammzellen aus dem Fettgewebe gewonnen und PrP intraartikulär injiziert. Auffallend ist insgesamt, dass es für die kombinierte Anwendung von PrP + MSCs *in vivo* nur eine geringe Anzahl an Studien gibt. Für die Anwendung am Meniskus sind die im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse die bisher einzigen erzielten Resultate. Sie zeigen, dass die kombinierte Anwendung von PrP + MSCs nach acht Wochen im Tiermodell nicht zu einer suffizienten Heilung führte.

Neben den angesprochenen gruppenspezifischen Faktoren haben auch peri- und postoperative Faktoren einen Einfluss auf die Aussagekraft der hier erhobenen Resultate. So wurden Unterschiede in der Art und Weise, wie im Tiermodell ein traumatischer Meniskusriss imitiert wird, nachgewiesen. Zwei Verfahren haben sich technisch etabliert, zum einen der Stanzdefekt, zum anderen ein scharf mit dem Skalpell applizierter Defekt. In einem *in vivo* Modell wurde doppelt zentrifugiertes PrP entweder in einen 2 mm Stanzdefekt oder in einen 4 mm Meniskusriss in der avaskulären Zone appliziert und das Gewebe nach sechs und zwölf Wochen histologisch untersucht (92). Zu beiden Untersuchungszeiträumen zeigten die Menisken der Stanzdefektgruppe eine histologisch bessere Heilung als die Rissgruppe. Der Hauptgrund für diesen wichtigen Unterschied dürfte darin liegen, dass der Meniskus nach Applikation eines longitudinal verlaufenden Risses höheren biomechanischen Belastungen im Vergleich zu einem Stanzdefekt ausgesetzt ist und somit schlechter heilt. Von klinischer Relevanz sind jedoch allen voran Rissdefekte, wie sie in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt wurden. Interessanterweise brachte der Einsatz von PrP in der zitierten Arbeit aber nur einen makroskopischen Heilungsvorteil bei Applikation eines Stanzdefekts. Die Applikation eines scharf gesetzten Risses kommt der biomechanischen Realität nach traumatischem Meniskusriss näher, mindert damit allerdings auch die Wahrscheinlichkeit einer Meniskusheilung. Letztlich ist dies aber auch ein Abbild der Realität, in der traumatische

avaskulär verlaufende Meniskusrisse eine hohe therapeutische Versagensrate aufweisen.

Ein Faktor, der den Heilungsverlauf postoperativ beeinflusst, stellt die Mobilisation dar. Auf eine starre Immobilisierung der operierten Gliedmaße wurde im vorliegenden Fall verzichtet. Als Vierfüßler entlastet das Schaf die operierte Gliedmaße postoperativ bis zum Erreichen der Schmerzkomensation, anschließend tritt seine Eigenschaft als ausgeprägtes Fluchttier in Erscheinung und es belastet die operierte Extremität wieder. Die Auswirkungen der postoperativen Immobilisierung auf den Heilungserfolg von Meniskusrissen werden kontrovers diskutiert: In einem Hundemodell konnte beobachtet werden, dass es bei postoperativer Immobilisierung zu einer geringeren Bildung von fibrokartilaginären Bindegewebe kam (109). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Menisken postoperativ immobilisierter Hunde nach einem artifiziell gesetzten Meniskusriss signifikant geringere Mengen an Kollagen im Vergleich zu postoperativ *ad libitum* mobilisierten Tieren aufwiesen (110). Weitere *in vitro* Ergebnisse deuten darauf hin, dass hydrostatischer Druck die Synthese von Kollagen in Meniskuszellkulturen signifikant steigert und durch die zusätzliche Applikation von TGF- $\beta$ 1 weiter verstärkt wird (111). Andere Autoren sehen keinen wesentlichen Unterschied im Heilungserfolg in Bezug zum postoperativen Prozedere (112). In der Humanmedizin wird zwar von einer Immobilisierung nach Meniskusrefixation abgesehen, die Flexion im Kniegelenk wird mitunter aber durch eine Schiene oder Orthese postoperativ eingeschränkt und erst schrittweise freigegeben (113). Dies stellt einen Kompromiss zwischen der Vermeidung von Scherkräften auf die Meniskusnaht und der Reduktion von Sekundärkomplikationen, u.a. Muskelatrophien, dar (114). Diese körperliche Schonung wäre im Tiermodell nur näherungsweise unter Zuhilfenahme eines *Fixateur externe* möglich. Aufgrund dieser Kontroverse und der Tatsache, dass weder der *Fixateur externe* noch die vollständige Ruhigstellung im Gips nach Meniskusrefixation klinisch eine Relevanz haben, wurden die Tiere in der vorliegenden Studie wie auch in anderen Studien *ad libitum* mobilisiert (115, 51).

