**AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. M. NERLICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

Tissue Engineering mit autologen Wachstumsfaktoren und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Christian Taeger

2008

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. M. NERLICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

Tissue Engineering mit autologen Wachstumsfaktoren und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Christian Taeger

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Angele
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Strutz
Tag der mündlichen Prüfung:	Dienstag, 26. Mai 2009

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der Meniskus 1

1.2 Anatomie des humanen Meniskus − Besonderheiten beim Kaninchen-Meniskus 2

1.3 Funktionelle Anatomie und Biomechanik des Meniskus 5

1.4 Meniskusläsionen 5

1.5 Behandlung von Meniskusläsionen 7

1.6 Einsatz von Tissue-Engineering zur Meniskusregeneration 9

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 14

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Material 15

2.1.1 Arzneimittel 15
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 15
2.1.3 Antikörper 17
2.1.4 Standards für ELISA 17
2.1.5 Medien und Seren 17
2.1.6 Puffer und Lösungen 18
2.1.6.1 Histologie 18
2.1.6.2 Immunhistochemie 19
2.1.6.3 ELISA 21
2.1.7 Kits 24
2.1.8 Verbrauchsmaterial 24
2.1.9 Geräte 25
2.1.10 Biomaterialien 26
2.1.11 Tiere 27

2.2 Methoden 27
2.2.1 Thrombozytenisolierung aus Vollblutproben 27
2.2.2 Zellzählung 29
2.2.2.1 Probengewinnung und Aufarbeitung 29
2.2.2.2 Automatisierte Zellzählung 29
2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl 29
2.2.3.1 Probenaufbereitung 29
2.2.3.2 LIFE/DEAD – Kit 29
2.2.4 Trägermatrixbeladung 30
2.2.5 Histologie 31
2.2.5.1 Analyse der Zellpellets mittels Ausstrichhistologie 31
2.2.5.2 Gefrierschnitthistologie 31
2.2.5.3 Färbungen 32
2.2.5.3.1 Toluidinblaufärbung 32
2.2.5.3.2 Immunhistochemische Verfahren (Kollagen I und II) 32
2.2.6 In vitro-Analysen der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF 33
2.2.6.1 Prinzip des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 33
2.2.6.2 Ermittlung eines geeigneten Mediums 34
2.2.6.2.1 Medienaufbereitung 34
2.2.6.2.1.1 Gruppe A: Serum 34
2.2.6.2.1.2 Gruppe B: Plasma 34
2.2.6.2.2 Probenaufbereitung 34
2.2.6.2.3 Probenentnahmen 35
2.2.6.3 Wachstumsfaktorenbestimmung 35
2.2.6.3.1 Probenaufbereitung und Mediengewinnung 35
2.2.6.3.2 Probenentnahmen 36
2.2.6.4 Auswertung der Proben mittels ELISA 36
2.2.6.4.1 Verwendetes Protokoll 36
2.2.7 Reparatur von avaskulären Außenmeniskusdefekten im Tiermodell 38
2.2.7.1 Operationsablauf und Technik 38
2.2.7.2 Meniskengewinnung 39
2.2.7.3 Scoring 39
2.2.7.4 Statistik 40

3 ERGEBNISSE 41

3.1 Ausstrichhistologie der isolierten Thrombozyten 41

3.2 Histologie der Trägermatrices mit Zellen 42

3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl 42

3.3.1 Ergebnisse der Auszählung 43

3.4 Automatisierte Zellzählung 43

3.5 Freisetzungskinetik von PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF 46

3.5.1 Abklärung des geeigneten Mediums 46

3.5.1.1 Medium: hitzeinaktiviertes autologes Serum 47

3.5.1.1.1 Leerwertkontrolle: Matrix mit hitzeinaktiviertem autologem Serum 47

3.5.1.1.2 Zellbesetzte Matrix mit hitzeinaktiviertem autologem Serum 47

3.5.1.2 Medium: Plasma 48

3.5.1.2.1 Leerwertkontrolle: Matrix ohne Zellen mit autologem Plasma 48

3.5.1.2.2 Zellbeladene Matrix mit autologem Plasma 49

3.5.2 Wachstumsfaktorenanalyse 50

3.5.2.1 PDGF-AB 50

3.5.2.2 TGF-ß1 51

3.5.2.3 VEGF 51

3.5.2.4 Zusammenfassung der Wachstumsfaktorenanalyse 52

3.6 Regeneration von avaskulären Außenmeniskusdefekten im Tiermodell 53

3.6.1 Stanzdefekte 54

3.6.1.1 Gruppe A: Laufzeit 6 Wochen 54

3.6.1.1.1 Makroskopische Auswertung 54

3.6.1.1.2 Histologische Auswertung 55

3.6.1.2 Gruppe B: Laufzeit 12 Wochen 57

3.6.1.2.1 Makroskopische Auswertung 57

3.6.1.2.2 Histologische Auswertung 57

3.6.1.3 Scoring der 6- und 12-Wochengruppe Stanzdefekt 59

3.6.2 Rissdefekte 60

3.6.2.1 Gruppe A: Laufzeit 6 Wochen 61

3.6.2.1.1 Makroskopische Beurteilung 61
3.6.2.1.2 Histologische Beurteilung 61
3.6.2.2 Gruppe B: Laufzeit 12 Wochen 63
3.6.2.2.1 Makroskopische Beurteilung 63
3.6.2.2.2 Histologische Beurteilung 63
3.6.2.3 Scoring der 6- und 12-Wochengruppe Rissdefekt 64
3.6.3 Beurteilung der Gelenkflächen 65

4 DISKUSSION 66

5 ZUSAMMENFASSUNG 83

6 LITERATUR 84

7 ANHANG 94

7.1 Lebenslauf 94
7.2 Danksagung 95

1 EINLEITUNG

Osteoarthrose ist die weltweit am häufigsten vorkommende Ursache für Gelenkschädigungen und ist in der westlichen Bevölkerung die Hauptursache für Schmerz, Funktionsverlust und Behinderung bei Erwachsenen. Die Mehrzahl der 65-Jährigen und sogar etwa 80% der über 75-Jährigen haben Anzeichen für Osteoarthrose[14]. Internationale Vergleichstudien konnten zeigen, dass die Prävalenz von Gelenkschäden in verschiedenen Bevölkerungsgruppierungen konstant mit steigendem Alter zunimmt[134].

In Deutschland stieg die Anzahl der Operationen aufgrund von Arthropathien zwischen den Jahren 1994 bis 1999 von 342.768 auf 432.227[30] - mit den konsekutiven sozioökonomischen Folgen. Die Gründe dafür sind zum einen eine zunehmende Lebenserwartung und zum anderen eine steigende Zahl von Sportverletzungen, die arthrotischen Spätfolgen den Weg bahnen. Ein Problem stellen dabei vor allem die vermehrten Fälle von Meniskusverletzungen dar, da derzeit die therapeutischen Möglichkeiten eingeschränkt sind. Die gängigen Therapieverfahren wie totale und subtotale Meniskusresektion stellen unweigerlich präarthrotische Veränderung für das Kniegelenk dar[47,138]. Einer der bedeutendsten Faktoren bei der Regeneration von Meniskusläsionen ist die Lokalisation des Risses. Liegt er im durchbluteten, peripheren Drittel, sind die Heilungschancen wesentlich höher als bei einer Lokalisation in der avaskulären Zone[119].

Vor dem Hintergrund einer immer älter werdenden Gesellschaft und einem veränderten Freizeitverhalten bedarf es neuer Lösungsansätze, um der stetig steigenden Prävalenz von Arthropathien entgegenzuwirken. Insbesondere bei Meniskusläsionen besteht die Möglichkeit mit innovativen Therapiekonzepten, wie beispielsweise dem Tissue Engineering, Folgeschäden zu vermindern und die Gelenkfunktion zu erhalten.

1.1 Der Meniskus

Bei der genaueren Betrachtung der Femorotibialgelenke fällt auf, dass die Gelenkflächen von Femur und Tibia keine Kongruenz zueinander aufweisen. Wären die tibialen Gelenkflächen der Krümmung der Femurkondylen angepasst, so wäre eine gute Führung einer Beuge-Streck-Bewegung gewährleistet, ein Rotieren und Gleiten aber nicht möglich, da zu diesem Zweck eine der Kondylen aus seiner Gelenkpfanne treten müsste. Mit Hilfe

der Menisken ist sowohl eine geführte Beuge-Streck-Bewegung als auch Rotation und Gleiten möglich – jedoch sind diese Strukturen anfällig für Traumata und Verschleißerscheinungen[79].

Die folgenden Ausführungen beziehen sich vornehmlich auf den humanen Meniskus. Da in der vorliegenden Studie auf ein in-vivo Modell am Kaninchen zurückgegriffen wurde, sind an manchen Stellen kurz die Besonderheiten des Kaninchenmeniskus dargelegt.

1.2 Anatomie des humanen Meniskus − Besonderheiten beim Kaninchen-Meniskus

Zunächst unterscheidet man den medialen von einem lateralen Meniskus, die beide dem Tibiaplateau aufliegen. Die Menisken sind C-förmige und im Koronarschnitt keilförmige Gebilde, mit einer breiten äußeren Basis und einem nach zentral konvexen Rand. Der mediale Meniskus ist mehr halbmondförmig, der laterale Meniskus annähernd kreisförmig ausgebildet. Die Oberflächen der Menisken sind konkav, während die Unterseiten wie das Tibiaplateau flach sind. Weiter wird ein ventral liegendes Vorderhorn von einem dorsalen Hinterhorn unterschieden, dazwischen liegt die sogenannte Pars intermedia[91,120].

Befestigt sind die Menisken an ihrer Basis mit der Gelenkkapsel, außerdem sind sie über ihre Vorder- und Hinterhörner fest mit der tibialen Gelenkfläche und untereinander über das Lig. transversum verbunden[91,120], das nicht regelmäßig ausgeprägt ist[115].

Das Vorderhorn des medialen Meniskus ist vor dem vorderen Kreuzband im ventralen, das Hinterhorn im dorsalen Bereich der Area intercondylaris mit der tibialen Gelenkfläche verbunden. Zusätzlich verankern tiefe Fasern des medialen Kollateralbandes den medialen Meniskus in der Intermediärzone mit Femur und Tibia[38].

Der laterale Meniskus, der einen größeren Bereich der tibialen Gelenkfläche bedeckt als der mediale[38], inseriert mit seinem Vorderhorn vor der Eminentia intercondylaris hinter dem Ansatzbereich des vorderen Kreuzbandes. Der Ansatz des Hinterhorns liegt hinter der Eminentia intercondylaris und vor der Insertion des medialen Meniskus[48]. Die Humphrey- und Wrisbergligamente sind zusätzliche, variabel ausgebildete meniskofemorale Verbindungen[72]. Eine Fixation am lateralen Kollateralband existiert nicht.

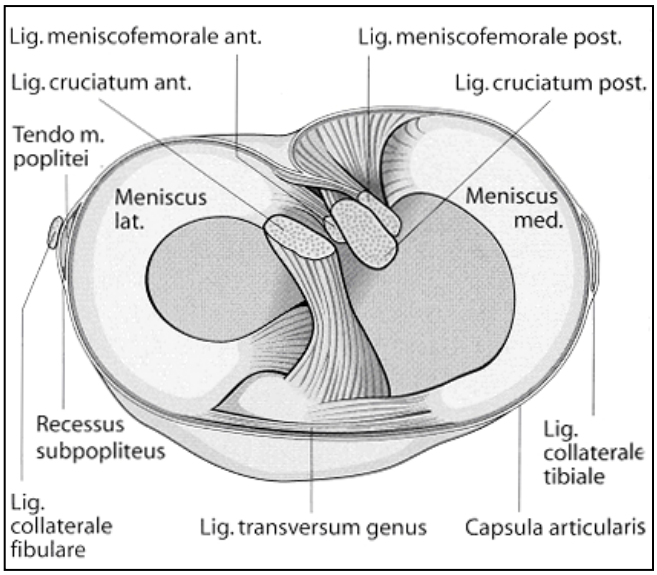

Abbildung 1.1: Rechtes Tibiaplateau. Ansicht von proximal nach Durchtrennung der Kreuz- und Kollateralbänder und Entfernung des Femur (aus: Weigel B, Nerlich M. *Praxisbuch Unfallchirurgie*. Berlin: Springer, 2005:594).

Im Kaninchenmeniskus fallen im Gegensatz zum humanen Meniskus zunächst die langen Insertionsbänder der Vorderhörner auf, die auf Höhe der Eminentia intercondylaris anterior aneinander vorbeiziehen. Ein Lig. transversum ist nicht ausgebildet[52]. Das Hinterhorn des lateralen Meniskus ist nur über ein Insertionsband an der medialen Femurkondyle befestigt. Verbindungsfasern zur Tibia sind nicht vorhanden[91].

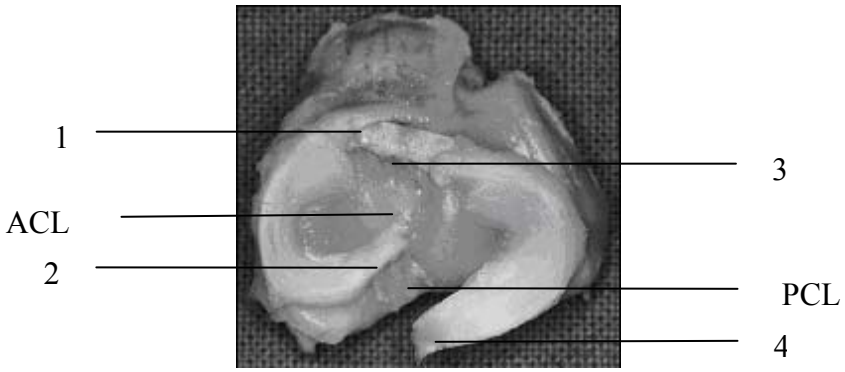

Abbildung 1.2: Rechtes Tibiaplateau eines Kaninchenmeniskus. Ansicht von proximal nach Durchtrennung der Kreuz- und Kollateralbänder und Entfernung des Femur. Anteriores Insertionsligament des medialen (1) bzw. lateralen (3) Meniskus. Posteriores Insertionsligament des medialen (2) bzw. lateralen (4) Meniskus. (ACL) Insertion des vorderen Kreuzbandes. (PCL) Insertion des hinteren Kreuzbandes (aus: Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 1998;193 (Pt 2):161-78).

Die Gefäßversorgung der Menisken erfolgt medial über die A. genus superior medialis und den Ramus articularis descendens der A. genus descendens sowie lateral über die A. genus inferior lateralis[23]. Versorgt werden vor allem die kapselnahen Anteile der Menisken, die

zentralen 2/3 sind avaskulär und werden per diffusionem über die Synovialflüssigkeit ernährt[54,96].

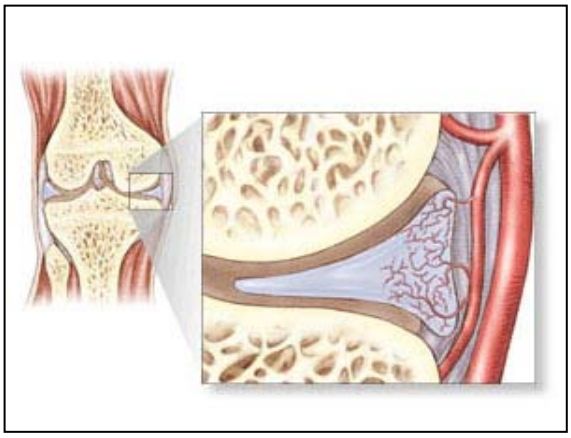

Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Vaskularisierung des Meniskus im Frontalschnitt (aus: Internet. *http://www.hksi.org.hk/hksdb/front/e_pub1_ep2_medicine3_series10.html*).

Die Menisken bestehen aus Faserknorpel[115]. Dieser besteht zu etwa 75% aus Wasser, 20% Kollagen, sowie einem geringen Anteil an Proteoglykanen, nichtkollagenen Proteinen, Lipiden, Fibrochondrozyten, vereinzelt Fibroblasten und Mastzellen[88-90,120,140]. Dabei bildet Kollagen I mit 90% neben Kollagen II, III, V und VI den Hauptanteil des Meniskuskollagen[96]. Die Kollagenfasern sind in einer für den Meniskus typischen Art angeordnet: oberflächlich jeweils parallel zur Oberfläche ohne bevorzugte Richtung, dazwischen zirkulär und radiär verlaufend[3].

Die Fibrochondrozyten haben sowohl Eigenschaften von Chondrozyten als auch von Fibroblasten und werden für die Produktion von extrazellulärer Matrix, im Besonderen von Kollagen, verantwortlich gemacht[95].

Nach eigenen Untersuchungen überwiegt in der pars intermedia des Kaninchenmeniskus Kollagen vom Typ II, das von peripher nach zentral an Dichte zunimmt. Dabei steigt der prozentuale Anteil an Kollagen II mit zunehmendem Alter des Tieres[27]. Kollagen I findet sich überwiegend basisnah.

1.3 Funktionelle Anatomie und Biomechanik des Meniskus

Die Menisken vergrößern die intraartikuläre Auflagefläche der Gelenkpartner und schaffen somit eine vergrößerte Artikulationsfläche der Femurkondylen, was zu einer günstigeren Belastungsverteilung führt[17,77]. Außerdem verbessern sie die Kongruenz zwischen Femur und Tibia[16]. Bei axialer Kompression vom Femur auf die Tibia nehmen die Menisken Energie durch Verformung auf, sodass diese als Stossdämpfer wirken und die Tibia entlasten[115]. Dabei führt eine radiäre Rissbildung, die bis an die Basis des Meniskus reicht, zum nahezu vollständigen Verlust der Lastverteilungsfunktion[73].

Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von Meniskusgewebe um 10% im Rahmen einer partiellen Meniskektomie zu einem Anstieg des Spitzendruckes zwischen den Gelenkflächen von bis zu 65% führen kann[21], was ein früheres Einsetzen von Osteoarthrosen zur Folge hat[47,66].

Aufgrund einer Beweglichkeit von bis zu 10mm des lateralen und 5mm des medialen Meniskus ist der Schutz vor schädlichen Belastungsspitzen in allen Gelenkstellungen gewährleistet[51]. Außerdem tragen die Menisken zur Stabilisierung der Gelenke bei[107], was vor allem bei ligamentärer Insuffizienz an Bedeutung gewinnt[5].

Weiter wird in der Fachliteratur den Menisken eine wichtige Rolle hinsichtlich einer Verbesserung der Gelenkknorpelernährung sowie Gleitfähigkeit und Schutz der Gelenkränder zugeschrieben[117,118]. Außerdem dienen die in Menisken enthaltenen Mechanorezeptoren der Propriozeption[151].

1.4 Meniskusläsionen

Grob untergliedern lassen sich Meniskusläsionen im Hinblick auf ihre Entstehungsursache. Zum einen degenerative Erscheinungen, die ihrer Natur nach überwiegend ältere Menschen betreffen, und zum anderen traumatische Prozesse, die vor allem im Rahmen von Sportverletzungen in der jüngeren Generation anzutreffen sind. Mit einem Verhältnis von etwa 2:1 ist überwiegend der mediale Meniskus betroffen[31]. Grund dafür ist die medialseitige Fixierung des Meniskus an das tibiale Kollateralband[142].

Bei indirekten Läsionen liegt als Mechanismus eine Rotationsbewegung im flektierten und belasteten Knie zugrunde[147]. Dabei ist es wichtig zu betonen, dass ein Meniskus allein durch indirekte Krafteinwirkung nur dann zerreißen kann, wenn degenerative

Veränderungen in seiner Substanz bereits vorliegen[142]. Ein wesentlicher Pathogenesefaktor ist die Ruptur beziehungsweise Instabilität des vorderen Kreuzbandes, da diese mit einer Mehrbelastung des Meniskus einhergeht[43,146]. Im Rahmen altersbedingter Degenerationen kommt es zu spontanen Rissen im Meniskus, ohne dass ein adäquates Trauma damit in unmittelbarem Zusammenhang steht[115].

Bezüglich der traumatischen Meniskusverletzungen konnte im Falle von Tibiakopffrakturen gezeigt werden, dass sie in 57% der Fälle direkt mit einer Meniskusläsion vergesellschaftet sind[2].

Eine Einteilung der Läsionen ihrer Form nach wurde 1962 von Trillat[133] vorgenommen, welche einen Längsriss, Horizontalriss, Lappenriss und einen Korbhenkelriss unterscheidet[115] (siehe Abbildung).

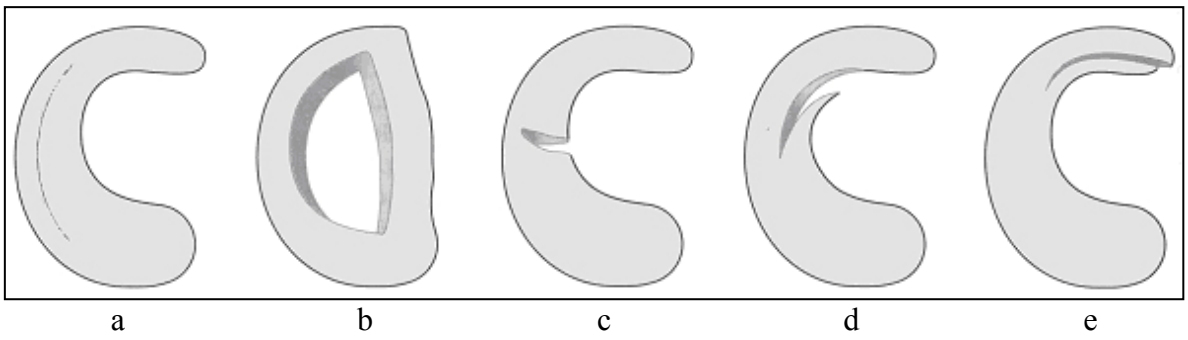

Abbildung 1.4: Darstellung verschiedener Meniskusrisstypen: a: Längsriss, b: Korbhenkelriss, c: Radiärriss, d: Querriss, e: Horizontalriss (aus: Weigel B, Nerlich M. *Praxisbuch Unfallchirurgie*. Berlin: Springer, 2005:600).

Typisch für Kniebeschwerden im Zusammenhang mit Meniskusläsionen ist eine Symptomtriade aus Schmerz, Blockierung und Schwellung[147]. Zur Befunderhebung dient neben einer Anamnese und den klinischen Meniskuszeichen die apparative Diagnostik. Dabei ist die Magnetresonanztomographie Mittel der Wahl[115].

1.5 Behandlung von Meniskusläsionen

Benjamin Bells' These, er wolle sich lieber einen Oberschenkel amputieren, als einen freien Gelenkkörper aus dem Kniegelenk entfernen lassen, entstand in Zeiten, als das Wissen um die Bedeutung der Antisepsis bei operativen Eingriffen noch nicht vorhanden war[24]. Aus diesem Zitat lassen sich folgende Punkte ableiten: Zum einem wird eine Problematik des Kniegelenks beschrieben, die offensichtlich mit erheblichen Unannehmlichkeiten für die Patienten verbunden ist. Weiter ist festzustellen, dass damals die Menisken als „freie Gelenkkörper" fehlgedeutet wurden. Erst mit der Einführung der Antisepsis und den damit möglichen operativen Eingriffen wuchsen die Erkenntnisse um den Meniskus und dessen mögliche Schädigungsformen.

Im Laufe der Zeit etablierte sich eine lang andauernde Diskussion, ob Naht, Teil- oder Totalresektion die beste Therapieoption sei. Entscheidende Hinweise für die richtige Vorgehensweise hinsichtlich der unterschiedlichen Läsionsentitäten brachte unter anderem die Langzeitdokumentation der Behandlungsergebnisse[109]. So zeigte sich beispielsweise, dass eine Totalresektion des Meniskus unweigerlich eine Arthroseentwicklung zur Folge hatte[47].

In den 1950er Jahren wurde die schon zuvor entdeckte Methode der Arthroskopie weiterentwickelt und etablierte sich allmählich im klinischen Alltag[109]. Gegenwärtig steht als Therapie der Wahl die Operation im Vordergrund, konservative Verfahren dienen vor allem der Symptomlinderung. Eine spontane Heilung eines Meniskusrisses ist nur im Falle einer stabilen, traumatischen und basisnah liegenden Läsion möglich[49]. In der Regel werden Operationen am Meniskus arthroskopisch durchgeführt. Die angewandten Standardverfahren sind die partielle und subtotale Meniskektomie sowie die Meniskusnaht.

Die partielle Meniskektomie ist bei einer nicht rekonstruierbaren, symptomatischen Läsion im zentralen Anteil indiziert[115]. Dabei spielt für ein gutes Langzeitergebnis hinsichtlich der Folgeschäden das Belassen einer stabilen Randleiste eine entscheidende Rolle[73]. Dennoch muss der Patient mit dem Auftreten einer weiteren Schädigung des Restmeniskus, sowie dem Entstehen einer Gonarthrose rechnen[47,129].

Die Option der Meniskusnaht kommt dann in Frage, wenn Kriterien der Nahtfähigkeit - wie nahtfähige Rissform, Lokalisation im äußeren kapselnahen Drittel, keine wesentliche Degeneration des Meniskus sowie bevorzugt jüngere Patienten - erfüllt sind. Dabei kommen im Wesentlichen 3 Techniken zum Einsatz. Die Outside-in- sowie Inside-out-

Technik werden überwiegend für Läsionen im Bereich des Vorderhorns angewandt. Mit der All-inside Technik werden Läsionen im Bereich des Hinterhorns versorgt. Die Ergebnisse werden in der Literatur aufgrund uneinheitlicher Bewertungsmaßstäbe sehr unterschiedlich mit Heilungsraten zwischen 50 und 90% beschrieben[115].

Neuere Entwicklungen zur Meniskusrekonstruktion sind Implantate in Form von Schrauben, Klammern oder Pfeilen mit Widerhaken, wobei man nicht resorbierbare von biodegradierbaren Implantaten unterscheidet. Ihr Vorteil besteht in einer Verkürzung der OP-Dauer und einer rein intraartikulären Implantationstechnik, wobei keine zusätzlichen Inzisionen erforderlich sind[119]. Nachteile bestehen darin, dass Abriebpartikel oder losgelöste Fragmente intraartikuläre Entzündungsreaktionen hervorrufen[143] oder Implantate brechen, beziehungsweise dislozieren können[18]. In biomechanischen Studien an Rissdefekten in Rindermenisken wurden Nahttechniken mit Implantaten verglichen, wobei die Nahttechniken den Implantaten hinsichtlich Defektstabilisierung überlegen waren. So konnte eine höhere Stabilität der versorgten Meniskusrisse im Vergleich zu Implantaten um bis zum Faktor 13 gezeigt werden[108].

Ein wichtiges Kriterium für die Heilungstendenz von Läsionen ist deren Lokalisation. In einer klinischen Studie an 91 untersuchten Fällen konnte gezeigt werden, dass es bei Läsionen im avaskulären Bereich des Meniskus, die arthroskopisch mit der Inside-out Nahttechnik versorgt wurden, im Schnitt nur in 25% der Fälle zu einer kompletten Heilung kam. 38% wiesen eine nur partielle und 36% keine Wiederherstellung auf[114]. Nicht zuletzt diese unbefriedigenden Ergebnisse haben zu Untersuchungen geführt, die eine Optimierung der Heilungsraten als optionale Verfahren zusätzlich zu den angewandten Therapieschemata zum Ziel haben.

Bei der Methode der sogenannten „Trephination“ werden kleine Kanäle vom vaskulären zum avaskulären Teil des Meniskus geschaffen, was wiederum eine verbesserte Heilung zur Folge haben kann[50]. Weiter wird neben einer Anfrischung der Defekträndern[94] auch der Anfrischung der Synovialmembran in unmittelbarer Nähe zum Defektbereich – also basisnah - eine Verbesserung der Meniskusregeneration zugesprochen, wobei diese Methode an Effektivität verliert, je zentraler der Defekt liegt[28].

Insbesondere die Arthroseprävention beim meniskektomierten jungen Patienten ist ein Ziel, das mit Hilfe der Meniskustransplantation angestrebt wird. Anfängliche Erfolge mit Sehnentransplantaten im Tierversuch konnten beim Einsatz im menschlichen Knie nicht bestätigt werden und wurden genauso wie der Ersatz des Meniskus mit dem Hoffa-

Fettkörper aufgrund unbefriedigender Ergebnisse nicht weiter verfolgt[64,92]. Bei den vor allem in den USA durchgeführten Meniskustransplantationen werden zum Teil kryokonservierte allogene Meniskustransplantate eingesetzt[115]. Erste Langzeitergebnisse, die aufgrund von unterschiedlichen Bewertungsmaßstäben schwer zu vereinheitlichen sind, werden - bei korrekter Indikationsstellung - als gut eingestuft[45,135]. Dabei werden in den verschiedenen Studien durchschnittlich 60% der Transplantationen als erfolgreich bewertet[87]. Insgesamt gibt es jedoch Hinweise darauf, dass mit einer Meniskustransplantation die Gelenkdegeneration zwar langsamer, auf Dauer aber unaufhaltsam voranschreitet[148]. Außerdem kann eine Übertragung von Infektionskrankheiten nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da beispielsweise bei einer Infektion des Transplantats mit dem HI-Virus dieser trotz Gamma-Bestrahlung experimentell noch nachgewiesen werden kann[87]. Auch wird in einem Fall von einer Abstoßungsreaktion eines transplantierten Meniskus berichtet, der bei einer second-look Arthroskopie als ausgefranst, geschrumpft und von entzündlicher Synovia umgeben beschrieben wurde. Histologische Untersuchungen zeigten eine zentrale Nekrose sowie periphere Einwanderung von Entzündungszellen im Meniskusgewebe[56]. Auch in anderen klinischen Studien wurde die Tendenz zur Transplantatschrumpfung beschrieben[93,125].

