

Abteilung für Sportorthopädie der Technischen Universität München

Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff

**Der Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation
von humanen Fibrochondrozyten aus unterschiedlichen
avaskulären Regionen des Meniskus**

Stefanie Maria Martinek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff
2. Privatdozentin Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 18.12.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen.

Meiner Mutter Brigitte

GLIEDERUNG

1. EINFÜHRUNG	6
2. GRUNDLAGEN	12
2.1. Meniskus	12
2.1.1. Anatomie	12
2.1.2. Meniskus-Zusammensetzung	18
2.1.2.1. Meniskus-Zellen	18
2.1.2.1.1. oberflächliche Fibrochondrozyten	20
2.1.2.1.2. tiefe Fibrochondrozyten	20
2.1.2.1.3. andere Meniskuszellen	21
2.1.2.2. Extrazelluläre Matrix	22
2.1.2.2.1. Kollagene Matrixproteine	23
2.1.2.2.1.1. Kollagene	23
2.1.2.2.1.2. Elastin	25
2.1.2.2.2. Nicht-kollagene Matrixproteine	25
2.1.2.2.2.1. Proteoglykane	25
2.1.2.2.2.2. andere Matrixproteine	27
2.1.3. Meniskus-Regeneration	27
2.1.3. Meniskusheilung	28
2.2. Wachstumsfaktoren	29
2.2.1. Definition	29

2.2.2. Meniskus-spezifische Wachstumsfaktoren	30
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1. Prinzip der Trennung der oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten	33
3.1.1. Gewinnung der Kaninchen-Menisci	33
3.1.2. Untersuchung der Kaninchen-Menisci in Gewebekultur	34
3.2. Proliferation der humanen Fibrochondrozyten	36
3.2.1. Patienten	36
3.2.2. Isolierung der Fibrochondrozyten	39
3.2.3. Messung der Proliferation	40
3.2.4. Statistische Analyse	40
4. ERGEBNISSE	41
4.1. Verhalten der Menisci in Gewebekultur	41
4.1.1. abwandernde Fibrochondrozyten	41
4.1.2. oberflächliche Schichten des Meniskus	42
4.1.3. tiefe Schichten des Meniskus	43
4.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der humanen Fibrochondrozyten	49
4.2.1. TGFα	49
4.2.2. VEGF	49

4.2.3. IGF-1	50
4. DISKUSSION	58
4.1. Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Meniskusheilung	58
4.2. Wirkung der untersuchten Wachstumsfaktoren	60
4.3. Zellpopulationen des Meniskus	64
4.4. Methodik der histologischen Darstellung	65
4.5. Ausblick in die Zukunft	67
5. ZUSAMMENFASSUNG	70
6. LITERATUR	73
7. DANKSAGUNG	84
8. LEBENSLAUF	86

1. EINFÜHRUNG

Die Menisci besitzen eine besondere Bedeutung für die Funktion und Erhaltung des biomechanischen sowie biologischen Gleichgewichts des Kniegelenks [11, 40,41,57,58,69,71]. Diese halbmondförmigen, aus Faserknorpel bestehenden Elemente tragen 30 bis 60% der Kompressionskräfte, die bei Belastung zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau auftreten [40,58]. Durch die sich den Inkongruenzen des Femurkondylus und des Tibiaplateaus anpassenden Menisci wird die Kontaktfläche zwischen diesen gewichttragenden Gelenkanteilen vergrößert und das Kniegelenk zusätzlich stabilisiert [57,71]. Die mechanischen Eigenschaften der Menisci tragen signifikant der Schockabsorption im Kniegelenk bei und schützen somit den Gelenkknorpel vor Verletzungen [69]. Nach MacConaill wird den Menisci außerdem eine wichtige Funktion für den Transport der Gelenkflüssigkeit im Kniegelenk und somit zur Verbesserung der Diffusionsvorgänge zur Ernährung des hyalinen Knorpels zugeschrieben [41].

Der Stellenwert der Menisci für das Kniegelenk wurde für lange Zeit verkannt und der Meniskus entwicklungs-anatomisch als ein funktionsloses Überbleibsel eines Muskels der unteren Extremität betrachtet [63]. Infolgedessen war die komplette Meniskektomie, ungeachtet des Ausmaßes der Läsion, bis vor 30 Jahren die Standardtherapie der Meniskusruptur (Abb. 1) [34]. Dieses Vorgehen wurde durch die kurzfristigen Erfolge mit Beschwerdefreiheit der Patienten und niedrige Rezidivraten gerechtfertigt. Dabei wurden die langfristigen Auswirkungen des

Meniskusverlustes missachtet obwohl Fairbank bereits Ende der 40-iger Jahre von einer erhöhten Inzidenz degenerativer Knorpelveränderungen nach Meniskektomie berichtete und den Menisci eine lastübertragende Funktion zuwies, wie bereits vor ihm King bekundet hatte [17,38].

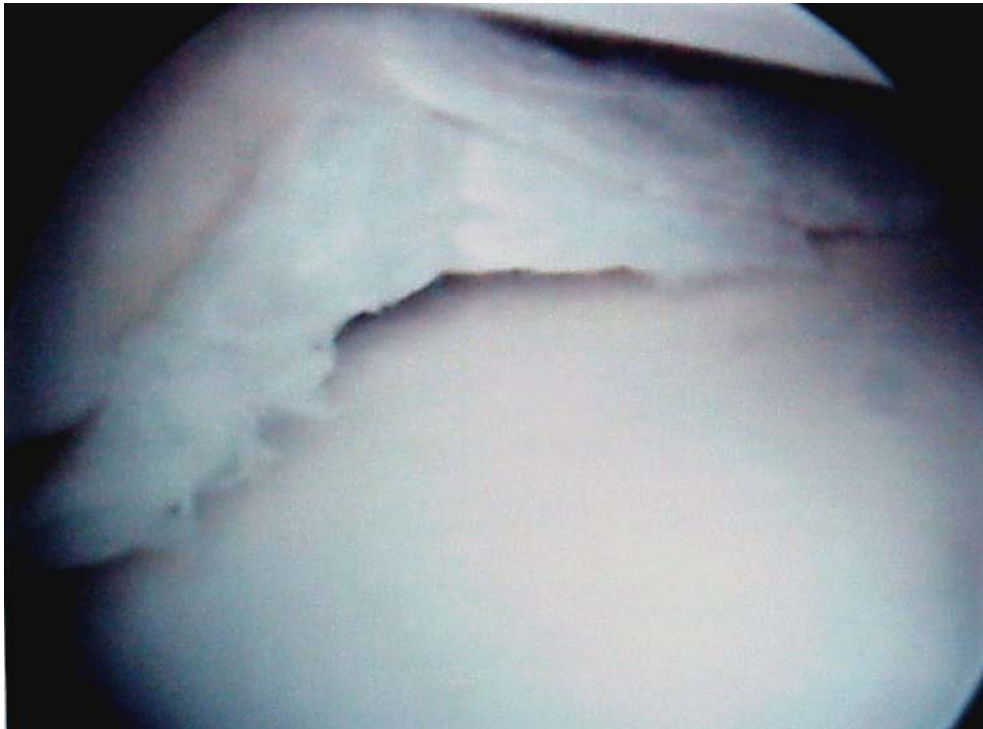


Abb. 1 Arthroscopisches Bild einer zentralen Meniskusruptur

Erst in den 70-iger Jahren wurden die schweren Folgen der totalen Meniskektomie für das Kniegelenk anerkannt (Abb. 2) und seitdem eine möglichst Meniskus-schonende, inzwischen auch eine minimal-invasive arthroscopische Therapie angestrebt [34,64].

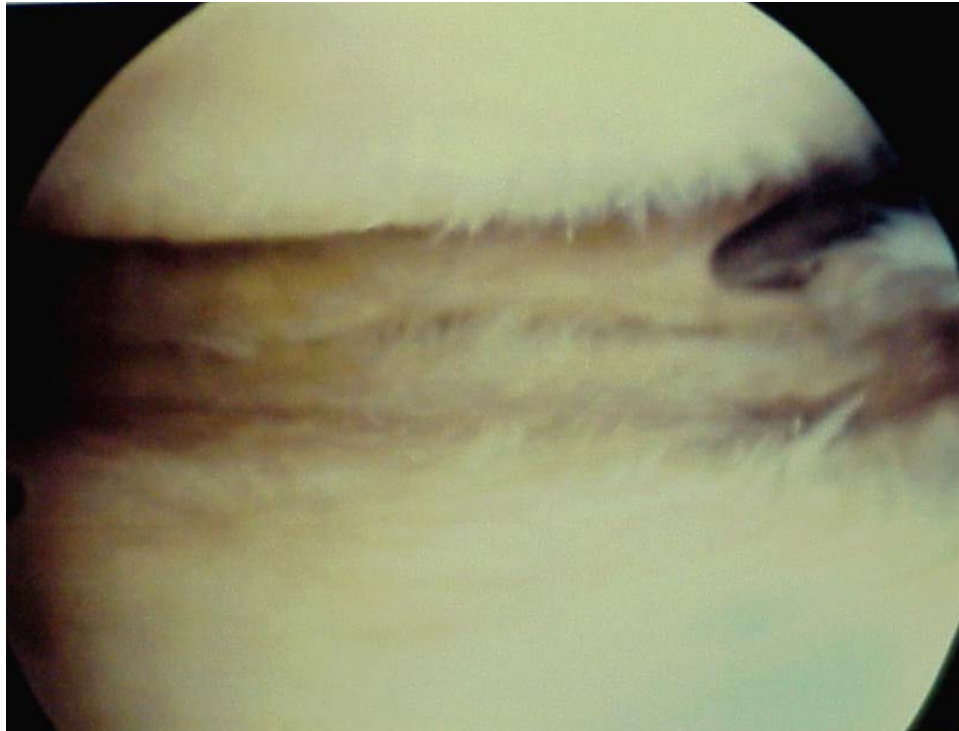


Abb. 2 Präarthrose im Sinne einer Knorpeldegeneration bei Zustand nach einer Meniskus-Entfernung vor 10 Jahren

Mit den heutigen Behandlungsstrategien wird versucht, den verletzten Meniskus durch Naht, Staple oder Anker zu reparieren und damit zu erhalten (Abb. 3). Da jedoch nur das kapselnahe Drittel der Menisci durchblutet ist, gelingt eine Meniskusrefixation nur in diesem Bereich, während zentrale, im avaskulären Bereich entstandene Rupturen nur eine geringe Heilungskapazität aufweisen [4]. In der klinischen Praxis werden die in den avaskulären Zonen lokalisierten Meniskusrisse durch eine Resektion des verletzten Gewebes behandelt, womit

die chondroprotektive Meniskusfunktion verloren geht und das Risiko eines späteren Knorpelschadens und die Entwicklung einer Gonarthrose in Kauf genommen werden müssen [10,56]. Der Meniskusverlust ist dabei insbesondere für die jüngeren Betroffenen, die infolge größerer sportlicher Aktivitäten zudem am häufigsten von einer Meniskusverletzung heimgesucht werden, schwerwiegend [54].



Abb. 3 Arthroskopische Meniskusrefixation

Eine der Behandlungsstrategien zur Steigerung der Heilungspotenz von Meniskusrupturen verfolgt die Stimulation der Proliferation und der Matrixsynthese meniskaler Fibrochondrozyten mit Wachstumsfaktoren. Bei diesen Wachstumsfaktoren handelt es sich um Zytokine, die an

Regenerationsvorgängen in allen Geweben des muskuloskeletalen Systems involviert werden [67]. Arnoczky et al. konnten durch Einlage eines, bekannterweise aus einem Gemisch verschiedener Wachstumsfaktoren bestehenden, Fibringerinnsels die Heilung kompletter Meniskusrupturen in der avaskulären Zone signifikant verbessern [5]. Die stimulierende Wirkung auf die Proliferation sowie die Synthese der kollagenen bzw. nicht-kollagenen Matrixsubstanzen der Meniskuszellen wurde inzwischen für einzelne selektierte Wachstumsfaktoren in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen, eine Untersuchung der Wirkung von Zytokinen auf humane meniskale Fibrochondrozyten wurde jedoch noch nicht durchgeführt [8,14,27,36,61,72].