Ein weiterer modulierender Faktor ist die Länge des postoperativen Beobachtungszeitraums. So konnte in einer *in vivo* Studie an Kaninchenmenisken acht Wochen postoperativ mit der hier angewandten Methode keine makroskopische Heilung erreicht werden (92). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie an Hundemenisken, bei der scharf ein artifizieller Riss in der avaskulären Zone gesetzt und dieser mit einem Scaffold oder einer Trepanation sowie einer anschließenden Naht

versorgt wurde (116). Histologisch wurde nach 6, 12 und 24 Wochen das Vorhandensein von Regenerationsgewebe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in einem Teil der mit einem Scaffold operierten Menisken nach sechs Wochen Regenerationsgewebe von den umliegenden Defekträndern in den Riss vordrang. Erst nach einem im Vergleich zum vorliegenden Versuch deutlich längeren Beobachtungszeitraum von 24 Wochen zeigten alle operierten Menisken defektübergreifendes Bindegewebe. Zur Identifikation einer Heilungstendenz muss man also einen möglichst langen postoperativen Beobachtungszeitraum einkalkulieren. Dies konkurriert mit der Möglichkeit, Veränderungen in der Konzentration von Wachstumsfaktoren nachzuweisen: So konnte in Studien bereits eine stetige Abnahme positiv gefärbter Zellen ab dem siebten postoperativen Tag gezeigt werden (117), wenngleich auch nach 56 Tagen tendenziell mehr Zellen in den operierten Menisken angefärbt waren. In der klinischen Praxis umfasst die Nachbehandlung von Meniskusnähten eine Teilbelastung von bis zu acht Wochen an zwei Unterarmgehstützen und eventuell das Tragen einer Knieschiene oder Orthese (118). Im Anschluss dürfen die Patienten jedoch ihre Extremität wieder voll, ohne das Tragen einer Orthese, belasten. Lediglich die tiefe Hocke wird für bis zu drei Monate untersagt. Aus diesem Grund wurde der Nachbeobachtungszeitraum in dieser Studie vorab auf acht Wochen festgelegt.

Um die hier erzielten Ergebnisse mit den in der Humanmedizin angewandten Methoden vergleichen zu können, ist es unerlässlich, ein Tiermodell zu wählen, welches sowohl anatomische als auch biomechanische Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Kniegelenk aufweist. Das ovine Kniegelenk ähnelt im Vergleich zu anderen Spezies dem humanen Kniegelenk: Histologisch sind die Eindringtiefe der Gefäße (11 % ovin vs. 14 % human) wie auch die Zellmorphologie und -architektur vergleichbar. Auch biochemisch ist die Verteilung von Kollagen und dessen lamellare Anordnung zwischen Mensch und Schaf vergleichbar (119). Außerdem betragen die epikondyläre Breite sowie die tibialen Ausmaße im Wesentlichen ein Drittel des humanen Kniegelenks (120). Aus diesen Gründen wurde das Schaf als Modellorganismus für die hier vorliegende Studie ausgewählt. Allerdings zeigen die bisher publizierten Studien, dass auch nach einem sechsmonatigen Nachbeobachtungszeitraum ovine Meniskusnähte im Schafmodell nur partiell heilten (121). Der Einsatz des Schafs als Tiermodell für die Untersuchung von Meniskusverletzungen in der avaskulären Zone ist demzufolge eine Herausforderung.

Neben der makroskopischen Heilung sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob es durch die kombinierte Anwendung von PrP + MSCs acht Wochen postoperativ zu einer Veränderung in der Konzentration der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1 und FGF-2 kommt, die für die Heilung von Meniskusrissen eine wichtige Rolle spielen. Eine signifikante Zunahme der Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 oder FGF-2 durch die kombinierte Applikation von PrP + MSCs in Meniskusrisse der avaskulären Zone konnte im Vergleich zur alleinigen Applikation in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Damit wird auch die zweite Hypothese abgelehnt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass es in allen Gruppen zu einer (teilweise auch signifikanten) Zunahme von TGF- $\beta$ 1 und Abnahme von FGF-2 in den operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Menisken kam.

Die Zunahme von TGF- $\beta$ 1 in den operierten Menisken könnte unter anderem dadurch zu erklären sein, dass es durch die Applikation von PrP in einer frühen postoperativen Phase zu einer Aktivierung der MSCs und ortsständigen Fibrochondrozyten kam. Hierdurch wurde die Syntheseleistung ruhender Zellen stimuliert und die *de-novo* Synthese von TGF- $\beta$ 1 initiiert. Im Laufe ihrer Proliferation und Differenzierung produzieren die Zellen eigenständig Wachstumsfaktoren, welche auf umliegende Zellen (Fibrochondrozyten, ruhende MSCs) wirken können. Es ist unwahrscheinlich, dass die erhöhten Level von TGF- $\beta$ 1 nach acht Wochen direkt auf die intraoperative Applikation von PrP zurückzuführen sind. Effekte wie die hier erhöht gemessene Konzentration von TGF- $\beta$ 1 sind daher in erster Linie durch eine *de novo* Synthese der Wachstumsfaktoren zu erklären. Immunhistochemisch wurden das Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 bisher nur in Kaninchenmenisken nachgewiesen (117): Die Autoren dieser Studie untersuchten Veränderungen in der Konzentration von TGF- $\beta$ 1 als Reaktion auf ein *meniscal rasping* in der femoralen Oberfläche. Bei diesem Verfahren wird die femorale Meniskusoberfläche sowie die parameniskale *Membrana synovialis* mechanisch angeraut. Hierdurch kommt es zu einer verbesserten Heilung von Rissen in der avaskulären Zone. Die Autoren setzten bilateral eine 5 mm messende Läsion in den avaskulären Teil von Kaninchenmenisken und führten unilateral ein *rasping* durch. Es zeigte sich, dass die ortsständigen (Fibro-)Chondrozyten sowohl auf das Setzen eines Defekts wie auch auf das *rasping* mit einer verstärkten Produktion von TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu nativen Menisken reagierten. Menisken, deren Oberfläche zusätzlich aufgeraut wurde, zeigten am siebten und 14. postoperativen Tag signifikant mehr Produktion von TGF- $\beta$ 1. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch

nach acht Wochen eine erhöhte Konzentration von TGF- $\beta$ 1 immunhistochemisch nachweisbar war. Dies zeigte sich jedoch unabhängig von der durchgeführten Therapie und trat auch in der Gruppe auf, welche nur genäht wurde und weder PrP noch MSCs appliziert bekam. Eine mögliche Schlussfolgerung hieraus wäre demnach, dass es durch die operative Manipulation (der Applikation eines Risses, die Naht mit der Punktion des Meniskus von der Peripherie ausgehend) zur Veränderung des Wachstumsfaktorlevels kommt. In einer weiteren Studie mit Kaninchenmenisken wurde die Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren nach Zufügen eines Rissdefekts in der avaskulären Zone getrennt nach vaskulärer und avaskulärer Zone untersucht. Mittels rt-PCR wurde der Gehalt an TGF- $\beta$ 1 - mRNA im Verhältnis zur Expression eines Housekeeping-Gens (GAPDH) zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass es im postoperativen Verlauf in den Menisken in der vaskulären Zone innerhalb der ersten Woche zu einer Abnahme der mRNA von TGF- $\beta$ 1 kam (122). In der avaskulären Zone konnte bis 120 Tage postoperativ tendenziell eine verringerte Expression von TGF- $\beta$ 1 ermittelt werden, auch wenn diese nicht statistisch signifikant war. Die Autoren sehen in dieser Tatsache eine mögliche Erklärung dafür, dass es nicht zur Ausheilung der Menisken kam. Die Verringerung der Konzentration von TGF- $\beta$ 1 steht teilweise in Widerspruch zu den hier erhobenen Resultaten. Es liegen jedoch relevante methodische Unterschiede vor: Zum einen wurde in der vorliegenden Studie TGF- $\beta$ 1 auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und ELISA quantifiziert, während Ruiz-Ibán *et al.* die Genexpressionsebene adressierten (rt-PCR). Aussagen über die metabolische Konsequenz sind hierbei nur indirekt möglich, während durch eine Immunhistochemie bzw. einen ELISA der aktive, zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhandene Wachstumsfaktor quantifiziert wird. Da des Weiteren keine Messung an Tag 56 vorgenommen wurde, ist ein direkter Vergleich nicht möglich.

Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Integration eines Scaffolds wurde in einer weiteren *in vitro* Studie untersucht (34): Hierzu wurde ein MSC-beladener Scaffold 40 Tage in einer Sandwich-Technik mit avaskulären Meniskuszellexplantaten inkubiert. Wurde dem Inkubationsmedium TGF- $\beta$ 1 hinzugefügt, zeigte sich, dass der Scaffold nahezu nicht in das umgebende Meniskusgewebe einwuchs. Die Autoren führen als mögliche Ursache für diese überraschende Tatsache an, dass TGF- $\beta$ 1 einen entscheidenden Faktor in der Differenzierung von MSCs darstellt. Das Vorhandensein von TGF- $\beta$ 1 könne, so die Hypothese der Autoren, noch vor Besiedlung des Scaffolds zu einer (End-)Differenzierung der MSCs führen und so deren Migrationsbereitschaft in den

Scaffold und ihren parakrinen Effekt herabsetzen. Ein ähnlicher Effekt könnte auch in der hier vorliegenden Untersuchung eingetreten sein: Die hohen Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 im lokal applizierten PrP könnten zu einer raschen Differenzierung der MSCs geführt haben. Hierdurch könnte das Integrationspotential der MSCs in das umliegende Gewebe herabgesetzt worden sein. Um diese Frage zu klären, wäre es in weiteren Untersuchungen notwendig, die Meniskusexplantate auf das Vorhandensein vitaler MSCs bzw. deren Differenzierungsstufen zu untersuchen. Bisher konnte außerdem nicht hinreichend geklärt werden, welche Faktoren dazu beitragen, dass TGF- $\beta$ 1 *in vivo* aktiviert wird. Eine Rolle scheinen jedoch die an der Entzündungskaskade beteiligten Matrix-Metalloproteasen (MMP) Typ 2 und 9 zu spielen. Sie lösen TGF- $\beta$ 1 aus seiner Bindung an das LAP und aktivieren es somit (123). Zusammenfassend muss also beachtet werden, dass gerade TGF- $\beta$ 1 im Rahmen der Wundheilung eine dichotome Funktion aufweist. Nur im Kontext des zeitlichen, lokalen und konzentrationsabhängigen Auftretens und in Abhängigkeit des Zelltyps ist ein wachstumshemmender oder -fördernder Effekt zu definieren (43, 124, 41).