1.6 Einsatz von Tissue-Engineering zur Meniskusregeneration

Wie oben bereits ausgeführt, stellen Läsionen im avaskulären Bereich des Meniskus nach wie vor ein Problem dar, dem auch mit bisherigen Ansätzen nicht suffizient begegnet werden kann. Die Forschung im Bereich des Tissue-Engineering versucht mit den Komponenten Zelle, einem strukturellen Gerüst – meist Scaffold genannt – und modulierenden Faktoren wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren ein Konstrukt zu erzeugen, das den Eigenschaften von Meniskusgewebe möglichst ähnlich ist, um es dann in ein Defektareal einzusetzen, beziehungsweise sogar den kompletten Meniskus zu ersetzen.

Die bisher untersuchten Ersatzgewebe lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen: in biologische und synthetische Materialien. Letztere stellen eine sehr heterogene Gruppe hinsichtlich ihrer Grundsubstanzen dar. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten unter anderem Karbonfasern allein oder kombiniert mit einer Polyurethan-poly(L-lactid)-Matrix[75,136,137], Teflonfasern[132], poröses Polyurethran[41,68-70] und andere Materialien im Tierversuch. Diese Behandlungsmethoden stellen keine Therapieoption dar, da sie

entweder das Wachstum von fibrösem Gewebe induzieren oder zur Degeneration des Gelenkknorpels führen[127].

Bei den biologischen Materialien wurden Kollagen, Dünndarmmukosa, Periostgewebe und perichondrales Gewebe untersucht.

Das Periostgewebe führte im Kaninchenmodell zu einem Wachstum von hyalinem Knorpel, aber auch Knochen[139]. Ebenso enttäuschend waren die Ergebnisse mit perichondralem Gewebe, das in Schafen untersucht wurde, da zwar meniskusähnliches Gewebe entstanden war, es aber keine ausreichende Zugstabilität aufwies[29]. Der Einsatz von Dünndarmmukosa bei Hunden ergab positive Resultate, die jedoch hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität nicht näher untersucht wurden[39].

Die besten Resultate lieferten biologische Scaffolds auf der Basis von Kollagen I, die sich bereits in klinischer Erprobung befinden. Dabei werden die beschädigten Anteile des Meniskus entfernt, das Scaffold auf die richtige Größe zugeschnitten und anschließend im Defektbereich eingenäht[111,126]. Aktuelle Kontrolluntersuchungen der 8 Patienten 6 Jahre nach der Behandlung zeigen gute Ergebnisse bezüglich Schmerzreduktion, Arthroseerscheinung, Defektfüllung und Art des Ersatzgewebes. Eine komplette Remission konnte jedoch nicht beobachtet werden, die Defekte waren bei Kontrollarthroskopien im Schnitt nur zu 69% gefüllt[124]. In einer weiteren klinischen Studie an Patienten mit subtotalen Verlust des medialen Meniskus und Varus-Morphotyp zeigten sich in der Gruppe, die zusätzlich zu einer valgisierenden Tibiakopfumstellung ein Kollagenimplantat erhalten hatte, nach 24 Monaten kein signifikanter Unterschied hinsichtlich subjektiver Schmerzreduktion im Vergleich zur Gruppe, die nur mit einer valgisierenden Tibiakopfumstellung versorgt wurde[78].

Arnoczky und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss eines exogen eingebrachten Fibringerinnsels auf die Regeneration von avaskulären Meniskusdefekten beim Hund. Zwar konnten damit die Meniskusdefekte mit fibrokartilaginärem Gewebe aufgefüllt werden, makroskopisch und histologisch waren jedoch starke Abweichungen von normalem Meniskusgewebe zu erkennen[19]. Außerdem fanden Port und Mitarbeiter bei weiteren Untersuchungen eine reduzierte biomechanische Belastbarkeit des entstandenen Gewebes. Auch die Zugabe von kultivierten Knochenmarkzellen zum Fibringerinnsel verbesserte die Ergebnisse nicht[104].

Ein weiterer Ansatz im Rahmen von Tissue-Engineering ist die Entwicklung von Biomaterialien, die das endogene Reparaturpotential von Gewebe unterstützen sollen,

indem sie entweder das Einwandern von Reparaturzellen aus den Wundrändern unterstützen, oder man sie ex-vivo mit Zellen besetzt und damit den Defektbereich füllt und regeneriert. Im Rahmen intensiver Biomaterialforschung im Labor der eigenen Abteilung[6,7,10,11] konnte ein speziell für die Meniskusregeneration abgestimmtes biodegradables Material mit guter Biokompatibilität hergestellt werden[9]. Mit den Komponenten Hyaluronsäure und Gelatine konnte eine poröse Matrix geformt werden, die nach ca. 14 Tagen degradiert und deren Abbauprodukte Teile der extrazellulären Matrix von Meniskusgewebe sind. Hyaluronsäure und Kollagen I, aus deren Derivaten die Matrix besteht, spielen zudem eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung[1,40,86,106,112,145], was zur Vermutung führt, dass die Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix ein geeignetes Milieu für Zellwachstum und –differenzierung von potentiellen Reparaturzellen ist[9].

Weiter konnten in der eigenen Abteilung in unterschiedlichen in-vivo Meniskusdefektmodellen im Neuseelandhasen Zell-Matrix-Kombinationen erfolgreich zur Regeneration von Meniskusläsionen eingesetzt werden. Im kombinierten vaskulär-avaskulären Meniskusdefekt, bei dem die Pars intermedia entnommen wurde, konnte mit einer Matrix und mesenchymalen Stammzellen die Entwicklung von meniskusähnlichem Reparaturgewebe erreicht werden. Dies stand im Gegensatz zu leer belassenen Defekten oder nur mit Matrices ohne Zellen besetzten Defekten, bei denen nur Narbengewebe - ausgehend von der Meniskusbasis - entstand[8].

In weiteren Untersuchungen wurden Punch-, beziehungsweise Rissdefekte im rein avaskulären Bereich der Pars intermedia des Meniskus erzeugt, wobei der Punchdefekt einen Durchmesser von 2mm und der Rissdefekt eine Länge von 4mm aufwies. Wieder konnten signifikante Vorteile der mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Matrices im Vergleich zu leer belassenen Defekten oder zu mit Matrices ohne Zellen gefüllten Defekten gefunden werden. Dabei konnte in biomechanischen Versuchen eine hohe Reißfestigkeit des neu entstandenen Regeneratgewebes nachgewiesen werden.

Trotz dieser Erfolge ist anzumerken, dass die Gewinnung und Handhabung von mesenchymalen Stammzellen bei einem möglichen klinischen Einsatz mit nicht geringen Kosten und Aufwand verbunden wäre. Zwar konnten durch retrovirale Markierung im Rahmen der oben geschilderten Untersuchungen die eingesetzten mesenchymalen Stammzellen nach 6 Wochen im Defektbereich nachgewiesen werden. Nach wie vor ist jedoch unklar, wie und in welchem Umfang die Zellen eine Rolle bei der Defektfüllung

spielen und ob sie möglicherweise mittels Chemotaxis eine Migration von Reparaturzellen aus dem umliegenden Gewebe in das Defektareal bewirken, die ihrerseits eine entscheidende Rolle bei der Regeneration haben könnten, oder ob sie selbst zu Reparaturzellen im Defektbereich differenzieren. Es wäre von Vorteil, die von den mesenchymalen Stammzellen ausgehenden positiven Faktoren näher zu verstehen und durch deren gezielten Einsatz eine Defektregeneration möglicherweise ohne mesenchymale Stammzellen zu erreichen.

Ansätze dazu liefern Untersuchungen, die sich mit der Regeneration von Meniskusdefekten mit Hilfe von Wachstumsfaktoren beschäftigen. Diese haben Einfluss auf Teile des Zellzyklus und können dadurch die Proliferation und Migration der Zellen sowie deren Produktion von extrazellulärer Matrix fördern[127]. Die verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel transforming growth factor (TGF-ß) und plateled-derived growth factor (PDGF), stimulieren dabei im unterschiedlichen Ausmaß die Produktion der einzelnen Komponenten der extrazellulären Matrix (Glykosaminoglykane oder Kollagene)[25,62]. Gerade im Rahmen von Tissue Engineering für den Meniskus ist es wichtig, ein Gewebe zu produzieren, das reich an Glykosaminoglykanen und Kollagenen ist, damit es den auf das Gewebe einwirkenden Kräften standhalten kann[99].

In einer in-vitro Studie an Fibrochondrozyten wurden in einer Zellkultur Wachstumsfaktoren zu den Zellen in unterschiedlicher Konzentration hinzugegeben. Untersucht wurden TGF-ß1, PDGF-AB, insulin-like growth factor I (IGF-I) und basic fibroblastic growth factor (bFGF). Am effektivsten konnte dabei die Produktion von Kollagen und Glykosaminoglykanen mit der höchsten Konzentration von TGF-ß1 induziert werden[99].

In weiteren Untersuchungen an Fibrochondrozyten, mit denen eine Polyglykol-Matrix besetzt wurde, zeigten sich ebenfalls die größten Effekte mit TGF-ß1 hinsichtlich der Produktion von extrazellulärer Matrix[100].

In-vitro Studien am Meniskus konnten mittels PDGF-AB und hepatocyte growth factor (HGF), die in einem Kollagen-Gel gebunden waren und langsam in einen Defekt diffundierten, im Gegensatz zur Kontrollgruppe nach 2 Wochen eine starke Produktion von Proteoglykanen, Zellwanderung in Richtung des Defekts und eine Zellvermehrung zeigen[26].

Hinweise, dass der vascular endothelial growth factor (VEGF) eine Rolle bei der Regeneration von Meniskusdefekten spielt, konnten in einer in-vivo Untersuchung an

Neuseelandhasen gefunden werden. In künstlich erzeugten Defekten im vaskulären und avaskulären Bereich in Menisken wurden im Gegensatz zur Kontrollgruppe stark erhöhte Level von VEGF im Bereich der Läsion mit einer Maximalkonzentration nach 7 Tagen gefunden. Dabei war die Konzentration an VEGF in der zentralen Zone im Vergleich zur peripheren Zone doppelt so hoch[22]. Vergleichbare Ergebnisse konnten im Kaninchenmeniskus für TGF-ß1 und PDGF-AB gezeigt werden[98].

Der Versuch, mit einem Nahtmaterial, an das VEGF über Poly-[d,l-Laktid]-Säure (PDLLA) gebunden war, im avaskulären Bereich einen Defekt im Schafmeniskus durch Induktion von Angiogenese zu therapieren, gelang nicht. Es zeigte sich sogar ein Vorteil in der Kontrollgruppe, bei der unbeschichtetes beziehungsweise nur mit PDLLA beschichtetes Nahtmaterial zum Einsatz kam. In der mit VEGF behandelten Gruppe zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung von Faktor VIII-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, was auf eine vermehrte Anzahl von einzelnen Endothelzellen zurückzuführen war[101].

Die oben angeführten Untersuchungen konzentrierten sich vor allem auf die Wirkungsweise einzelner Wachstumsfaktoren. Eine endogene Quelle unterschiedlichster Wachstumsfaktoren, die angiogenetische, mitogene und osteogene Potenz haben[20,81], wie unter anderem PDGF, TGF-ß und VEGF, sind die alpha-Granula der Thrombozyten[110]. Einige Studien zeigten eine verbesserte Heilung von Knochen- oder Weichteildefekten, wenn sie mit Thrombozyten-angereichertem Plasma (PRP) versetzt wurden[12,42,82]. Dabei zeigten sich bei der Verwendung von Knochentransplantaten im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie in Verbindung mit PRP eine schnellere Epithelialisierung, eine dichtere und reifere Knochenstruktur mit besser organisierten Trabekeln und eine verbesserte Knochenregeneration[12,67,85,113]. Andere Studien berichten von keinem signifikanten Vorteil beim Einsatz von PRP[116,130]. Ein neuerer Ansatz ist die Inkorporation von PRP in ein biodegradables Hydrogel aus Gelatine, aus dem Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum verzögert freigesetzt werden. In einer Studie an japanischen weißen Hasen wurde freies PRP, PRP in einem Fibrin Clot und PRP in einem biodegradablen Hydrogel in einen Knochendefekt eingesetzt. Dabei konnte ein signifikanter Vorteil bei der Reparatur des Knochendefekts für das PRP-Hydrogel-Konstrukt gefunden werden[59]. Murray und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen einer PRP-Kollagen-Matrix auf einen im vorderen Kreuzband gesetzten Defekt im Kaninchen. Dabei wurden nach 6 Wochen in der behandelten Gruppe die Defekte durchschnittlich zu 43% gefüllt, während die Defekte in

der unbehandelten Kontrollgruppe nur eine Defektfüllung von durchschnittlich 23% aufwiesen. Auch hinsichtlich biomechanischer Testung war die behandelte Gruppe der unbehandelten Gruppe statistisch signifikant überlegen[97].

Untersuchungen, ob die von Thrombozyten sezernierten Wachstumsfaktoren auch positive Effekte auf die Regeneration von Meniskusdefekten haben könnten, wurden bislang nicht durchgeführt, oder wurden nicht publiziert.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zusammenfassend kann man sagen, dass trotz vielversprechender Ansätze und immer neuen Therapieoptionen keine der klinisch angewandten oder experimentellen Methoden eine ausreichende Möglichkeit bietet, Meniskusläsionen im avaskulären Bereich auf Dauer suffizient zu therapieren. Innovative Konzepte in der eigenen Abteilung mit mesenchymalen Stammzellen und einer biodegradablen Matrix geben Anlass zur Hoffnung, dass mit weiterführenden Untersuchungen diese Lücke geschlossen werden kann. Bislang unklar ist jedoch, welche Einzelkomponenten zur Reparatur beitragen und welche Rolle dabei mesenchymale Stammzellen spielen. Um das Geschehen näher zu verstehen und insbesondere die Frage zu klären, ob von den mesenchymalen Stammzellen möglicherweise freigesetzte Botenstoffe entscheidend für die Regeneration von Läsionen sind, soll in diesem experimentellen Ansatz untersucht werden, ob ähnliche Ergebnisse ohne mesenchymale Stammzellen und nur mit Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten zu erreichen sind. Dabei galt es, folgende Hypothesen zu überprüfen:

1. Hypothese: Die Extraktion einer ausreichenden Menge von Thrombozyten aus Vollblutproben beim New Zealand White Rabbit ist möglich.
2. Hypothese: Die extrahierten Thrombozyten sind trotz Aufbereitungsprozess vital.
3. Hypothese: Es ist möglich, Thrombozyten in eine Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix einzubringen.
4. Hypothese: Aus dem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt werden Wachstumsfaktoren freigesetzt. Dabei soll die Freisetzungskinetik von PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF in-vitro über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.
5. Hypothese: Es ist möglich, sowohl Stanz-, als auch Rissdefekte im Meniskus mit einem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt suffizient zu therapieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Arzneimittel

Ketaminhydrochlorid	Ketamin 10%	WDT, Garbsen
NaCl-Lösung (isoton, 0,9%)		Braun, Melsungen
Pentobarbital-Natrium	Narcoren	Merial, Hallbergmoos
Xylazinhydrochlorid	Xylazin 2%	CP Pharma, Burgdorf
Providon Jod	Betaisodona Salbe	Mundipharma, Limburg

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

ACD-A	Baxter, Unterschleißheim
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Sigma Aldrich, Steinheim
Chromalaun Chrom(III) Kaliumsulfatdodecahydrat	Omikron, Neckarwestheim
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
$CoCl_2$	Sigma Aldrich, Steinheim
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
DePex	Serva, Heidelberg
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin 0,5%	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäuredimethylamid (DMA)	Sigma Aldrich, Steinheim
1,9-Dimethyl-Methylen Blau (DMMB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure 2,5N	Merck, Darmstadt
Gelatine (Schwein)	Sigma Aldrich, Steinheim

Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
Harnstoff 10M	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid 2,7N	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Nickel Chlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Para-Formaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
Pepsin (Schwein) 3348U/mg	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenylhydrazin	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Propanol 100%	Merck, Darmstadt
Reagent Diluent Concentrate 1	R&D Systems, Minneapolis
Salzsäure 37% rauchend	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Minneapolis
Tetrabutylammoniumborohydride	Sigma Aldrich, Steinheim
Tissue Tec	Sakura, Zoeterwoude, NL
ToluidineBlue O	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris Pufferan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Darmstadt
TWEEN	Sigma Aldrich, Steinheim

Urea Hydrogen Peroxide	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 37%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Hohenbrunn

2.1.3 Antikörper

Anti-Kollagen I (Isotyp $IgG_{2a}\kappa$)	Oncogene, Cambridge, England
Anti-Kollagen II (Isotyp IgG1κ)	Oncogene, Cambridge, England
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat anti-Rat IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Mouse Anti-TGF-ß 1 Fang Antikörper	R&D Systems, Minneapolis
Biotinylated chicken anti-human TGF-ß1	R&D Systems, Minneapolis
Mouse anti-human PDGF-BB	R&D Systems, Minneapolis
Biotinylated goat anti-human PDGF-AA	R&D Systems, Minneapolis
Mouse anti-human VEGF	R&D Systems, Minneapolis
Biotinylated goat anti-human VEGF	R&D Systems, Minneapolis

2.1.4 Standards für ELISA

TGFß1 human rekombinant	R&D Systems, Minneapolis
PDGF human rekombinant	R&D Systems, Minneapolis
VEGF human rekombinant	R&D Systems, Minneapolis

2.1.5 Medien und Seren

Fetal Bovine Serum	PAN Biotech, Südafrika
Goat Serum	DakoCytomation, Dänemark

D-PBS (ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$)	Invitrogen, Schottland

2.1.6 Puffer und Lösungen

HEPES 1M	Sigma Aldrich, Steinheim

PBS

137 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl, 8,1 mmol Na_2HPO_4, 1,5 mmol KH_2PO_4

pH 7,2-7,4

2.1.6.1 Histologie

DMMB-Färbelösung 0,1%

99,9g Aqua dest.

\+ 0,1g DMMB

Gelatine-Lösung für Objektträgerbeschichtung

- Lösen von 0,5g Chromalaun in 5ml Aqua dest.
- Gelatine in 45ml Aqua dest. einige Minuten quellen lassen und anschließend Erhitzen, bis zur Auflösung der Gelatine
- Nach Erkalten Zugabe von Chromalaun-Lösung und 125µl Glutaraldehyd

Methylformalin – Fixierungslösung

25ml 0,2M Phosphat-Puffer

\+ 25ml Para-Formaldehyd-Lösung (37%)

\+ 50ml Methanol (100%)

Methanol-Phosphatpuffer

100ml 0,2M Phosphatpuffer

\+ 100ml Methanol 100%

Phosphatpuffer 0,2M

500ml 0,2M di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$)

\+ 100ml 0,2M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4 x H_2O)

Saccharose Lösungen

Um eine Saccharose Lösung bestimmter Konzentration zur erhalten, wurde die dazu nötige Menge an Saccharose eingewogen und in 0,1M Phosphatpuffer gelöst.

Toluidinblau Färbelösung 0,1%

99,9g Aqua dest.

\+ 0,1g Toluidinblau

2.1.6.2 Immunhistochemie

ABC-Komplex

2,5ml 0,1M Trispuffer

\+ ABC – Kit: je ein Tropfen Reagenz A und B

30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur vor Verwendung

Blockingpuffer

60ml Aqua dest.

\+ 120ml Trispuffer 0,2M

\+ 2400mg NaCl

\+ 60ml Triton 4%

+ 30ml Ziegenserum
+ 30ml fetales Rinderserum

Diaminobenzidin Arbeitslösung

600µl Diaminobenzidin-Stammlösung
+ 5,4ml 0,1M m-PBS-Puffer
+ 240µl Ni/Co-Lösung
+ 36µl H_2O_2 3% (direkt vor Anwendung zugeben)

Diaminobenzidin-Stammlösung

10ml Aqua dest.
+ 10mg BSA
+ 50mg Diaminobenzidin

McIlvaine-Puffer - pH 3,6

67,8ml 0,1M Zitronensäure
+ 32,2ml 0,2M di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

m-PBS-Puffer 1M

47,2g Kaliumdihydrogenphosphat (K_2HPO_4 x $3H_2O$)
+ 6,6g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4 x H_2O)
+ 36,0g NaCl
+ mit Aqua dest. auf 500g auffüllen

pH 7,0-7,4

Ni/Co-Lösung (für Diaminobenzidin-Arbeitslösung)

10ml Aqua dest.

+ 100mg $NiCl_2$

+ 5mg $CoCl_2$

+ 10mg BSA

Pepsin-Andaulösung 0,1%

0,1g Pepsin

+ 99,9ml McIllvaine-Puffer (pH 3,6)

Phenylhydrazin-Lösung

200ml Waschpuffer

+ 4mg Phenylhydrazin ($C_6H_5NHNH_2$)

Trispuffer 0,2M für Immunhistochemie

1000ml Aqua dest.

+ 24,225g Tris

+ mit HCl (37%) auf pH 7 einstellen

Waschpuffer (3000ml)

2220ml Aqua dest

+ 780ml Trispuffer 0,2M

+ 24,96g NaCl

2.1.6.3 ELISA

Reagenz Lösung für TGF-ß1

1,4% Reagent Diluent Concentrate 1, 0,005% Tween 20 in PBS

Reagenz Lösung für VEGF und PDGF

1% BSA in PBS

Folgende Reagenzien wurden zur Verdünnung der jeweiligen Antikörper, bzw. Standards verwandt:

Fang-Antikörper	PBS
Standards	Reagenz Lösung
Detektions-Antikörper	Reagenz Lösung

Die für die jeweiligen Wachstumsfaktoren spezifischen Reagenz Lösungen sind dem Punkt 2.1.2 (Chemikalien und Reagenzien) zu entnehmen.

Arbeitskonzentrationen:

	Fang-Antikörper	Detektions-Antikörper	Standard
PDGF-AB	4,0µg/ml	50ng/ml	1000pg/ml
TGF-ß1	2,0µg/ml	300ng/ml	2000pg/ml
VEGF	1,0µg/ml	50ng/ml	2000ng/ml

Essigsäure-/Harnstoffarbeitslösung (für Aktivierung von latentem TGF-ß1)

100ml Aqua dest.

+ 150,2g Harnstoff (10M)

+ 35,9ml Essigsäure (2,5N)

+ mit Aqua dest. auf 250ml auffüllen

NaOH-/ HEPES-Arbeitslösung

140ml Aqua dest.

+ 67,5ml 10N NaOH

+ 59,5g HEPES

+ mit Aqua dest. auf 250ml auffüllen

Blockingpuffer (für TGF-ß1 ELISA)

5%ige Tween 20 PBS Lösung mit 0,05% NaN_3

Citratpuffer 0,4M

4,72 g Natriumcitrat

+ 3,36g Citronensäure-Monohydrat

+ 3,12g MES

+ 28,8g Aqua dest.

TMB-Gebrauchslösung

1ml Ureaperoxidlösung (2 fach)

+ 1ml Aqua dest.

+ 40µl TMB Stammlösung

TMB-Stocklösung

120µg TMB

+ 10g Essigsäuredimethylamid

+ 21mg Tetrabutylammoniumborohydrid

Ureaperoxid-Lösung für Gebrauchslösung ELISA

38mg Ureaperoxid

+ 40ml Citratpuffer 0,4M

Waschpuffer

0,05% Tween 20 in PBS

2.1.7 Kits

ABC-Kit	Vectorlabs, Grünberg
LIVE/DEAD Viability/Cytotoxity Kit (L-3224)	Mo Bi Tec, Göttingen

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Biopsiestanzen ∅ 2mm		Stiefel, Offenbach am Main
Butterfly (21G)	Valu-Set	Becton, Brasilien
Citrat-Röhrchen 5ml	S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser (24*24mm, 24*32mm)		Roth, Karlsruhe
Fäden	Prolene 4-0 Vicryl 3-0	Ethicon, Norderstedt
Sterilfilter 0,45µm		Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen (18/20/27G)		BD Falcon, Heidelberg
Lochtücher	Foliodrape	Hartmann, Heidenheim
Mikrotiterplatten 96 Well		TPP, Schweiz
Multi-Adapter		Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Starfrost adhäsiv	Knittel, Braunschweig
Parafilm	„M“	Pechiney, Chicago
Pipetten, (5/10/15/50ml)	Costar Stripette	Corning, Corning USA
Pipettensets (10/100/1000µl)		Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen epTips filter		Eppendorf, Hamburg

Rasierklingen	Personna	American Safety Razor Company, Verona, USA
Reaktionsgefäße 2ml Reaktionsgefäße 1,5ml Reaktionsgefäße 0,2ml		Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Skalpelle No. 11		Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Serum Röhrchen 5.5ml	S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (5/10ml)		BD Falcon, Heidelberg
Wellplatten 24 Loch		TPP, Schweiz

2.1.9 Geräte

Autoklav Melatronic 23		Melag, Berlin
Brutschrank Heracell 240		Heraeus, Hanau
Digitalkameras	EX-Z4 Polaroid DMC 3	Casio, Japan Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
Färbekammer	Coverplates	Thermo Shandon, Frankfurt a. M.
Glasküvetten		Roth, Karlsruhe
Heizplatte Monotherm		H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Kryostat HM 500 OM		Microtom, Berlin
Mikroskop	Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
OP-Instrumente		Aesculap Braun, Melsungen
pH Meter	pH 315	WTW, Weilheim

Pipettierhilfe	Falcon Express	BD Falcon, Heidelberg
Sicherheitswerkbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Fluoreszenz-Messgerät	Genios	Tecan, Österreich
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad		GFL, Burgwedel
Waagen	Analysenwaage Kern 770 Analysenwaage Kern EW	Kern, Balingen-Frommern
Wippe	Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Blutbild-Analysator	Advia 2120	Bayer, Leverkusen
Zentrifugen	Multifuge 3S-R Combi-Spin FVL 2400 Biofuge fresco	Heraeus, Hanau Kisker, Steinfurt Heraeus, Hanau

2.1.10 Biomaterialien

Die Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix (Abb. 2-1 und 2-2) wurde vor jeden in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nach einem patentierten Herstellungsverfahren (Europäisches Patent Nr.: EP1135177B1) frisch hergestellt. Das Hyaluronan-Gelatine-Verhältnis betrug stets 7:3. Dieses Mischungsverhältnis hat sich in zahlreichen Vorversuchen sowohl mechanisch als auch biologisch bewährt. Die Porengröße der Trägermatrizes (Höhe 4mm, Ø5mm) betrug 350-450µm. Im Tiermodell wurden zwei unterschiedliche geometrische Formen der Matrices verwendet:

- für das Stanzdefekt-Modell Zylinder (Höhe 3mm, Ø2mm)
- für das Rissdefekt-Modell Quader (Höhe 3mm, Länge 4mm, Tiefe 1mm)

In der Abbildung 2-2 wird anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in der linken und mittleren Spalte die hohe Porosität der Matrix und deren Sekundärporenbildung dargestellt.

Abbildung 2.1: Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix in Aufsicht

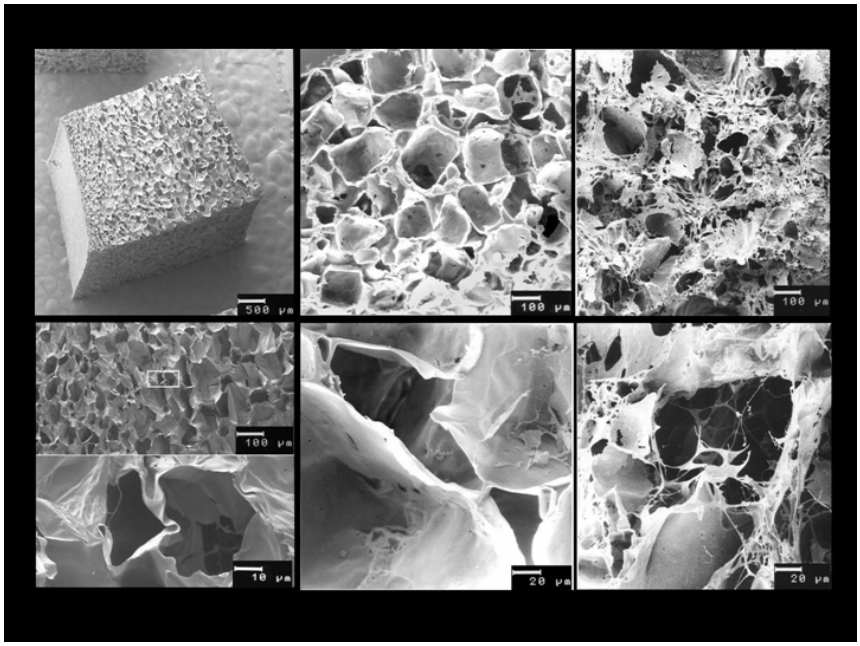

Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahmen der verwendeten Tissue Engineering Trägermatrix

2.1.11 Tiere

Für das Tiermodell wurden männliche New Zealand White Rabbits (2,5-3,5kg) vom Anbieter Harland und Winkelmann (Borchen) verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des Klinikums der Universität Regensburg unter artgerechten Bedingungen gehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Thrombozytenisolierung aus Vollblutproben

Um Thrombozyten aus Vollblutproben quantitativ möglichst effektiv zu isolieren, wurden verschiedene Protokolle auf ihre Effizienz hin untersucht (siehe Tabelle unten). Die

nötigen Blutproben entstammten dabei männlichen Probanden, die folgende Kriterien erfüllten: Sie waren Nichtraucher und hatten mindestens zwei Wochen vor Probenentnahme keine Acetylsalicylsäure zu sich genommen, da diese Faktoren Einfluss auf die Funktionsfähigkeit von Thrombozyten haben können. Dies gilt auch für alle weiteren durchgeführten Versuche.