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von drei verschiedenen Wachstumsfaktoren, Insulin-like Growth Factor (IGF-1), Transforming Growth Factor α (TGF α) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), erstmals auf die Proliferation der humanen meniskalen Fibrochondrozyten unter in-vitro Bedingungen untersucht. Dabei wurden Wachstumsfaktoren ausgewählt, deren positive Wirkung auf die Proliferation der Fibrochondrozyten aus dem Tierexperiment bekannt ist. Die Untersuchungen werden an humanen Fibrochondrozyten aus den avaskulären Zonen der Menisci durchgeführt, wobei die Messungen getrennt an zwei verschiedenen Populationen der Meniskuszellen, den oberflächlichen und den tiefen Fibrochondrozyten erfolgen.

Mit den nachfolgenden Experimenten sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der humanen Fibrochondrozyten mit dem aus den Tierexperimenten bekannten Effekt vergleichbar?

⇒ Können die im Tierexperiment gewonnenen Daten bezüglich Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Meniskuszell-Proliferation für humane Verhältnisse verwendet werden?

2. Kann der Vaskularisation-induzierende VEGF die Proliferation humaner, aus der avaskulären Meniskuszone stammenden Fibrochondrozyten steigern?

⇒ Gibt es in der avaskulären Zone des humanen Meniskus Zellen, die sich durch VEGF zur Proliferation und womöglich auch zur Bildung von Gefäßen stimulieren lassen?

3. Reagieren oberflächliche und tiefe meniskale Fibrochondrozyten unterschiedlich auf die verschiedenen verwendeten Wachstumsfaktoren?

⇒ Gibt es im humanen Meniskus verschiedene Zellpopulationen mit unterschiedlicher Reaktionsfähigkeit auf die Einwirkung von Zytokinen?

2. GRUNDLAGEN

2.1. Meniskus

Menisci sind C-förmige Scheiben aus Faserknorpel, die zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau liegen und integrale Bestandteile der biomechanischen Einheit des Kniegelenkes darstellen [6]. Die besondere Stellung der Menisci für die Erhaltung des Kniegelenkes wurde lange Zeit verkannt. Trotz zahlreicher wissenschaftliche Untersuchungen in den letzten 30 Jahren sind vor allem die biologischen Eigenschaften der Menisci noch nicht vollständig aufgeklärt und deshalb Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen [44].

2.1.1. Anatomie

Aus anatomischer Sicht handelt es sich bei Menisci um Verlängerungen der Tibia, die zum Ausgleich der Inkongruenzen zwischen den runden Femurkondylen und den flachen Tibiaplateaus dienen [6]. Sie entstehen durch Kondensation des Mesenchymalgewebes und sind in der 8-ten Entwicklungswoche bereits klar definiert. Zu diesem Zeitpunkt besitzen sie bereits die halbmondförmige Form der Erwachsenen-Menisci, sind jedoch komplett vaskularisiert und bestehen aus Fibroblasten [13]. In der Weiterentwicklung des Fötus kommt es, v.a. durch die intrauterinen Kniebewegungen, zur Bildung und zirkulären Orientierung von Kollagenfasern, deren Inhalt und Organisation auch nach der Geburt weiter zunimmt. Zum

Zeitpunkt der Geburt sind die Menisci noch komplett vaskularisiert; erst in der Mid-Adoleszenz werden die zentrale und die mittlere Zone der Menisci avaskulär (Abb. 4) [13].

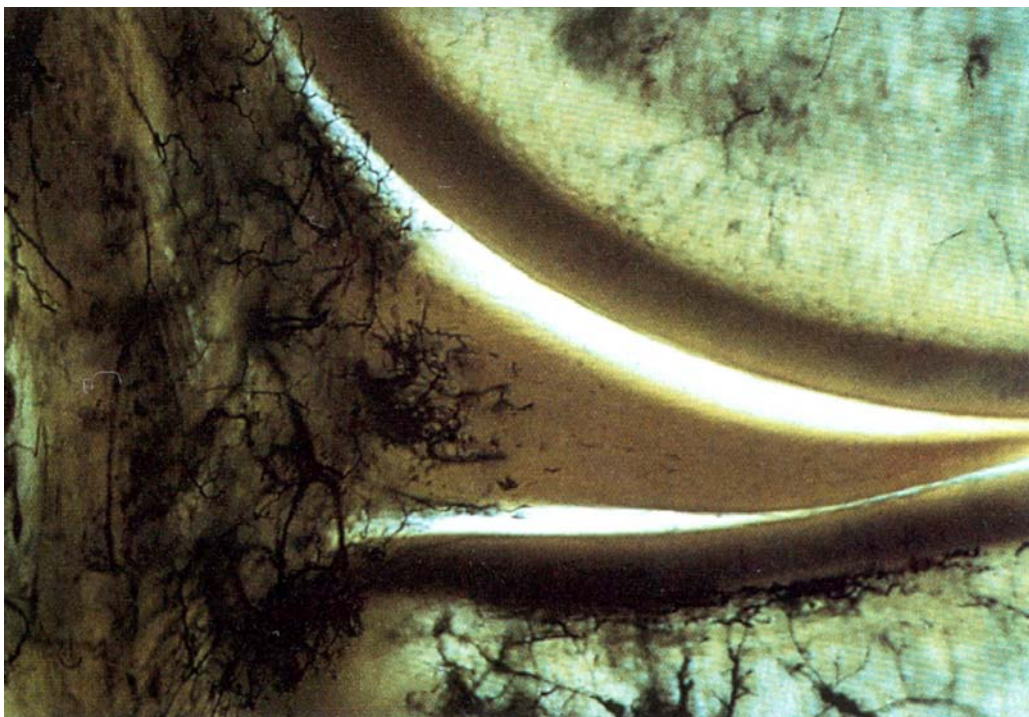


Abb. 4 Querschnitt-Darstellung eines humanen medialen Meniskus. Mit Spatelholz-Technik (x1.65) wird die auf das periphere Drittel beschränkte Vaskularisation des Meniskus dargestellt. Außerdem ist die konkave Form der proximalen sowie die flache Form der distalen Fläche des Meniskus erkennbar. Aus [3]

Die peripheren Ränder der Menisci sind dick, konvex und mit der Gelenkkapsel verbunden, während die zentralen Anteile der Menisci zu dünnen freien Ecken auslaufen (Abb. 4). Die proximalen Oberflächen der Menisci sind konkav, mit den Femurkondylen abschließend, die distalen Oberflächen sind, entsprechend der Form des Tibiaplateaus, flach (Abb. 4).

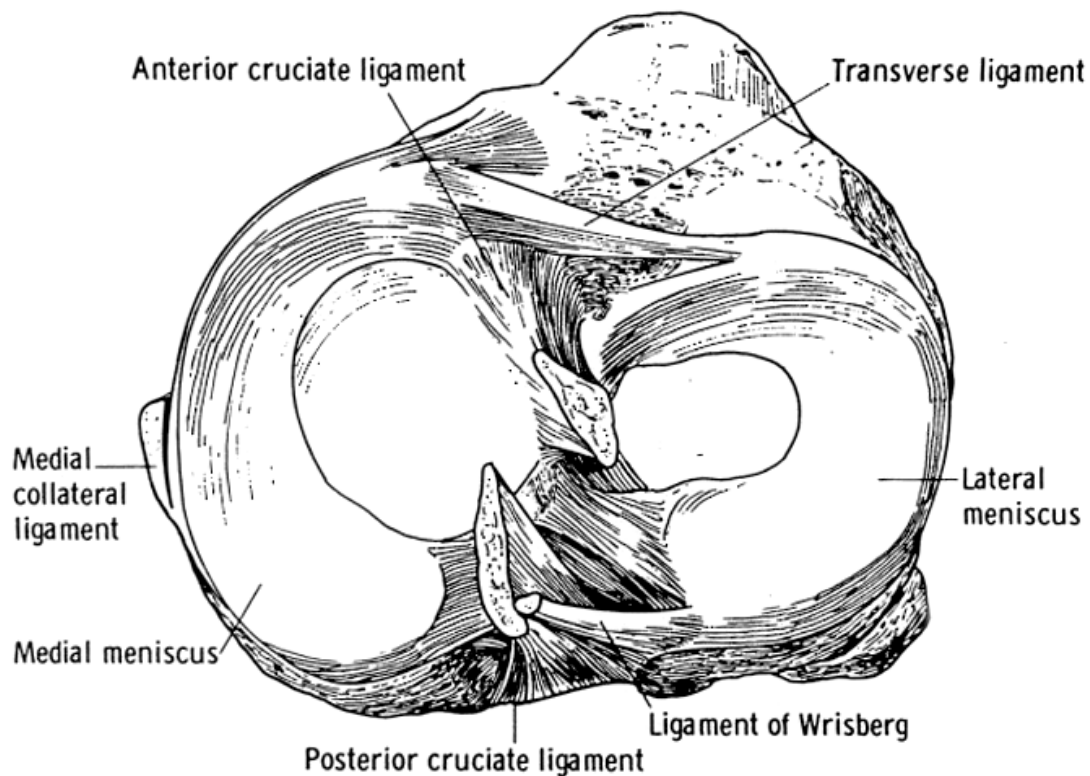


Abb. 5 Schematische Darstellung der Anatomie der Menisci. Aus [6]

Der mediale Meniskus ist semizirkulär geformt, in antero-posteriorer Richtung etwa 3.5 cm lang und im posterioren Bereich deutlich breiter als im anterioren Bereich (Abb. 5). Das Vorderhorn des Innenmeniskus ist vor der vorderen Fossa interkondylaris vor dem Ansatz des vorderen Kreuzbandes am Tibiaplateau befestigt, zusätzlich laufen posteriore Fasern der Vorderhorn-Anheftung in das Lig. transversum, das die Vorderhörner des medialen und lateralen Meniskus verbindet. Das Hinterhorn des Innenmeniskus ist fest an der hinteren Fossa interkondylaris der Tibia zwischen den Ansätzen des Außenmeniskus und des hinteren Kreuzbandes angeheftet. Die Peripherie des medialen Meniskus ist in der ganzen Länge mit der Gelenkkapsel verbunden, der tibiale Anteil der Kapselanheftung wird dabei als koronares Ligament bezeichnet. In der Mitte ist der Innenmeniskus durch Fasern des tiefen medialen kollateralen Ligaments mit der Tibia und dem Femur verbunden.

Der im gesamten Verlauf etwa gleich breite laterale Meniskus ist nahezu kreisförmig und deckt einen größeren Teil der tibialen Gelenkfläche als der mediale Meniskus (Abb. 5). Das Vorderhorn des Außenmeniskus setzt an der Tibia vor der Eminentia interkondylaris hinter dem Ansatz des vorderen Kreuzbandes an, das Hinterhorn hinter der Eminentia interkondylaris anterior des Ansatzes des medialen Meniskus. Der laterale Meniskus ist nicht mit dem Außenband verbunden, es besteht nur eine lose Verbindung des Außenmeniskus zur Kapsel. In den meisten Fällen ist das Hinterhorn über die akzessorischen menisko-femorale Ligamente, Lig. Humphrey und Lig.

Wrisberg, in der Nähe des hinteren Kreuzbandes mit dem medialen Femur verbunden [29].

Die Blutversorgung der Menisci stammt vorwiegend aus den inferioren und superioren Ästen der Ae. geniculares lateralis und medialis [3]. Aus den Ästen dieser Arterien wird innerhalb des synovialen und kapsulären Gewebes des Kniegelenkes ein zirkulär orientierter perimeniskaler Plexus gebildet, aus dem ein radiär angeordnetes Gefäßnetz über die Kapselanheftung des Meniskus dessen periphere Anteile versorgt. Anatomische Studien belegen, daß die periphere vaskuläre Penetration 10 bis 30% Breite des medialen und 10-25% Breite des lateralen Meniskus beträgt [3]. Zusätzliche Blutgefäße kommen aus der A. genicularis media, die mit ihren Ästen die Synovia über den hinteren und vorderen Ansätzen der Menisci versorgt, sowie aus dem vaskularisierten, die artikulären Oberflächen in der Peripherie die Menisci bedeckenden, synovialen Überzug [4].