Dieser hoch dynamische Prozess ist eine Herausforderung für jede experimentelle Untersuchung. Dies gilt für TGF- $\beta$ 1 - ebenso wie für FGF-2: Eine Verringerung der Konzentration von FGF-2 zeigte sich tendenziell in allen operierten Menisken im Vergleich zu den kontralateralen Kontrollmenisken, unabhängig von der durchgeführten Therapie. Dies stellt eine überraschende Erkenntnis dar, da FGF-2 eine wichtige Rolle in der Proliferationsinduktion von Meniskuszellen spielt. *In vitro* gezüchtete, humane Meniskuszellen zeigten typischerweise eine deutlich verringerte Expression von Kollagen Typ II und einen Fibroblasten-artigen Phänotyp (125). Man nimmt an, dass dieser veränderte Phänotyp den biomechanischen Anforderungen nicht gewachsen ist und daher Meniskuszellimplantate verminderte biomechanische Fähigkeiten aufweisen (126). Durch die Kultivierung mit FGF-2 konnte erreicht werden, dass Meniskuszellen eine bis zu 200-fache Menge an Kollagen Typ II exprimierten und eine dreidimensionale Matrix ausbildeten (126). Allerdings deuten *in vitro* Ergebnisse mit ovinen Meniskuszellen darauf hin, dass FGF-2 unterschiedliche Wirkungen auf Zellen der vaskulären oder avaskulären Region ausübt: Wurden Meniskuszellen der vaskulären Region unter Anwesenheit von FGF-2 kultiviert, kam es nicht zu einer Induktion der Genexpression von Kollagen Typ I oder Typ IIa, dafür aber zu einer verstärkten Expression von MMP-13 (127). Diese Protease ist entscheidend an der Degradation von Kollagenfasern beteiligt. Die Zellen der avaskulären Region hingegen reagierten durch die Kultivierung mit FGF-2 mit einer

deutlichen Steigerung der Expression von Kollagen Typ I und IIa. Auch hier wird deutlich, dass Wachstumsfaktoren im Rahmen der Heilung von Meniskusverletzungen eine zentrale Rolle zuteilwird. Ihre Wirkung hängt aber von ihrem zeitlichen, lokalen und konzentrationsabhängigen Auftreten ab. *In vivo* zeigte beispielsweise der Einsatz eines FGF-2 beladenen Gelatine-Hydrogels bei horizontalen Läsionen im vaskulären Drittel von Kaninchenmenisken eine signifikante Verbesserung der histologischen Heilung nach zwei bis zwölf Wochen (115). Im Unterschied zu den zitierten Ergebnissen wurde in der vorliegenden Studie keine direkte Applikation von FGF-2 praktiziert, sondern ein „Cocktail“ aus Wachstumsfaktoren in Form von PrP mit einer hohen Konzentration an FGF appliziert (128). Acht Wochen postoperativ wurde dann die Konzentration unter anderem von FGF-2 evaluiert. Interessanterweise zeigte eine Studie an chronischen humanen Druckulzera, dass die Konzentration von FGF-2 signifikant im Vergleich zu gesunder Haut verringert war. Die Autoren bringen dies mit dem chronisch-inflammatorischen Milieu in Verbindung, welches zu einer Degradation von FGF-2 geführt haben könnte (129). Eine mögliche Hypothese für die Verringerung der Konzentration von FGF-2 acht Wochen postoperativ wäre demnach, dass auch in Meniskusrissen ein inflammatorisches Zytokinmilieu vorherrscht und dies zum Abbau von FGF-2 führte. Hierzu wären weitere immunquantitative Untersuchungen nötig, beispielsweise die Konzentrationsbestimmung der proinflammatorischen Zytokine Interleukinen und TNF- $\alpha$ .

Die hier vorliegende Studie hat auch Limitationen. Ein mit einem Skalpell artifizell gesetzter Riss in den avaskulären Teil des Meniskus kann die realen Bedingungen einer traumatisch entstandenen Verletzung nur nachahmen. Wie bereits erwähnt existieren mehrere Möglichkeiten, Risse in einem Tiermodell herbeizuführen. Den realen Bedingungen kommt dabei der scharf gesetzte, longitudinale Riss näher als ein Stanzdefekt. Hierdurch ist jedoch auch die Zeit zwischen dem Auftreten des Risses und der Naht sehr kurz - oftmals anders als in der Realität. Eine weitere Limitation stellt die relativ kleine Gruppengröße mit  $n = 6$  dar. Diese Tieranzahl war zum einen logistisch und finanziell begründet, außerdem wurden in vergleichbaren Studien sechs Tiere pro Gruppe verwendet (51, 130, 131). Auf eine Power-Analyse wurde jedoch verzichtet. Die geringe Tieranzahl pro Gruppe ist auch der Grund für die konsequente Verwendung nichtparametrischer Tests in der statistischen Auswertung. Zudem wurden als Referenz für die operierten Menisken die kontralateralen, nicht operierten Menisken genutzt. Es existieren keine Untersuchungen dazu, wie stark die Mehrbelastung der nicht operierten