Die Vollblutproben wurden durch Venenpunktion mit Hilfe von Butterfly-Abnahmesystemen und Citrat-Röhrchen durchgeführt. Anschließend wurden sie den unterschiedlichen Aufreinigungsverfahren unterzogen, die sich vor allem in den G-Stärken und der Dauer der einzelnen Zentrifugationsschritte unterschieden. Um die effektivste Methode für die Thrombozytenisolation herauszufinden, wurden von allen angefertigten Proben Ausstrichpräparate angefertigt und unter dem Mikroskop beurteilt (s.u.). Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die untersuchten Protokolle:

	1. Zentrifugation	2. Zentrifugation	Zusatzstoff(e)
Protokoll 1	300g, 5 Minuten	5000g, 5 Minuten	Citrat
Protokoll 2	2300g, 20 Minuten	1000g, 10 Minuten	Citrat
Protokoll 3	2300g, 20 Minuten	2000g, 10 Minuten	Citrat
Protokoll 4	2300g, 20 Minuten	3000g, 10 Minuten	Citrat
Protokoll 5	2300g, 20 Minuten	4000g, 10 Minuten	Citrat
Protokoll 6	2300g, 20 Minuten	4600g, 10 Minuten	Citrat
Protokoll 7	200g, 15 Minuten	4000g, 15 Minuten	Citrat, ACD-A

Im Folgenden wird das für die weiteren Versuche verwendete Protokoll (Nummer 7) genauer beschrieben.

Die gewonnenen Blutproben wurden unter sterilen Bedingungen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Verhältnis 5:1 mit ACD-A verdünnt. Die Proben wurden anschließend im ersten Schritt 15 Minuten bei 200g ungebremst bei 22˚C zentrifugiert. Dabei sedimentiert die Erythrozytenfraktion unten und wird von Plasma überschichtet. Zwischen diesen beiden Fraktionen befindet sich der so genannte Buffy-Coat, eine Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten[105]. Mitsamt dem Plasma wurde diese Schicht in ein neues 15ml Zentrifugenröhrchen mit Hilfe einer Plastik- Pipette überführt. Diese Plasma – Zellsuspension wurde wiederum 15 Minuten bei nunmehr 4000g unter sonst gleichen Bedingungen wie im ersten Schritt zentrifugiert. Dabei sedimentiert unten ein Zellpellet und darüber das Plasma, welches mit einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt wurde, um die Zellen isoliert zu erhalten.

2.2.2 Zellzählung

Um den prozentualen Anteil sowie die absoluten Zellzahlen der aus einer Vollblutprobe isolierten Thrombozyten nach dem verwendeten Protokoll beurteilen zu können, wurden maschinelle Zellzählungen durchgeführt, die im Prinzip der Anfertigung eines Differentialblutbildes entsprechen.

2.2.2.1 Probengewinnung und Aufarbeitung

Vier Probanden wurde jeweils 5ml venöses Blut mit einem Citratröhrchen entnommen, aus dem ein Differentialblutbild angefertigt wurde. Weiter wurden den Probanden jeweils 10ml venöses Blut mit Citratröhrchen abgenommen und wie unter Punkt 2.2.1 ein Zellpellet isoliert. 10ml wurden gewählt, um möglichst den Bedingungen, unter welchen im Tiermodell verfahren wurde, zu entsprechen. Die Zellpellets wurden anschließend mit 2ml D-PBS vorsichtig mit einer 1ml Pipette durch mehrmaliges Aufsaugen und Ablassen resuspendiert.

2.2.2.2 Automatisierte Zellzählung

Die Thrombozytenzahlen der aufbereiteten Proben wurden mit Hilfe eines vollautomatischen Blutbildgerätes ermittelt.
Aus den gemessenen Zellkonzentrationen wurden die Absolutzahlen der Zellen anhand der Formel c=n/V berechnet und unter Berücksichtigung der Volumina, in denen sie gemessen wurden, verglichen (c= Konzentration, n= Stoffmenge, V= Volumen).

2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

2.2.3.1 Probenaufbereitung

Aus 5ml Vollblut eines männlichen Probanden wurden, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, Zellen isoliert und zur weiteren Verarbeitung in ein Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.2 LIFE/DEAD – Kit

Die Zellpräparation wurde zunächst nach Herstellerprotokoll mit dem LIFE/DEAD - Kit gefärbt. Dazu wurde 1ml der vom Hersteller vorgegebenen Kit-Lösung der

Zellenpräparation zugegeben. Anschließend wurde diese Suspension mit D-PBS soweit unter ständiger mikroskopischer Kontrolle von Proben verdünnt, dass sie abzählbar waren. 200µl der Suspension wurden entnommen und damit ein Objektträger überschichtet. Von dem Präparat wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop, das zunächst mit einem Fluoreszenzfilter versehen war, eine Aufnahme angefertigt. Anschließend wurde, ohne den Objektträger zu bewegen, ein weiteres Bild angefertigt; diesmal jedoch mit Durchlicht und eingestelltem Phasenkontrast. Um die Anzahl lebender Zellen mit abgestorbenen vergleichen zu können, wurden die digitalisierten Bilder mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms übereinander gelegt und die Deckkraft um jeweils 50% reduziert. Auf diese Weise war es möglich, die Gesamtzellzahl mit der Zahl der lebendigen Zellen zu vergleichen. In jedem Bilderpaar wurden jeweils vier Quadranten ausgezählt und ausgewertet.

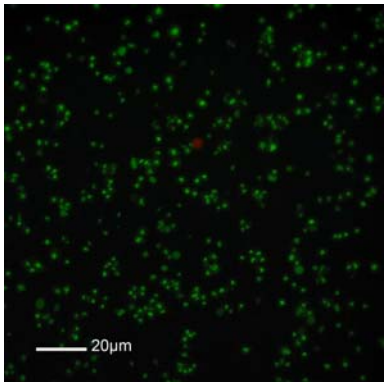

Abbildung 2.3: Thrombozytenisolation (LIVE-DEAD-KIT); Fluoreszenzfilter.

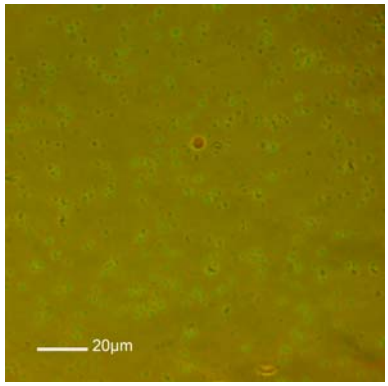

Abbildung 2.4: gleiches Bild wie Abb. 2.3 - nur mit Durchlicht.

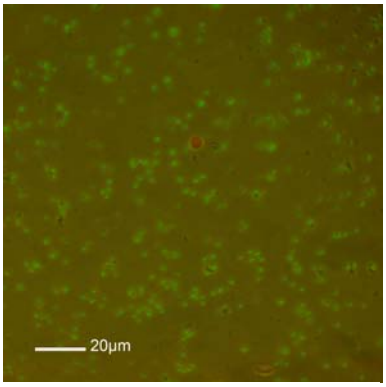

Abbildung 2.5: Abb. 2.3 + 2.4 übereinander gelegt. Deckkraft jew. um 50% reduziert.

2.2.4 Trägermatrixbeladung

Um zu überprüfen, mit welcher Methode Matrices mit den isolierten Zellen am effektivsten besetzt werden können und wie sich die Zellen nach Beimpfung in einer Matrix verteilen, wurde dies durch Anfertigung von Gefrierschnitthistologien näher untersucht. Dabei wurden sowohl zylindrische als auch quaderförmige Matrices untersucht, da diese später im Tiermodell verwendet wurden.

Zunächst wurde ein Zellpellet aus 10ml Vollblut eines Probanden wie unter Punkt 2.2.1 isoliert. Auf das Pellet wurde eine Matrix gesetzt und gewartet, bis sie Feuchtigkeit und Zellen aufgesaugt hatte. Um die Ausbeute an Zellen in der Matrix zu erhöhen, wurde sie manuell mit einem Spatel komprimiert, damit sie beim selbständigen Entfalten ähnlich

einem Schwamm weitere Zellen aufnehmen konnte. Aus den mit Zellen besetzten Matrices wurden Gefrierschnitthistologien (s.u.) angefertigt.

2.2.5 Histologie

Alle verwendeten Adhäsiv-Objektträger wurden zusätzlich mit einer Gelatine-Suspension beschichtet, um eine bessere Adhäsion der Präparate zu gewährleisten.

2.2.5.1 Analyse der Zellpellets mittels Ausstrichhistologie

Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen der Zellsuspension aufgebracht und mit Hilfe eines weiteren Objektträgers gleichmäßig verteilt. Nachdem das Präparat durch Verdunstung getrocknet war, wurde es für 5 Minuten zur Fixierung mit Methanol überschichtet. Danach wurde es vorsichtig mit entionisiertem Wasser abgespült und für ca. 5 Minuten mit einer 0,1%igen DMMB-Färbelösung überschichtet. Anschließend wurde es wieder mit entionisiertem Wasser gespült und in einer aufsteigenden Reihe von 2-Propanol-Bädern (70%, 80%, 90%, 100%) entwässert. Nach einem Xylol-Bad (10 Minuten) wurde es mit Deckgläsern und DePex eingedeckt.

2.2.5.2 Gefrierschnitthistologie

Die Thrombozyten Matrix-Präparate wurden zunächst für zwei Stunden in 15ml Zentrifugenröhrchen mit Methylformalin zur Fixierung überschichtet. Anschließend wurde das Fixans mit Methanol-Phosphatpuffer für 30 Minuten ausgewaschen. Daraufhin wurden die Präparate mit 0,1M Phosphatpuffer zwölf Stunden lang inkubiert. Hierauf folgte eine aufsteigende Saccharosereihe. Für jeweils 2 Stunden wurden die Präparate mit 10%iger und 20%iger Saccharoselösung überschichtet, zuletzt 12 Stunden mit 30%iger Saccharoselösung. Diese wurde anschließend zur Hälfte durch Tissue-Tec ersetzt.
Die Meniskuspräparate wurden zunächst wie oben beschrieben fixiert und anschließend mit 2 radiären Schnitten in 3 Teile mit Hilfe einer Rasierklinge geteilt. Dabei wurde der erste Schnitt kurz vor der Defektstelle gesetzt und der zweite kurz dahinter. Die dabei entstandenen Teile wurden so in Tissue-Tec bei -30˚C in einen Block eingefroren, dass die Schnittflächen nach unten zeigten und man in den Histologieschnitten die Defektstellen in Horizontalschnitten beurteilen konnte. Die Gefrierschnitte wurden in einer Schichtdicke

von 10µm angefertigt und mit beschichteten Objektträgern aufgenommen. Zur weiteren Untersuchung wurden verschiedene Färbungen angefertigt.

2.2.5.3 Färbungen

2.2.5.3.1 Toluidinblaufärbung

Die Schnitte wurden 5 Minuten lang in einer Glasküvette mit Aqua dest. gespült, um restliches Tissue-Tec zu entfernen. Dann wurden sie unter Blickkontrolle zwischen 20 und 30 Sekunden lang in einer 0,1%igen Toluidinblau-Lösung gefärbt. Nachdem sie anschließend kurz mit Aqua dest. gespült worden waren, erfolgte das Entwässern in einer aufsteigenden Reihe von 2-Propanol Bädern (70%, 80%, 90%, 100%), in die die Präparate jeweils kurz getaucht wurden. Weitere 10 Minuten wurden die Präparate in technisches Xylol getaucht und anschließend mit DePex und Deckgläsern eingedeckt.

2.2.5.3.2 Immunhistochemische Verfahren (Kollagen I und II)

Hierfür wurden kommerziell erhältliche Färbekammern verwendet.

Tag I

Die Objektträger wurden zunächst in Shandon-Coverplate®-Halterungen eingespannt und mit Waschpuffer blasenfrei befüllt. Die angegebenen Mengen an Reagenzien wurden jeweils pro Präparat in die dafür vorgesehenen Öffnungen pipettiert.

1. Dreimal Waschpuffer, wobei nach jedem Befüllen gewartet wurde, bis der Waschpuffer aus den Füllöffnungen abgelaufen war
2. 200µl 0,1%ige Pepsin Andaulösung für 15min
3. Dreimal Waschpuffer wie unter Punkt 1
4. 200µl Blockingpuffer mit Serum für 30 Minuten
5. 150µl der jeweiligen Primärantikörpersuspension über Nacht auf einer Wippe

Tag II

6. Dreimal Waschpuffer wie unter Punkt 1
7. 150µl der Sekundärantikörpersuspension für eine Stunde
8. Dreimal Waschpuffer wie unter Punkt 1

9. 150µl Phenylhydrazinlösung für 10 Minuten
10. Absättigung der endogenen Peroxidase durch 150µl Phenylhydrazinlösung mit unmittelbar vorher zugegebenem H_2O_2 (30µl, 6%) für 20 Minuten
11. Dreimal Waschpuffer wie unter Punkt 1
12. 150µl Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe (ABC-Kit) für 90 Minuten
13. Überführung der Objektträger in eine mit Waschpuffer gefüllte Glasküvette
14. Zur Entwicklung wurden die Schnitte mit einem DAB-Kit unter Blickkontrolle überschichtet
15. Kurzes Abspülen mit Aqua dest.
16. Entwässern in aufsteigender 2-Propanol Reihe (70%, 80%, 90%, 100%) durch kurze Tauchbäder
17. Bad in technischem Xylol für 10 Minuten
18. Eindeckeln

2.2.6 In vitro-Analysen der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF

2.2.6.1 Prinzip des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe der ELISA-Technik ist es möglich, Moleküle, die Träger bestimmter Antigenstrukturen sind, in Probenmaterial nachzuweisen und deren Konzentration zu quantifizieren. Dabei kommen zwei Antikörper zum Einsatz, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antiköper, auch Capture-Antikörper genannt, wird an eine feste Phase (meist spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Dabei bindet der Capture-Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am Capture-Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein biotinylierter Detektions-Antikörper zugegeben, der wiederum an das Antigen bindet. Ungebundene Detektions-Antikörper werden wiederum durch Waschen entfernt. Nun wird ein Enzymkomplex (Streptavidin-Meerrettichperoxidase) zugegeben, der an den biotinylierten Teil des Detektionsantikörpers bindet. Wieder werden ungebundene Enzymkomplexe durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wird ein Chromogen als Substrat (bei uns

Tetramethylbenzidin) zugegeben, das vom Enzymkomplex zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird. Um die Reaktionszeit zu standardisieren, wird nach 20 Minuten Schwefelsäure hinzugegeben, um den Substratumsatz zu stoppen. Diese Reaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei der Konzentration des entstandenen Produkts und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe proportional. Mit Hilfe von Standardkurven können die Antigen-Konzentrationen der untersuchten Proben aufgrund der gemessenen Extinktion ermittelt werden.

2.2.6.2 Ermittlung eines geeigneten Mediums

2.2.6.2.1 Medienaufbereitung

2.2.6.2.1.1 Gruppe A: Serum

Bei den Pobanden wurde zunächst mit Serumröhrchen Vollblut entnommen. Um eine ausreichende Gerinnung zu gewährleisten, wurde 45 Minuten gewartet, bis die Proben weiter aufbereitet werden konnten. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation mit 2000g wurde der Serumüberstand abgenommen und mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,45µm filtriert, um mögliche Zellreste zu beseitigen. Anschließend wurde er noch 30 Minuten bei 56* C hitzeinaktiviert, um den Gehalt an endogenen Wachstumsfaktoren zu reduzieren.

2.2.6.2.1.2 Gruppe B: Plasma

Den Probanden wurde mit Citrat-Röhrchen 30ml Vollblut abgenommen und die Proben wie unter Punkt 2.2.1 bis zur 1. Zentrifugation aufbereitet. Dann wurden die Plasma-Überstände inklusive Buffy Coat in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschließend gleichmäßig auf 2 Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach dem 2. Zentrifugationsschritt wurde das Plasma gesammelt und steril filtriert. Die Zellpellets wurden im weiteren Versuch verwandt.

2.2.6.2.2 Probenaufbereitung

Die unter Punkt 2.2.6.2.1.2 beschriebenen zwei Proben mit dem Gesamtvolumen von jeweils ca. 100µl wurden mit 60µl des entsprechenden Mediums (Plasma oder Serum) verdünnt, um die Proben besser pipettieren zu können. Pro geplanten Entnahmezeitpunkt

wurden jeweils 20µl der Zellsuspension mit einer 100µl Eppendorfpipette auf eine Matrix pipettiert und diese in ein Loch einer 24-Wellplatte verbracht. In jeder Gruppe entstanden so 4 zellbesetzte Matrices. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu ermöglichen, wurde 15 Minuten gewartet und anschließend pro Matrix je nach Gruppe 1ml Plasma, beziehungsweise 1ml Serum als Medium zugegeben. Als Negativkontrollen wurden Matrices ohne Zellen mit dem jeweiligen Medium verwendet. Die Präparate wurden anschließend in Brutschränken bei 37˚C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.6.2.3 Probenentnahmen

Zu den Zeitpunkten 0h, 8h, 24h, 48h, 192h wurden die Proben entnommen. Nur der 0h-Wert wurde sowohl für die positiv- als auch für die Negativ-Kontrollgruppe verwendet.
Bei den Probenentnahmen wurde zunächst das Medium abpipettiert und in zwei spitze 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt. Um keine Matrixreste in beiden Gruppen, und keine Zellbestandteile in der Positiv-Kontrolle für die weitere Auswertung zu erhalten, wurden die Proben 5 Minuten bei 10.000 U/min (Eppendorfzentrifuge) zentrifugiert und nur der Überstand isoliert. Dieser wurde zu drei gleichen Portionen in Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -20˚C für die spätere Analyse eingefroren.

2.2.6.3 Wachstumsfaktorenbestimmung

Aufgrund der Erkenntnisse, die man aus dem Vorversuch gewonnen hatte, wurde als Medium autologes Plasma verwendet.

2.2.6.3.1 Probenaufbereitung und Mediengewinnung

Vier Probanden wurde insgesamt 60ml Vollblut mittels Venenpunktion in Citrat-Röhrchen abgenommen und die Proben nach der Vorgehensweise wie unter Punkt 2.2.1 aufgereinigt, wobei pro Proband jeweils ein Zellpellet entstand. Das Plasma über dem Zellpellet wurde bei jeder Probe separat isoliert und zur Herstellung des Kulturmediums in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschließend steril filtriert.
Um das Zellpellet pipettieren zu können, wurde es mit einer geringen Menge an Plasma resuspendiert, sodass ein Gesamtvolumen von 230µl entstand. Mit jeweils 40µl dieser Zellsuspension wurden fünf zylindrische Matrices (ECM 124) mit Hilfe einer 100µl-

Eppendorfpipette beimpft und jeweils in ein Loch einer 24-Well-Platte verbracht. Um den Zellen die Möglichkeit zu geben, sich gleichmäßig in der Matrix zu verteilen, wurde 15 Minuten gewartet, bis jeweils 1,2ml des autologen Plasmas hinzugegeben wurde. Die leeren Löcher der 24-Well-Platte wurden mit PBS-Medium befüllt, um eine möglichst feuchtigkeitsgesättigte Luft um die Löcher herum zu erhalten und somit einer Verdunstung des Plasmas, wie es im Vorversuch zu beobachten war, während des Versuchsablaufes entgegenzuwirken. Als Leerwertkontrolle wurde 1,2ml autologes Plasma zu einer Matrix ohne Zellen zugegeben.
Die Präparate wurden anschließend in Brutschränken bei 37˚C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.6.3.2 Probenentnahmen

Zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h, 24h, 48h, 192h wurden die Proben entnommen. Nur der 0h-Wert wurde sowohl für die Positiv- als auch für die Negativ-Kontrollgruppe verwendet. Ansonsten wurde wie unter Punkt 2.2.6.2.3 vorgegangen.

2.2.6.4 Auswertung der Proben mittels ELISA

Alle durchgeführten Messungen wurden pro Entnahmezeitpunkt dreifach bestimmt.

2.2.6.4.1 Verwendetes Protokoll

Bis auf die zusätzliche Aktivierung von latentem TGF-ß1 und der Verwendung delipidierten Serums zum Blocken für die Vorbereitung der Mikrotiterplatten beim TGF-ß1- ELISA wurden bei der Durchführung der ELISA alle Proben der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren dem gleichen Protokoll unterzogen. Deshalb wird im Folgenden die Durchführung der ELISA nur einmal exemplarisch erläutert. Die für die jeweiligen Wachstumsfaktoren spezifischen Arbeitskonzentrationen der Fang- bzw. Detektions-Antikörper sind dem Punkt 2.1.6.3 zu entnehmen. Die Mengen der zugegebenen Reagenzien wurden jeweils pro Loch der verwendeten 96-Loch-Mikrotiterplatten hinzugefügt. Vor jedem Schritt wurden die Reagenzien des vorigen Schrittes durch dreimaliges Waschen entfernt.

Aktivierung von latentem TGF-ß1

1. Zugabe von 100µl Essigsäure-/Harnstoffarbeitslösung zu 100µl des Probenmaterials, anschließendes Durchmischen und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
2. Neutralisieren mit 100µl NaOH-/ HEPES-Arbeitslösung und Durchmischen
3. Zugabe von 900µl Reagenz Lösung (damit wurde das Probenmaterial insgesamt um den Faktor 12 verdünnt)

Vorbereitung der Mikrotiterplatten (TGF-ß1)

1. 100µl Arbeitslösung des Fang-Antikörpers (Konzentrationen siehe Punkt 2.1.6.3) – Abdecken mit Parafilm und Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
2. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
3. Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit jeweils 300µl Blockingpuffer bei Raumtemperatur eine Stunde
4. Dreimaliges Waschen wie unter Punkt 2

Vorbereitung der Mikrotiterplatten (PDGF-AB und VEGF)

1. 100µl Arbeitslösung des Fang-Antikörpers (Konzentrationen siehe Punkt 2.1.6.3) - mit Parafilm abgedeckt und Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
2. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
3. Blocken mit jeweils 300µl Reagenz Lösung bei Raumtemperatur eine Stunde
4. Dreimaliges Waschen wie unter Punkt 2

Durchführung des ELISA (PDGF-AB, TGF-ß1, VEGF)

1. 100µl des Probenmaterials bzw. der Standards – zusätzlich wurden Verdünnungsreihen angelegt – Abdecken und Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur
2. Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer
3. 100µl des jeweiligen Detektion-Antikörpers (Konzentrationen siehe Punkt 2.1.6.3); 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur
4. Dreimaliges Waschen wie unter Punkt 2

5. 100µl Streptavidin-HRP-Lösung; Abdecken und unter Lichtschutz 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
6. Dreimaliges Waschen wie unter Punkt 2
7. 75µl TMB-Gebrauchslösung; Abdecken und unter Lichtschutz 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
8. 125µl 1M Schwefelsäure (=Stoplösung)
9. Messung mit Photometer bei 450nm

2.2.7 Reparatur von avaskulären Außenmeniskusdefekten im Tiermodell

2.2.7.1 Operationsablauf und Technik

Die Anästhesie der Neuseelandhasen wurde mit einer Dosis von 0,6ml/kg aus einer Mixtur von 1ml Ketamin 10% und 1ml Xylazin 2% mittels glutealer i.m. Injektion durchgeführt. Um die für die Präparation des Zellpellets benötigten 10ml Vollblut zu erhalten, wurde die Arterie eines Ohres punktiert und das Blut in Citratröhrchen gesammelt. Die Isolierung des Zellpellets erfolgte unter sterilen Bedingungen wie unter Punkt 2.2.1. Damit wurde wie unter 2.2.4 je nach Versuchgruppe entweder eine zylindrische oder quaderförmige Matrix beimpft.

Die Knie des Tieres wurden vor der Operation enthaart. Für die Operation wurde das Tier in Rückenlage positioniert und das OP-Gebiet steril abgedeckt. Am Knie erfolgte lateral parapatellar eine Längsinzision vom distalen Femurdrittel bis zur Tuberositas tibiae. Die Gelenkkapsel wurde eröffnet und der Hoffa-Fettkörper partiell reseziert. Die anterolaterale Gelenkkapsel wurde proximal partiell von der lateralen Femurkondyle gelöst und die Gelenkkapsel von der anterioren Kante des lateralen Kollateralbandes disseziert. Danach erfolgte die anteriore Luxation des lateralen Meniskus.

In der einen Gruppe wurde anschließend mit einer Biopsiestanze im avaskulären Bereich der Pars intermedia des Außenmeniskus ein im Durchmesser 2mm großer Stanzdefekt, beziehungsweise in der anderen Gruppe mit einem Skalpell ein ca. 4mm langer Rissdefekt gesetzt und wie folgt bestückt:

- linkes Knie: mit Thrombozytenkonzentrat besetzte Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix
- rechtes Knie: zellfreie Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix

Der Rissdefekt wurde anschließend mit einer Adaptationsnaht versorgt. Die Matrices des Stanzdefekts wurden pressfit ohne weitere Fixierung eingebracht. Nach Reluxation des lateralen Meniskus wurde die anterolaterale Kapsel in anatomischer Position readaptiert (4-0 Vicryl-Faden) und die Gelenkkapsel verschlossen (4-0 Vicryl-Faden). Die Hautnaht erfolgte intrakutan ebenfalls mit bioresorbierbarem Nahtmaterial. Die Laufzeiten der einzelnen Gruppen betrugen jeweils 6 beziehungsweise 12 Wochen.

2.2.7.2 Meniskengewinnung

Die Anästhesie wurde wie unter Punkt 2.2.7.1 durchgeführt. Die Knie wurden anschließend enthaart und das Tier mit einer intravenösen Applikation von 2ml Narcoren® an einer Ohrvene getötet. Danach erfolgte die Entnahme der Außenmenisken nach Querdurchtrennung der Patellarsehne, der Kollateral- und Kreuzbänder, sowie der Kapselstruktur. Die Außenmenisken wurden makroskopisch beurteilt und photographiert. Zur weiteren Analytik wurden Gefrierschnitthistologien wie unter Punkt 2.2.5.2 angefertigt und mit unterschiedlichen Färbemethoden behandelt.

2.2.7.3 Scoring

Um die Defektheilung qualitativ bewerten zu können, wurde auf einen Score mit hoher interner Konsistenz (Cronback's alpha = 0,88) zurückgegriffen, der speziell für Tiermodelle dieser Art entwickelt und bereits in mehreren Versuchen erprobt wurde. Die Einzelwerte lassen sich zu einem Gesamtscore zusammenfassen, der Werte zwischen 0 (= kein Reparaturgewebe) bis 24 (= meniskustypisches Reparaturgewebe) annehmen kann.

Scoringwert	0	1	2	3
1. Makroskopische Defektfüllung	keine Füllung	<25%	25-75%	>75%
2. Oberfläche	keine Oberfläche	Komplettriss	rau, zerklüftet	meniskoider Schichtaufbau
3. Integration	keine Integration	partielle, einseitige Integration	beidseits partielle bzw. einseitig komplette Integration	komplette distale und proximale Integration
4. Zellzahl	keine Zellen	>10 Zellcluster/ Schnitt	<10 Zellcluster/ Schnitt Zell/ Matrixverhältnis >0,5	meniskusähnliches Verhältnis
5. Zellverteilung/ -morphologie	keine meniskoiden Zellen, Fibroblasten	<25% meniskoide Zellen	25-75% meniskoide Zellen	>75% meniskoide Zellen
6. Proteoglykangehalt	keine Färbung	<25%	25-75%	>75%
7. Kollagen Typ II-Gehalt	kein Kollagen II	<25%	25-75%	>75%
8. Stabilität	keine Stabilität	weich, gerissen	formstabil	druck- und zugelastisch

2.2.7.4 Statistik

Begonnen wurde mit der Erstellung einer deskriptiven Statistik mit Errechnen des Mittelwertes und der Konfidenzintervalle bezogen auf die Gesamtscoring-Ergebnisse. Dies erfolgte sowohl für die behandelten Gruppen, als auch für die Kontrollgruppen der zellfreien Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix unter Berücksichtigung der verschiedenen Laufzeiten von 6 Wochen und 3 Monaten. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS, wobei ein gepaarter T-Test ($p<0.05$) durchgeführt wurde. Für die graphische Darstellung wurde mit Microsoft Excel gearbeitet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ausstrichhistologie der isolierten Thrombozyten

Wichtige Grundlage aller Untersuchungen war eine sowohl quantitativ effektive, wie auch möglichst zellschonende Thrombozytenisolierung aus Vollblutproben. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Verfahren durchgeführt und beurteilt.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Protokollen (s.o.) konnte nur mit der Kombination aus 15 Minuten Zentrifugation bei 200g im ersten Schritt und 15 Minuten bei 4000g im zweiten Schritt des mit ACD-A versetzen Vollbluts eine suffiziente Ausbeute an Thrombozyten erreicht werden. Die Menge an Thrombozyten reichte dabei aus, um die im Versuch verwandten Kompositmatrices vollständig mit Zellen zu besetzen.

Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen mit 1,9-Dimethyl-Methylenblau (DMMB) gefärbte Ausstrichhistologien. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch das Versuchsergebnis einer Thrombozytenisolierung, die anhand eines Protokolls (siehe 2.2.1, Protokoll Nr. 1) durchgeführt wurde, das nicht zur gewünschten maximalen Ausbeute und Konzentrierung der Zellen führte.

Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis einer Zellisolation, die anhand des Protokolls durchgeführt wurde, das in den gesamten weiteren Versuchen verwendet wurde (siehe 2.2.1, Protokoll 7). Dabei konnte eine maximale Konzentrierung von Thrombozyten erreicht werden.

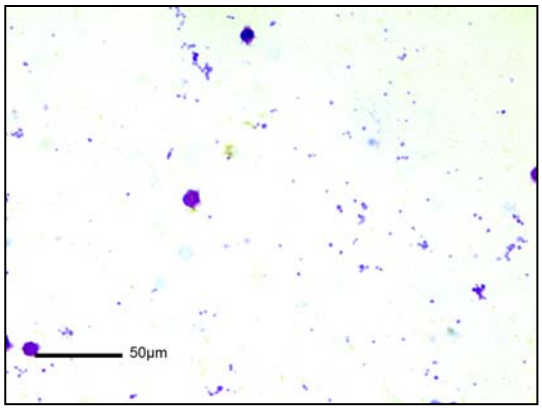

Abbildung 3.1: Ausstrichhistologie einer Zellisolation mit mangelhafter Ausbeute (DMMB).

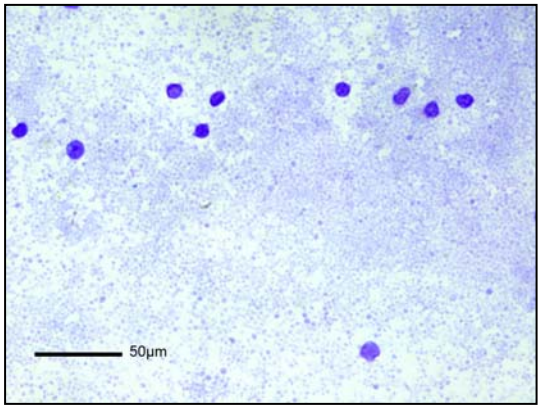

Abbildung 3.2: Ausstrichhistologie einer Zellisolation. Zu sehen sind fast ausschließlich Thrombozyten (DMMB).

3.2 Histologie der Trägermatrices mit Zellen

Es konnte histologisch nachgewiesen werden, dass es möglich ist, Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices effektiv mit Thrombozyten zu besetzen, indem man die Matrix auf das isolierte Zellpellet gibt und die Matrix sich nach manueller Kompression ähnlich einem Schwamm beim Entfalten mit Thrombozyten füllt.

Abbildung 3.3 und 3.4 zeigen DMMB-gefärbte Gefrierschnitthistologien von Matrices, die, wie oben beschrieben, mit Zellen besetzt wurden. Abbildung 3.3 zeigt einen Querschnitt durch eine zylindrische Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix in 3,2-facher Vergrößerung. Die Poren der Matrix sind mit Zellen gefüllt. Abbildung 3.4 zeigt einen Ausschnitt in 40-facher Vergrößerung.

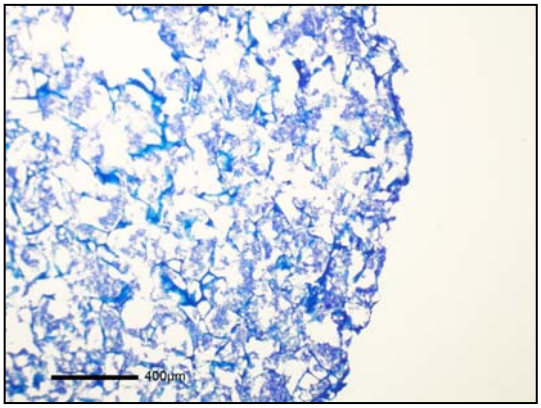

Abbildung 3.3: Gefrierschnitthistologe einer mit Zellen besetzten Kompositmatrix (DMMB).

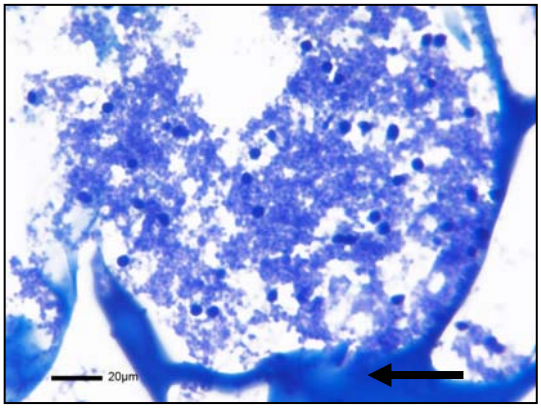

Abbildung 3.4: Gefrierschnitthistologe einer mit Zellen besetzten Kompositmatrix(DMMB). Pfeil: Kompositmatrix.

3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zu diesem Zweck wurde ein LIVE/DEAD-Kit verwendet, der mit den zwei Komponenten Calcein AM und Ethidium-Homodimer-1 die Aussage ermöglicht, ob Zellen vital oder abgestorben sind. Wird Calcein in Zellen aufgenommen, so erhält es durch intrazelluläre Esterasen vitaler Zellen Eigenschaften, welche unter Beleuchtung mit einer Fluoreszenzlampe bei einer Wellenlänge zwischen 495nm und 515nm eine grüne Fluoreszenz hervorrufen. Ethidium-Homodimer-1 färbt abgestorbene Zellen unter einer Fluoreszenzlampe mit einer Wellenlänge zwischen 495nm und 635nm rot. Das Prinzip beruht darauf, dass Ethidium-Homodimer-1 in Zellen mit beschädigter und somit poröser Zellmembran eindringen kann und an Nukleinsäuren bindet, was zur Folge hat, dass eine fluoreszierende Verbindung entsteht. Da aber Thrombozyten, die für die Untersuchungen

von eigentlichem Interesse waren, weder DNA noch RNA in ausreichenden Mengen besitzen, konnte der Nachweis von toten Zellen mit Ethidium-Homodimer-1 für Thrombozyten nicht verwendet werden. Deshalb wurde die Vorgehensweise wie oben beschrieben (Material und Methoden) modifiziert.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde exemplarisch anhand einer Probenaufbereitung durchgeführt. Die angefertigten Bilder (n=4) wurden in 4 Quadranten geteilt und vitale und abgestorbene Zellen ausgezählt.

3.3.1 Ergebnisse der Auszählung

Durchschnittlich waren 94% vital (Standardabweichung=10) und 6% abgestorben (Standardabweichung=10) (siehe Diagramm 3.1).

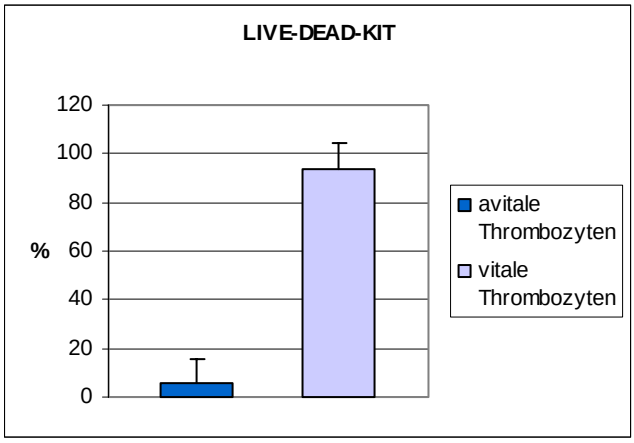

Diagramm 3.1: Prozentuale Verteilung vitaler und avitaler Zellen.

3.4 Automatisierte Zellzählung

Um die Effektivität der Thrombozytenisolierung näher beurteilen zu können, wurde anhand der Anfertigung von Differentialblutbildern die Absolutzellzahlen der Thrombozyten in Vollblutproben mit den Proben der isolierten Thrombozyten verglichen.

Im Mittel konnte eine Ausbeute von 70% der Thrombozyten aus den Vollblutproben erzielt werden (Standardabweichung 0,054).

Diagramm 3.2 zeigt in einer Gegenüberstellung von Absolutzellzahlen, wie viele der in Vollblutproben enthaltenen Thrombozyten von Probanden (n=4) isoliert werden konnten.

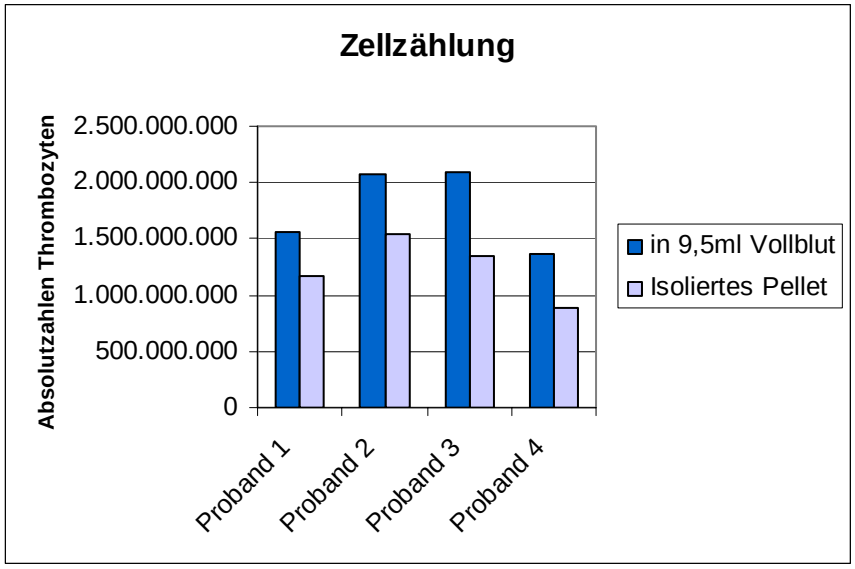

Diagramm 3.2: Ergebnisse der automatisierten Zellzählung der Vollblutproben und Zellpellets.

Die erhaltenen Zellpellets aus ca. 9,5ml Vollblut hatten Volumina im Mittel von 50µl. Durchschnittlich waren in den 4 untersuchten Pellets $1{,}24*10^9$ Thrombozyten enthalten. Daraus errechnet sich eine Thrombozytenkonzentration von ca. $24{,}74*10^6$/µl pro Pellet.

Eine möglichst effektive Ausbeute an Thrombozyten war deshalb von zentralem Interesse, da im in-vivo Modell zur Regeneration von avaskulären Meniskusdefekten mit Kaninchen gearbeitet wurde, bei denen man nicht uneingeschränkt Blut entnehmen konnte, um sie nicht vital zu gefährden. Die mit der oben beschriebenen und im in-vivo Modell angewandten Methode der Zellisolierung ergab ein aus Thrombozyten bestehendes Pellet, das hinsichtlich seines Volumen exakt zur vollständigen Besetzung einer Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix ausreichte.

In Diagramm 3.3 sind pro Proband die prozentualen Erträge an Thrombozyten aus den Vollblutproben dargestellt.

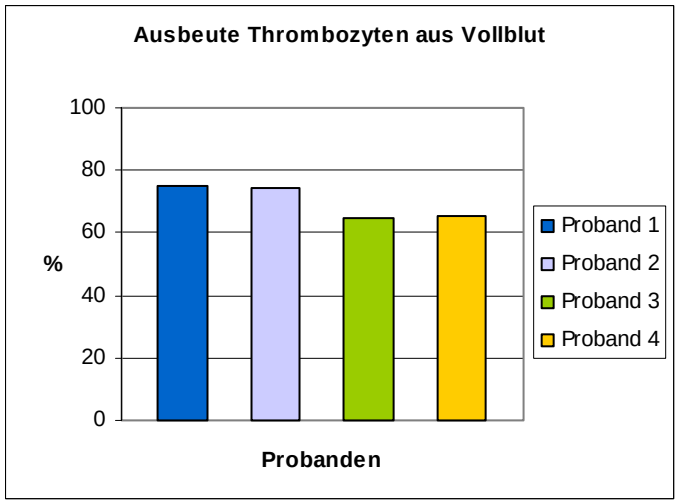

Diagramm 3.3: Darstellung der prozentualen Ausbeute von Thrombozyten aus Vollblutproben.

Diagramm 3.4 zeigt anhand gestapelter Säulendiagramme die Zusammensetzung der einzelnen Zellisolationen. Dabei ist ersichtlich, dass nahezu ausschließlich Thrombozyten isoliert wurden (Mittelwert= 99,88%, Standardabweichung= 0,01).

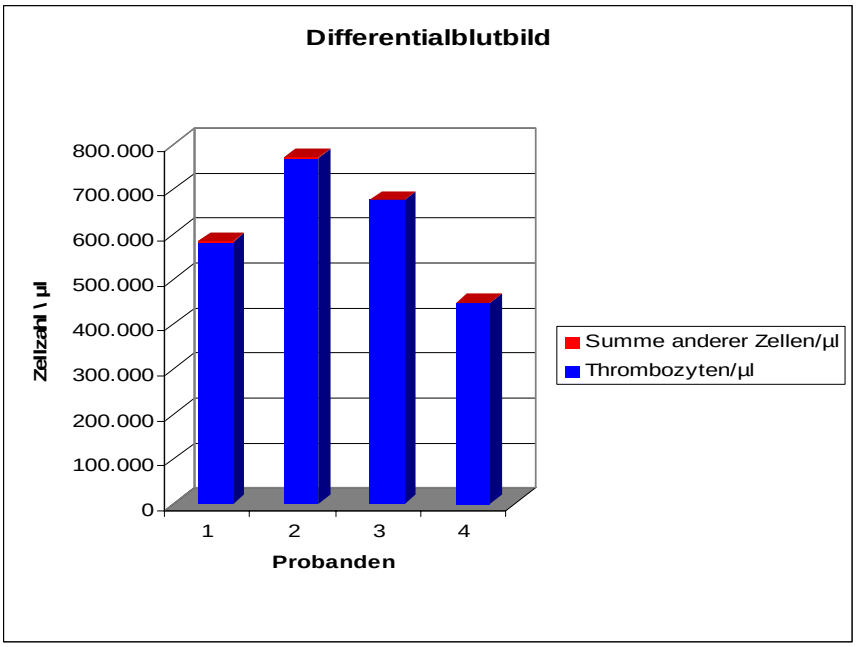

Diagramm 3.4: Darstellung der Zellpellet-Differentialblutbilder von vier Probanden anhand gestapelter Säulendiagramme.

3.5 Freisetzungskinetik von PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF

Über einen Zeitraum von 8 Tagen wurden die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF, die aus thrombozytenbesetzten Kompositmatrices im Kulturmedium freigesetzt wurden, zu definierten Zeitpunkten bestimmt.
Dabei war das verwendete Zellmaterial ausschließlich humanen Ursprungs. Zwar wurde das in-vivo Modell an Kaninchen durchgeführt, jedoch wurden für die Untersuchungen Blutproben in quantitativ größerem Umfang benötigt, welche aus Kaninchen nur in sehr begrenztem Umfang zu gewinnen sind.
Für jeden zu bestimmenden Zeitpunkt wurde eine eigene Probe aufbereitet und die Konzentration an Wachstumsfaktoren im Medium ermittelt. Jeder im Medium gemessene Wert wurde im Versuch zur Abklärung des am besten geeigneten Mediums zweifach, im Hauptversuch dreifach bestimmt. Ein Medienwechsel wurde während der Versuchsdauer nicht durchgeführt, da die gesamte Menge an Wachstumsfaktoren, die während des Versuchszeitraumes freigesetzt wurden, bestimmt werden sollte.
Zur besseren Vergleichsmöglichkeit wurden die Ordinaten in den Diagrammen einheitlich skaliert.

3.5.1 Abklärung des geeigneten Mediums

Um zu klären, in welchem Umfang aus thrombozytenbesetzten Matrices im Zeitverlauf Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, wurde dies im in-vitro Modell mit Hilfe des ELISA-Verfahrens nachvollzogen. Dabei war es von besonderem Interesse, die Versuchsbedingungen möglichst denen des in-vivo Modells anzugleichen. Wesentlicher Bestandteil dieser Überlegungen war dabei das zu verwendende Medium. Im in-vivo Versuch wurden künstlich erzeugte Defekte im Meniskus mit zellbesetzten Matrices aufgefüllt und folglich mit der dort natürlich vorhandenen Synovialflüssigkeit in Kontakt gebracht. Das Medium im in-vitro Versuch sollte daher der Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit möglichst ähnlich sein. Diese Anforderungen erfüllt am ehesten der flüssige Bestandteil des Blutes. Letztlich musste noch geklärt werden, ob autologes, hitzeinaktiviertes Serum oder autologes Plasma für die Versuchsanordnung geeigneter wäre.

3.5.1.1 Medium: hitzeinaktiviertes autologes Serum

3.5.1.1.1 Leerwertkontrolle: Matrix mit hitzeinaktiviertem autologem Serum

PDGF-AB und TGF-ß1 wiesen - im Gegensatz zu VEGF - hohe Konzentrationen auf und waren im zeitlichen Verlauf nicht konstant.

Diagramm 3.5 zeigt den Gehalt von PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF im Serum mit Matrix ohne Zellen im Verlauf von 8 Tagen. Dem Konzentrationsabfall von PDGF-AB und TGF-ß1 nach 6 Stunden folgten bei 24 Stunden Werte, die den Ausgangswerten glichen und auch in etwa nach 48 Stunden gefunden wurden. Der 8-Tage-Wert von TGF-ß1 war für die photometrische Detektion auch in der höchsten Verdünnung noch zu konzentriert, sodass hier die Ermittlung des Wertes nicht möglich war. PDGF-AB nahm nach 8 Tagen im Vergleich zum 48-Stunden-Wert leicht ab.

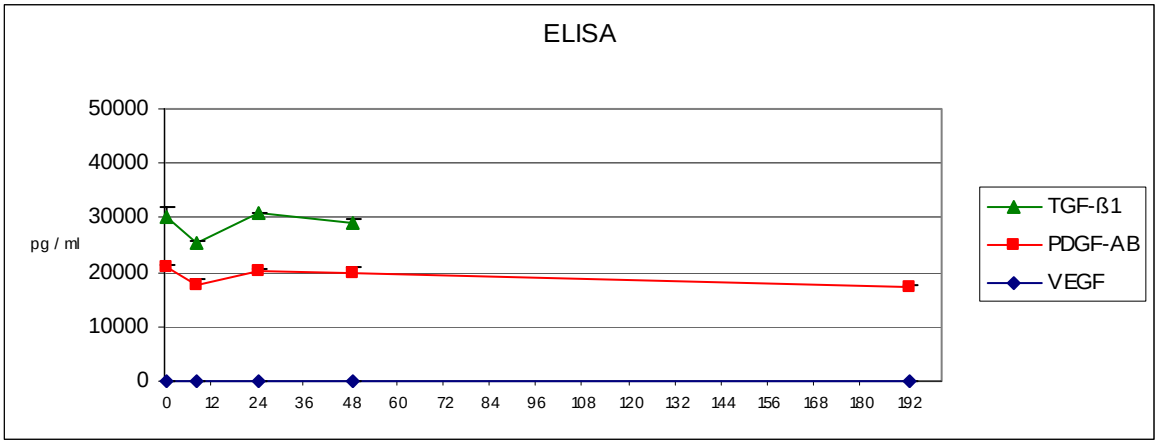

Diagramm 3.5: Bestimmung der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF im Verlauf von 8 Tagen im Serum. TGF-ß1 war nach 48h für die photometrische Detektion zu hoch konzentriert.

3.5.1.1.2 Zellbesetzte Matrix mit hitzeinaktiviertem autologem Serum

In Diagramm 3.6 sind die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren, die aus den zellbesetzten Matrices freigesetzt wurden, dargestellt. Von den Werten wurden die Leerwerte (siehe Punkt 3.5.1.1.1) jeweils abgezogen. Für TGF-ß1 wurden innerhalb eines Zeitpunktes stark voneinander abweichende Werte ermittelt. So lag beispielsweise einer der 24-Stunden-Werte außerhalb des messbaren Bereichs, während der andere sogar niedriger als der 6-Stunden-Wert war, weshalb auch beim 24-Stunden-Wert keine Standardabweichung angegeben ist. Die TGF-ß1- und PDGF-AB-Konzentrationen nahmen nach 48 Stunden im Vergleich zum 6-Stunden-Wert ab. Für PDGF-AB konnte nach 8

Tagen eine maximale Konzentration ermittelt werden, während bei TGF-ß1 die Werte aufgrund der hohen Konzentration oberhalb des messbaren Bereichs lagen. Wie in der Leerwertkontrolle konnte im Vergleich zu TGF-ß1 und PDGF-AB kaum VEGF nachgewiesen werden.

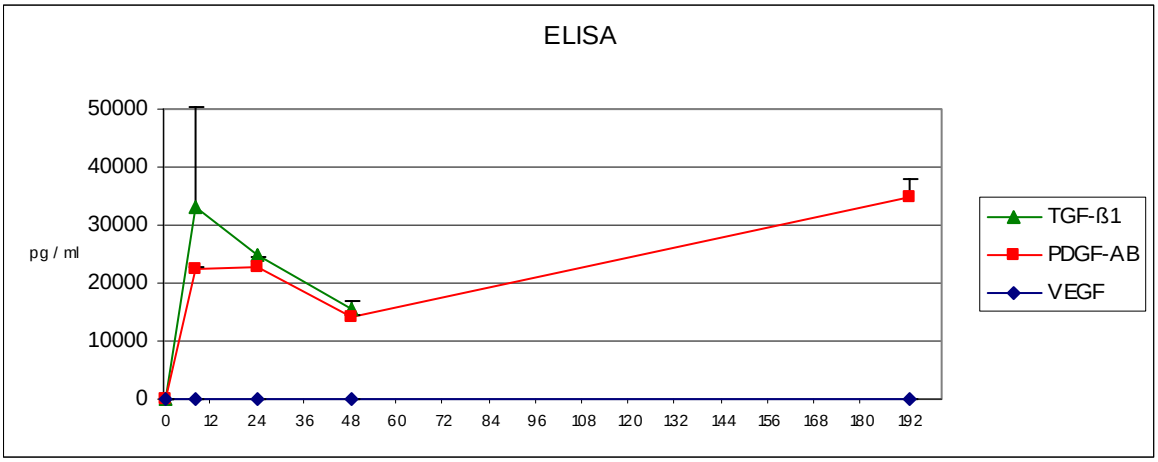

Diagramm 3.6: Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF aus Thrombozyten-Matrix-Konstrukten im Verlauf von 8 Tagen. Kulturmedium: Serum. TGF-ß1 war nach 48h für die photometrische Detektion zu hoch konzentriert.

3.5.1.2 Medium: Plasma

3.5.1.2.1 Leerwertkontrolle: Matrix ohne Zellen mit autologem Plasma

Es konnten zu allen Zeitpunkten nur sehr geringe Konzentrationen von PDGF-AB und TGF-ß1, beziehungsweise nur Spuren von VEGF nachgewiesen werden (Diagramm 3.7). Zudem waren die Konzentrationen im Verlauf sehr konstant. Da dies den Anforderungen des in-vitro Modells, nämlich ein Medium mit möglichst geringer Konzentration an Wachstumsfaktoren, am besten entsprach, wurde autologes Plasma als Medium im Hauptversuch eingesetzt.

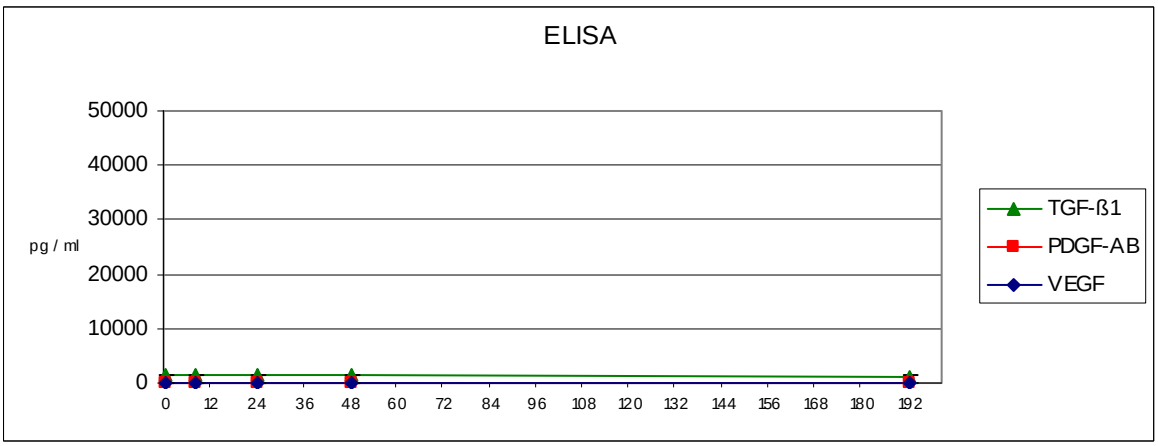

Diagramm 3.7: Bestimmung der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF im Verlauf von 8 Tagen im Plasma.

3.5.1.2.2 Zellbeladene Matrix mit autologem Plasma

PDGF-AB zeigte im zeitlichen Verlauf einen kontinuierlichen Anstieg. TGF-ß1 erreichte innerhalb 24h die höchste Konzentration, wobei in den darauf folgenden Messungen niedrigere Werte gemessen wurden. VEGF konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. Von den in Diagramm 3.8 dargestellten Werten wurden die Leerwerte (siehe Punkt 3.5.1.2.1) abgezogen.

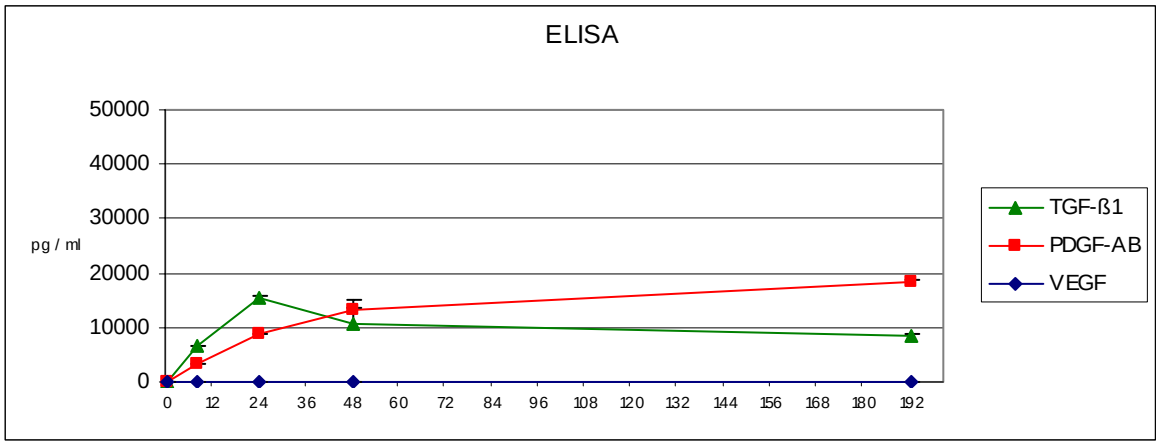

Diagramm 3.8: Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF aus Thrombozyten-Matrix-Konstrukten im Verlauf von 8 Tagen. Kulturmedium: Plasma.

3.5.2 Wachstumsfaktorenanalyse

Nachdem im Vorversuch die Durchführbarkeit des Versuchablaufs gezeigt und als geeignetes Medium autologes Plasma festgestellt worden war, konnte der Hauptversuch mit mehreren Probanden (n=4) durchgeführt werden. Die untenstehenden Diagramme zeigen jeweils die Freisetzungskinetik eines Wachstumsfaktors der vier Probanden im zeitlichen Verlauf von acht Tagen. Messzeitpunkte waren 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 192h (8 Tage). Für jeden Zeitpunkt wurde ein separates Präparat angefertigt. Neben den Präparationen von zellbeladenen Matrices wurden jeweils Leerwertkontrollen mit Matrices ohne Zellen angefertigt. Von den in den Diagrammen dargestellten Werten wurden jeweils diese Leerwerte abgezogen.