Da mehr als 2/3 der Menisci keine Blutversorgung besitzen, muß die Ernährung der Meniskuszellen durch Diffusion oder durch ein wiederholtes mechanisches, durch Bewegungen bzw. Belastungen des Kniegelenkes stattfindendes Pumpen erfolgen [53]. Bird und Sweet haben in tierischen und humanen Menisci 10 bis 200 µm große Öffnungen beschrieben, die eine Nährstoff-Diffusion auch in die tieferen Schichten der dichten, fibrösen Meniskusmatrix ermöglichen sollen (Abb. 6) [9].

Die Präsenz neuraler Elemente in den Menisci wurde in zahlreichen anatomischen Studien nachgewiesen [15,76]. Neben myelinisierten und nicht-myelinisierten Nervenfasern, die hauptsächlich in den vorderen bzw. hinteren Insertionen sowie entlang der radiären Blutgefäße in der Peripherie der Menisci zu finden sind, wurden, auch außerhalb des Gefäßnetzes, Mechanorezeptoren wie Ruffini-Endigungen, Golgi-Apparate als auch Paccini-Körper im medialen Meniskus nachgewiesen [15,76]. Diesen Mechanorezeptoren, die hauptsächlich in den posterioren und anterioren Anteilen der Menisci liegen, wird eine wichtige afferente Funktion in der Propriozeption des Kniegelenkes v.a. bei extremer Flexion bzw. Extension zugeschrieben [76].

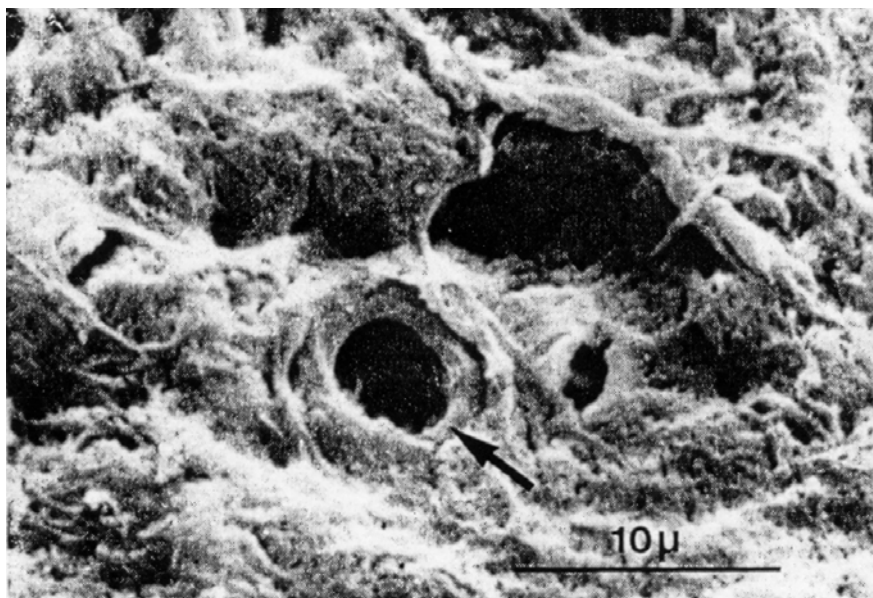


Abb. 6 Elektronenmikroskopisches Bild der Oberfläche eines Rinder-Meniskus mit Darstellung eines in die Tiefe penetrierenden Kanals. Aus [9]

2.1.2. Meniskus-Zusammensetzung

Die mechanische Funktion ist abhängig von den visko-elastischen Eigenschaften der Menisci, die ihrerseits von den Eigenschaften und Interaktionen der Gewebe-Komponenten und des Wassers abhängen [53]. Der Meniskus besteht aus Zellen und extrazellulärer Matrix, die aufgrund der Heterogenität der Belastung der einzelnen Meniskus-Regionen ebenfalls heterogen ist. Die vorwiegend durch Zug belasteten Meniskus-Regionen sind vor allem fibrös und enthalten vermehrt Dermatansulfat, während die hauptsächlich durch Druck belasteten Areale eher hyalin beschaffen sind und aus mehr Chondroitinsulfat bestehen [2]. Die Meniskus-Zusammensetzung ändert sich im Laufe des Lebens. Ghosh und Taylor fanden heraus, daß der Kollagen-Gehalt bis zum 30-ten Lebensjahr ansteigt, dann bis zum 80-ten Lebensjahr konstant bleibt, um danach abzunehmen, während die Konzentration der Proteoglykane von 20% nach der Geburt auf ca. 10% bis zum 60-ten Lebensjahr abnimmt [23,33].

2.1.2.1. Meniskus-Zellen

Die Zellen des Meniskus sind für die Herstellung und die komplizierte Organisation der extrazellulären Matrix des mechanisch extrem belasteten Meniskus verantwortlich [44]. Im Gegensatz zu den Chondrozyten des hyalinen artikulären Knorpels, war für lange Zeit nur sehr wenig über die Morphologie und Funktion der Meniskuszellen bekannt.

Historisch wurden die Meniskuszellen aufgrund der fibrösen Natur der Menisci als Fibroblasten bzw. Fibrozyten bezeichnet [48]. Erst Ghadially und seine Mitarbeiter klärten durch aufwendige licht- und elektronen-mikroskopische Arbeiten die Natur der Meniskuszellen auf [22]. Nach ihren Untersuchungen am Kaninchen- und am humanen Meniskus werden die Meniskuszellen als Chondrozyten klassifiziert, und zudem zwei sich nur relativ wenig unterscheidenden Zellpopulationen, den oberflächlichen und tiefen Meniskus-Chondrozyten zugeordnet. Die Anwesenheit zweier morphologisch nur unwesentlich unterschiedlicher Meniskus-Subpopulationen wird analog zu den unterschiedlichen Chondrozyten-Subpopulationen aus verschiedenen Zonen des artikulären Knorpels gesehen [44].

Ghadially et al. nannten folgende Gründe für ihre Ansicht über den chondrozytären Ursprung der Meniskuszellen:

1. Meniskuszellen besitzen eine runde oder ovale Form und sind deshalb morphologisch den Chondrozyten näher als den Fibroblasten. Die ovalen Meniskuszellen an der Meniskus-Oberfläche ähneln dabei den Chondrozyten in der tangentialen Zone des artikulären Knorpels.
2. Die Meniskuszellen besitzen, ähnlich wie die Chondrozyten, eine perizelluläre Matrix.
3. Die extrazelluläre Matrix des Meniskus ist hyalin, relativ fein und homogen.

Trotz dieser plausiblen Kriterien bleibt ein entscheidender Unterschied zwischen den Chondrozyten des hyalinen Knorpels und den Meniskuszellen bestehen.

Während im Meniskus hauptsächlich Kollagen Typ I vorkommt, ist im artikulären Knorpel Kollagen Typ II prädominant [44]. Aus diesem Grund haben Webber et al. für die Meniskuszellen die Bezeichnung Fibrochondrozyten eingeführt, welche die morphologischen und synthetischen Eigenschaften der Meniskuszellen am besten erfasst und welche sich deshalb bis heute durchsetzte [72].

2.1.2.1.1. oberflächliche Fibrochondrozyten

Die Zellen in der oberflächlichen Zone der Menisci sind oval bzw. fusiform und besitzen sehr kurze Zellausläufer (Abb. 7) [22]. Das eher reduzierte Zytoplasma lässt die Nuklei dieser Zellen groß und prominent erscheinen. Organellen wie Mitochondrien, Elemente des rauhen endoplasmatischen Retinakulums und Golgi-Komplexe sowie Lipid-Tröpfchen können gelegentlich identifiziert werden, Glykogen-Partikel werden nicht nachgewiesen.

2.1.2.1.2. tiefe Fibrochondrozyten

Die Mehrzahl der Zellen in den tiefen Meniskusschichten besitzen eine runde oder polygonale Form (Abb.7) [22]. Die meisten dieser Zellen sind solitär, es werden aber gelegentlich Zell-Paare oder Zell-Tripplets vorgefunden. Verglichen mit den Chondrozyten im hyalinen Knorpel, besitzen die tiefen Meniskuszellen nur wenig Zellausläufer oder pinozytische Vesikel. Dagegen sind die tiefen Fibrochondrozyten gut mit rauhem endoplasmatischem Retinakulum und Golgi-Komplexen ausgestattet und besitzen regelmäßig Mitochondrien.

Intrazytoplasmatische Lipidtröpfchen sowie einige Aggregate von Glykogen-Partikeln sind ebenfalls nachweisbar.

2.1.2.1.3. andere Meniskuszellen

Neben den Fibrochondrozyten werden in den vaskularisierten Arealen der Menisci kapilläre Endothelialzellen sowie gelegentlich Mastzellen gefunden. Die Endothelialzellen, die durch die Anwesenheit des Faktor VIII Antigens nachgewiesen werden, stammen offensichtlich aus den Gefäßen in der Peripherie der Menisci [72]. Miller und Rydell gelang es, die mikrovaskulären Endothelzellen aus Menisci zu isolieren und in Primärkultur zu halten [47].

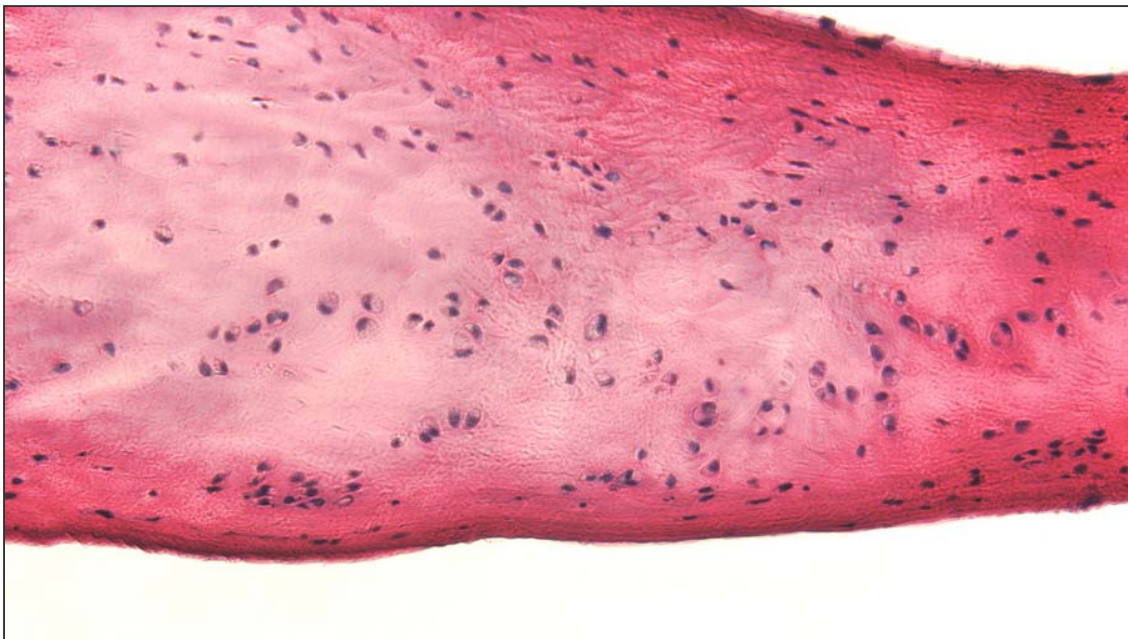


Abb. 7 Histologische Sektion eines Kaninchen-Meniskus mit Darstellung der oberflächlichen, flachen und tiefen, runden Fibrochondrozyten. H/E, x200

2.1.2.2. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix der Menisci besteht hauptsächlich aus fibrösen Elementen, Kollagenen und Elastin, aus Proteoglykanen, den nicht-kollagenen Matrix-Proteinen und aus Wasser (Abb. 8). Der Wassergehalt der Menisci beträgt etwa 74%, die Trockenmasse des Meniskus enthält ca. 75% Kollagen, 8-13% der nicht-kollagenen Proteine und 1% Hexosamine [2].