Extremität zu einer Veränderung in der Expression von Wachstumsfaktoren führt. Ausgeschlossen werden konnten jedoch systemische Effekte des PrPs oder der MSCs, da keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl positiv gefärbter Zellen der kontralateralen, nicht operierten Menisken nachweisbar waren. Des Weiteren bilden die dargestellten Ergebnisse der Immunhistochemie und des ELISAs den Ist-Zustand an Tag 56 ab. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Expression von Wachstumsfaktoren vor allem in den ersten zwei postoperativen Wochen zu beobachten sind und nach vier Wochen kein signifikanter Unterschied mehr zum nicht operierten Meniskus nachweisbar war (117). Um herauszufinden, ob sich zu einem früheren Zeitpunkt signifikante Unterschiede zur Nahtgruppe oder zwischen den Therapiegruppen nachweisen lassen, müssten Tiere zu mehreren Zeitpunkten postoperativ nachuntersucht werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

Durch die kombinierte lokale Applikation von PrP und MSCs wurde keine Verbesserung der makroskopischen Heilung von avaskulär verlaufenden Meniskusrissen erzielt. Acht Wochen postoperativ ließen sich tendenziell in allen operierten Menisken erhöhte Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und verringerte Konzentrationen von FGF-2 nachweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Applikation von PrP und MSCs oder der kombinierten Anwendung ließ sich nicht nachweisen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] Kennedy M, Dunne C, Mulcahy B, Molloy M. The sports' clinic: a one year review of new referrals. *Ir Med J* 1993;86:29-30.
  
- [2] Majewski M, Susanne H, Klaus S. Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study. *Knee* 2006;13:184-8.
  
- [3] Mitchell J, Graham W, Best TM, Collins C, Currie DW, Comstock RD, Flanigan DC. Epidemiology of meniscal injuries in US high school athletes between 2007 and 2013. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2016;24:715-22.
  
- [4] Nielsen AB, Yde J. Epidemiology of acute knee injuries: a prospective hospital investigation. *J Trauma* 1991;31:1644-8.
  
- [5] Swenson DM, Collins CL, Best TM, Flanigan DC, Fields SK, Comstock RD. Epidemiology of knee injuries among U.S. high school athletes, 2005/2006-2010/2011. *Med Sci Sports Exerc* 2013;45:462-9.
  
- [6] Greis PE, Bardana DD, Holmstrom MC, Burks RT. Meniscal injury: I. Basic science and evaluation. *J Am Acad Orthop Surg* 2002;10:168-76.
  
- [7] Kusayama T, Harner CD, Carlin GJ, Xerogeanes JW, Smith BA. Anatomical and biomechanical characteristics of human meniscomfemoral ligaments. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1994;2:234-7.
  
- [8] Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982;10:90-5.

- [9] Clark CR, Ogden JA. Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg Am* 1983;65:538-47.
- [10] Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 2011;32:7411-31.
- [11] Cooper DE, Arnoczky SP, Warren RF. Meniscal repair. *Clin Sports Med* 1991;10:529-48.
- [12] van Trommel MF, Simonian PT, Potter HG, Wickiewicz TL. Different regional healing rates with the outside-in technique for meniscal repair. *Am J Sports Med* 1998;26:446-52.
- [13] Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 1987;16:343-56.
- [14] Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. *Sports Health* 2012;4:340-51.
- [15] Herwig J, Egnér E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 1984;43:635-40.
- [16] Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. The Knee Meniscus: A Complex Tissue of Diverse Cells. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2009;2:332-40.

- [17] Englund M, Roos EM, Lohmander LS. Impact of type of meniscal tear on radiographic and symptomatic knee osteoarthritis: a sixteen-year followup of meniscectomy with matched controls. *Arthritis Rheum* 2003;48:2178-87.
- [18] Diemer F, Sutor V. Meniskusverletzungen. *Physiopraxis Refresher* 2009;Supplement 1.
- [19] Edd SN, Giori NJ, Andriacchi TP. The role of inflammation in the initiation of osteoarthritis after meniscal damage. *J Biomech* 2015;48:1420-6.
- [20] Englund M, Guermazi A, Lohmander SL. The role of the meniscus in knee osteoarthritis: a cause or consequence? *Radiol Clin North Am* 2009;47:703-12.
- [21] Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* 1948;30B:664-70.
- [22] Jackson JP. Degenerative changes in the knee after meniscectomy. *Br Med J* 1968;2:525-7.
- [23] Dasic Z, Radoicic D. Arthroscopic partial medial meniscectomy. *Vojnosanit Pregl* 2011;68:774-8.
- [24] Biedert RM. Treatment of intrasubstance meniscal lesions: a randomized prospective study of four different methods. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;8:104-8.
- [25] El Ghazaly SA, Rahman AA, Yusry AH, Fathalla MM. Arthroscopic partial meniscectomy is superior to physical rehabilitation in the management of symptomatic unstable meniscal tears. *Int Orthop* 2015;39:769-75.