3.5.2.1 PDGF-AB

Bei allen vier Probanden konnte ein kontinuierlicher Anstieg von PDGF-AB im Verlauf mit einem Maximum bei 8 Tagen beobachtet werden. Bei den Probanden 2, 3 und 4 konnten sehr homologe Konzentrationsverläufe gemessen werden. Nach relativ konstanten Konzentrationen zwischen 6 und 24 Stunden kam es zu einem erneuten Anstieg nach 48 Stunden. Nach 8 Tagen konnte bei allen 4 Probanden eine maximale Konzentration an Wachstumsfaktoren gemessen werden. Durchschnittliche Konzentration nach 192h der vier Probanden der Positiv-Proben war ohne Abzug der Leerwerte 17978pg/ml (SD=2411) und die der Leerwerte 777pg/ml (SD=1115). Damit konnten in den Positiv-Proben im Schnitt nach 192h um den Faktor 23 höhere Konzentrationen an PDGF-AB gemessen werden, als in den Leerwertkontrollen.

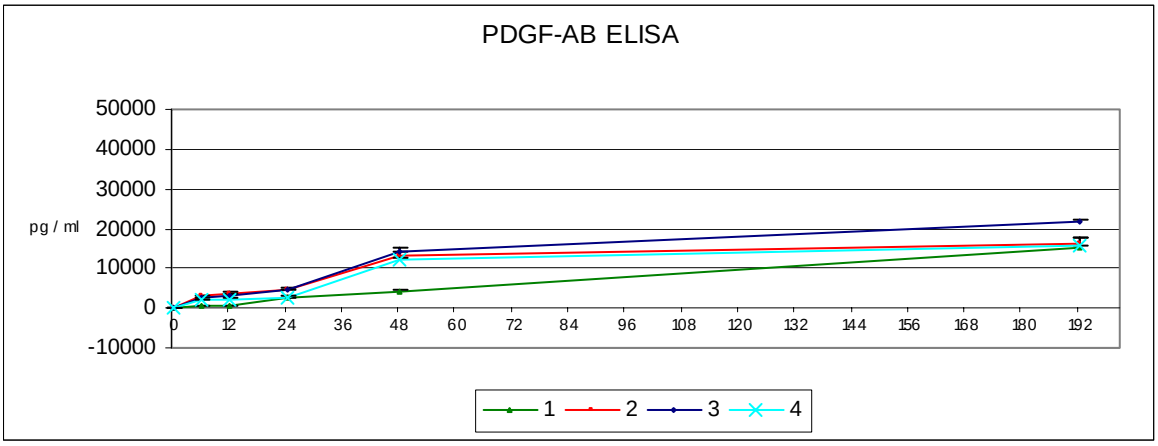

Diagramm 3.9: Freisetzungskinetik von PDGF-AB aus Thrombozyten-Matrix-Konstrukten vier unterschiedlicher Spender im Verlauf von 8 Tagen. Kulturmedium: Plasma.

3.5.2.2 TGF-ß1

Bei drei der vier Probanden konnte eine sehr konstante Zunahme der Konzentrationen von TGF-ß1 innerhalb von acht Tagen gemessen werden. Bei einem Probanden (Nummer 2) wurde nach 48 Stunden eine deutlich höhere Konzentration als bei den anderen Probanden gemessen, die nach acht Tagen nur gering unter diesem Niveau lag. Durchschnittliche Konzentration nach 192h der vier Probanden der Positiv-Proben war ohne Abzug der Leerwerte 33421pg/ml (SD=6573) und die der Leerwerte 1665pg/ml (SD=113). Ähnlich wie bei PDGF-AB konnten im Vergleich zu den Leerwertkontrollen in den Positiv-Proben nach 192h durchschnittlich um den Faktor 20 höhere Konzentrationen an TGF-ß1 gemessen werden.

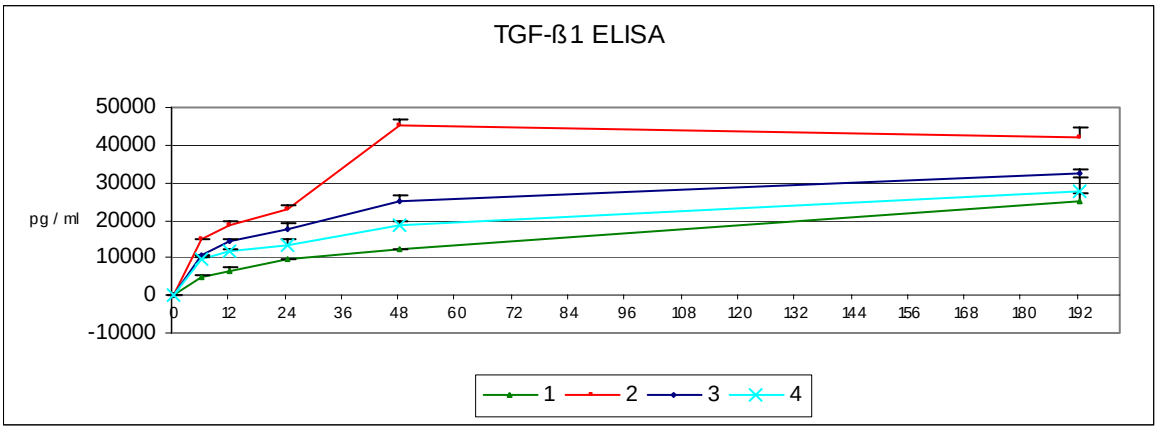

Diagramm 3.10: Freisetzungskinetik von TGF-ß1 aus Thrombozyten-Matrix-Konstrukten vier unterschiedlicher Spender im Verlauf von 8 Tagen. Kulturmedium: Plasma.

3.5.2.3 VEGF

Wie sowohl der Vorversuch mit hitzeinaktiviertem autologem Serum als auch mit autologem Plasma gezeigt hatte, konnte auch hier kaum VEGF, beziehungsweise - im Vergleich zu den anderen Wachstumsfaktoren - nur Spuren nachgewiesen werden. Hierbei war bemerkenswert, dass sich die Positiv-Proben nur wenig von den Werten der Leerwertkontrollen (Plasma + Matrix) unterschieden. Die im Diagramm teilweise sogar leicht negativen Werte ergeben sich aus der Subtraktion der Leerwerte von den Positiv-Werten, die dann gering über den Positiv-Werten lagen. Durchschnittliche Konzentration nach 192h der vier Probanden der Positiv-Proben war ohne Abzug der Leerwerte 303pg/ml (SD=213) und die der Leerwerte 499pg/ml (SD=364).

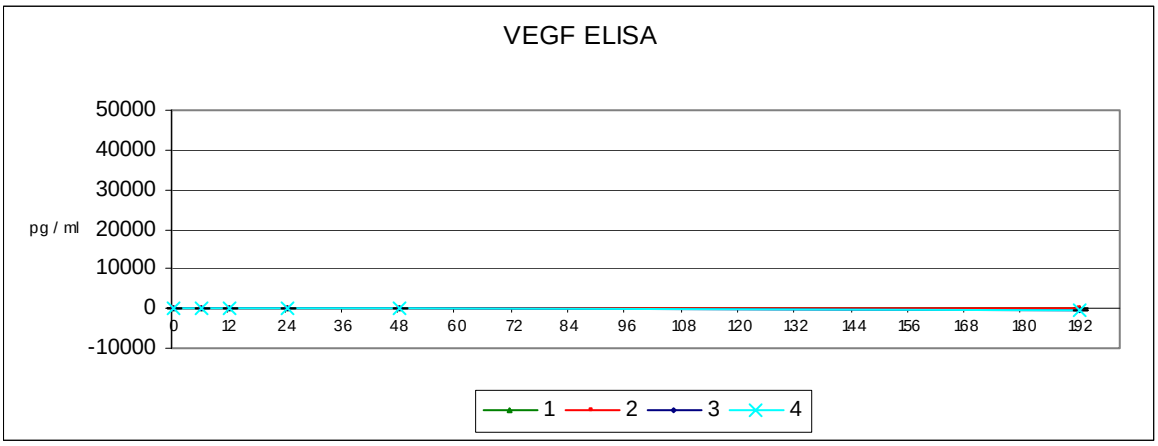

Diagramm 3.11: Freisetzungskinetik von VEGF aus Thrombozyten-Matrix-Konstrukten vier unterschiedlicher Spender im Verlauf von 8 Tagen. Kulturmedium: Plasma.

3.5.2.4 Zusammenfassung der Wachstumsfaktorenanalyse

Es ist festzustellen, dass es mit einem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt möglich ist, im Verlauf von 8 Tagen größere Mengen von TGF-ß1 sowie PDGF-AB bereitzustellen. Da in den Positiv-Proben wesentlich mehr Wachstumsfaktoren als in den Leerwertkontrollen gemessen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die detektierten Faktoren aus den Thrombozyten freigesetzt wurden. VEGF bildet dabei eine Ausnahme, da es im Vergleich zu TGF-ß1 und PDGF-AB nur in Spuren gemessen wurde und nicht gezeigt werden konnte, dass in den Positiv-Proben mehr Faktoren enthalten waren, als in den Leerwertkontrollen. Bei dem genaueren mathematischen Vergleich der durchschnittlichen Endkonzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren nach 192h ergibt sich, dass VEGF zu PDGF um den Faktor 62 und zu TGF-ß1 um den Faktor 116 weniger gemessen werden konnte.

Diagramm 3.12 zeigt das Verhältnis der Endkonzentration von VEGF, PDGF-AB und TGF-ß1 nach 192h ohne Abzug der Leerwerte im Vergleich.

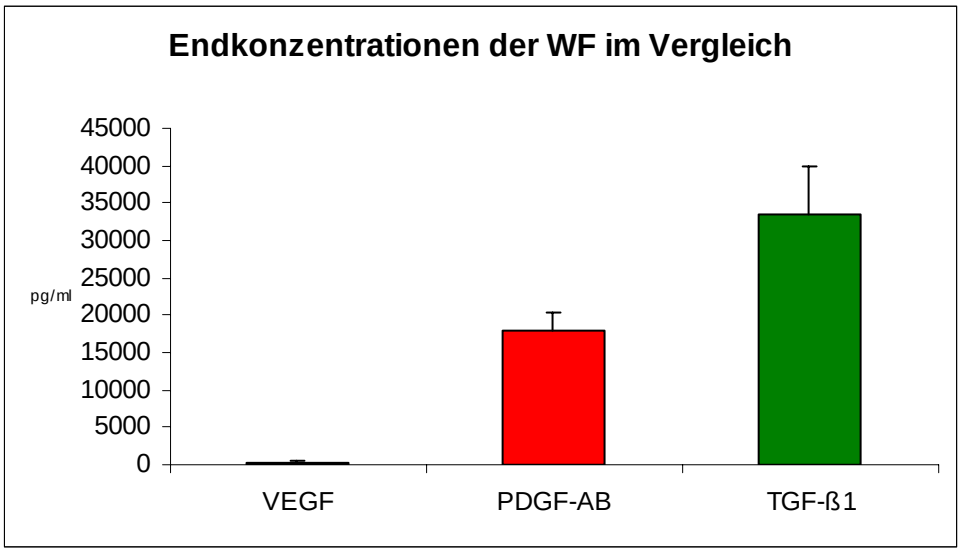

Diagramm 3.12: Zusammenfassende Gegenüberstellung der Endkonzentrationen von PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF nach 8 Tagen.

3.6 Regeneration von avaskulären Außenmeniskusdefekten im Tiermodell

Für das in-vivo Modell konnte auf ein bereits etabliertes Tiermodell zurückgegriffen werden. In diesem Modell wurden bei Neuseelandhasen sowohl Stanz- als auch Rissdefekte in Außenmenisken im avaskulären Bereich der Pars intermedia mit mesenchymalen Stammzellen und einer Kompositmatrix versorgt. Abweichend von diesem Modell wurden in der vorliegenden Arbeit keine mesenchymalen Stammzellen, sondern ein autologes Thrombozytenkonzentrat als Zellkomponente eingesetzt. Die künstlich erzeugten Defekte wurden wie folgt behandelt:

- Stanzdefekte: zylindrische Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix mit Thrombozytenkonzentrat
- Rissdefekte: quaderförmige Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix mit Thrombozytenkonzentrat

Als Kontrollgruppe fungierte jeweils ein Defekt im kontralateralen Außenmeniskus im avaskulären Bereich, der mit einer Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix ohne Zellen versehen wurde.

Der klinische Verlauf der Tiere wurde beobachtet und dokumentiert. Den Kaninchen war ein freies Herumlaufen ohne Einschränkung der Belastung oder des Bewegungsumfangs erlaubt. Keines der Tiere musste vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

Die Untersuchungszeiten betrugen 6 Wochen (Gruppe A) beziehungsweise 3 Monate (Gruppe B), bevor die makroskopische, histologische und immunhistochemische Auswertung anhand eines bereits ebenfalls etablierten Scoringsystems erfolgte (siehe oben). Der verwendete Score berücksichtigt 8 Kriterien der Defektheilung:

- makroskopische Defektfüllung
- Oberflächenbeschaffenheit
- Integration
- Zellzahl
- Zellmorphologie
- Proteoglykangehalt
- Kollagen II-Gehalt
- Stabilität

3.6.1 Stanzdefekte

Wie bereits im Methodenteil näher beschrieben, wurde im in-vivo Modell versucht, einen mit einer Biopsiestanze (Ø 2mm) künstlich erzeugten, kreisrunden Punchdefekt im avaskulären Bereich der Pars intermedia eines Außenmeniskus mit einem zylindrischen Zell-Matrix-Konstrukt zu therapieren. Zwar ist ein Punchdefekt sicherlich keine typische klinische Problematik, jedoch bietet das Modell aufgrund der immer gleichen Morphologie des künstlich erzeugten Defekts eine sehr gute Standardisierung und somit eine optimale Vergleichsmöglichkeit der Ergebnisse sowohl untereinander, aber auch zu Vorarbeiten, die mit anderen Zellreihen durchgeführt wurden.

3.6.1.1 Gruppe A: Laufzeit 6 Wochen

3.6.1.1.1 Makroskopische Auswertung

Die Defektfüllung des Außenmeniskus in der mit autologen Thrombozyten und einer Kompositmatrix behandelten Gruppe (n=6) zeigte nach 6 Wochen Laufzeit eine meist inkomplette Füllung. Der Defekt war in seiner runden Form oftmals erhalten und war nach zentral nicht eingerissen.

In der Kontrollgruppe (n=6), in der der Defekt nur mit einer zellfreien Kompositmatrix versorgt wurde, konnte - ähnlich wie in der behandelten Gruppe - meist nur eine partielle Defektfüllung beobachtet werden. Bei einigen Menisken waren die Defekte nach zentral hin eingerissen und der Defekt nicht mehr als geschlossener Kreis abgrenzbar.

Insgesamt konnte in der behandelten Gruppe bis auf die etwas bessere Defektstabilität kein wesentlicher Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden.

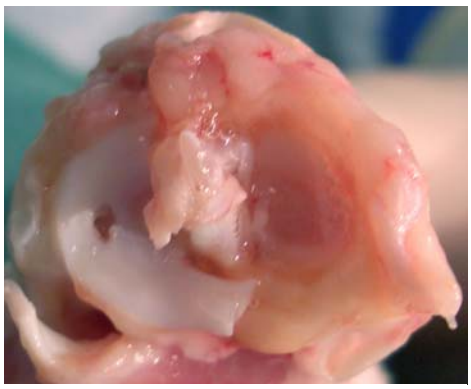

Abbildung 3.5: Ansicht der Menisken des linken Kniegelenks. Der Defekt des Außenmeniskus wurde mit einem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt versorgt.

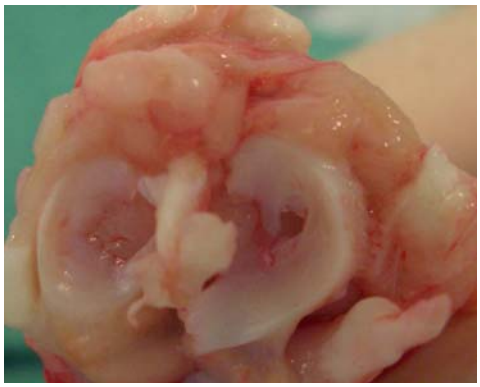

Abbildung 3.6: Ansicht der Menisken des rechten Kniegelenks. Der Defekt des Außenmeniskus wurde mit zellfreier Matrix versorgt (Kontrolle).

3.6.1.1.2 Histologische Auswertung

Die histologische Betrachtung der mit Toluidinblau gefärbten Gefrierschnitte ergab innerhalb der behandelten Gruppe (n=6) äußerst unterschiedliche Ergebnisse. In 2 von 6 Menisken war der Defekt vollkommen leer. Bei 3 Menisken war der Defekt überwiegend mit Matrixresten gefüllt, mit wenig bis keinen Zellen und Nachweis von Kollagen I und II.

Nur bei einem Tier konnte auf der behandelten Seite ein sehr gutes Ergebnis nachgewiesen werden: der Defekt war nahezu komplett mit Zellen gefüllt und es zeigte sich ein hoher Gehalt an Proteoglykanen bei einer peripher sehr guten, sowie zentral partiellen Integration. Der immunhistochemische Nachweis für Kollagen II war vor allem in den peripheren 2 Dritteln positiv. Kollagen I konnte im Vergleich zu Kollagen II wenig detektiert werden.

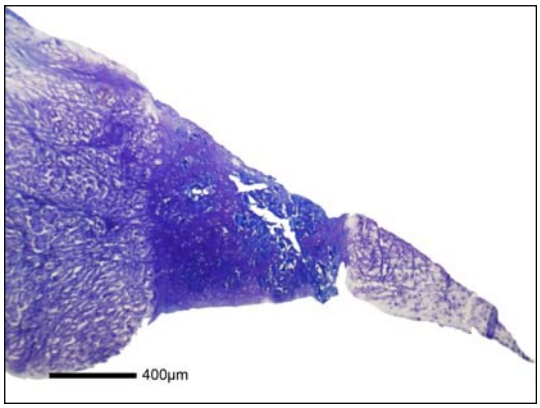

Abbildung 3.7: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (Toluidinblau).

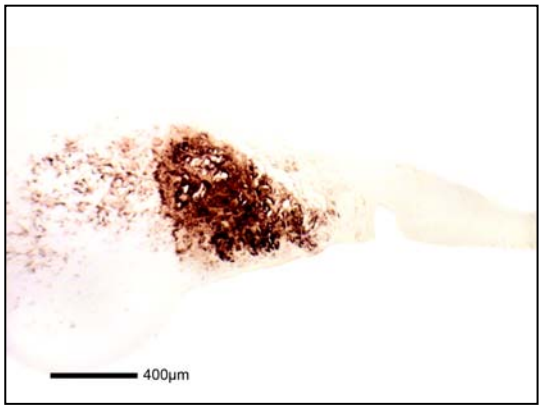

Abbildung 3.8: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

Die Kontrollgruppe (n=6) zeigte ein ebenso inhomogenes Bild wie die behandelte Gruppe. 3 von 6 Menisken waren gar nicht, beziehungsweise nur partiell mit fibrotischem Bindegewebe gefüllt.

Bei zwei Menisken konnte ein von basisnah einwachsendes, in der Toluidinblau-Färbung metachromatisch erscheinendes Gewebe gefunden werden, das aber zentral keinerlei Integration zeigte. Beide zeigten im Bereich der partiellen Defektfüllung einen positiven Nachweis für Kollagen II, einer zusätzlich für Kollagen I. Bei einem Tier konnte eine komplette Auffüllung des Defekts mit hohem Gehalt an Kollagen II und einer sehr guten Integration beobachtet werden. Dabei konnte kein Kollagen I nachgewiesen werden.

Mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe kann somit kein wesentlicher Unterschied zur behandelten Gruppe festgestellt werden, die ebenso keine suffiziente Heilungstendenz zeigte.

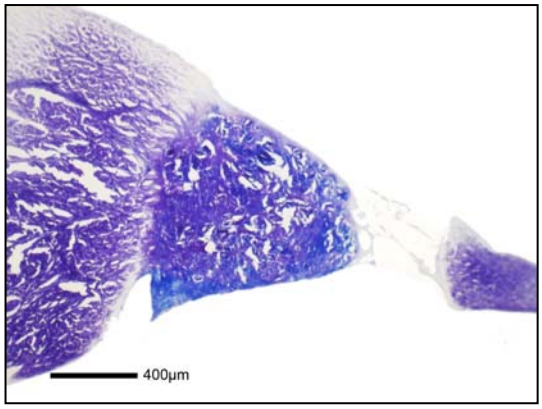

Abbildung 3.9: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (Toluidinblau).

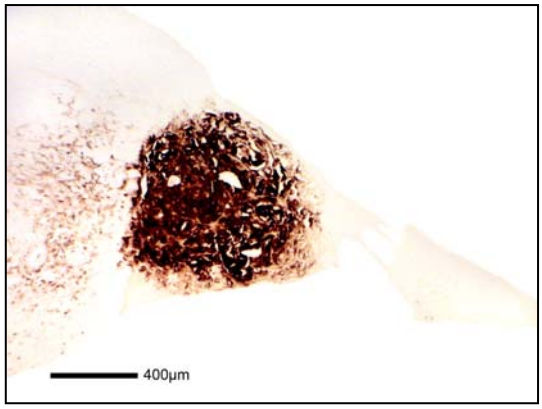

Abbildung 3.10: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

3.6.1.2 Gruppe B: Laufzeit 12 Wochen

3.6.1.2.1 Makroskopische Auswertung

Nach 12 Wochen waren in der behandelten Gruppe (n=6) die Defekte meist leer beziehungsweise bestenfalls teilweise gefüllt. Alle Defektränder waren nach zentral hin ausgerissen.

Die Kontrollgruppe zeigte überwiegend partiell gefüllte und nach zentral ausgerissene Defekte, aber auch komplett gefüllte und nach zentral intakte Defekte (n=6).

Zusammenfassend zeigte sich in der Kontrollgruppe nach 12 Wochen eine der behandelten Gruppe leicht überlegene Defektfüllung sowie Stabilität. Insgesamt konnte jedoch auch in der Kontrollgruppe kein suffizientes makroskopisches Reparaturergebnis beobachtet werden. Insgesamt scheint ein Thrombozyten-Matrix-Konstrukt im Falle von Punch-Defekten keine geeignete Therapieoption darzustellen.

Abbildung 3.11: Ansicht des linken Außenmeniskus (Innenmeniskus reseziert). Der Defekt wurde mit einem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt versorgt.

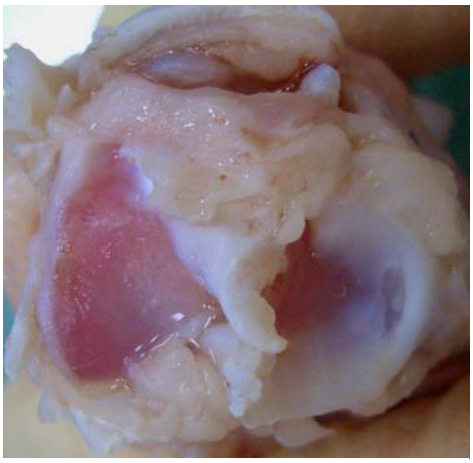

Abbildung 3.12: Ansicht des rechten Außenmeniskus (Innenmeniskus reseziert). Der Defekt wurde mit zellfreier Matrix versorgt (Kontrolle).

3.6.1.2.2 Histologische Auswertung

In der behandelten Gruppe (n=6) kam es in 2 Fällen zu keiner Defektfüllung, weitere 3 waren nur teilweise mit fibrotischem Bindegewebe gefüllt, mit unterschiedlichen Gehalt an Kollagen II und Proteoglykanen. Die Integration war vor allem basisnah partiell vorhanden. Bei einem Meniskus konnte eine insgesamt gute Defektfüllung, die reich an Kollagen II, Proteoglykanen und Reparaturzellen war, gefunden werden. Der

immunhistochemische Nachweis für Kollagen I war in allen Schnitten im Defektbereich sehr gering bis negativ.

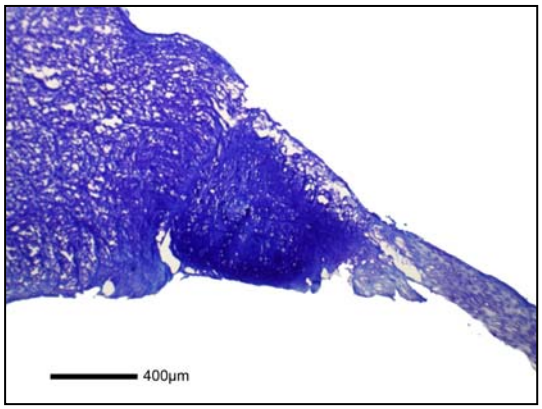

Abbildung 3.13: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (Toluidinblau).

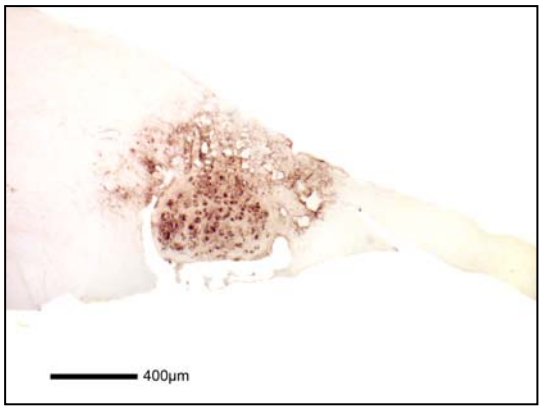

Abbildung 3.14: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

Die histologische Beurteilung der Kontrollgruppe (n=6) zeigte in einem Fall einen nur mit fibrotischem Bindegewebe gefüllten Defekt, der basisnah keine Integration aufwies. Weder Kollagen I noch II konnte in der Defektfüllung detektiert werden. In 3 Fällen war der Defekt mit Proteoglykan-, Kollagen II- und zellreichem Material gefüllt, jedoch jeweils mit fehlender zentraler Integration. In 2 Fällen kam es zu einer insgesamt guten Defektfüllung mit basisnah und zentral guter Integration. Das Gewebe war reich an Kollagen II und Proteoglykanen sowie Reparaturzellen. Kollagen I konnte nicht nachgewiesen werden.

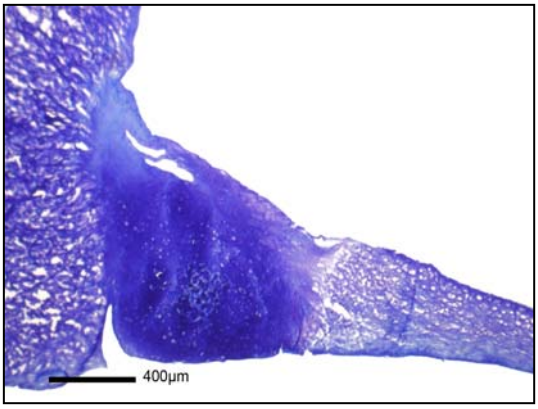

Abbildung 3.15: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (Toluidinblau).

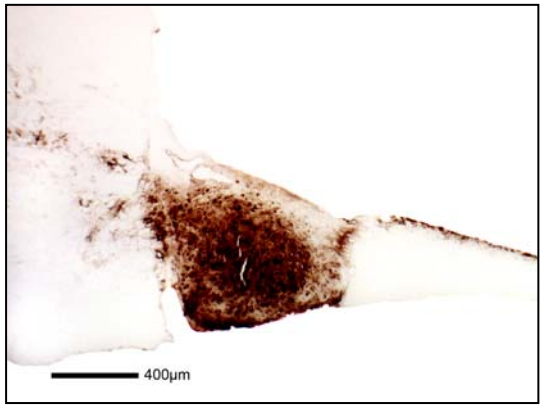

Abbildung 3.16: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

3.6.1.3 Scoring der 6- und 12-Wochengruppe Stanzdefekt

Wie bereits oben erwähnt, wurde für die Auswertung der Reparaturergebnisse ein für diese Art von Studie bereits etablierter Meniskus-Score angewandt. Dieser Score setzt sich aus 8 Einzelwertungen wie Defektfüllung, Oberflächenbeschaffenheit, Integration, Zellzahl, Zellverteilung und –morphologie, Proteoglykan- und Kollagen II-Gehalt und Stabilität zusammen. Die Einzelitems haben einen Wertebereich von jeweils 0 (= schlecht, meniskusuntypisch) bis 3 (=gut, meniskusähnlich). Der Meniskus-Score stellt die Summe der 8 Einzelwertungen dar und kann daher Werte von 0 (=kein Reparaturgewebe) bis 24 (=meniskustypisches Reparaturgewebe) annehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Berechnung aufgrund einer hohen internen Konsistenz (Cronback's alpha = 0,88) statistisch gerechtfertigt ist.

Die Ergebnisse aller Gruppen wurden einer statistischen Auswertung unterzogen. Hierbei erfolgte gemäß dem Versuchsaufbau ein gepaarter t-Test, wobei alle Gruppen jeweils gegen die Gruppe der zellfreien Matrix des gleichen Untersuchungszeitpunktes verglichen wurden, da diese Gruppe jeweils die Kontrollgruppe im kontralateralen Kniegelenk darstellte.

Nach 6 Wochen zeigte die Behandlung des Stanzdefekts (n=6) mit einer thrombozytenbesetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix keinen Vorteil gegenüber der zellfreien Kompositmatrix (n=6). Auch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p>0,05$) zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die mit Thrombozyten behandelte Gruppe erlangte im Durchschnitt ein Scoring-Ergebnis von 9,7, während die Kontrollgruppe einen Wert von 9,8 erlangte.