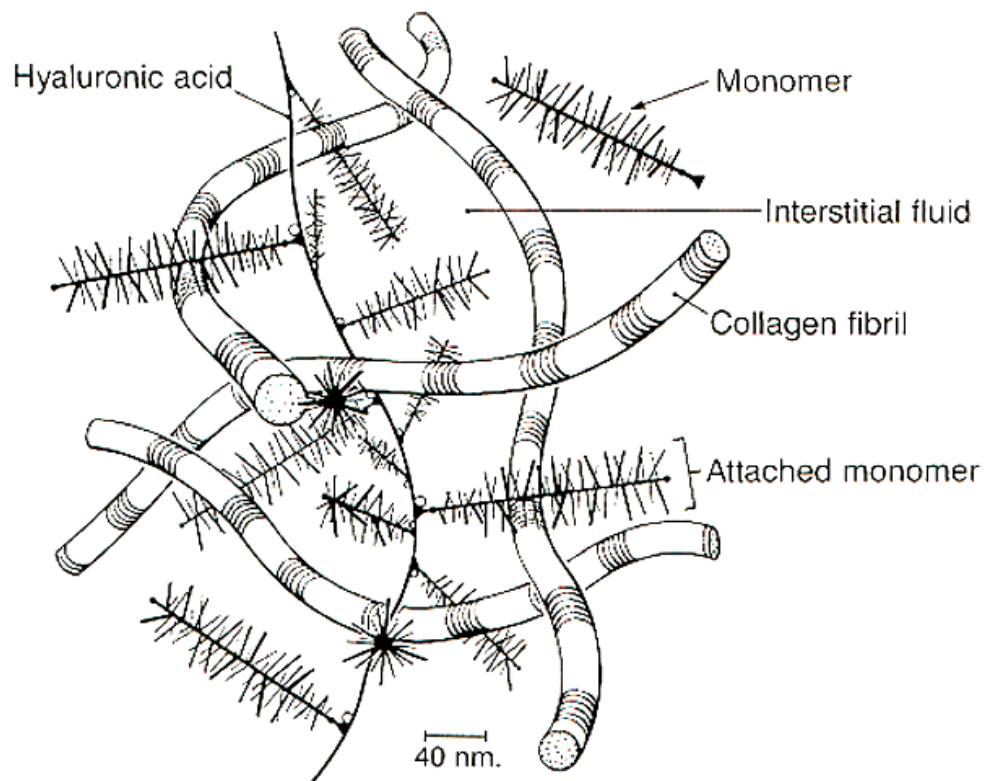


Abb. 8 Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix des Meniskus. Aus [51]

2.1.2.2.1. Kollagene Matrixproteine

2.1.2.2.1.1. Kollagene

Das Meniskusgewebe enthält mehrere verschiedene Kollagen-Typen, wobei der Anteil der Moleküle des Kollagen Typ I mehr als 90% der Trockenmasse beträgt. Erst durch die verbesserte Methodologie wurde demonstriert, dass neben dem Typ I Kollagen auch kleine Mengen an Typ II, III, V und VI im Meniskus vorhanden sind [2]. Die Kollagenfasern, die einzeln ca. 10 nm im Durchmesser betragen. (Kollagen Typ I) sind typischerweise entsprechend der mechanischen Belastung im Meniskus angeordnet (Abb. 9 und 10). Ein ca. 100 µm dickes Bündel der Kollagenfasern ist auf der Oberfläche des Meniskus angeordnet, während die meisten Kollagenfasern zirkulär im Meniskus-Korpus verlaufen und von einigen radiären Bündeln aus der Meniskus-Basis verstärkt werden [7].

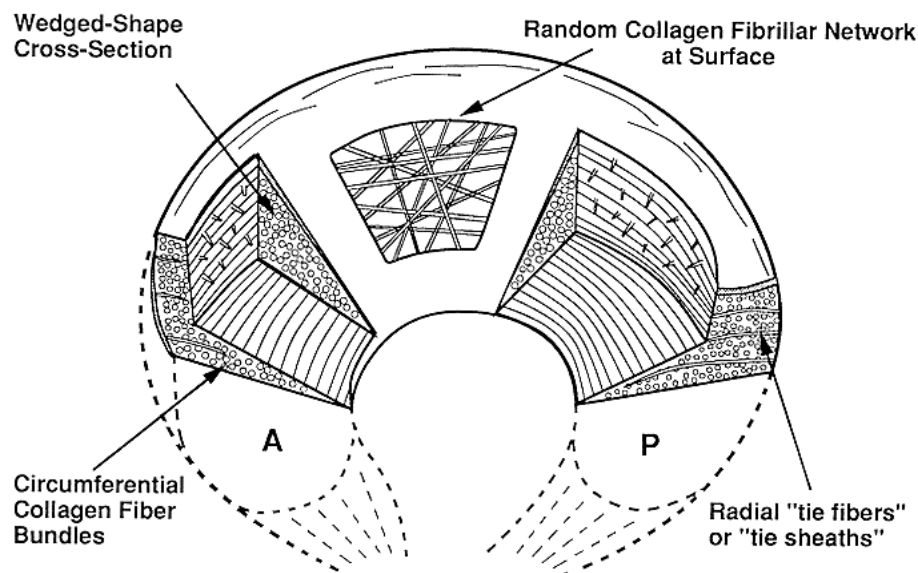


Abb. 9 Orientierung der Kollagenfasern des Meniskus. Aus [52]

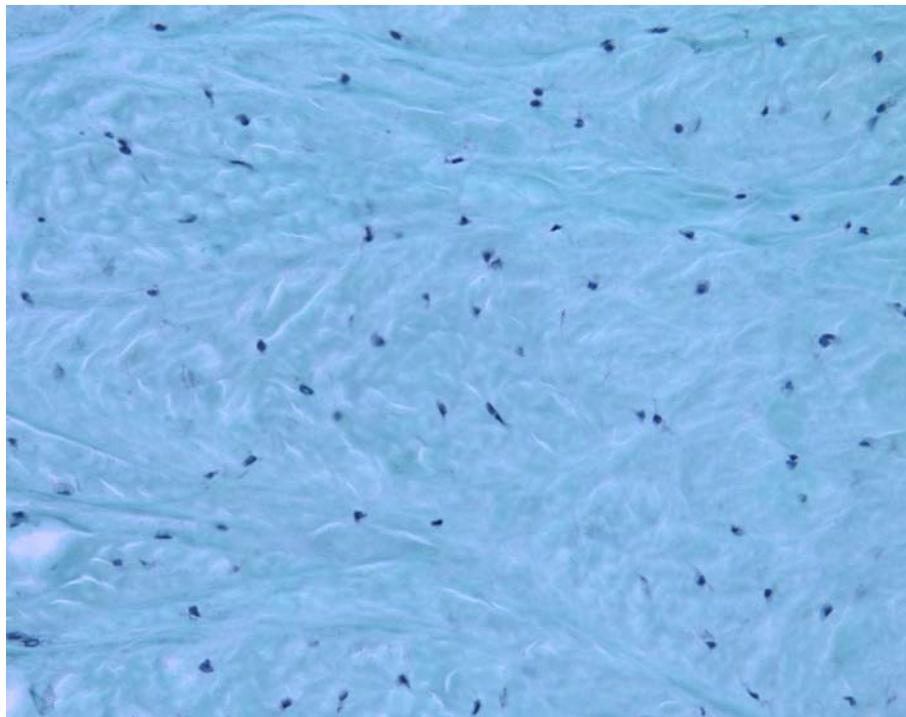


Abb. 10 Am histologischen Präparat erkennbare Längs- und Querschnitte der Kollagenfasern der Basis des Kaninchen-Meniskus. Safranin-O, x200

2.1.2.2.1.2. Elastin

Elastin repräsentiert mit 0.6% nur einen kleinen Anteil der kollagenen Proteine im humanen Meniskus. Elastin ist ein hoch-vernetztes und somit unlösliches Protein, das zusammen mit den elastischen Mikrofibrillen Bestandteil der elastischen Fasern des Meniskus ist. Mechanisch ähnelt Elastin einem Gummi: es kann ohne Bruch große Belastungen abfangen und springt nach Wegfall der Deformität unmittelbar zurück in die ursprüngliche Form. Demzufolge hat Elastin im Meniskus die Funktion der Formerhaltung, die durch die viel steiferen Kollagenfasern nicht gewährleistet wäre [23].

2.1.2.2.2. Nicht-kollagene Matrixproteine

2.1.2.2.2.1. Proteoglykane

Der Anteil der Proteoglykane an der Trockenmasse des Meniskus beträgt lediglich ca. 3%, sie besitzen jedoch die wichtige Funktion der Wasserspeicherung im Meniskus-Gewebe [50]. Proteoglykane gehören zu einer Familie von Makromolekülen, die durch eine oder mehrere Glycosaminoglykan-Ketten mit kovalenter Bindung zu einem Protein-Core charakterisiert sind (Abb. 11). Sie können in mehrere Unterfamilien in Abhängigkeit von der Struktur des Protein-Core, der Natur der Glycosaminoglykan-Ketten und der Fähigkeit nicht-kovalente Aggregate mit Hyaluronsäure zu bilden eingeteilt werden [28]. Grundsätzlich existieren im Knorpel, den Faserknorpel eingeschlossen, zwei Klassen der Proteoglykane: große, high-density und kleine low-density

Proteoglykane [2]. Die großen Proteoglykane besitzen ein großes Protein-Core mit vielen angehefteten Chondroitin-Sulfat und Keratan-Sulfat-Ketten. Diese Proteoglykane aggregieren mit der Hyaluronsäure und werden dadurch nicht nur zu extrem hydrophilen, wasserbindenden Strukturen sondern erfüllen gleichzeitig viskoelastische Funktionen im Meniskus [50].

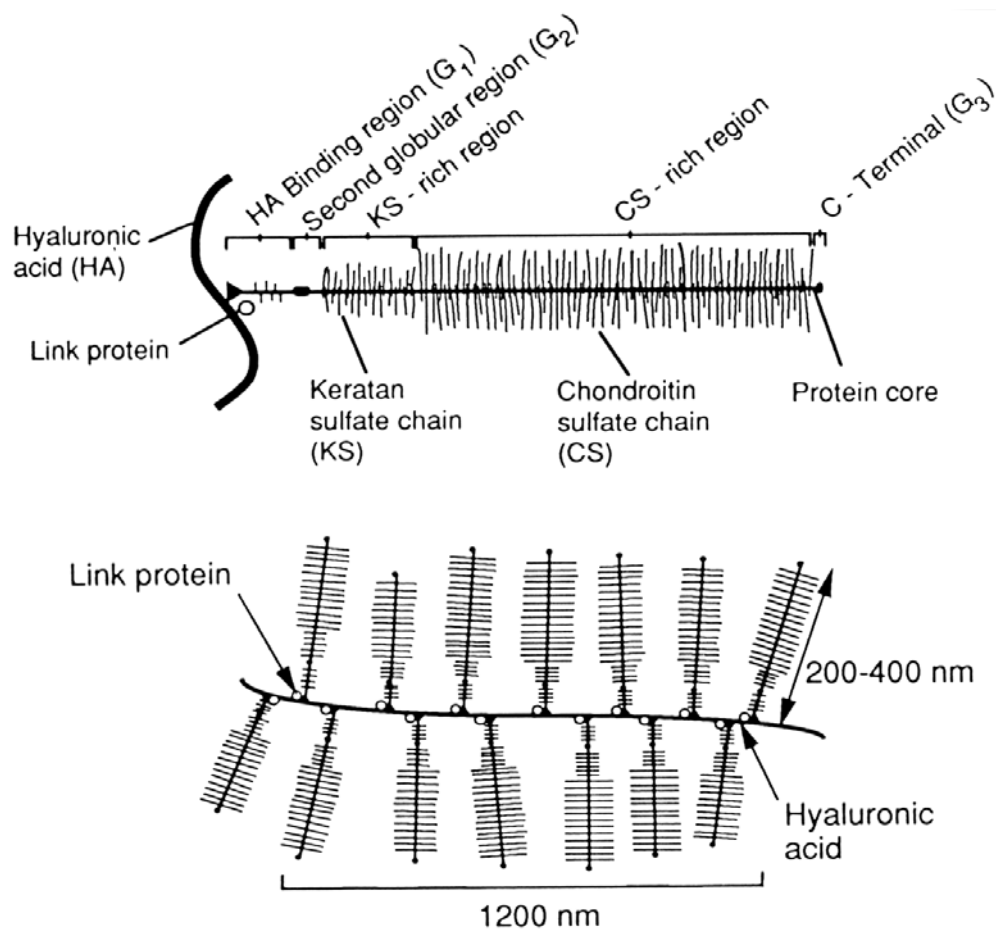


Abb. 11 Schematische Darstellung der meniskalen Proteoglykan-Struktur.