- [26] Petty CA, Lubowitz JH. Does arthroscopic partial meniscectomy result in knee osteoarthritis? A systematic review with a minimum of 8 years' follow-up. *Arthroscopy* 2011;27:419-24.
- [27] Mononen ME, Jurvelin JS, Korhonen RK. Effects of radial tears and partial meniscectomy of lateral meniscus on the knee joint mechanics during the stance phase of the gait cycle--A 3D finite element study. *J Orthop Res* 2013;31:1208-17.
- [28] Starke C, Kopf S, Petersen W, Becker R. Meniscal repair. *Arthroscopy* 2009;25:1033-44.
- [29] Jarvela S, Sihvonen R, Sirkeoja H, Jarvela T. All-inside meniscal repair with bioabsorbable meniscal screws or with bioabsorbable meniscus arrows: a prospective, randomized clinical study with 2-year results. *Am J Sports Med* 2010;38:2211-7.
- [30] Grant JA, Wilde J, Miller BS, Bedi A. Comparison of inside-out and all-inside techniques for the repair of isolated meniscal tears: a systematic review. *Am J Sports Med* 2012;40:459-68.
- [31] Konan S, Haddad FS. Outcomes of meniscal preservation using all-inside meniscus repair devices. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:1209-13.
- [32] Tengrootenhuysen M, Meermans G, Pittoors K, van Riet R, Victor J. Long-term outcome after meniscal repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011;19:236-41.
- [33] Rodeo SA. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Arthroscopic Meniscal Repair with Use of the Outside-in Technique. *JBJS* 2000;82:127-41.

- [34] 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;31:2583-91.
- [35] 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;11:131-41.
- [36] Kopf S, Starke C, Becker R. Klinische Ergebnisse nach Meniskusnaht. *Arthroskopie* 2011:30-5.
- [37] Sanchez M, Delgado D, Sanchez P, Fiz N, Azofra J, Orive G, Anitua E, Padilla S. Platelet rich plasma and knee surgery. *Biomed Res Int* 2014;2014:890630.
- [38] Yu H, Adesida AB, Jomha NM. Meniscus repair using mesenchymal stem cells - a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:86.
- [39] 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 Cartilage* 1995;3:127-38.
- [40] Tanaka T, Fujii K, Kumagai Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1999;7:75-80.
- [41] Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:3676-80.

- [42] Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.
- [43] Liu AC, Gotlieb AI. Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells. *Am J Pathol* 2008;173:1275-85.
- [44] Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.
- [45] Hayashi H, Sakai T. Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases. *Front Physiol* 2012;3:12.
- [46] Raju R, Palapetta SM, Sandhya VK, Sahu A, Alipoor A, Balakrishnan L, Advani J, George B, Kini KR, Geetha NP, Prakash HS, Prasad TS, Chang YJ, Chen L, Pandey A, Gowda H. A Network Map of FGF-1/FGFR Signaling System. *J Signal Transduct* 2014;2014:962962.
- [47] Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:166-80.
- [48] Narita A, Takahara M, Ogino T, Fukushima S, Kimura Y, Tabata Y. Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. *Knee* 2009;16:285-9.
- [49] Cucchiarini M, Schetting S, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H. rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and alpha-SMA expression in human meniscal lesions. *Gene Ther* 2009;16:1363-72.



- [50] Tumia NS, Johnstone AJ. Promoting the proliferative and synthetic activity of knee meniscal fibrochondrocytes using basic fibroblast growth factor in vitro. *Am J Sports Med* 2004;32:915-20.
- [51] Kopf S, Birkenfeld F, Becker R, Petersen W, Starke C, Wruck CJ, Tohidnezhad M, Varoga D, Pufe T. Local treatment of meniscal lesions with vascular endothelial growth factor. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:2682-91.
- [52] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
- [53] 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;284:143-7.
- [54] 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;7:393-5.
- [55] Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006;13:419-25.
- [56] Pak J, Lee JH, Lee SH. Regenerative repair of damaged meniscus with autologous adipose tissue-derived stem cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:436029.
- [57] 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 Biol Anim* 2010;46:624-34.
- [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. *Knee* 2005;12:217-23.
- [59] Liao HT, Marra KG, Rubin JP. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20:267-76.
- [60] Andia I, Sánchez M, Maffulli N. Basic Science: Molecular and Biological Aspects of Platelet-Rich Plasma Therapies. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2012;22:3-9.
- [61] Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009;23:177-89.
- [62] 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;13:1103-12.
- [63] DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy* 2012;28:998-1009.
- [64] Mazzocca AD, McCarthy MB, 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;94:308-16.

- [65] Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med* 2014;42:42-9.
- [66] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004;62:489-96.
- [67] Griffin JW, Hadeed MM, Werner BC, Diduch DR, Carson EW, Miller MD. Platelet-rich plasma in meniscal repair: does augmentation improve surgical outcomes? *Clin Orthop Relat Res* 2015;473:1665-72.
- [68] Goedecke A, Wobus M, Krech M, Munch N, Richter K, Holig 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;5:648-54.
- [69] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.
- [70] Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, Dietz AB, Terzic A. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant* 2011;20:797-811.
- [71] 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;27:1817-23.

- [72] Petersen A, Joly P, Bergmann C, Korus G, Duda GN. The impact of substrate stiffness and mechanical loading on fibroblast-induced scaffold remodeling. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1804-17.
- [73] Henning CE, Lynch MA, Yearout KM, Vequist SW, Stallbaumer RJ, Decker KA. Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop Relat Res* 1990;252:64-72.
- [74] Longo UG, Loppini M, Romeo G, Maffulli N, Denaro V. Histological scoring systems for tissue-engineered, ex vivo and degenerative meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013;21:1569-76.
- [75] Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK, D'Lima DD. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:1132-41.
- [76] Moreno B, Woodall CJ, Watt NJ, Harkiss GD. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) expression in ovine lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. *Clin Exp Immunol* 1998;112:74-83.
- [77] Fenwick SA, Curry V, Harrall RL, Hazleman BL, Hackney R, Riley GP. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in chronic tendinosis. *J Anat* 2001;199:231-40.
- [78] Collins JJ, Kunzmann S, Kuypers E, Kemp MW, Speer CP, Newnham JP, Kallapur SG, Jobe AH, Kramer BW. Antenatal glucocorticoids counteract LPS changes in TGF-beta pathway and caveolin-1 in ovine fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;304:L438-44.