In der 12-Wochengruppe der Stanzdefekte konnte ebenfalls kein Vorteil der behandelten Gruppe (n=6) gegenüber der Kontrollgruppe (n=6) festgestellt werden – es konnte sogar ein positiver Trend zugunsten der Kontrollgruppe gefunden werden, der jedoch statistisch nicht signifikant war ($p>0,05$). Die behandelte Gruppe erreichte im Scoring einen Mittelwert von 7,8, während die Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 12,3 bewertet wurde.

Die im Diagramm aufgetragenen Fehlerindikatoren entsprechen den Ober- beziehungsweise Untergrenzen der jeweiligen Konfidenzintervalle. An ihren hohen Werten ist, wie auch schon in der Beschreibung der makroskopischen und histologischen

Ergebnisse näher ausgeführt, abzulesen, dass stark variierende Therapieergebnisse zu den gefundenen Mittelwerten des Scorings beigetragen haben.

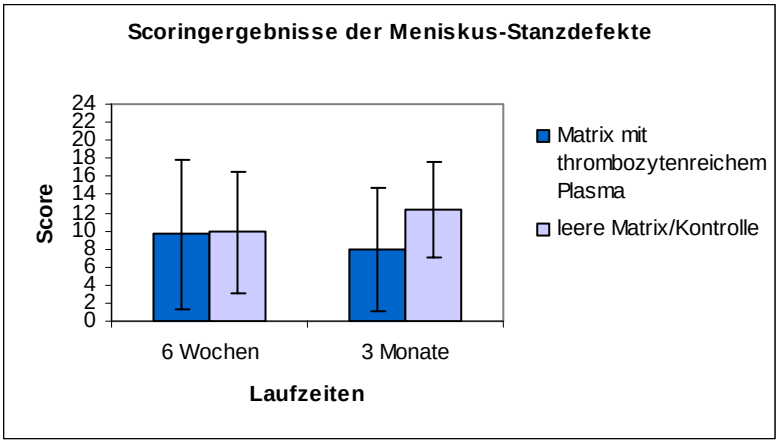

Diagramm 3.12: Statistische Auswertung des Scorings nach 6 Wochen beziehungsweise 3 Monaten Laufzeit.

3.6.2 Rissdefekte

Auch hier wurde wie im oben beschriebenen Stanzdefektmodell ein künstlicher Defekt in Außenmenisken von Neuseelandhasen erzeugt. Abweichend zum Stanzdefekt wurde mit einem Skalpell ein 4mm langer Schnitt gesetzt, der anschließend mit einer quaderförmigen thrombozytenbesetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix und einer Adaptationsnaht versorgt wurde.

Das Rissdefektmodell hat, wie oben bereits angedeutet, den Nachteil gegenüber einem Stanzdefektmodell, dass der künstlich erzeugte Defekt intraoperativ weniger gut zu standardisieren ist und die Morphologie des Defekts von Tier zu Tier in einem gewissen Rahmen Unterschiede aufweist. Dennoch galt dem Rissdefektmodell besonderes Interesse, da es - weit mehr als das Stanzdefektmodell - der klinischen Situation entspricht.

Weiter ist es wichtig zu betonen, dass in diesem Modell bezüglich der Therapierbarkeit der Defekte erhöhte Ansprüche gelten. So befinden sich zwar die Defekträndern in geringerer Distanz zueinander als beim Stanzdefektmodell, jedoch unterliegt ein 4mm langer Riss trotz Adaptationsnaht ständigen Scherkräften, die einer Heilung stark entgegenwirken.

3.6.2.1 Gruppe A: Laufzeit 6 Wochen

3.6.2.1.1 Makroskopische Beurteilung

In der mit Thrombozyten besetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices versorgten Gruppe der Rissdefekte (n=6) konnte makroskopisch in drei Fällen keine Defektfüllung, beziehungsweise in den anderen drei Fällen nur partiell gefüllte Defekte gefunden werden. Dennoch waren alle Defekte als solche noch abgrenzbar und nicht erweitert oder eingerissen.

Im Gegensatz dazu war in der nur mit zellfreier Matrix behandelten Kontrollgruppe (n=6) keiner der Defekte auch nur ansatzweise regeneriert. In drei Fällen war der Defekt nicht mehr abgrenzbar und der Meniskus völlig deformiert und zerrissen. In den übrigen drei Fällen waren die Defekte noch zu erkennen, allerdings in 2 Fällen nach zentral eingerissen.

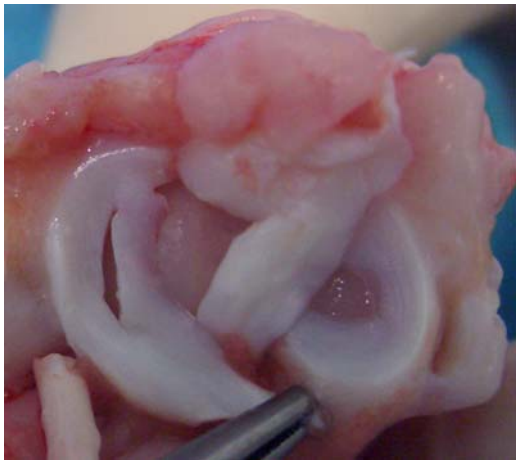

Abbildung 3.17: Ansicht der Menisken des linken Kniegelenks. Der Defekt wurde mit einem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt versorgt.

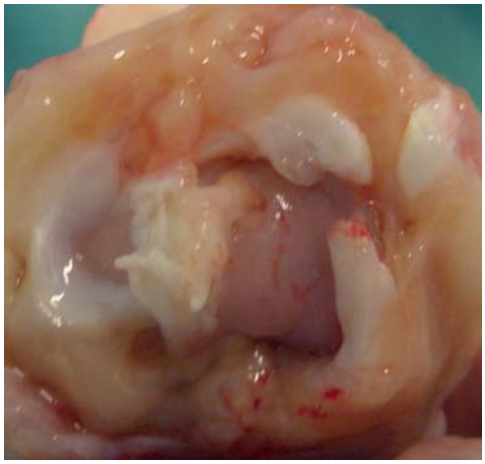

Abbildung 3.18: Ansicht der Menisken des rechten Kniegelenks. Der Defekt des Außenmeniskus wurde mit zellfreier Matrix versorgt (Kontrolle).

3.6.2.1.2 Histologische Beurteilung

Die behandelte Gruppe (n=6) zeigte in der Toluidinblaufärbung in 3 Fällen komplett offene, bis minimal an den Defekträndern proliferiertes, bindegewebiges Reparaturmaterial. In zwei Fällen konnte eine partielle Defektfüllung gefunden werden, die aber ebenfalls bindegewebig-fibrotisch mit negativem Nachweis für Proteoglykane und Kollagen II war. Nur in einem Fall entstand zu Teilen eine Defektfüllung, die leicht positiv für Proteoglykane war und einige Reparaturzellen detektiert werden konnten und sowohl

basisnahe wie zentrale Integration des Reparaturgewebes zeigte. Der immunhistochemische Nachweis für Kollagen I war in allen Präparaten im Defektbereich negativ.

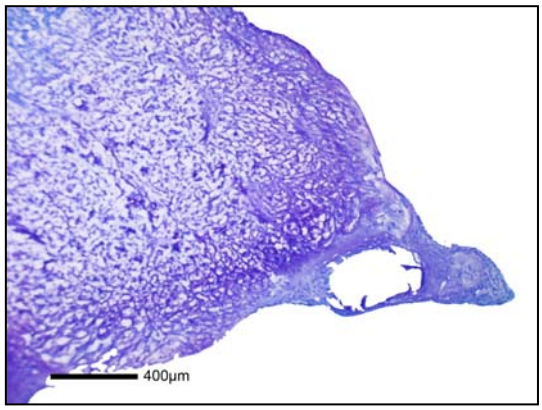

Abbildung 3.19: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (Toluidinblau).

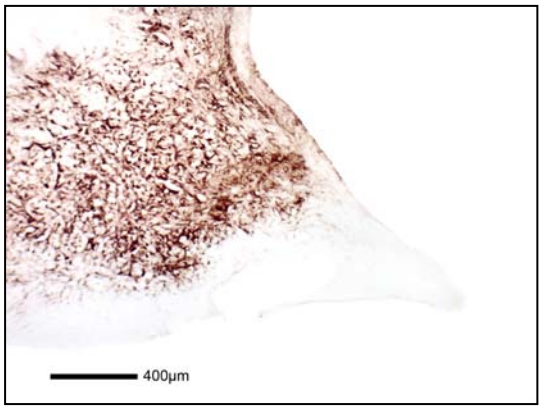

Abbildung 20: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

Auch wenn in der behandelten Gruppe eine wenig zufrieden stellende Heilungstendenz festzustellen war, so stand dies dennoch im starken Kontrast zur Kontrollgruppe (n=6). Hier konnte bis auf einen Fall, in dem partiell fibrotisches Bindegewebe ohne basisnahe Integration in den Defektbereich eingewachsen war, kein Ansatz zur Regeneration im Defektbereich gefunden werden.

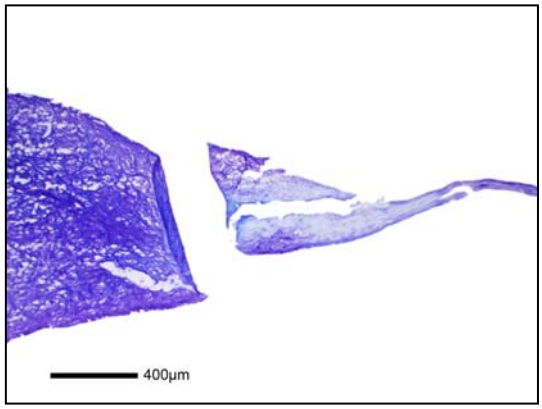

Abbildung 3.21: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (Toluidinblau).

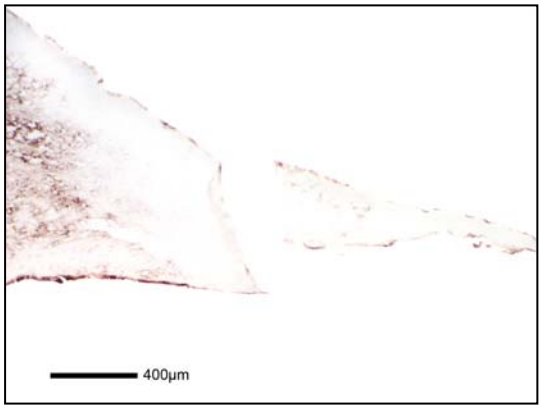

Abbildung 3.22: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

3.6.2.2 Gruppe B: Laufzeit 12 Wochen

3.6.2.2.1 Makroskopische Beurteilung

Nach 12 Wochen Laufzeit war in der behandelten Gruppe (n=6) bei 3 Tieren keine Füllung des Defekts zu sehen. Diese waren allerdings alle noch abgrenzbar und nicht erweitert beziehungsweise nach zentral eingerissen. In zwei Fällen konnte ein partieller Verschluss des Defekts beobachtet werden. In einem Fall war makroskopisch kein Defekt mehr sichtbar, da er augenscheinlich mit Reparaturgewebe gefüllt war.

In der Kontrollgruppe (n=6) bot sich ein ähnliches Bild wie in der Kontrollgruppe der 6-Wochengruppe: bis auf einen partiell gefüllten Defekt waren alle anderen entweder offen, beziehungsweise sogar ausgerissen.

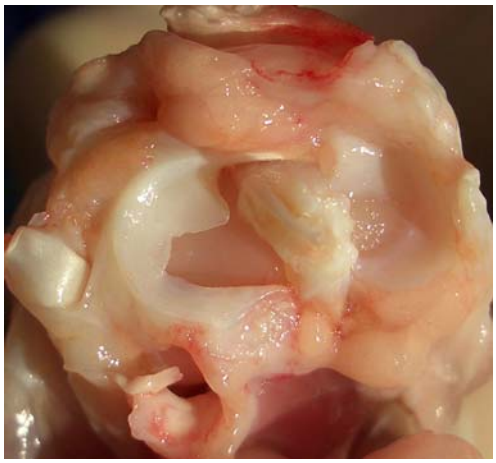

Abbildung 3.23: Ansicht der Menisken des linken Kniegelenks. Der Defekt wurde mit einem Thrombozyten-Matrix-Konstrukt versorgt.

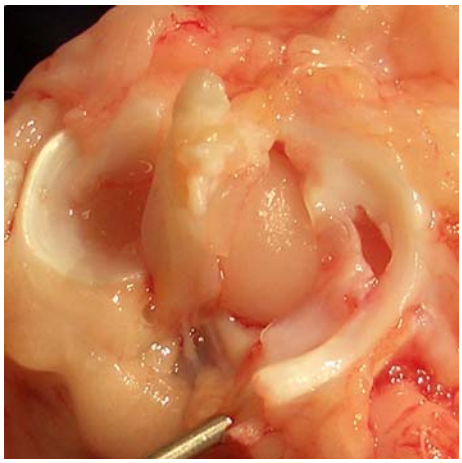

Abbildung 3.24: Ansicht der Menisken des rechten Kniegelenks. Der Defekt des Außenmeniskus wurde mit zellfreier Matrix versorgt (Kontrolle).

3.6.2.2.2 Histologische Beurteilung

Neben 3 Defekten in der behandelten Gruppe (n=6), die keinerlei Reparaturgewebeeinsprossung zeigten, konnte in 2 Fällen zumindest an den Defekträndern eine Proliferation von in der Toluidinblaufärbung metachromatisch erscheinendem Gewebe gefunden werden. Der Nachweis für Kollagen II war in beiden Fällen positiv. In einem Fall konnte sogar eine suffiziente Regeneration des Defektbereichs beobachtet werden, in dem Kollagen II nachgewiesen werden konnte. Kollagen I konnte in keinem Präparat im Defektbereich vermehrt gefunden werden.

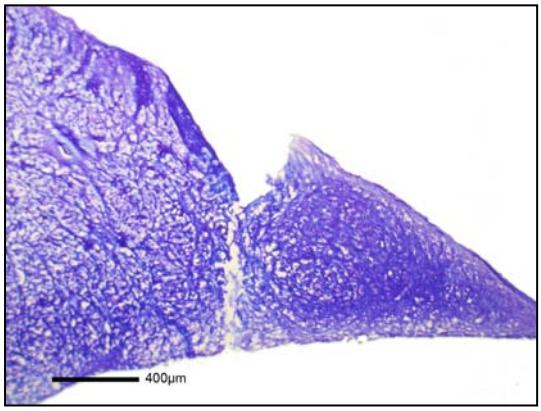

Abbildung 3.25: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (Toluidinblau).

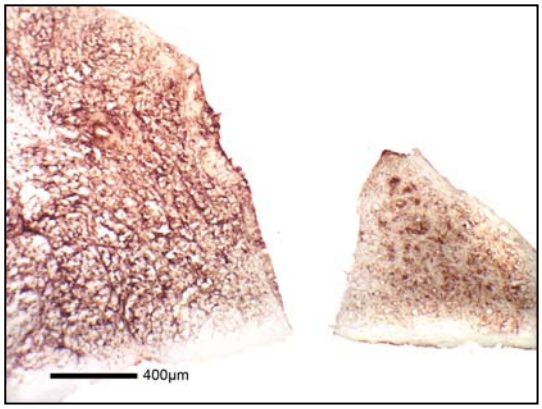

Abbildung 3.26: Gefrierschnitthistologie eines behandelten Außenmeniskus (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

Die Kontrollgruppe (n=6) verhielt sich wieder analog zur Kontrollgruppe der 6-Wochengruppe: bis auf einen Fall, bei dem basisnah nicht integriertes, fibrotisches Bindegewebe entstanden war, waren alle anderen Defekte gänzlich ohne Regeneratgewebe.

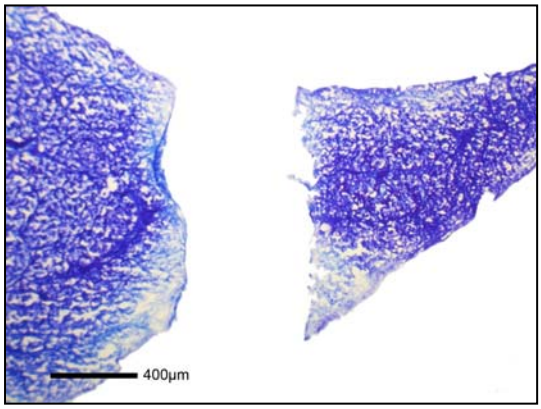

Abbildung 3.27: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (Toluidinblau).

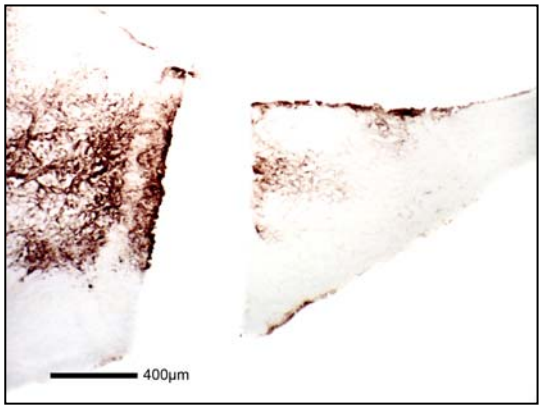

Abbildung 3.28: Gefrierschnitthistologie eines Außenmeniskus der Kontrollgruppe (immunhistochemische Färbung für Kollagen II).

3.6.2.3 Scoring der 6- und 12-Wochengruppe Rissdefekt

Die behandelte Gruppe (n=6) erlangte nach 6 Wochen Laufzeit beim Scoring einen Mittelwert von 5,3 und die der Kontrolle einen Wert von 0,2. Im gepaarten t-Test erreichte die behandelte Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant besseres Ergebnis ($p<0,05$). Insgesamt konnte aber auch in der behandelten Gruppe im Mittel keine

Regeneration des Defektbereichs gefunden werden, die eine suffiziente Defektheilung darstellen würde.

Nach 12 Wochen konnte der signifikante Unterschied zwischen behandelter und Kontrollgruppe nicht mehr bestätigt werden (p>0,05), jedoch blieb ein Trend zu Gunsten der behandelten Gruppe mit 5,3 Punkten im Scoring im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0,8 Punkten bestehen. Wie nach 6 Wochen Laufzeit konnte auch hier keine ausreichende Defektheilung beobachtet werden.

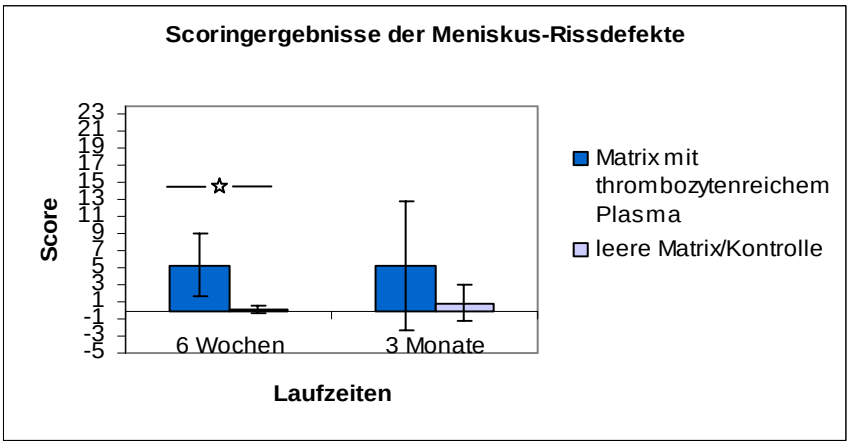

Diagramm 3.13: Statistische Auswertung des Scorings nach 6 Wochen beziehungsweise 3 Monaten Laufzeit.

3.6.3 Beurteilung der Gelenkflächen

Die femoralen und tibialen Gelenkflächen der entnommenen Kniegelenke wurden alle makroskopisch bezüglich degenerativer Veränderung beurteilt. Sowohl in der Gruppe der Stanzdefekte als auch in der Gruppe der Rissdefekte konnten weder nach 6 noch nach 12 Wochen Gelenkknorpelläsionen oder Anzeichen von Chondropathie gefunden werden. Ebenso konnte keine Osteophytenbildung beobachtet werden. Die Entwicklung einer Gonarthrose bedingt durch den operativen Eingriff konnte somit ausgeschlossen werden.

4 DISKUSSION

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass eine Regeneration von Meniskusläsionen mit Hilfe von mesenchymalen Stammzellen möglich ist. Die aus der vorgelegten Arbeit gewonnen Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass die Heilungspotenz der mesenchymalen Stammzellen nicht überwiegend durch deren Produktion von Wachstumsfaktoren zu erklären ist, sondern dabei vielmehr die Komponente Zelle eine wesentliche Rolle spielt.

Weiter konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, auch aus geringen Mengen an Vollblut ausreichend und zudem vitale Thrombozyten als endogene Quelle für Wachstumsfaktoren zu isolieren. Mit diesen kann man effektiv Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices besetzen. Zudem konnte gezeigt werden, dass im Verlauf mehrerer Tage die Wachstumsfaktoren TGF-ß1 und PDGF-AB in größeren Mengen aus diesen Zell-Matrix-Konstrukten freigesetzt wurden.

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen für Meniskusläsionen im Bereich des Tissue Engineering bietet sich ein genauerer Blick auf die natürlich ablaufenden Reparaturmechanismen an, wie sie nach erfolgtem Trauma zu finden sind. Daraus könnten sich neue Ansatzpunkte hinsichtlich einer Imitation beziehungsweise Förderung der im Gelenk ablaufenden Vorgänge ergeben, was wiederum eine Verbesserung der Therapieoptionen zur Folge haben könnte. Von besonderem Interesse sind dabei Bereiche im Meniskus, die kaum Heilungstendenz zeigen, um sie durch Förderung des endogenen Reparaturpotentials möglicherweise suffizient zu therapieren. Als besonders schwierig und therapierefraktär gilt dabei der avaskuläre Bereich des Meniskus.

Arnoczky und Mitarbeiter konnten in Untersuchungen zeigen, dass im Rahmen des natürlichen Heilungsprozesses durch die Migration von Fibroblasten aus Synovia und Gelenkkapsel in den beschädigten Meniskus, deren dortige Proliferation und Differenzierung manche Läsionen im Meniskus regenerieren können. Dabei entstand nach einer Phase des Remodelings ein Gewebe, das annähernd den Eigenschaften des nativen Meniskusgewebes entsprach[15]. Webber und Mitarbeiter konnten in in-vitro Untersuchungen zeigen, dass Fibrochondrozyten aus einem Kaninchenmeniskus auswandern können, um einen Fibrin-Clot zu besiedeln[141], der reich an Wachstumsfaktoren ist[19]. Ebenso gelang es Bhargava und Mitarbeitern, mit einzelnen Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor oder hepatocyte growth factor in bovinen Meniskuszellen

eine Migration sowie Hochregulierung der DNA-Synthese zu stimulieren[25]. Die angeführten und viele weitere in der Literatur beschriebenen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Möglichkeit besteht, in natürlich ablaufende Reparaturvorgänge steuernd einzugreifen und sie möglicherweise zu verstärken, um eine bessere Heilung im Bereich des Meniskus zu erzielen.

Einen weiteren wesentlichen Faktor bei der Regeneration von verbrauchtem und beschädigtem Gewebe stellen mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark dar. Sie sind in der Lage, in Phänotypen wie beispielsweise Knorpel-, Knochen-, Sehnen- oder Fettgewebe zu differenzieren und derartige Gewebetypen bei Bedarf zu regenerieren[103]. Ansätze, in denen aufgrund dieser Erkenntnisse versucht wurde, Meniskusgewebe zu regenerieren, sind vielversprechend. Agung und Mitarbeiter konnten zeigen, dass green fluorescent protein (GFP) markierte mesenchymale Stammzellen, die in Kniegelenke von Ratten injiziert wurden, sich in Meniskusdefekten ansiedelten und dort extrazelluläre Matrix produzierten[4]. Einschränkend ist jedoch zu bemerken, dass dies nur bei einer hohen Menge an injizierten Stammzellen beobachtet wurde, bei der als Nebenwirkung zusätzlich zur Defektregeneration freies Narbengewebe im Kniegelenk entstand[4]. Die Funktion der mesenchymalen Stammzellen als Reparaturzelle im Meniskus und deren Produktion von extrazellulärer Matrix konnte auch in weiteren Untersuchungen gezeigt werden[63,149]. Dass jedoch das Gesamtergebnis der beobachteten Reparaturvorgänge allein durch die nachgewiesenen markierten mesenchymalen Stammzellen in ihrer Funktion als Reparaturzellen bewirkt wurde, wird wiederum durch andere Autoren in Frage gestellt[33]. Eine mögliche Erklärung liefern Untersuchungen, die zeigen, dass mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, unterschiedlichste Zytokine und Wachstumsfaktoren abhängig von ihrer Umgebung zu sezernieren und damit benachbarte Zellen parakrin, wie auch sich selbst autokrin zu beeinflussen[57]. In Untersuchungen an Ratten, denen nach künstlich erzeugter cerebraler Ischämie systemisch oder direkt in das ZNS mesenchymale Stammzellen injiziert wurden, konnte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine signifikant bessere Wiederherstellung der Koordinationsfunktion gezeigt werden. In den mit mesenchymalen Stammzellen behandelten Gruppen zeigte sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine Reduzierung von Narbenbildung und Apoptose, eine vermehrte Angiogenese und eine Stimulation der intrinsischen Zellen zur Wiederherstellung der Neuronenbahnen. Dabei konnte eine Differenzierung der markierten mesenchymalen Stammzellen in neuronales Gewebe jedoch nicht beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die positiven Effekte der mesenchymalen Stammzellen über Mediatorsubstanzen

induziert wurden[36,57]. Untersuchungen, in denen mesenchymale Stammzellen in ischämisches Myokard von Ratten implantiert wurden, ergaben eine erhöhte Produktion von vascular endothelial growth factor (VEGF), eine erhöhte Gefäßdichte und Blutfluss im Defektareal, sowie eine verringerte Apoptoserate, was auf die Sezernierung bioaktiver Moleküle der mesenchymalen Stammzellen zurückgeführt wurde[128].

Die geschilderten Untersuchungsergebnisse sollen zeigen, dass mesenchymale Stammzellen zum einen als Ersatzzellen bei Reparaturvorgängen dienen können, aber auch allein durch Sezernierung bioaktiver Substanzen das endogene Reparaturpotenzial des geschädigten Gewebes positiv beeinflussen.

Wie in der Einleitung bereits näher beschrieben, konnten in Untersuchungen der eigenen Abteilung unter Einsatz mesenchymaler Stammzellen in Kombination mit einer Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix sowohl kombiniert vaskulär-avaskuläre Defekte[8], wie auch rein avaskuläre Defekte erfolgreich im Kaninchenmeniskus therapiert werden[150]. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die eingesetzten mesenchymalen Stammzellen an der Reparatur unter anderem durch Produktion extrazellulärer Matrix wesentlich beteiligt sind[63,149], ist es, wie oben bereits erwähnt, eher unwahrscheinlich, dass nur die Funktion der mesenchymalen Stammzellen allein als Reparaturzelle zur erfolgreichen Therapie beiträgt. Es ist anzunehmen, dass die von den mesenchymalen Stammzellen sezernierten bioaktiven Substanzen einen nicht unwesentlichen Anteil dazu beitragen. Nicht zuletzt um die Rolle dieser Zellen bei der Meniskusregeneration besser verstehen zu können, beziehungsweise die Wirkungsweise besser eingrenzen zu können, wurde die vorliegende Studie durchgeführt. Dabei stellte sich die zentrale Frage, ob es möglich wäre, allein mit bioaktiven Substanzen in Kombination mit der in den vorigen Versuchen erfolgreich eingesetzten Kompositmatrix eine Reparatur von avaskulären Meniskusdefekten zu erreichen. Neben einem besseren Verständnis der Wirkungsweise der mesenchymalen Stammzellen wäre es auch hinsichtlich des Kostenaufwands im klinischen Alltag von Vorteil, wenn man auf die Komponente Stammzelle verzichten könnte. In der vorliegenden Studie wurde auf das in der eigenen Abteilung bereits etablierte in-vivo Modell am New Zealand White Rabbit zurückgegriffen, um optimale Vergleichsbedingungen zu haben und damit aussagekräftige Schlüsse ziehen zu können.