Aus [2]

Die kleinen Proteoglykane enthalten lediglich eine bzw. zwei Glykosaminoglykan-Ketten (und heißen Decorin bzw. Biglykan), die entweder aus Chondroitin-Sulfat oder aus Dermatan-Sulfat bestehen können. Sie verleihen ebenfalls, durch physiko-chemische Prozesse bedingt, dem Faserknorpel die wichtigen mechanischen Funktionen, die der Meniskus bei den Belastungen im Kniegelenk benötigt.

2.1.2.2.2. andere Matrixproteine

Zahlreiche Matrixproteine, wie Fibronectin, Thrombospondin und andere Zelladhäsionsmoleküle, wurden inzwischen aus dem Meniskusgewebe isoliert [2,44]. Das Link-Protein stabilisiert bekanntlich Proteoglykan-Hyaluronat-Aggregate und ist demzufolge in relativ großen Mengen in der Meniskus-Matrix anwesend. Ein von Fife isoliertes Protein von 116 kDa Größe besitzt einen Anteil von 3,5% der Meniskus-Proteine, seine Funktion wurde jedoch bis jetzt noch nicht aufgeklärt [19].

2.1.3. Meniskus-Regeneration

Meniskus-Regeneration war für lange Zeit ein Gegenstand kontroverser Diskussionen [6,39,59]. Während die einen, wie Smilie, nach totaler Meniskektomie ein fast perfektes Regenerat des Meniskus vorfanden, war für die anderen, wie Sir Robert Jones, nicht einmal eine Spur von Regeneration des Meniskus in humanen Kniegelenken nachgewiesen worden [39,59]. Tatsächlich

kommt es, wenn die Exzisionsgrenze bis in die vaskularisierte Zone des verletzten Meniskus reicht, zur Ausbildung eines meniskus-ähnlichen Regenerates aus Faserknorpel, wie Burr und Radin in allen Fällen von 22 Patienten zehn Jahre nach kompletter Meniskektomie zeigen konnten [12]. Die Bedingung für den Regenerationsprozess ist jedoch eine, aus dem durchbluteten Exzisionsrand des Meniskus erfolgte Blutung und nachfolgende Bildung eines zunehmend organisierten Blutgerinnsels [6]. Die Diskussion über die Bildung des Regenerats nach Meniskektomie verlor allerdings bis heute an Bedeutung. Das Ersatzgewebe kann die biomechanischen Anforderungen des Meniskus nicht erfüllen und eine Meniskektomie führt mit und ohne die Bildung eines Meniskus-Regenerats zur Entstehung einer Gonarthrose [17,34,55,64].

2.1.3. Meniskusheilung

Risse in den avaskulären Regionen der Menisci können unter normalen Bedingungen nicht heilen [37]. Ursprünglich wurde auch angenommen, dass Meniskuszellen ohne Blutversorgung zu reparativen Prozessen, wie Proliferation und Synthese von Matrixbestandteilen, nicht fähig sind. Seit Webber et al. jedoch demonstrierten, dass meniskale Fibrochondrozyten, wenn sie chemotaktischen und mitogenen Zytokinen exponiert werden, die normalerweise im Wundhämatom vorhanden sind, proliferieren, extra-zelluläre Matrix produzieren und in die Meniskuswunde einwandern können, wird die Verwendung von Wachstumsfaktoren zur Anregung der Heilungsvorgänge im Meniskus untersucht

[72,75]. Das Prinzip der Heilung in der avaskulären Region des Meniskus ist, Verhältnisse wie bei der normalen Wundheilung zu erreichen [6]. Die Einblutung in eine Wunde ermöglicht die Bildung eines Fibringerinnsels, das zum einen die Funktion eines defekt-füllenden Scaffolds in der Wunde übernimmt und zum anderen Zytokine, wie das Platelet-derived growth factor (PDGF) oder Fibronectin produziert, die als chemotaktische bzw. mitogene Stimula für die einwandernden Reparaturzellen die Heilung unterstützen. Durch Herstellung von aus der vaskulären in die avaskuläre Zone des Meniskus reichenden künstlichen Kanälen konnte Heilung auch in den zentralen Regionen des Meniskus an Hunden erzielt werden [4]. Mit der Interposition eines Fibringerinnsels, und somit Nachahmung der physiologischen Wundheilung, konnte im Tierexperiment an Hunden die Heilungsrate von Meniskusrissen in der avaskulären Zone signifikant verbessert werden [5]. Eine zusätzliche Kombination des Fibringerinnsels mit dem Endothelial growth factor (EGF) steigert weiter den Heilungseffekt im avaskulären Teil des Meniskus durch Zunahme der Neovaskularisation und Mehrbildung von Granulationsgewebe [27].

2.2. Wachstumsfaktoren

2.2.1. Definition

Basierend auf den Forschungserkenntnissen der letzten 20 Jahre wurden zahlreiche, auf der Molekularebene der Heilungsprozesse entscheidend mitwirkende Substanzen, sogenannte Wachstumsfaktoren, definiert [67]. Die

Wachstumsfaktoren sind kleine Proteine und Peptide, die entweder von ortsspezifischen Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Mesenchymzellen oder von einwandernden Reparatur- und Entzündungszellen wie Thrombozyten, Makrophagen und Monozyten nach entsprechender Signalwirkung synthetisiert werden können. Diese Zytokine können Gewebszellen zu Proliferation, Migration und gesteigerter Matrix-Synthese stimulieren oder ihre Differenzierung steuern [14,67]. Zwischenzeitlich wurde der stimulierende Effekt verschiedener Wachstumsfaktoren in den einzelnen Geweben des Bewegungsapparates unter in-vitro und in-vivo Bedingungen im Experiment demonstriert [67].

2.2.2. Meniskus-spezifische Wachstumsfaktoren

Den ersten indirekten Hinweis auf die Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Regenerationsfähigkeit des Meniskus (Tab. 1) lieferten Webber et al. in den 80-er Jahren [72,74]. Sie konnten zunächst demonstrieren, dass durch Zugabe von Fibroblast growth factor (FGF) oder eines Plättchen-Lysats zu Kaninchen-Fibrochondrozyten deren Proliferation in serumfreien Medium signifikant gesteigert werden konnte [72]. Die gleiche Arbeitsgruppe wies später eine mitogene Wirkung auf die Fibrochondrozyten des Kaninchen auch für das Platelet-derived growth factor (PDGF) nach [74]. Das PDGF ist ein Zytokin, welches eine fundamentale Rolle bei Entzündung und Wundheilung spielt [56]. Es ist in hohen Konzentrationen in den Thrombozyten vorhanden und wird in der Frühphase der Wundheilung in großen Mengen freigesetzt, wo es v.a. auf

einwandernde Fibrozyten mitogen wirkt. Eine ausgeprägte Proliferationsstimulation von PDGF auch auf Fibrochondrozyten konnte inzwischen von Webber et al (Kaninchen), Spindler et al. (Schaf), Bhargava et al. (Rind) und von Kasemkijwattana (Kaninchen) belegt werden [8,37,61,74], zusätzlich wurden auch ein chemotaktischer Effekt und Stimulation der Matrixsynthese demonstriert [8,37]. Kasemkijwattana et al. haben den Effekt verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Fibrochondrozyten der Kaninchen untersucht und dabei Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor α (TGF- α), FGF und PDGF für die Stimulation der Proliferation und EGF, TGF- α und PDGF für die Steigerung der Matrixsynthese empfohlen [37]. Von Bhargava et al., der die Auswirkungen von Zytokinen auf die Proliferation und Migration der bovinen Fibrochondrozyten evaluierte, wurden insbesondere PDGF, Hepatocyte growth factor (HGF) und Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) dosisabhängig für die mitogene Stimulation der Meniskuszellen wirksam. PDGF, HGF, BMP-2, IGF-1 und EGF zeigten zusätzlich in unterschiedlichem Ausmaß in Abhängigkeit der Zell-Lokalisation (periphere-mittlere-zentrale Zone des Meniskus) eine signifikante chemotaktische Wirkung auf die bovinen Fibrochondrozyten. Hashimoto et al. konnten eindrucksvoll zeigen, dass durch Kombination von Fibrinkoagel mit dem Endothelial growth factor (EGF) die Bildung des reparativen Granulationsgewebes durch signifikante Steigerung der Neovaskularisation in den avaskulären Arealen der Hunde-Menisci verbessert wurde [27].

Eine Studie, die den direkten Effekt von Zytokinen auf humanen Fibrochondrozyten untersucht, wurde bisher nicht präsentiert. In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal die Auswirkungen von Wachstumsfaktoren auf menschliche Meniskuszellen aufgezeigt.

	Proliferation	Matrixsynthese	Migration
IGF-1		+	+
bFGF	+	+	
PDGF	+	+	+
EGF	+	+	+
TGF-α	+	+	
TGF-β		+	
BMP-2	+		+
HGF	+		+

Tabelle 1: Die biologische Wirksamkeit von Wachstumsfaktoren am Meniskus
[8,14,24,27,37,61,72]

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Prinzip der Trennung der oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten

3.1.1. Gewinnung der Kaninchen-Menisci

Vier weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2 bis 2,5 kg wurden durch eine intrakardiale Pentobarbital-Injektion (Abbott Laboratories, USA) geopfert. Die Kniegelenke wurden unter aseptischen Bedingungen eröffnet, die lateralen und medialen Menisci entfernt und in sterile physiologische Lösung, Gey's Balanced Salt Solution (GBSS, Life Technologies, USA) gelegt (Abb. 12). Dadurch wurden 16 Kaninchen-Menisci erhalten.