- [79] Becker R, Pufe T, Giessmann N, Kuhlow S, Mentlein R, Petersen W. Die Rolle des Angiogenesefaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) bei der Heilung von Meniskusläsionen. *Arthroskopie* 2002;15:190-5.
- [80] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [81] Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, Wiltfang J. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004;25:5387-93.
- [82] Giusti I, D'Ascenzo S, Manco A, Di Stefano G, Di Francesco M, Rughetti A, Dal Mas A, Properzi G, Calvisi V, Dolo V. Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior in vitro. *Biomed Res Int* 2014;2014:630870.
- [83] Pujol N, Salle De Chou E, Boisrenoult P, Beaufils P. Platelet-rich plasma for open meniscal repair in young patients: any benefit? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015;23:51-8.
- [84] Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med* 2011;39:266-71.
- [85] Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent* 2009;18:303-10.
- [86] Cho HS, Song IH, Park SY, Sung MC, Ahn MW, 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;31:212-8.

- [87] Hua L, Lai G, Zhenjun L, Guie M. [The study of anticoagulants selection in platelet-rich plasma preparation]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2015;31:295-300.
- [88] Woodell-May JE, Ridderman DN, Swift MJ, Higgins J. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *J Craniofac Surg* 2005;16:749-56; discussion 57-9.
- [89] Schar MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473:1635-43.
- [90] Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006;24:227-34.
- [91] Lee HR, Shon OJ, Park SI, Kim HJ, Kim S, Ahn MW, 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.
- [92] Zellner J, Taeger CD, Schaffer M, Roldan JC, Loibl M, Mueller MB, Berner A, Krutsch W, Huber MK, Kujat R, Nerlich M, Angele P. Are applied growth factors able to mimic the positive effects of mesenchymal stem cells on the regeneration of meniscus in the avascular zone? *Biomed Res Int* 2014;2014:537686.
- [93] Wei LC, Gao SG, Xu M, Jiang W, Tian J, Lei GH. A novel hypothesis: the application of platelet-rich plasma can promote the clinical healing of white-white meniscal tears. *Med Sci Monit* 2012;18:HY47-50.
- [94] Braun HJ, Wasterlain AS, Dragoo JL. The use of PRP in ligament and meniscal healing. *Sports Med Arthrosc* 2013;21:206-12.

- [95] Laudy AB, Bakker EW, Rekers M, Moen MH. Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2015;49:657-72.
- [96] Yu H, Adesida AB, Jomha NM. Meniscus repair using mesenchymal stem cells - a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:86.
- [97] Walsh CJ, Goodman D, Caplan AI, Goldberg VM. Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng* 1999;5:327-37.
- [98] Port J, Jackson DW, Lee TQ, Simon TM. Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model. *Am J Sports Med* 1996;24:547-55.
- [99] Zellner J, Hierl K, Mueller M, Pfeifer C, Berner A, Dienstknecht T, Krutsch W, Geis S, Gehmert S, Kujat R, Dendorfer S, Prantl L, Nerlich M, Angele P. Stem cell-based tissue-engineering for treatment of meniscal tears in the avascular zone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;101:1133-42.
- [100] Jager M, Degistirici O, Knipper A, Fischer J, Sager M, Krauspe R. Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. *J Bone Miner Res* 2007;22:1224-33.
- [101] Zellner J, Mueller M, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, Nerlich M, Hennemann B, Koller M, Prantl L, Angele M, Angele P. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:1150-61.
- [102] Dutton AQ, Choong PF, Goh JC, Lee EH, Hui JH. Enhancement of meniscal repair in the avascular zone using mesenchymal stem cells in a porcine model. *J Bone Joint Surg Br* 2010;92:169-75.

- [103] Martinello T, Bronzini I, Perazzi A, Testoni S, De Benedictis GM, Negro A, Caporale G, Mascarello F, Iacopetti I, Patrino M. Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *J Orthop Res* 2013;31:306-14.
- [104] Kleiner DM. Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology: *J Athl Train*. 1998 Apr-Jun;33(2):185-6.
- [105] Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10:312-20.
- [106] Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan MV, Wang JH. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:173.
- [107] Yokoya S, Mochizuki Y, Natsu K, Omae H, Nagata Y, Ochi M. Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2012;40:1259-68.
- [108] Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ. Comparative outcomes of open-wedge high tibial osteotomy with platelet-rich plasma alone or in combination with mesenchymal stem cell treatment: a prospective study. *Arthroscopy* 2014;30:1453-60.
- [109] Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:1209-17.