Schwierigkeiten bereitet dabei jedoch die Wahl der einzusetzenden Wachstumsfaktoren, da bislang nicht geklärt ist, welche speziellen Wachstumsfaktoren von mesenchymalen Stammzellen in der Umgebung von Meniskusgewebe sezerniert werden. Klar ist jedoch,

dass die Menge und Art der sezernierten Wachstumsfaktoren abhängig vom umgebenden Milieu ist. Dies konnte in Analysen der von mesenchymalen Stammzellen sezernierten Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit von unterschiedlichen Medienzusätzen nachgewiesen werden[57]. Eine Möglichkeit wäre, wie schon vielfach von anderen Forschergruppen durchgeführt, einzelne, in Art und Menge definierte Wachstumsfaktoren zu applizieren. Der Vorteil läge darin, positive wie negative Heilungsergebnisse direkt mit den einzelnen untersuchten Faktoren in Verbindung bringen zu können und deren Wirkungsweise gerade im Meniskusgewebe besser eingrenzen zu können. Jedoch gibt es eine Großzahl an Wachstumsfaktoren, die zur Auswahl stehen. Auch vermag die Auswahl einiger weniger Faktoren nicht die gewünschten Erkenntnisse über die Wirkungsweise der mesenchymalen Stammzellen zu vermitteln, da es, wie schon erwähnt, völlig unklar ist, welche sie in der Umgebung von Meniskusgewebe sezernieren und welche zur Heilung von Läsionen beitragen. Klar ist auch, dass sich die Wirkungsweise der einzelnen Wachstumsfaktoren in-vivo gegenseitig beeinflussen. Eine natürliche Quelle für eine effektive Mischung bioaktiver Substanzen zur Heilung von Gewebsdefekten sind Thrombozyten[13]. Zudem zeigen deren sezernierte Substanzen Parallelen zu der Wirkungsweise der von mesenchymalen Stammzellen sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokine, da sie Faktoren freisetzen, die in Zellen unter anderem Chemotaxis, Proliferation, Differenzierung, Interaktion mit anderen Zellen und damit eine Regeneration von defektem Gewebe bewirken[13].

Durch die Zugabe von Thrombozytenkonzentraten konnte eine Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen und Fibroblasten, sowie Produktion von Kollagen Typ I in-vitro beobachtet werden[58,80]. Wie in der Einleitung schon erwähnt, konnte in verschiedenen Studien eine verbesserte Heilung von Knochen- und Weichteildefekten unter Verwendung von Thrombozyten-angereichertem Plasma (PRP) erzielt werden. So konnte bei der Verwendung von Knochentransplantaten in Verbindung mit PRP im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eine schnellere Epithelialisierung, eine dichtere und reifere Knochenstruktur mit besser organisierten Trabekeln und einer verbesserte Knochenregeneration gezeigt werden[12,67,85,113]. Auch die Behandlung chronischer, nicht heilender Dekubitus-Ulzera konnte durch den Einsatz von PRP verbessert werden[71].

In Zusammenschau der geschilderten Datenlage schien es somit sinnvoll zu erproben, ob eine Kombination von Wachstumsfaktoren aus PRP mit einer bereits erfolgreich

eingesetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix zum Heilungserfolg avaskulärer Meniskusdefekte führt.

Will man Thrombozyten verwenden, um sich deren bioaktive Substanzen zu Nutze zu machen, sind einige technische Details bei der Zellisolation zu beachten. Zunächst erscheint es einleuchtend, dass es von Vorteil ist, möglichst viele Thrombozyten aus dem zur Verfügung stehenden Vollblut zu isolieren, um konsekutiv eine größere Menge an Wachstumsfaktoren zu erhalten. Untersuchungen dazu zeigten jedoch, dass es nur eingeschränkt möglich ist, von der ermittelten Thrombozytenzahl auf eine zu erwartende Wachstumsfaktorenkonzentration zu schließen, da interindividuelle Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsfaktorengehalts von Thrombozyten bestehen[46]. Dennoch zeigte sich in Untersuchungen von Haynesworth und Mitarbeitern, dass die Proliferation von adulten mesenchymalen Stammzellen direkt proportional zu der zugegebenen Menge an Thrombozyten in-vitro war[58]. Auch Marx beschreibt eine Mindestkonzentration für therapeutische Effekte von Thrombozytenkonzentraten von 1 Million/µl[84]. In der vorliegenden Arbeit gelang es am Beispiel von 4 Probanden, bei der Präparation von PRP eine Konzentrierung im Schnitt von 24,7 Millionen Zellen/µl zu erreichen, legt man ein im Durchschnitt ermitteltes Volumen der Zellpellets von 50µl zugrunde. Da die in der vorliegenden Studie zu versorgenden Defekte sehr klein waren und nur eine geringe Menge an PRP benötigt wurde, konnten die Thrombozytenpellets auf ein geringes Volumen sehr stark konzentriert werden.

Mit dem verwendeten Protokoll wurden bei einer exemplarischen Zellzählung im Schnitt 70% der im Vollblut enthaltenen Thrombozyten isoliert. Die Forschungsgruppe, die diese Methode als erste und einzige beschrieb, erzielte eine Ausbeute im Schnitt von 77%[122]. Der Unterschied zu der vorliegenden Arbeit ist möglicherweise auf die kleine Anzahl der Proben (n=4) sowie mögliche Abweichungen bei der praktischen Durchführung des Protokolls zurückzuführen. Kommerziell erhältliche Automaten für die Thrombozytenisolation erlauben Ausbeuten je nach Modell zwischen 30% und 80%[102]. Eine Ökonomisierung der Isolierung von Thrombozyten darf jedoch nicht auf Kosten der Zellintegrität realisiert werden. Intakte Zellen sind unter anderem deshalb von besonderem Interesse, da einige der in den alpha-Granula der Thrombozyten gespeicherten Wachstumsfaktoren erst während des Sekretionsvorgangs durch die Thrombozytenmembran in eine aktive Form überführt werden. Beschädigte, beziehungsweise avitale Thrombozyten können diese Modulation nicht vollziehen[84].

Zusätzlich sind vitale Thrombozyten in der Lage, über einen Zeitraum von 7 Tagen aktiv Wachstumsfaktoren zu produzieren und anschließend zu sezernieren[84]. Auch eine frühzeitige Aktivierung der Thrombozyten aufgrund der Aufreinigungsschritte ist möglichst gering zu halten, da es dabei zur Degranulation der alpha-Granula mit folgender Sezernierung der Wachstumsfaktoren in das umgebende Plasma kommt und diese damit nicht zur Defektregeneration zur Verfügung stehen würden[46], da nur die Zellfraktion isoliert und verwendet wurde. Bei der Analyse der Plasmaüberstände in der vorliegenden Studie konnten nur Spuren von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden, was somit gegen eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten spricht. Anzeichen für eine isolationsbedingte Aktivierung wie Pseudopodienbildung oder Verklumpung[35] konnten unter mikroskopischer Kontrolle nicht gefunden werden. Exemplarisch wurde mittels eines LIVE/DEAD-Kits die Vitalität eines Isolationspräparates nachgewiesen, bei der 94% der Zellen unmittelbar nach Isolation als vital eingestuft wurden. Eine detaillierte Untersuchung der Thrombozyten, die mit dem in der Studie verwandten Protokoll isoliert wurden, ist bislang nicht beschrieben. Um einer vorzeitigen Aktivierung möglichst vorzubeugen, wurde das Blut mit Citratröhrchen abgenommen und zusätzlich mit dem Antikoagulans ACD-A versetzt, wie es in der Literatur empfohlen wird [53,83].

Bei der Methode der Zellisolierung gilt es weiter zu berücksichtigen, ob neben Thrombozyten auch andere Zellen wie Leukozyten mitüberführt werden, da bekannt ist, dass auch sie in der Lage sind, Wachstumsfaktoren freizusetzen[74] und sie damit in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssten. Die Ergebnisse der Zellzählung und Typisierung anhand von 4 Probanden konnten jedoch zeigen, dass zu 99,88% Thrombozyten isoliert wurden, sodass die Verunreinigung mit anderen Zellen vernachlässigt werden kann.

Wie oben näher ausgeführt, kann eine vorzeitige Aktivierung oder Avitalität der Thrombozyten durch unsachgemäße Isolation zum Verlust von Wachstumsfaktoren führen. Marx sieht darin einen wesentlichen Faktor für das Scheitern von Studien, in denen keine verbesserte Heilung durch den Einsatz von PRP gezeigt werden konnte[84]. Um diesen möglichen Methodenfehler auszuschließen, wurde in der vorliegenden Studie die Freisetzungskinetik von Wachstumsfaktoren aus einem Zell-Matrix-Konstrukt, wie es später im in-vivo Versuch zum Einsatz kam, untersucht. Anitua und Mitarbeiter haben in einer Übersichtsarbeit die bislang gefundenen und untersuchten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden,

zusammengefasst[13]. Beispiele der nahezu unzähligen bioaktiven Substanzen sind der platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF-ß), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived epidermal growth factor (PDEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) und der insulin-like growth factor-1 (IGF-1), wovon die meisten zusätzlich in unterschiedlichen Isoformen vorkommen. Dabei gilt es als gesichert, dass durch weitere Untersuchungen zusätzliche bioaktive Moleküle gefunden werden[13]. So konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, dass Thrombozyten auch bone-morphogenetic proteins (BMPs) enthalten[121], wobei lange Zeit vom Gegenteil ausgegangen wurde[84,131].

In der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel einiger ausgewählter Wachstumsfaktoren gezeigt werden, dass sie - und damit sehr wahrscheinlich auch andere - aus Thrombozyten freigesetzt werden. Es ist einleuchtend, die Auswahl der zu untersuchenden Wachstumsfaktoren danach zu richten, ob sie in der Literatur besonders im Hinblick auf Meniskusregeneration schon untersucht wurden, seien es positive wie auch negative Effekte. Wie in der Einleitung beschrieben, konnte unter anderem für PDGF, TGF-ß und VEGF eine Beeinflussung der Zellkomponenten und der extrazellulären Matrix von Meniskusgewebe gezeigt werden. Deren Freisetzungskinetik aus einer mit Thrombozyten besetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix wurde in der vorliegenden Studie mit Hilfe der ELISA Technik näher untersucht.

Damit sollte zunächst nachgewiesen werden, ob nach dem Aufbereitungsprozess der Zellen Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Wie im späteren in-vivo Modell, bei dem die Thrombozyten in Verbindung mit einer Trägermatrix eingesetzt wurden, wurde auch hier ein Zell-Matrix-Konstrukt untersucht. Dabei stellte sich jedoch die entscheidende Frage, welches Medium eingesetzt werden sollte. Idealerweise wäre dies autologe Synovialflüssigkeit gewesen, da das Zell-Matrix Konstrukt innerhalb des Kniegelenks im in-vivo Modell von dieser umgeben ist. Diese ist jedoch schwierig zu gewinnen. Deshalb galt es, ein möglichst der Synovia ähnliches Medium zu wählen. Die Synovia ist sowohl Dialysat des Blutplasmas als auch Sekretionsprodukt der Synoviozyten. Sie enthält vor allem Proteine, Hyaluronsäure, Glukose und Wasser[144]. Somit kamen als einfach und in ausreichender Menge zu erhaltende Kulturmedien entweder autologes Blutserum oder autologes Blutplasma in Frage. Serum hat den Vorteil, dass es aus geronnenem Vollblut ohne künstliche Zusätze gewonnen wird. Deshalb wurde es in einem Vorversuch in der vorliegenden Studie ausgetestet. Die Messungen zeigten jedoch, dass trotz

Hitzeinaktivierung ein hoher Gehalt an Wachstumsfaktoren im Serum vorhanden war, der, trotz gleicher Aufbereitung, von Probe zu Probe stark variierte. Letztlich liegt eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen darin, dass durch den Gerinnungsprozess Thrombozyten aktiviert werden und diese Wachstumsfaktoren in das Serum freisetzen. Schwankungen sind dabei vorprogrammiert, da das Ausmaß der Gerinnung und die Aktivierung der Thrombozyten kaum steuerbar sind. Zudem scheint die Hitzeinaktivierung zur Reduzierung der Wachstumsfaktoren nicht ausreichend gewesen zu sein.

Bei der Austestung von Plasma als mögliches Medium konnten nahezu keine Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf von 8 Tagen gefunden werden. Plasma wird aus Vollblut gewonnen, das meist durch die Zugabe von Citrat ungerinnbar gemacht wurde. Damit wird unter anderem die Aktivierung von Thrombozyten und somit die Freisetzung von Wachstumsfaktoren verhindert[53,83]. Die anfänglichen Bedenken, die Thrombozyten könnten bei der Verwendung von Plasma als Medium auf Dauer nicht aktiviert werden und somit keine Wachstumsfaktoren freisetzen, konnte durch einen Vorversuch ausgeräumt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass im Verlauf von 8 Tagen die Wachstumsfaktoren PDGF-AB und TGF-ß1 freigesetzt wurden. Untersuchungen, in denen die Freisetzung von bioaktiven Molekülen (Regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted (=RANTES), ß-thromboglobulin, platelet factor 4, interleukin-7) aus Thrombozytenkonzentraten untersucht wurden, in denen die Thrombozyten in Plasma aufbewahrt waren, kamen auch zu dem Ergebnis, dass im Verlauf von 7 Tagen diese Stoffe freigesetzt wurden. Diese werden, wie PDGF, TGF-ß und VEGF, in den alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert[55]. Die gesamten in-vitro Untersuchungen der Wachstumsfaktoren wurden aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse mit Plasma als Medium durchgeführt.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der in-vitro Wachstumsfaktorenanalysen von PDGF-AB, TGF-ß1 und VEGF diskutiert werden. Quantitativ wurde am meisten TGF-ß1 gemessen. Um etwa ein Drittel weniger wurde PDGF-AB gefunden. VEGF konnte im Vergleich zu den anderen Wachstumsfaktoren nur in Spuren detektiert werden.

PDGF-AB wurde aus den Thrombozyten-Matrix-Konstrukten über einen Zeitraum von 192h freigesetzt, mit einer maximalen Konzentration nach 192h. Dass die Quelle von PDGF-AB die Thrombozyten waren, kann man deshalb feststellen, da in Leerwertkontrollen von Matrix mit Medium ohne Zellen um den Faktor 23 weniger PDGF-AB gefunden wurde. Leitner und Mitarbeiter untersuchten 4 auf unterschiedliche Weise

hergestellte Thrombozytenisolationen hinsichtlich der Freisetzung von PDGF-AB innerhalb 120h. Sie fanden unabhängig von der Art der Zellisolierung eine kontinuierliche Freisetzung von PDGF-AB. In 3 von 4 Präparationen zeigte sich die stärkste PDGF-AB Freisetzung zwischen den Messpunkten 6h und 72h, während in der vorliegenden Studie erst nach 24h eine deutlicher Anstieg von PDGF-AB gefunden wurde. Welche Antikoagulantien in dieser Studie von Leitner und Mitarbeiter eingesetzt wurden, ist nicht beschreiben. Dies und die Tatsache, dass keine Matrix eingesetzt wurde[76], sind mögliche Erklärungsmöglichkeiten für die unterschiedliche Freisetzungskinetik. Weiter konnten sie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass durch die Aufreinigung der Thrombozyten diese aktiviert, beziehungsweise beschädigt wurden[76], was, wie oben näher ausgeführt, zu einer Sezernierung von Wachstumsfaktoren führt.

In vielen Untersuchungen von PDGF bezüglich Wundheilung konnte nachgewiesen werden, dass PDGF eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten, Neutrophile, Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen und glatte Muskelzellen hat. PDGF ist in alle drei Phasen der Wundheilung wie Angiogenese, Bildung von fibrösem Gewebe und Reepithelialisierung involviert[61]. Wie oben angedeutet, gelang es Bhargava und Mitarbeitern in bovinen Meniskuszellen sowohl aus der peripheren als auch der zentralen Zone eine Hochregulierung der DNA-Synthese von bis zu 200%, sowie eine gesteigerte Migration von bis zu 300% unter Zugabe von PDGF-AB in-vitro zu erreichen. Dabei konnten Effekte bei Konzentrationen von eingesetztem PDGF-AB gezeigt werden, wie sie auch in etwa in der vorliegenden Studie gemessen wurden[25]. Untersuchungen von Spindler und Mitarbeitern zeigten jedoch, dass, im Gegensatz zur peripheren Region von Schafsmenisken, zentral gelegene Zellen des Meniskus nicht durch Zugabe von humanem, rekombinanten PDGF-AB im in-vitro Modell stimuliert werden können[123].

Wie für PDGF-AB konnte auch für TGF-ß1 im in-vitro Versuch eine Freisetzung aus den Thrombozyten-Matrix-Konstrukten über 192h gemessen werden. Bei drei von 4 Proben zeigte sich eine maximale Konzentration nach 192h, bei einer schon nach 48h. Das Verhältnis an gemessenem TGF-ß1 von Positiv-Proben zu den Leerwerten war um den Faktor 20 höher, was dafür spricht, dass TGF-ß1 aus Thrombozyten freigesetzt wurde.

Cardigan und Mitarbeiter untersuchten die spontane Freisetzung unter anderem von TGF-ß1 in Thrombozytenkonzentraten im zeitlichen Verlauf von 1d, 5d und 7d. Diese waren – wie in der vorliegenden Studie - mit ACD-A versetztem Plasma als Aufbewahrungsmedium hergestellt. Sie fanden dabei einen kontinuierlichen Anstieg von

TGF-ß1 im Plasma im Verlauf der 7 Tage, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmt[34].

Dass TGF-ß bei der natürlichen Defektregeneration im Meniskus eine Rolle spielen könnte, zeigten Ochi und Mitarbeiter im Kaninchenmodell, in dem sie eine verbesserte Heilung von Meniskusdefekten im avaskulären Bereich durch Anraspeln der Meniskusoberfläche erzielten und dabei immunhistochemisch unter anderem TGF-ß1 signifikant höher exprimiert fanden als in der Kontrollgruppe. Dies konnte auch für PDGF gezeigt werden[98]. Weiter zeigte ein in-vitro Modell von Johnstone, dass TGF-ß1 wesentlich die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen (Kaninchen) positiv beeinflussen kann[65]. Auch im embryonalen Knorpel ist TGF-ß nachzuweisen und scheint dort eine entscheidende Rolle im Laufe der Differenzierung zu spielen[32]. In-vitro konnten bei der Untersuchung der Effekte von PDGF-AB, TGF-ß1, insulin-like growth factor type I und basic fibroblastic growth factor auf Fibrochondrozyten von Kaninchen bezüglich Kollagen- und Glykosaminoglykanproduktion für TGF-ß1 die größten Effekte gezeigt werden[99]. Die gleiche Forschergruppe untersuchte in einem erweiterten Experiment die Effekte der eben genannten Wachstumsfaktoren auf Fibrochondrozyten von Kaninchen, die in eine dreidimensionale Poly-glykolsäurematrix injiziert wurden. Wieder konnte der größte Effekt bezüglich Kollagen- und Glykosaminoglykanproduktion unter Zugabe von TGF-ß1 gesehen werden[100]. Die gemessenen TGF-ß1 Konzentrationen in der vorliegenden Studie sind dabei vergleichbar zu den eingesetzten Konzentrationen in den eben beschriebenen Studien.

Der letzte untersuchte Wachstumsfaktor war der vascular endothelial growth factor (VEGF). Er konnte - im Vergleich zu den anderen Faktoren - durchgängig nur in Spuren nachgewiesen werden, wobei der Gehalt an VEGF im reinen Plasma (Leerwertkontrollen) teilweise höher war als in den Positiv-Proben mit Thrombozyten. Zu beachten ist dabei jedoch die geringe Probenzahl sowie ein hohe Standardabweichung. Das bei allen Untersuchungen verwendete Medium (Plasma) fiel als Nebenprodukt bei der Herstellung der Thrombozytenkonzentrate an. Eine mögliche Erklärung für die gefundenen Werte in den Leerwertkontrollen (Plasma + Matrix) und Positiv-Proben (Plasma + Matrix + Thrombozyten) könnte sein, dass während des Aufbereitungsprozesses die Thrombozyten VEGF an das umgebende Plasma sezerniert haben. Da dies bei TGF-ß1 und PDGF-AB in diesem Ausmaß nicht gesehen wurde, müsste die Sezernierung dieses Faktors empfindlicher als die anderen auf den Isolierungsvorgang reagieren. Eine weitere

Folgerung wäre, dass, wenn VEGF frühzeitig in das umgebene Plasma sezerniert würde, es für den Einsatz im in-vivo Modell nicht zur Verfügung gestanden hätte, da hier nur die Zellen und nur sehr wenig Plasma eingesetzt wurde. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die gefundenen Mengen an VEGF natürlicherweise schon im Plasma enthalten sind. Diesem Erklärungsversuch jedoch widersprechen die Ergebnisse von Hormbrey und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass zwar VEGF im Plasma gefunden werden kann[60], jedoch etwa um den Faktor 10 weniger, als es in der vorliegenden Studie gemessen wurde. Zur endgültigen Klärung des Sachverhalts wären weitere Untersuchungen nötig. Die Größenrelationen zu PDFG-AB und TGF-ß1 im Thrombozytenkonzentrat, in denen VEGF in der vorliegenden Studie gefunden wurden, lassen sich jedoch durch andere Studien bestätigen[37,81].

Der überwiegende Anteil des Meniskus ist avaskulär und hat schlechtes Heilungspotential. Die Neubildung von Blutgefäßen wird durch Angiogenesefaktoren reguliert, wobei das potenteste angiogenetisch wirkende Peptid VEGF ist[22]. Wie in der Einleitung erwähnt, konnten Becker und Mitarbeiter in einer in-vivo Untersuchung am Kaninchen zeigen, dass nach künstlicher Verletzung des Meniskus sowohl im vaskulären wie auch im avaskulären Bereich 7 Tage nach Trauma im Gegensatz zur nicht traumatisierten Kontrollgruppe vermehrt VEGF produziert wurde. Dabei konnte im avaskulären Bereich sogar doppelt soviel VEGF nachgewiesen werden wie im vaskulären, peripheren Anteil. Dennoch heilte keiner der Defekte nach 10 Wochen im avaskulären Bereich, während 90% im vaskulären Bereich regenerierten[22]. Die gleiche Forschergruppe versuchte später mit einem Nahtmaterial, an das VEGF über Poly-[d,l-Laktid]-Säure (PDLLA) gebunden war, im avaskulären Bereich einen Defekt im Schafmeniskus durch Induktion von Angiogenese zu therapieren. Dies scheiterte jedoch und es zeigte sich sogar ein Vorteil in der Kontrollgruppe, bei der unbeschichtetes, beziehungsweise nur mit PDLLA beschichtetes Nahtmaterial zum Einsatz kam[101]. Diese Untersuchung lässt vermuten, dass von VEGF bei der Regeneration von avaskulären Meniskusläsionen keine positiven Effekte ausgehen, ferner, dass VEGF möglicherweise die Heilung in diesem Bereich hemmt. Könnte dies in weiteren Studien bestätigt werden, könnte man die Tatsache, dass VEGF in Thrombozyten in nur sehr geringen Mengen vorhanden ist, als Vorteil für den Einsatz von Thrombozyten als Quelle für Wachstumsfaktoren werten.

Aus den Erkenntnissen der in-vitro Wachstumsfaktorenanalysen kann man folgern, dass es möglich ist, Wachstumsfaktoren in hohen Konzentrationen durch Thrombozyten-Matrix-

Konstrukte bereitzustellen. Nun stellt sich die Frage, inwieweit diese Erkenntnisse auf die in-vivo Situation im Kaninchenmeniskus übertragbar sind. Das in-vitro Modell ist ein in sich abgeschlossenes System, ein Medienwechsel fand während des Versuchablaufs nicht statt. Möglicherweise diffundierte in-vivo ein mehr oder minder großer Teil der Wachstumsfaktoren in das umliegende Gewebe und stand nicht zur Defektregeneration zu Verfügung. Unklar ist weiter, ob die mechanische Beanspruchung des Thrombozyten-Matrix-Konstrukts die Freisetzungskinetik beeinflusst hat. Möglicherweise wurden die Thrombozyten aus der Matrix ausgeschwemmt und haben sich in der Gelenkhöhle verteilt. Auf der anderen Seite muss in Betracht gezogen werden, dass im in-vitro Versuch die Thrombozytenpräparate in 1,2ml Medium resuspendiert wurden und sich im Kaninchenknie nur ca. 130µl Synovialflüssigkeit befinden[44], was konsekutiv höhere Konzentrationen der Faktoren zur Folge haben müsste und ein möglicher Verlust damit kompensiert werden könnte. Die exakte Beantwortung der Frage, inwiefern die in-vitro Ergebnisse Rückschlüsse auf die in-vivo Situation zulassen, kann nicht abschließend geklärt werden und bedürfte weiterer Untersuchungen. Aufschluss könnten dabei beispielsweise Untersuchungen bringen, die klären, ob Thrombozyten in-vivo nach wenigen Tagen in der im Meniskus implantierten Matrix noch nachweisbar sind.

Wie in der Einleitung näher ausgeführt, galt es in der vorliegenden Arbeit mit den in-vivo Versuchen am Kaninchen zu klären, ob es möglich ist, künstlich erzeugte Defekte im avaskulären Bereich der Pars intermedia des Meniskus mit Hilfe von Wachstumsfaktoren suffizient zu therapieren. In Untersuchungen der eigenen Abteilung gelang es mit Hilfe einer Kombination von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und einer Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix, eben beschriebene Läsionen im Meniskus von Kaninchen erfolgreich zu behandeln. Dabei ist jedoch die Rolle der eingesetzten mesenchymalen Stammzellen bei der Defektreparatur nicht vollkommen klar. Wirken diese rein als Reparaturzellen? Oder fördern sie eine Heilung durch umliegende Zellen aus Meniskus und Synovia über die Sezernierung bioaktiver Moleküle, beziehungsweise ist es eine Kombination aus beidem? Wie zu Beginn der Diskussion näher ausgeführt, konnten Studien, die unter anderen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, die eben genannten Effekte von mesenchymalen Stammzellen, also deren Wirkweise als Reparaturzelle wie auch durch Mediatorsubstanzen, zeigen. Um nun die Funktion der mesenchymalen Stammzellen bei der Meniskusregeneration näher zu verstehen, wurde diese Studie mit den gleichen Verfahrensweisen wie in den erfolgreichen Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen durchgeführt und die Evaluation der Ergebnisse mit dem gleichen Scoring-

System durchgeführt, um möglichst präzise Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der mesenchymalen Stammzellen ziehen zu können. Deshalb sollen nun die Ergebnisse der in-vivo Untersuchungen näher beleuchtet werden und mit den Ergebnissen der Versuche mit mesenchymalen Stammzellen verglichen werden.

Nach 6 Wochen konnte in der behandelten Gruppe der Stanzdefekte keine effektive Therapie durch PRP-Matrix-Konstrukte erreicht werden und wurde mit einem Scoringwert von 9,7 bewertet (max. 24 Punkte). Sehr ähnliche Ergebnisse wurden in der Kontrollgruppe beobachtet, bei der sich ebenfalls kein Heilungserfolg zeigte. Mit einem durchschnittlichen Scoringwert von 9,8 konnte kein signifikanter Unterschied in den Gruppen gezeigt werden. Bedingt sind die vergebenen Scoring-Punkte vor allem durch das entstandene minderwertige Reparaturgewebe, das überwiegend aus fibrotischem Narbengewebe bestand. In den zu vergleichenden Studien mit mesenchymalen Stammzellen konnte schon nach 6 Wochen ein signifikanter Vorteil der behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden.

Nach 12 Wochen Laufzeit zeigte sich in der behandelten Gruppe mit Thrombozyten sogar eine Verschlechterung im durchschnittlichen Gesamtergebnis (Scoringwert 7,8), während sich die Kontrollgruppe sogar leicht verbesserte (Scoringwert 12,3). Dennoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Der Vorteil in den Studien mit mesenchymalen Stammzellen entwickelte sich dagegen nach 12 Wochen weiter zu Gunsten der behandelten Gruppe. Es ist somit anzunehmen, dass beim Heilungsprozess von Meniskusläsionen durch mesenchymale Stammzellen Wachstumsfaktoren eher eine untergeordnete Rolle spielen, oder, dass das freigesetzte Wachstumsfaktorenprofil von Thrombozyten und mesenchymalen Stammzellen zu unterschiedlich ist, als dass mit Thrombozyten gleiche Effekte erzielt werden könnten. Letztere Frage könnte in weiteren Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen geklärt werden. Ein weiterer Faktor könnte die kurze Lebensdauer der Thrombozyten sein. In den Untersuchungen mit mesenchymalen Stammzellen konnten diese noch nach 6 Wochen in-vivo nachgewiesen werden, womit sie über einen weit größeren Zeitraum bioaktive Substanzen freisetzen können. Diese Überlegungen sollen weiter unten näher beleuchtet werden.

Neben Stanzdefekten wurde auch das Heilungspotential von PRP-Matrix-Konstrukten auf die vor allem im klinischen Alltag relevanten Rissdefekte untersucht. Diese wurden zusätzlich sowohl in der behandelten wie auch in der Kontrollgruppe mit

Adaptationsnähten versorgt. Hier sei nochmals betont, dass bei dieser Läsionsentität zwar die Defektränder näher zusammen liegen, jedoch im Meniskus auftretende Scherkräfte einer Heilung stark entgegenwirken.

Bei der Evaluierung der Ergebnisse der 6-Wochengruppe konnte weder in der behandelten noch in der Kontrollgruppe ein suffizientes Therapieergebnis gefunden werden. Auffällig sind dennoch die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: so fiel makroskopisch zunächst auf, dass in der behandelten Gruppe die Defekte in ihrer Morphologie noch erhalten waren, im Gegensatz dazu waren bis auf einen Fall in der Kontrollgruppe alle Defekte nach zentral eingerissen, beziehungsweise waren gar nicht mehr abgrenzbar. Auch in den histologischen Untersuchungen waren in der behandelten Gruppe wenigstens Ansätze zur Defektregeneration zu finden, während dies in der Kontrollgruppe, mit einer Ausnahme, nicht zu finden war. Im Scoring-Ergebnis erhielt die behandelte Gruppe einen durchschnittlichen Wert von 5,3, während die Kontrollgruppe nur 0,2 Punkte erhielt. Der Unterschied konnte als statistisch signifikant festgestellt werden.