Nach scharfer Abtrennung der Meniskus-Ansätze sowie des adhärennten Kapselgewebes wurden die Menisci erneut mit GBSS gewaschen und in kollagen-beschichteten Kulturflaschen im Medium (Ham's F12 Medium (Gibco, USA)+ 10% FBS (fetales bovines Serum; Gibco, USA)+ 1% P/S (Penicillin/Streptomycin; Gibco, USA) mit 3-tägigem Wechsel bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

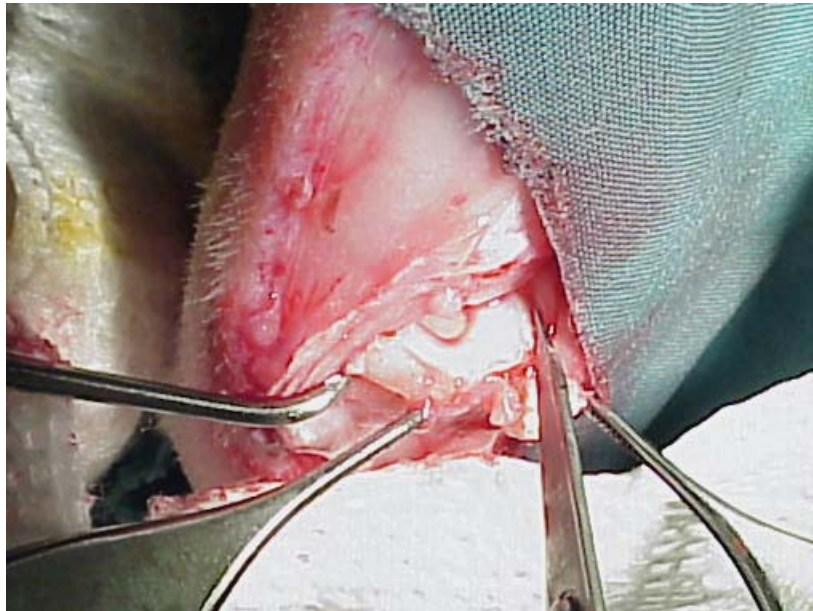


Abb. 12 Sterile Entnahme des kompletten medialen Meniskus aus dem Kniegelenk des Kaninchen

3.1.2. Untersuchung der Kaninchen-Menisci in Gewebekultur

Der Boden der Kulturflaschen mit den gezüchteten Menisci wurden 3-tägig, jeweils vor dem durchgeführten Mediumwechsel lichtmikroskopisch untersucht. Nach 1, 2, 3 und 4 Wochen in Gewebekultur wurden jeweils 4 Menisci für 4 Stunden in einer 0,05%-igen MTT-Lösung bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA) ist ein gelb-gefärbtes Tetrazolium-Salz, das in den Mitochondrien biologisch aktiver, also intakter Zellen, durch Succinat-Dehydrogenase zu einem blau-gefärbten Formazan-produkt umgewandelt wird, um sodann histologisch nachweisbar zu sein [46,70]. MTT wurde bisher hauptsächlich in Zellkulturen zum Nachweis von

Vitalität verwandt [46]. Wie sich jedoch in meinen Untersuchungen zeigte, diffundiert dieser Farbstoff in-vitro innerhalb von ca. 30 Minuten durch den gesamten Meniskus und kann somit auch zum Färben vitaler Zellen in der Gewebekultur des Kaninchen-Meniskus verwendet werden. Innerhalb der 4-stündigen Einwirkzeit wurden alle intakten Fibrochondrozyten in den inkubierten Menisci mittels MTT durch Blaufärbung markiert, während tote oder metabolisch inaktive Zellen ungefärbt blieben.

Die Menisci wurden anschließend im PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Gibco, USA) kurz gewaschen und in Flüssigstickstoff gefroren. Nach Anfertigung von 7 µm dicken Gefrierschnitten und Fixation mit Gluteraldehyd (0.5%; Sigma, USA) für 1 min, wurden alle Zellkerne der Präparate durch Zugabe von 20 µl von Ethidium Bromid (ETB) (10 ng/ml; Molecular Probes, USA) unter das Deckglas Fluoreszenz-gefärbt. Ethidium Bromid ist ein DNA-Farbstoff, der bei Anregung mit grünem Licht die Zellkerne von Zellen in histologische Präparaten rot-leuchten lässt [68].

Die durch MTT und ETB erreichte Doppelfärbung der Meniskus-Präparate wurde sofort unter dem Licht- und Fluoreszenzmikroskop beurteilt und dokumentiert (Abb. 13). Mit dem Lichtmikroskop wurden alle vitalen Fibrochondrozyten der Menisci durch MTT-Blaufärbung dargestellt, während bei Umschaltung auf Fluoreszenz im gleichen Blickfeld alle Zellkerne der Menisci durch Rot-Emission (ETB) erkennbar waren.



Abb.13 Mikroskopie-Arbeitsplatz, der simultane licht- und fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der Meniskus-Schnitte und gleichzeitig deren digitale Verarbeitung sowie Speicherung ermöglichte

3.2. Proliferation der humanen Fibrochondrozyten

3.2.1. Patienten

Eine große Meniskusbiopsie wurde von 6 Patienten, 2 Frauen und 4 Männern, im Alter zwischen 24 und 44 Jahren (Mittelwert 34 Jahre) gewonnen, bei welchen

wegen eines irreparablen Meniskus-Korbhenkelrisses in der avaskulären Zone des Meniskus eine arthroskopische Meniskus-Teilresektion (4x lateraler, 2x medialer Meniskus) unternommen wurde (Abb. 14).

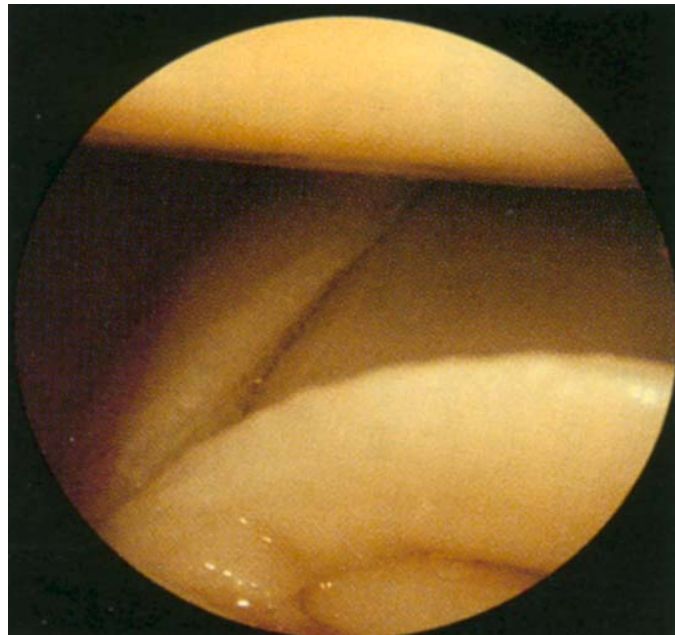
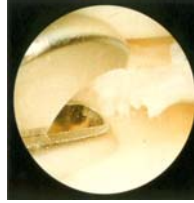


Abb.14 Arthroskopisches Bild einer Meniskus-Korbhenkelruptur

Die gewonnenen Meniskus-Lappen wurden sofort in ein steriles Nährmedium (Ham's F12 Medium + 10% FBS + 1% P/S) plaziert und innerhalb von 20 min zur Inkubation in eine 37°C/5% CO₂ Atmosphäre gebracht (Abb. 15).

Abb. 15 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

Arthroskopie (Meniskusresektion)



Gewebekultur

3 Wo



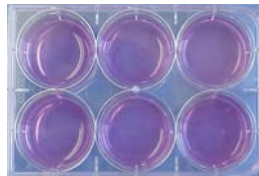
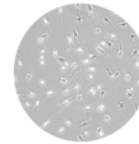
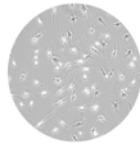
Extraktion

(Trypsin/Kollagenase I)

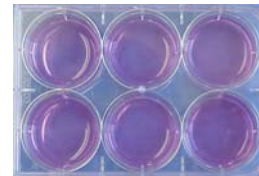


oberflächliche Fibrochondrozyten

tiefe Fibrochondrozyten



Zellkultur (2 Passagen)



Wachstumsfaktoren (IGF-1, TGF α , VEGF)

96 h

Zellzählung (Coulter Counter)

3.2.2. Isolierung der Fibrochondrozyten

Die Menisci wurden in Gewebekultur unter 3-tägigem Medium-Wechsel gehalten. Wie bereits unter 3.1. beschrieben und an Kaninchen-Menisci dargestellt, kam es innerhalb von 3 Wochen zum Abwandern der oberflächlichen Fibrochondrozyten auf den Boden der kollagen-beschichteten Kulturflaschen, während die tiefen Fibrochondrozyten im Meniskusgewebe verblieben.

Nach drei Wochen wurden die Menisci aus der Kulturflasche entfernt und die tiefen Fibrochondrozyten in Anlehnung an das Protokoll von Green gewonnen [26]. Unter Einhaltung von sterilen Kautelen wurden die Menisci mit einem Skalpell (Größe 15) in kleinst-mögliche Stücke geschnitten und für 30 Minuten trypsinisiert (Trypsin, 0.2% Gewicht/Volumen). Danach wurde das zerkleinerte Meniskusgewebe für 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert und mit Kollagenase Typ I (0.2% Gewicht/Volumen) auf einem Shaker für 6 Stunden inkubiert [26]. Die bei dieser enzymatischen Andauung herausgelösten tiefen Fibrochondrozyten wurden vom restlichen Debris über ein feines Nylonnetz getrennt, und nach 3-maligem Waschen/Zentrifugation in einer Kulturflasche im Medium (Ham's F12 Medium + 10% FBS + 1% P/S) mit 3-tägigem Wechsel entsprechend der aus dem Meniskus abgewanderten oberflächlichen Fibrochondrozyten gezüchtet [37].

3.2.3. Messung der Proliferation

Nach zwei Passagen im Kulturmedium wurden die oberflächlichen und die tiefen meniskalen Fibrochondrozyten auf 6-well Zellkulturplatten (je 100,000 Zellen) und in Ham's F-12 Medium und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) ohne fetales bovines Serum inkubiert. Nach 24 Stunden wurden humanes rekombinantes Insulin-like growth factor-1 (IGF-1; Gibco, USA), humanes rekombinantes Transforming growth factor α (TGF α ; Gibco, USA) und humanes rekombinantes Vascular endothelial growth factor (VEGF; Gibco, USA) in jede Zellkulturschale in 6 verschiedenen Konzentrationen (0, 0.01, 0.1, 1, 10 und 100 ng/ml/ Zellkulturschale) zugefügt. Nach 96 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst und im Coulter Counter maschinell gezählt. Der Versuch wurde pro Wachstumsfaktor, Konzentration und Zeitpunkt viermal wiederholt und für jede Zell-Linie gleichzeitig mit dem Kulturmedium (Ham's F-12 Medium mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)) durchgeführt.

3.2.4. Statistische Analyse

Die zwischen einzelnen Wachstumsfaktor-Konzentrationen und den beiden Fibrochondrozyten-Populationen gemessenen Differenzen wurden mit der Ein-Faktor-Varianzanalyse (multiple Vergleiche) mit Hilfe des Stat View Statistikprogrammes (Stat View 512+; Brain Power, USA) analysiert. Das Signifikanzniveau wurde bei mindestens $p < 0,05$ angesetzt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Verhalten der Menisci in Gewebekultur

4.1.1. abwandernde Fibrochondrozyten

Eine Woche nach Platzierung der Kaninchen-Menisci in der Gewebekultur begannen Zellen vom Meniskus-Gewebe auf den Boden der kollagen-beschichteten Kulturflasche abzuwandern (Abb. 16).



Abb. 16 Oberflächliche Fibrochondrozyten, die von einem Meniskus in Gewebekultur nach der 2-ten und 3-ten Woche auf den kollagen-beschichteten Boden der Kulturflasche abgewandert sind

Die licht- und fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Meniskus-Gefrierschnitte nach 1, 2, 3 und 4 Wochen zeigte, dass es sich bei den abgewanderten Zellen ausschließlich um Fibrochondrozyten aus den oberflächlichen Schichten der Menisci handelt (Abb. 17, 18 und 19)

4.1.2. oberflächliche Schichten des Meniskus

Die histologische Darstellung der oberflächlichen Schichten der avaskulären Anteile der Menisci zeigte nach 1 Woche eine zu den tieferen Schichten des Meniskus relativ hohe Anzahl von oberflächennahen Fibrochondrozyten (Abb. 17). Durch die Doppel-Färbung, die licht-mikroskopisch die Darstellung selektiv vitaler Zellen und simultan fluoreszenz-mikroskopisch die Darstellung aller Zellkerne ermöglichte, war zu diesem Zeitpunkt die Vitalität aller Meniskuszellen vorhanden (Abb. 17A).