- [110] 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 Sports Med* 1995;23:721-8.
- [111] Gunja NJ, Uthamanthil RK, Athanasiou KA. Effects of TGF-beta1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds. *Biomaterials* 2009;30:565-73.
- [112] Huang TL, Lin GT, O'Connor S, Chen DY, Barmada R. Healing potential of experimental meniscal tears in the rabbit. Preliminary results. *Clin Orthop Relat Res* 1991;267:299-305.
- [113] Bohnsack M, Ruhmann O. [Arthroscopic meniscal repair with bioresorbable implants]. *Oper Orthop Traumatol* 2006;18:425-52.
- [114] Keller K, Engelhardt M. [Muscle atrophy caused by limited mobilisation]. *Sportverletz Sportschaden* 2013;27:91-5.
- [115] 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;28:255-63.
- [116] Cook JL, Fox DB. A novel bioabsorbable conduit augments healing of avascular meniscal tears in a dog model. *Am J Sports Med* 2007;35:1877-87.
- [117] Ochi M, Uchio Y, Okuda K, Shu N, Yamaguchi H, Sakai Y. Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing. *Arthroscopy* 2001;17:724-31.
- [118] Cavanaugh JT, Killian SE. Rehabilitation following meniscal repair. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2012;5:46-58.

- [119] 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;27:1197-203.
- [120] Osterhoff G, Loffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P. Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee* 2011;18:98-103.
- [121] 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* 2017;6:1237-48.
- [122] Ruiz Iban MA, Comellas Melero N, Martinez-Botas J, Ortiz A, Diaz Heredia J. Growth factor expression after lesion creation in the avascular zone of the meniscus: a quantitative PCR study in rabbits. *Arthroscopy* 2014;30:1131-8.
- [123] Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816-27.
- [124] Sellheyer K, Bickenbach JR, Rothnagel JA, Bundman D, Longley MA, Krieg T, Roche NS, Roberts AB, Roop DR. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5237-41.
- [125] Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, Horibe S, Tada K, Ochi T, Yoshikawa H. Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 2001;391:S208-18.

- [126] 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:R61.
- [127] 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;30:1647-51.
- [128] El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007;78:661-9.
- [129] Jiang L, Dai Y, Cui F, Pan Y, Zhang H, Xiao J, Xiaobing FU. Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing. *Spinal Cord* 2014;52:145-51.
- [130] Guisasola I, Vaquero J, Forriol F. Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep. *Clin Orthop Relat Res* 2002:227-33.
- [131] Burger C, Kabir K, Rangger C, Mueller M, Minor T, Tolba RH. Polylactide (LTS) causes less inflammation response than polydioxanone (PDS): a meniscus repair model in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2006;126:695-705.

## 8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

---

„Ich, Raphael-Donatus Hein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Der Effekt der lokalen Applikation von thrombozytenreichem Plasma, mesenchymalen Stromazellen und ihrer Kombination auf die Heilung avaskulärer Meniskusrisse sowie auf TGF-β1 und FGF-2* 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 Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

## **9 LEBENSLAUF**

---

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

## 10 VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONSLISTE

---

Hein R., Schrödter J., Schmidt T., Korus G., Kopf S.: *Detektion und Quantifizierung des Transforming Growth Factor beta in ovinen Menisken mittels Immunhistochemie.* Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie 2014.

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- $\beta$  and FGF.* Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie 2015.

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 2015.

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- $\beta$ .* Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2015.

## 11 DANKSAGUNG

---

Zunächst gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Carsten Perka sowie Prof. Dr. Georg Duda, die mir die Durchführung dieser Promotion an ihren Einrichtungen ermöglichten.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei PD Dr. Sebastian Kopf für die exzellente Betreuung dieser Promotion bedanken. Sein umfangreiches Wissen, sein kritisches Urteil und seine immerwährende Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und zur Weiterentwicklung meiner klinischen und wissenschaftlichen Fähigkeiten geführt.

Zudem gilt mein Dank allen weiteren Mitgliedern der AG Kopf. Namentlich nennen möchte ich hier Dr. med. vet. Tanja Schmidt, Nadja Goldbach und Dr. med. vet. Elisabeth Huber, deren Enthusiasmus ansteckend und deren sorgfältiger Umgang mit den Versuchstieren beispielhaft waren. Als weitere Mitglieder möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen Janine Schrödter und Jasmin Rose für die unzähligen Stunden gemeinsamer Arbeit im OP, Tierstall und Labor bedanken. Ohne die unvergessliche Zusammenarbeit wäre das Gelingen des Projekts nicht möglich gewesen.

Außerdem gebührt mein großer Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius-Wolff-Instituts, allen voran Dr. rer. medic. Franka Klatter-Schulz, Zienab Kronbach, Mario Thiele und insbesondere Gabriela Korus. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz wäre die mühsame Etablierung der Immunhistochemie nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegerinnen und -pflegern der tierexperimentellen Einrichtung des Virchow-Klinikums für wertvolle Hinweise zum artgerechten Umgang mit den Schafen und die liebevolle Pflege der Tiere.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Michaela Maria Schmidt-Hein und Wolfgang Hein sowie meiner Schwester Caecilia-Désirée Hein. Ihre moralische Unterstützung und der interdisziplinäre Austausch haben mir das Studium und die parallele Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden für jede Form der Unterstützung, die durch fachlich-kritische Anmerkungen, aber auch durch Ablenkung und die Möglichkeit, in den unterschiedlichsten Ländern dieser Welt Erholung zu finden, auf besondere Art und Weise die Vollendung dieser Arbeit ermöglicht haben.