Die Verwendung vom mesenchymalen Stammzellen in vorangegangenen Studien in der eigenen Abteilung zeigte, wie auch schon in den Untersuchungen im Stanzdefektmodell, bereits nach 6 Wochen gute Therapieergebnisse, mit einem signifikanten Vorteil der behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

Nach 12 Wochen Laufzeit bot sich in der mit PRP-Matrix-Konstrukten behandelten Gruppe wie auch in der Kontrollgruppe ein ähnliches Bild wie nach 6 Wochen. Jedoch waren die Ergebnisse unter den verschiedenen Tieren in der behandelten Gruppe inhomogener, weshalb letztlich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mehr gefunden wurde. Die behandelte Gruppe blieb dabei bei einem Wert von 5,3 im Scoring, während sich die Kontrollgruppe minimal auf 0,8 verbesserte. Trotz der längeren Laufzeit konnte also eine Verbesserung in keiner der beiden Gruppen gesehen werden und somit auch keine adäquate Therapie der Defekte bewirkt werden. Dies stand wiederum im Gegensatz zu den Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen im Rissdefekt, bei der die behandelte Gruppe ein signifikant besseres Ergebnis erzielte und zudem eine suffiziente Therapie der Defekte im Gegensatz zur Kontrollgruppe erzielt werden konnte.

Somit bestätigen sich die Schlussfolgerungen aus den Beobachtungen der Stanzdefekte: Die Defektregeneration durch mesenchymale Stammzellen scheint nicht maßgeblich durch die Effekte von Wachstumsfaktoren erklärbar zu sein. Im Fall der Rissdefekte lassen die

besseren Ergebnisse in der behandelten Gruppe vermuten, dass wenigstens ein kleiner Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Defektregeneration ausgeht. Die unterschiedliche Effektivität von PRP im Riss- und Stanzdefekt könnte - sofern man davon ausgeht, dass diese positiven Effekte durch eine PRP-vermittelte Chemotaxis von Reparaturzellen induziert wurde - damit erklärt werden, dass ein Rissdefekt mit wesentlich weniger Reparaturzellen zu regenerieren wäre als ein Stanzdefekt, der ein weit größeres Volumen aufweist. Außerdem liegen die Defektränder im Rissdefektmodell näher aneinander und wurden durch zusätzliche Nähte adaptiert.

Insgesamt liegt der Schluss nahe, dass es nicht möglich ist, effektiv Läsionen im avaskulären Bereich des Meniskus ohne die Komponente mesenchymale Stammzelle nur mit Wachstumsfaktoren und einer Matrix zu therapieren. Einschränkend ist zu hinterfragen, ob eventuell das in der vorliegenden Studie verwandte Modell zur Bereitstellung von Wachstumsfaktoren nicht optimal war und nur ein Mangel in der Methodik der nicht erfolgreichen Therapie zu Grunde liegt. Dies soll in abschließenden Überlegungen näher diskutiert werden.

Eine wichtige Komponente im Bereich des Tissue Engineering stellt die verwendete Matrix dar. Die in den Versuchen eingesetzte Matrix hatte sich in den Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen bewährt. Sie wurde in der eigenen Abteilung entwickelt und ihre Eignung zum Einsatz im Bereich des Tissue Engineering für die Reparatur von Knorpeldefekten konnte in zahlreichen in-vitro und in-vivo Versuchen gezeigt werden[6,8-10]. Dennoch stellt sich die Frage, ob diese Matrix auch im Zusammenhang mit Thrombozyten die besten Voraussetzungen für die zu untersuchende Fragestellung ist. In der vorliegenden Studie konnte zwar eine effektive und vollständige Besetzung der Matrix mit Thrombozyten gezeigt werden, jedoch ist die Frage offen, inwiefern unter in-vivo Bedingungen diese in der Matrix bleiben, oder ob sie durch die mechanischen Kräfte, die durch die Bewegung der Versuchstiere im Kniegelenk entstehen, aus der Matrix ausgeschwemmt werden und nicht mehr nur in unmittelbarer Nähe des Defekts ihre Wirkung entfalten können. Damit wären die Ergebnisse nur eingeschränkt auf die Untersuchungen mit mesenchymalen Stammzellen zu übertragen. Um dies zu verhindern, besteht die Möglichkeit, durch Zugabe von Substanzen wie Thrombin und $CaCl_2$ eine Aktivierung der Thrombozyten zu induzieren und damit einen Fibrin-Clot zu erzeugen, der stabil ist und nach und nach Wachstumsfaktoren sezerniert[102] und gleichzeitig als Matrix für den Reparaturprozess dient[19]. Arnoczky und Mitarbeiter untersuchten die

Heilungspotenz eines eingebrachten Fibrin-Clots in avaskulären Stanzdefekten von Hundemenisken. Sie fanden nach 6 Monaten Laufzeit im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in der die Defekte leer belassen wurden, im Defektbereich fibrokartilaginäres Gewebe, das alle Defekte komplett ausfüllte. Allerdings wiesen sie auf starke makroskopische sowie histologische Abweichungen des entstandenen Reparaturgewebes zum normalen Meniskusgewebe hin[19]. Port und Mitarbeiter untersuchten daraufhin den Einsatz eines Fibrin-Clots in Kombination mit einer Naht in Rissdefekten im avaskulären Bereich von Ziegen. Dabei konnten sie keine relevante Verbesserung der Defektheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe finden. Dies zeigten auch weitere biomechanische Untersuchungen des entstandenen Defektgewebes. Interessanter Weise konnte auch die Zugabe von mesenchymalen Stammzellen keine Verbesserung der Ergebnisse erzielen[104]. Aktivierte Thrombozyten in Kombination mit weiteren Zellbestandteilen des Blutes in Form eines Fibrin-Clots scheinen also auch nicht ein verbessertes Release-System von Wachstumsfaktoren darzustellen, um eine effektive Therapie im Meniskus zu erreichen. Vergleicht man nun die Studien der eigenen Abteilung mit mesenchymalen Stammzellen mit den eben genannten, so scheint es, dass aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse ein Fibrin-Clot auch für mesenchymale Stammzellen keine geeignete Matrix darstellt, dieser vielmehr die Entfaltung des Regenerationspotentials von mesenchymalen Stammzellen behindert.

Hinweise, dass die Heilungspotenz von eingesetzten Thrombozytenkonzentraten entscheidend von der verwendeten Trägermatrix determiniert wird, ergeben sich aus den Ergebnissen einer Studie an japanischen weißen Hasen. Hier wurde der Effekt von in Gelatine-Hydrogel inkorporiertem Thrombozytenkonzentrat auf die Heilung von Knochendefekten untersucht. Als Kontrollgruppen diente der Einsatz von Thrombozytenkonzentrat (TK) in einen Fibrin-Kleber, freies TK, und nur Gelatine-Hydrogel. Mit dem Gelatine-Hydrogel-TK-Konstrukt konnte eine suffiziente Therapie der Läsionen erreicht werden, die statistisch signifikant besser war als in allen anderen Kontrollgruppen. Der Einsatz von freiem TK führte zu keinerlei Knochenregeneration, was die Autoren darauf zurückführten, dass dieses nicht lange genug an der Defektstelle in hohen Konzentrationen verweilt. Der Einsatz von TK in Fibrin-Kleber zeigte eine mäßige Regeneration. Nach 4 Wochen konnte der Fibrin-Kleber noch im Defekt nachgewiesen werden, was die Autoren als Grund für eine Behinderung der Defektheilung deuteten. Die positiven Resultate in der Gelatine-Hydrogel-TK-Gruppe führten die Autoren auf die

stufenweise Degradation des Gels mit konsekutiver Freisetzung von Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum zurück[59].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen vermuten, dass der Einsatz von Thrombozytenkonzentraten zur Meniskusregeneration möglicherweise durch die Verwendung eines für Thrombozyten angepassten Release-Systems in Form einer Trägermatrix zur Verbesserung der Ergebnisse führen könnte. Die Verwendung eines solchen optimalen Release-Systems würde weitere Sicherheit bei der Übertragung der Ergebnisse auf die Wirkungsweise von mesenchymalen Stammzellen bei der Defektregeneration von Meniskusläsionen im avaskulären Bereich zulassen.

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass einiges dafür spricht, dass auf den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen zur Defektregeneration im avaskulären Bereich von Menisken nicht verzichtet werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Betrachtung der Epidemiologie von Meniskusläsionen wird, abgesehen von der individuellen Belastung und Einschränkung der Patienten, die sozioökonomische Tragweite dieses Krankheitsbildes deutlich. Die aktuellen Studien zur demographischen Entwicklung der Bevölkerung und die steigende Zahl von Sportverletzungen geben keinen Anlass zur Hoffnung, dass eine Trendwende hinsichtlich der Inzidenz zu erwarten ist. Während die Traumatologie für Verletzungen der Menisken im vaskulären Bereich oftmals effektive Therapieoptionen bietet, sind bei der Versorgung von Verletzungen im avaskulären Bereich die Möglichkeiten und Erfolgsaussichten beschränkt. Gerade die Forschung im Bereich des Tissue Engineering liefert vielversprechende Ansätze, um diese Lücke zu schließen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Regeneration von avaskulären Meniskusläsionen mit Wachstumsfaktoren und einer Matrix gewonnen werden. Dazu wurden PRP-Matrix-Konstrukte zur Versorgung von avaskulären Meniskusdefekten eingesetzt, aus denen nachweislich über einen Zeitraum von 8 Tagen Wachstumsfaktoren in größeren Mengen freigesetzt wurden. Da auch nach 12 Wochen keine suffiziente Heilung gesehen werden konnte, scheint es, als ob Wachstumsfaktoren alleine keine ausreichende Therapie bewirken können. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Fragestellung, welche Rolle mesenchymale Stammzellen bei der erfolgreichen Regeneration von Meniskusläsionen spielen, beziehungsweise, ob dabei hauptsächlich die von den Zellen sezernierten Wachstumsfaktoren die ausschlaggebenden Faktoren sind, liefert Anhalspunkte dafür, dass die entscheidende Komponente im Heilungsprozess die Zelle ist und somit auf diese nicht verzichtet werden kann. Weitere Klärung bei der Charakterisierung und Eingrenzung der Reparaturabläufe würden zum einen Untersuchungen der freigesetzten Botenstoffe der mesenchymalen Stammzellen im Milieu von Meniskusgewebe liefern und zum anderen würde ein optimiertes Release-System von Wachstumsfaktoren weitere Erkenntnisse um deren Potential im Rahmen von Defektregeneration liefern.

6 LITERATUR

1. Abatangelo G, Cortivo R, Martelli M, et al. Cell detachment mediated by hyaluronic acid. *Exp Cell Res* 1982;137:73-8.

2. Abdel-Hamid MZ, Chang CH, Chan YS, et al. Arthroscopic evaluation of soft tissue injuries in tibial plateau fractures: retrospective analysis of 98 cases. *Arthroscopy* 2006;22:669-75.

3. Adams ME, Hukins DWL. The extracellular matrix of the meniscus. In: Mow V.C., Arnoczky S.P., Jackson D.W. (eds) Knee meniscus: basic and clinical foundations. Raven Press, New York. 1992.

4. Agung M, Ochi M, Yanada S, et al. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006;14:1307-14.

5. Ahmed AM. The load-bearing role of the knee menisci. In: Mow V.C., Arnoczky S.P., Jackson D.W. (eds) Knee meniscus: basic and clinical foundations. Raven Press, New York 1992.

6. Angele P, Abke J, Kujat R, et al. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 2004;25:2831-41.

7. Angele P, Faltermeier H, Kujat R, et al. Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:205-8.

8. Angele P, Johnstone B, Kujat R, et al. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:445-55.

9. Angele P, Kujat R, Nerlich M, et al. Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng* 1999;5:545-54.

10. Angele P, Schumann D, Angele M, et al. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 2004;41:335-46.

11. Angele P, Yoo JU, Smith C, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 2003;21:451-7.

12. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:529-35.

13. Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.

14. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:3-25.

15. Arnoczky SP. Building a meniscus. Biologic considerations. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S244-53.

16. Arnoczky SP. Gross and vascular anatomy for the meniscus and the role in meniscal healing. In: Mow V.C., Arnoczky S.P., Jackson D.W. (eds) Knee meniscus: basic and clinical foundations. Raven Press, New York 1992:1-4.

17. Arnoczky SP, Adams ME, Mow VC. The meniscus. In: Buckwalter J., Woo S., (eds). The injury and repair of musculosketal soft tissue. Park Rdge, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons; 1998:487-537.

18. Arnoczky SP, Lavagnino M. Tensile fixation strengths of absorbable meniscal repair devices as a function of hydrolysis time. An in vitro experimental study. *Am J Sports Med* 2001;29:118-23.

19. 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.

20. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956-64.

21. Baratz ME, Fu FH, Mengato R. Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report. *Am J Sports Med* 1986;14:270-5.

22. Becker R, Pufe T, Kulow S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:1082-7.

23. Benedetto KP, Glotzer W, Kunzel KH, et al. The vascularization of the menisci. Morphological basis for the repair. *Acta Anat (Basel)* 1985;124:88-92.

24. Benndorf HM. Mittheilung zweier Fälle von Excision fremder Körper im Kniegelenk mittels directen Einschnittes. In Inaugural-Dissertation ed. Leipzig, 1867:3.

25. Bhargava MM, Attia ET, Murrell GA, et al. The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med* 1999;27:636-43.

26. Bhargava MM, Hidaka C, Hannafin JA, et al. Effects of hepatocyte growth factor and platelet-derived growth factor on the repair of meniscal defects in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005;41:305-10.

27. Bland YS, Ashhurst DE. Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. *Histochem J* 1996;28:265-74.

28. Brindle T, Nyland J, Johnson DL. The Meniscus: Review of Basic Principles With Application to Surgery and Rehabilitation. *J Athl Train* 2001;36:160-9.

29. Bruns J, Kahrs J, Kampen J, et al. Autologous perichondral tissue for meniscal replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:918-23.

30. Bundesamt fS. 1998.

31. Campbell SE, Sanders TG, Morrison WB. MR imaging of meniscal cysts: incidence, location, and clinical significance. *AJR Am J Roentgenol* 2001;177:409-13.

32. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 1995;159:265-358.

33. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-84.

34. Cardigan R, Sutherland J, Wadhwa M, et al. The influence of platelet additive solutions on cytokine levels and complement activation in platelet concentrates during storage. *Vox Sang* 2003;84:28-35.

35. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang* 2005;88:153-63.

36. Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73:778-86.

37. Christgau M, Moder D, Hiller KA, et al. Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. *J Clin Periodontol* 2006;33:837-45.

38. 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.

39. Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, et al. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *Am J Sports Med* 1999;27:658-65.

40. Cortivo R, De Galateo A, Castellani I, et al. Hyaluronic acid promotes chick embryo fibroblast and chondroblast expression. *Cell Biol Int Rep* 1990;14:111-22.

41. de Groot JH, de Vrijer R, Pennings AJ, et al. Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses. *Biomaterials* 1996;17:163-73.

42. de Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:486-97.

43. de Roeck NJ, Lang-Stevenson A. Meniscal tears sustained awaiting anterior cruciate ligament reconstruction. *Injury* 2003;34:343-5.

44. Delecrin J, Oka M, Takahashi S, et al. Changes in joint fluid after total arthroplasty. A quantitative study on the rabbit knee joint. *Clin Orthop Relat Res* 1994:240-9.

45. Dienst M, Kohn D. Allogenic Meniscus Transplantation. *Oper Orthop Traumatol* 2006;18:463-80.

46. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:1502-8.

47. Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1948:664-70.

48. Fink C. Meniskusrefixation - Anatomische und biologische Grundlagen. *Arthroskopie* 2001:248-53.

49. Fitzgibbons RE, Shelbourne KD. "Aggressive" nontreatment of lateral meniscal tears seen during anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1995;23:156-9.

50. Fox JM, Rintz KG, Ferkel RD. Trephination of incomplete meniscal tears. *Arthroscopy* 1993;9:451-5.

51. Fu FH, W.O. T. Motion of the meniscus during knee flexion. In: Mow V.C., Arnoczky S.P., Jackson D.W. (eds) Knee meniscus: basic and clinical foundations. Raven Press, New York 1992.

52. Gao J, Oqvist G, Messner K. The attachments of the rabbit medial meniscus. A morphological investigation using image analysis and immunohistochemistry. *J Anat* 1994;185 (Pt 3):663-7.

53. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:547-57.

54. Guilak F, Sah R, Setton LA. Physical regulation of cartilage metabolism. *Basic orthopedic biomechanics* 1997.

55. Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R, et al. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2003;85:199-205.

56. Hamlet W, Liu SH, Yang R. Destruction of a cyropreserved meniscal allograft: a case for acute rejection. *Arthroscopy* 1997;13:517-21.

57. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585-92.

58. Haynesworth SE, S K, L L, et al. Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet releasate suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates. Transaction of the 48th Annual Meeting of the Ortopaedic Research Society. Dallas, 2002.

59. Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, et al. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng* 2005;11:1224-33.

60. Hormbrey E, Gillespie P, Turner K, et al. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin Exp Metastasis* 2002;19:651-63.

61. Hosgood G. Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg* 1993;22:490-5.

62. Imler SM, Doshi AN, Levenston ME. Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:736-44.

63. Izuta Y, Ochi M, Adachi N, et al. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *Knee* 2005;12:217-23.

64. Johnson LL, Feagin JA, Jr. Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study. *Arthroscopy* 2000;16:191-6.

65. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-72.

66. Jones RE, Smith EC, Reisch JS. Effects of medial meniscectomy in patients older than forty years. *J Bone Joint Surg Am* 1978;60:783-6.

67. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000;71:1654-61.

68. Klompmaker J, Jansen HW, Veth RP, et al. Meniscal repair by fibrocartilage? An experimental study in the dog. *J Orthop Res* 1992;10:359-70.

69. Klompmaker J, Veth RP, Jansen HW, et al. Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog. *Biomaterials* 1996;17:1169-75.

70. Klompmaker J, Veth RP, Jansen HW, et al. Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity. *Biomaterials* 1996;17:1685-91.

71. Knox RL, Hunt AR, Collins JC, et al. Platelet-rich plasma combined with skin substitute for chronic wound healing: a case report. *J Extra Corpor Technol* 2006;38:260-4.

72. Kohn D, Moreno B. Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study. *Arthroscopy* 1995;11:96-103.

73. Kohn D, Mussack T, Plitz W. Material properties of meniscus tissue and the effect of the menisci on the compression behavior of the knee joint. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1993;131:397-403.

74. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297-300; discussion -1.

75. Leenslag JW, Pennings AJ, Veth RP, et al. A porous composite for reconstruction of meniscus lesions. In: Christel, P., Meunier, A., Lee, A.J.C. ed. Biological and Biomechanical Performance of Biomaterials. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.147. 1986.

76. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang* 2006;91:135-9.

77. Levy IM, Torzilli PA, Warren RF. The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:883-8.

78. Linke RD, Ulmer M, Imhoff AB. [Replacement of the meniscus with a collagen implant (CMI)]. *Oper Orthop Traumatol* 2006;18:453-62.

79. Lippert. *Lehrbuch der Anatomie*ed.

80. Liu Y, Kalen A, Risto O, et al. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* 2002;10:336-40.

81. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, et al. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998;275:H1054-61.

82. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:229-37; discussion 38-9.

83. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-8.

84. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-96.

85. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.

86. Mast BA, Diegelmann RF, Krummel TM, et al. Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix* 1993;13:441-6.

87. Matava MJ. Meniscal allograft transplantation: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 2007;455:142-57.

88. McDevitt CA, R.R. M, K.P. S. The cells and cell matrix interactions of the meniscus. In: Mow V.C., Anroczky S.P., Jackson DW (eds) Knee meniscus: basic and clinical foundations. Raven Press, New York. 1992.

89. McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1990:8-18.

90. McNicol D, Roughley PJ. Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *Biochem J* 1980;185:705-13.

91. Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 1998;193 (Pt 2):161-78.

92. Milachowski KA, Kohn D, Wirth CJ. Meniscus replacement using Hoffa's infrapatellar fat bodies--initial clinical results. *Unfallchirurgie* 1990;16:190-5.

93. Milachowski KA, Weismeier K, Wirth CJ, et al. [Meniscus transplantation and anterior cruciate ligament replacement--results 2-4 years postoperative]. *Sportverletz Sportschaden* 1990;4:73-8.

94. Mooney M. Meniscus repair: zone-specific technique. *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 1993;9:451-5.

95. Mow VC. Structure and function relationships of the meniscus in the knee. In: Mow V.C., Arnoczky S.P., Jackson D.W. (eds) Knee meniscus: basic and clinical foundations. Raven Press, New York.

96. Mow VC, Rattcliffe A. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: Mow V.C., Hayes W.C. (eds) Basic orthopedic biomechanics. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997.

97. Murray MM, Spindler KP, Devin C, et al. Use of a collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res* 2006;24:820-30.

98. Ochi M, Uchio Y, Okuda K, et al. Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing. *Arthroscopy* 2001;17:724-31.

99. Pangborn CA, Athanasiou KA. Effects of growth factors on meniscal fibrochondrocytes. *Tissue Eng* 2005;11:1141-8.

100. Pangborn CA, Athanasiou KA. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res* 2005;23:1184-90.

101. Petersen W, Pufe T, Starke C, et al. The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. *Arch Orthop Trauma Surg* 2006.

102. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005;16:1043-54.

103. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.

104. Port J, Jackson DW, Lee TQ, et al. Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model. *Am J Sports Med* 1996;24:547-55.

105. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*ed, 1997.

106. Radice M, Brun P, Cortivo R, et al. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res* 2000;50:101-9.

107. Rangger C, Glotzer W, Benedetto KP. Ligament instability after arthroscopic partial medial meniscus resection. *Unfallchirurg* 1994;97:435-7.

108. Rankin CC, Lintner DM, Noble PC, et al. A biomechanical analysis of meniscal repair techniques. *Am J Sports Med* 2002;30:492-7.

109. Rauschmann MA, Deb R, Thomann KD, et al. History of meniscus surgery. From excision of joint loose bodies to meniscus suture. *Der Orthopäde* 2000;29:1044-54.

110. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12:261-73.

111. Rodkey WG, Steadman JR, Li ST. A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S281-92.

112. Rooney P, Kumar S. Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis. *Differentiation* 1993;54:1-9.

113. Rosenberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma--initial case presentation. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 2000;12:843-50; quiz 52.

114. Rubman MH, Noyes FR, Barber-Westin SD. Arthroscopic repair of meniscal tears that extend into the avascular zone. A review of 198 single and complex tears. *Am J Sports Med* 1998;26:87-95.

115. Rupp S, Seil R, Kohn D. Meniscus lesions. *Der Orthopäde* 2002;31:812-28.

116. Sanchez AR, Eckert SE, Sheridan PJ, et al. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:526-32.

117. Seedholm B. Transmission of the load in the knee with special reference to the role of the meniscus: part I. *Eng Med.* 1979;8:207-21.

118. Seedholm B, D. H. Transmission of the load of the knee with special reference to the role of the meniscus: part II. *Eng Med.* 1979;8:211-28.

119. Seil R, Kohn D. Meniscus reconstruction. Established and innovative methods. *Der Unfallchirurg* 2001;104:274-87.

120. Setton LA, Guilak F, Hsu EW, et al. Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S254-72.

121. Sipe JB, Zhang J, Waits C, et al. Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone* 2004;35:1316-22.

122. Skodacek D, Püschel R, Birner M, et al. Optimierung der Thrombozytenisolation zur Gewinnung von autologem TGF-beta für Tissue Engineering von Knorpel. 76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. Bonn, 2005.

123. Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, et al. Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *J Orthop Res* 1995;13:201-7.

124. Steadman JR, Rodkey WG. Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results. *Arthroscopy* 2005;21:515-25.

125. Stollsteimer GT, Shelton WR, Dukes A, et al. Meniscal allograft transplantation: a 1- to 5-year follow-up of 22 patients. *Arthroscopy* 2000;16:343-7.

126. Stone KR, Steadman JR, Rodkey WG, et al. Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1770-7.

127. Sweigart MA, Athanasiou KA. Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng* 2001;7:111-29.

128. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept* 2004;117:3-10.

129. Tapper EM, Hoover NW. Late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* 1969;51:517-26 passim.

130. Thor A, Wannfors K, Sennerby L, et al. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with autogenous bone, platelet-rich plasma, and implants: 1-year results of a controlled prospective 5-year study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005;7:209-20.

131. Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002;68:22-4.

132. Toyonaga T, Uezaki N, Chikama H. Substitute meniscus of Teflon-net for the knee joint of dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1983:291-7.

133. Trillat A. Lesions traumatiques du menisque interne du genou. Classement anatomique et diagnostique clinique. *Rev Chir Orthop* 1962;48:551-60.

134. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, et al. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 1989;48:271-80.

135. Verdonk R, Almqvist KF, Huysse W, et al. Meniscal allografts: indications and outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2007;15:121-5.

136. Veth RP, den Heeten GJ, Jansen HW, et al. An experimental study of reconstructive procedures in lesions of the meniscus. Use of synovial flaps and carbon fiber implants for artificially made lesions in the meniscus of the rabbit. *Clin Orthop Relat Res* 1983:250-4.

137. Veth RP, Jansen HW, Leenslag JW, et al. Experimental meniscal lesions reconstructed with a carbon fiber-polyurethane-poly(L-lactide) graft. *Clin Orthop Relat Res* 1986:286-93.

138. Vetter C. Standard und Optionen für die Therapie der Arthrose. *Deutsches Ärzteblatt* 1995:A-2896-A-900.

139. Walsh CJ, Goodman D, Caplan AI, et al. Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng* 1999;5:327-37.

140. Webber RJ, Harris MG, Hough AJ, Jr. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res* 1985;3:36-42.

141. Webber RJ, York JL, Vanderschilden JL, et al. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med* 1989;17:393-400.

142. Weber M. Die Beurteilung des Unfallzusammenhangs von Meniskusschäden. *Der Orthopäde* 1994;23:171-8.

143. Weiler A, Hoffmann RF, Stahelin AC, et al. Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy* 2000;16:305-21.

144. Welsch U. Lehrbuch Histologie, 2003:262.

145. Wheatley SC, Isacke CM, Crossley PH. Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development* 1993;119:295-306.

146. Wickiewicz TL. Meniscal injuries in the cruciate-deficient knee. *Clin Sports Med* 1990;9:681-94.

147. Wirth CJ, Peters G. Meniscus lesions. *Der Orthopäde* 1997;26:191-208.

148. Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, et al. Long-term results of meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med* 2002;30:174-81.

149. Yamasaki T, Deie M, Shinomiya R, et al. Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:23-30.

150. Zellner J, et a. *Submitted*.

151. Zimny ML, Albright DJ, Dabezies E. Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat (Basel)* 1988;133:35-40.

7 ANHANG

7.1 Lebenslauf

25.06.1980	Als zweites Kind von Christina Taeger, geb. Wörndl und Kai Taeger in Gräfelfing geboren
1987 – 1991	Grundschule Fürstenfeldbruck
1991 – 2000	Goethe-Gymnasium Regensburg
2000 – 2001	Zivildienst
2001 – 2002	Internationale Betriebswirtschaftslehre an der Wirtschaftswissenschaftlichen Fakultät Ingolstadt
2002 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2004	Ärztliche Vorprüfung
seit 2004	Klinischer Studienabschnitt an der Universität Regensburg

7.2 Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. M. Nerlich für das Anvertrauen dieser interessanten wie aktuellen Thematik. Der persönlicher Umgang und die weitreichende Erfahrung waren stets eine große Hilfestellung. Die Möglichkeit an diversen Forschungswochenenden teilnehmen zu können und vor Ort mit Wissenschaftlern verschiedener Fachdisziplinen zu diskutieren, sowie die eigenen Ergebnisse präsentieren zu können war eine große Bereicherung, wofür ich mich explizit bedanken möchte.

Weiter möchte ich mich bei Herrn PD Dr. P. Angele für die ausgesprochen freundliche Betreuung, seinen Ideenreichtum wie Weitblick bedanken, die den Grundstein dieser Arbeit gebildet haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem unmittelbarem Betreuer Dr. J. Zellner. Trotz intensivster Arbeitsbelastung und wissenschaftlichen Verpflichtungen nahm er sich immer Zeit, hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und gewährleistete bei den Tier-Operationen ein höchstes Maß an Zuverlässigkeit und Genauigkeit.

Durch die Hilfe von Dr. D. Skodacek gelang die Thrombozytenisolierung, was von grundlegender Bedeutung für die gesamte Arbeit war. Dafür bin ich ihm persönlich mit großem Dank verbunden.

Herrn Dr. R. Kujat möchte ich für seine Geduld und Hilfestellung bezüglich der Durchführbarkeit der unterschiedlichsten Labortechniken danken. Zu jeder Zeit waren Fragen sowie Diskussionen möglich.

Für die kompetente Unterstützung bei den Laborarbeiten möchte ich D. Drenkard, T. Böttner und U. Renner meinen Dank aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Koller möchte ich mich für die Unterstützung im Rahmen der Statistikfragen bedanken.