2 Wochen nachdem die Präparate in die Gewebekultur gebracht worden waren zeichnete sich die Abwanderung der oberflächlichen Fibrochondrozyten durch abnehmende Dichte der Zellen, durch Vorkommen loser Zellen auf der Meniskus-Oberfläche und auf dem Boden der Kulturflaschen ab (Abb. 16 und 18).

Nach 3 und 4 Wochen sind die Fibrochondrozyten aus den oberflächlichen Zonen der Menisci weitgehend abgewandert, während in den tieferen Schichten die Anzahl der Zellen unverändert blieb (Abb. 19). Durch den direkten Vergleich zwischen der MTT- und ETB-Färbung wurden einzelne oberflächliche avitale,

jedoch keine vitalen Fibrochondrozyten in den oberflächlichen Schichten des Meniskus dargestellt (Abb. 19B).

Dies demonstriert, dass die Mehrzahl der in den oberflächlichen Schichten der avaskulären Zonen des Kaninchen-Meniskus gelegenen Fibrochondrozyten innerhalb der ersten 3 Wochen in Gewebekultur auf den Boden der Kulturflaschen abwandern.

4.1.3. tiefe Schichten des Meniskus

Die histologische Darstellung der tiefen Schichten der avaskulären Anteile der Menisci zeigte eine zu allen Untersuchungszeitpunkten unveränderte Dichte der Fibrochondrozyten (Abb. 20 und 21). Durch die Doppel-Färbung, die lichtmikroskopisch die Darstellung selektiv vitaler Zellen und simultan fluoreszenzmikroskopisch die Darstellung aller Zellkerne ermöglichte, war zu allen Zeitpunkten die Vitalität sämtlicher dargestellter Meniskuszellen vorhanden (Abb. 20A und 21A).

Es wurde somit demonstriert, daß die in den tiefen Schichten der avaskulären Zonen des Kaninchen-Meniskus gelegenen Fibrochondrozyten nicht abwandern und bis zur 4 Wochen in Gewebekultur mit 10%-igem FBS vital bleiben.

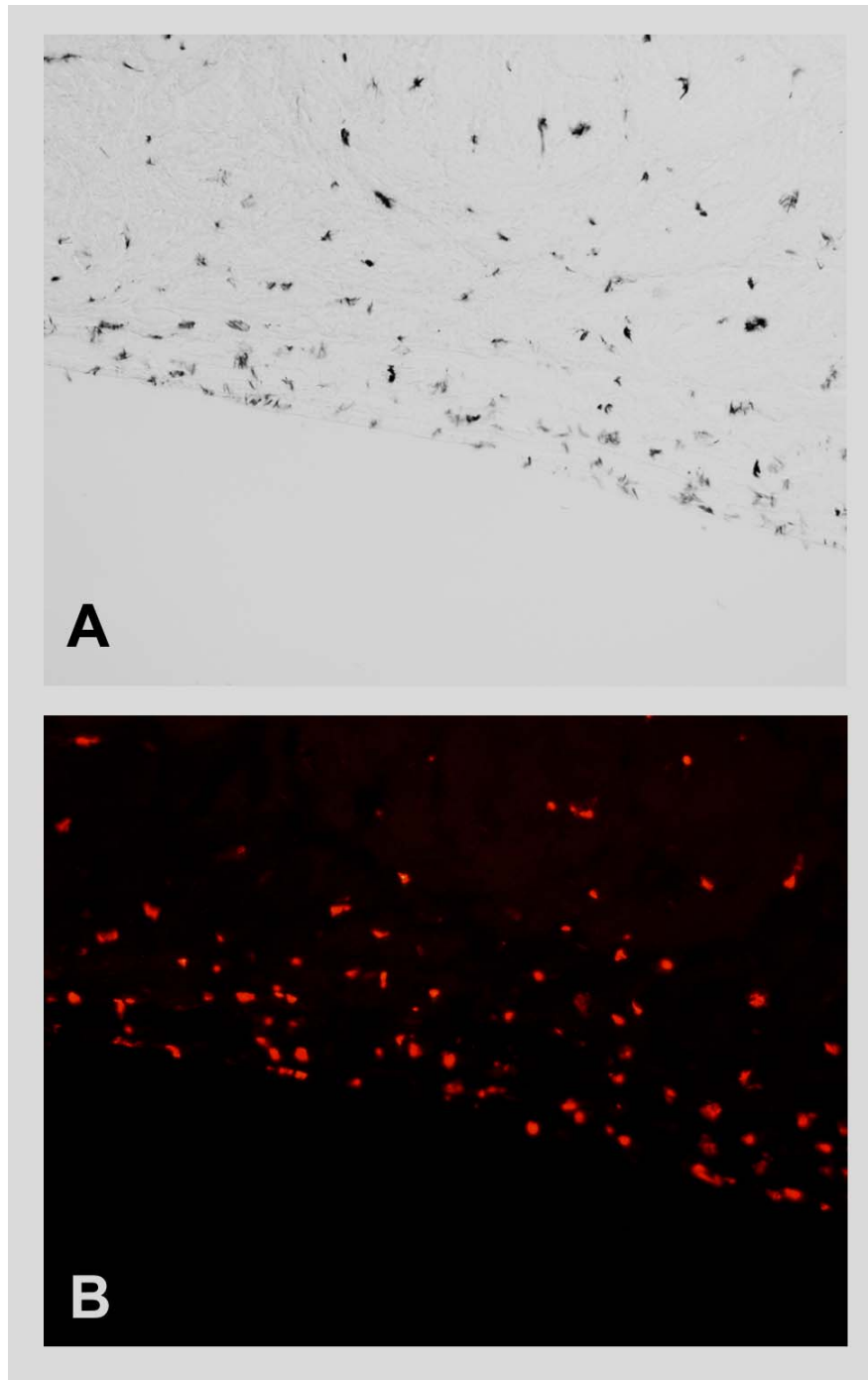


Abb. 17 Oberflächliche Schichten der avaskulären Zone des Meniskus nach 1 Woche in Gewebekultur: eine zu den tieferen Zonen relativ hohe Anzahl oberflächlich gelegener vitaler Fibrochondrozyten. A: dunkelgefärbte vitale Zellen (MTT-Färbung), B: rot-fluoreszierende Zellkerne der Zellen (ETB-Färbung)

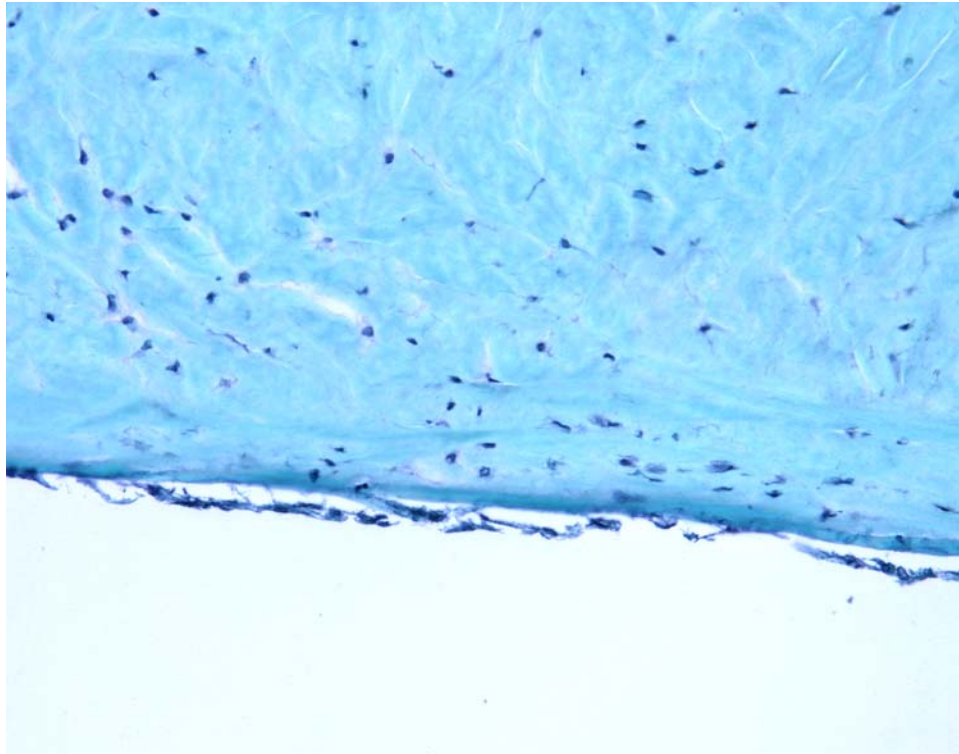


Abb. 18 Von der Oberfläche der avaskulären Zone des Meniskus nach 2 Wochen in Gewebekultur abwandernde oberflächliche Meniskuszellen. Safranin-O Färbung

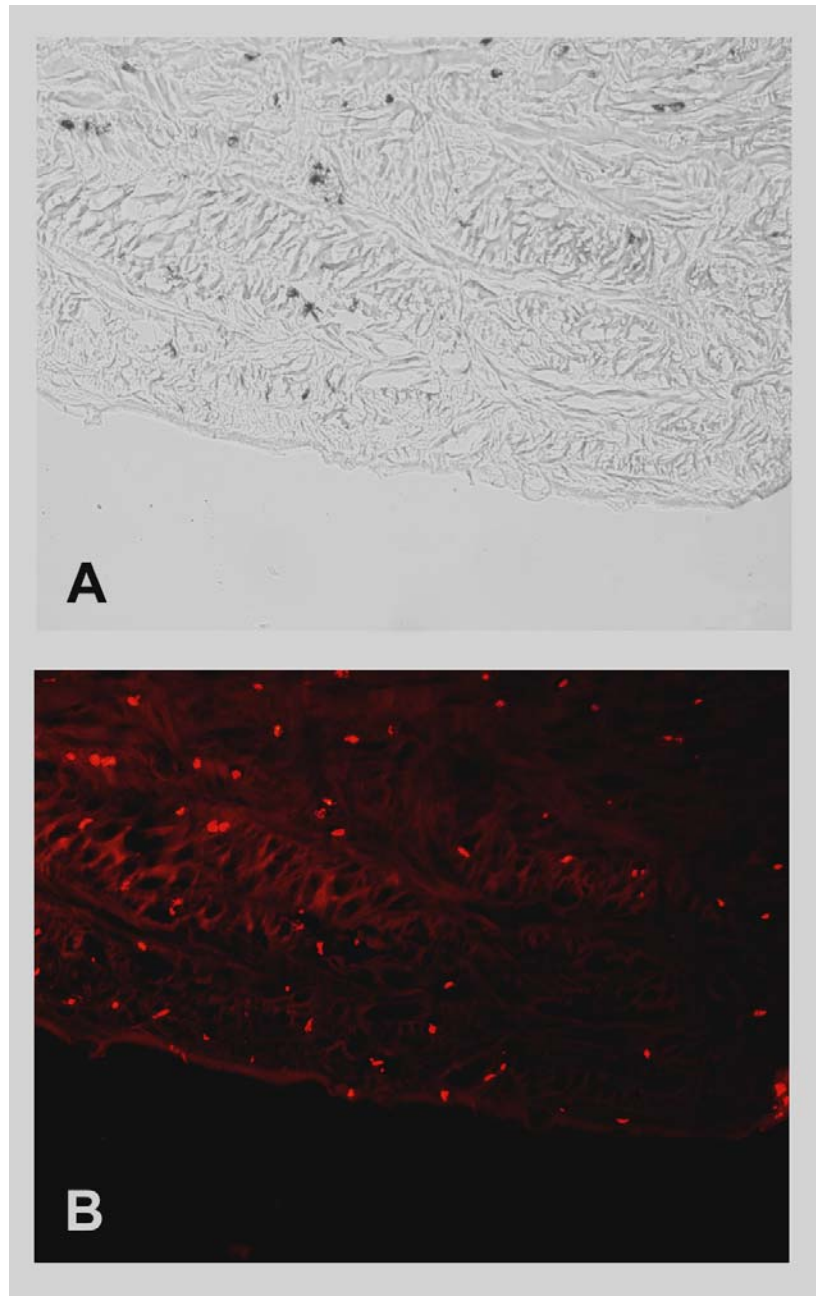


Abb. 19 Oberflächliche Schichten der avaskulären Zone des Meniskus nach 3 Woche in Gewebekultur: weitgehend Abwesenheit von vitalen, oberflächlich gelegenen Fibrochondrozyten. A: dunkelgefärbte vitale Zellen nur in den tieferen Schichten des Präparats (MTT-Färbung), B: rot-fluoreszierende Zellkerne der Zellen (ETB-Färbung), die einige avitale Zellen an der Meniskus-Oberfläche darstellen

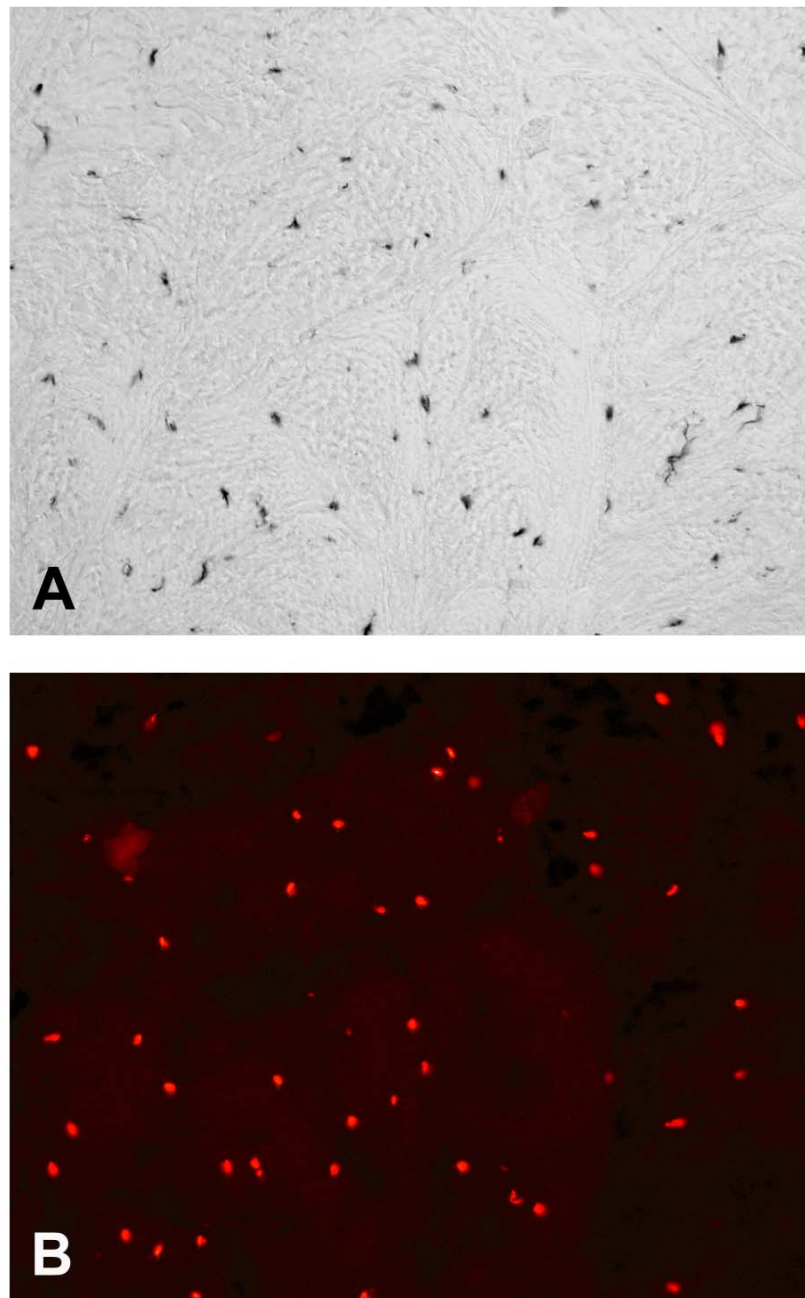


Abb. 20 Tiefe Schichten der avaskulären Zone des Meniskus nach 1 Woche in Gewebekultur: durch den direkten Vergleich zwischen MTT- und ETB-Färbung ist kein Untergang der unregelmäßig verteilten Fibrochondrozyten erkennbar. A: dunkelgefärbte vitale Zellen (MTT-Färbung), B: rot-fluoreszierende Zellkerne der Zellen (ETB-Färbung)

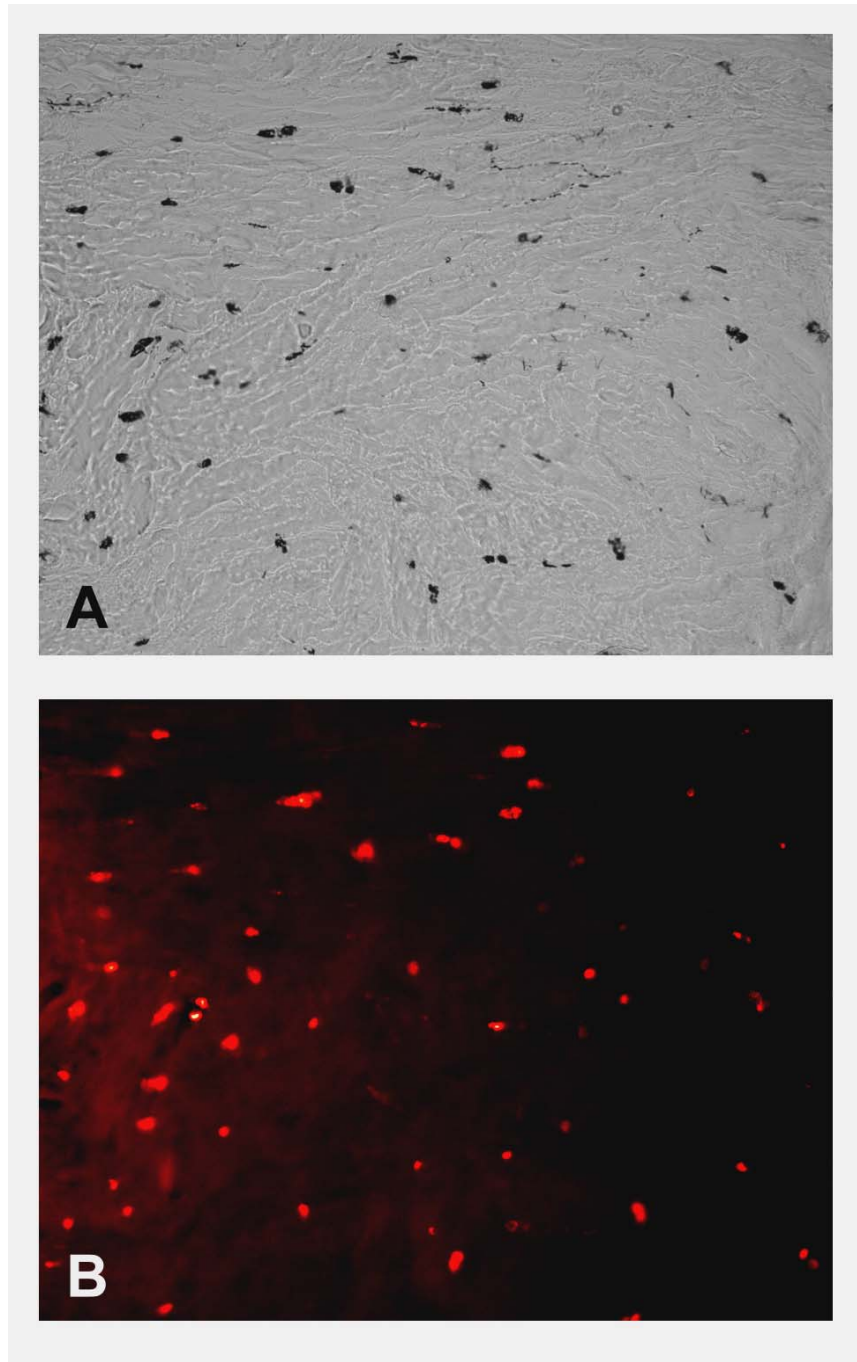


Abb. 21 Tiefe Schichten der avaskulären Zone des Meniskus nach 3 Wochen in Gewebekultur: keine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den 1-Wochen-Histologien, kein Untergang der unregelmäßig verteilten Fibrochondrozyten nachweisbar. A: dunkelgefärbte vitale Zellen (MTT-Färbung), B: rot-fluoreszierende Zellkerne der Zellen (ETB-Färbung)

4.2. Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der humanen Fibrochondrozyten

Nach 96 Stunden Inkubationszeit mit den drei verschiedenen Wachstumsfaktoren wurde ein unterschiedlicher Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der Fibrochondrozyten aus den verschiedenen avaskulären Zonen des humanen Meniskus festgestellt (Tab. 2 und 3; Abb. 22 und 23)

4.2.1. TGF α

Bei Stimulation der humanen Fibrochondrozyten durch TGF α war die Proliferation sowohl oberflächlicher als auch tiefer Zellen für alle Konzentrationen des Wachstumsfaktors signifikant gesteigert (Abb. 24). Die mitogene Wirkung von TGF α war bei den oberflächlichen Fibrochondrozyten dabei ausgeprägter als bei den tief gelegenen Meniskuszellen und war etwa mit der mitogenen Wirkung des mitgetesteten 10%-igen Serums vergleichbar. Der Unterschied zwischen beiden Zell-Populationen war jedoch nicht signifikant.

4.2.2. VEGF

Bei Stimulation der humanen Fibrochondrozyten durch VEGF war nur die Proliferation tiefer Zellen konzentrationsabhängig signifikant gesteigert, während die mitogene Wirkung dieses Wachstumsfaktors bei den oberflächlichen Fibrochondrozyten nicht signifikant war (Abb. 25). Der

mitogene Effekt des VEGF war dabei in der tiefen Ebene etwa mit der mitogenen Wirkung des mitgetesteten 10%-igen Serums vergleichbar.

4.2.3. IGF-1

Die Proliferation der oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten war durch Zugabe von IGF-1 nicht signifikant verändert, obwohl tendenziell zumindest für die Population der tiefen Fibrochondrozyten eine mitogene Wirkung gemessen wurde (Abb. 26).

ng/ml	TGF α	VEGF	IGF
0	98.929 \pm 37.705	117.103 \pm 36.006	117.910 \pm 50.720
0.01	125.401 \pm 48.981	142.813 \pm 50.966	138.830 \pm 53.952
0.1	143.570 \pm 44.641	142.804 \pm 55.089	135.383 \pm 68.019
1	145.424 \pm 53.273	156.098 \pm 55.723	138.253 \pm 72.814
10	158.365 \pm 35.948	146.061 \pm 46.891	136.403 \pm 67.724
100	166.100 \pm 38.779	150.683 \pm 41.095	124.920 \pm 65.234

Tabelle 2 Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Zellzahl-Messung 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den oberflächlichen Regionen humaner Menisci mit Wachstumsfaktoren

ng/ml	TGF α	VEGF	IGF
0	118.491 \pm 26.720	151.933 \pm 64.502	133.188 \pm 37.924
0.01	135.008 \pm 39.704	192.789 \pm 59.285	140.738 \pm 52.871
0.1	166.844 \pm 58.688	222.407 \pm 44.871	142.871 \pm 43.402
1	146.698 \pm 50.073	293.835 \pm 61.437	162.105 \pm 26.394
10	152.589 \pm 50.073	261.960 \pm 64.347	172.130 \pm 44.848
100	163.165 \pm 71.981	221.937 \pm 54.179	172.400 \pm 39.289

Tabelle 3 Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Zellzahl-Messung 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den **tiefen** Regionen humaner Menisci mit Wachstumsfaktoren

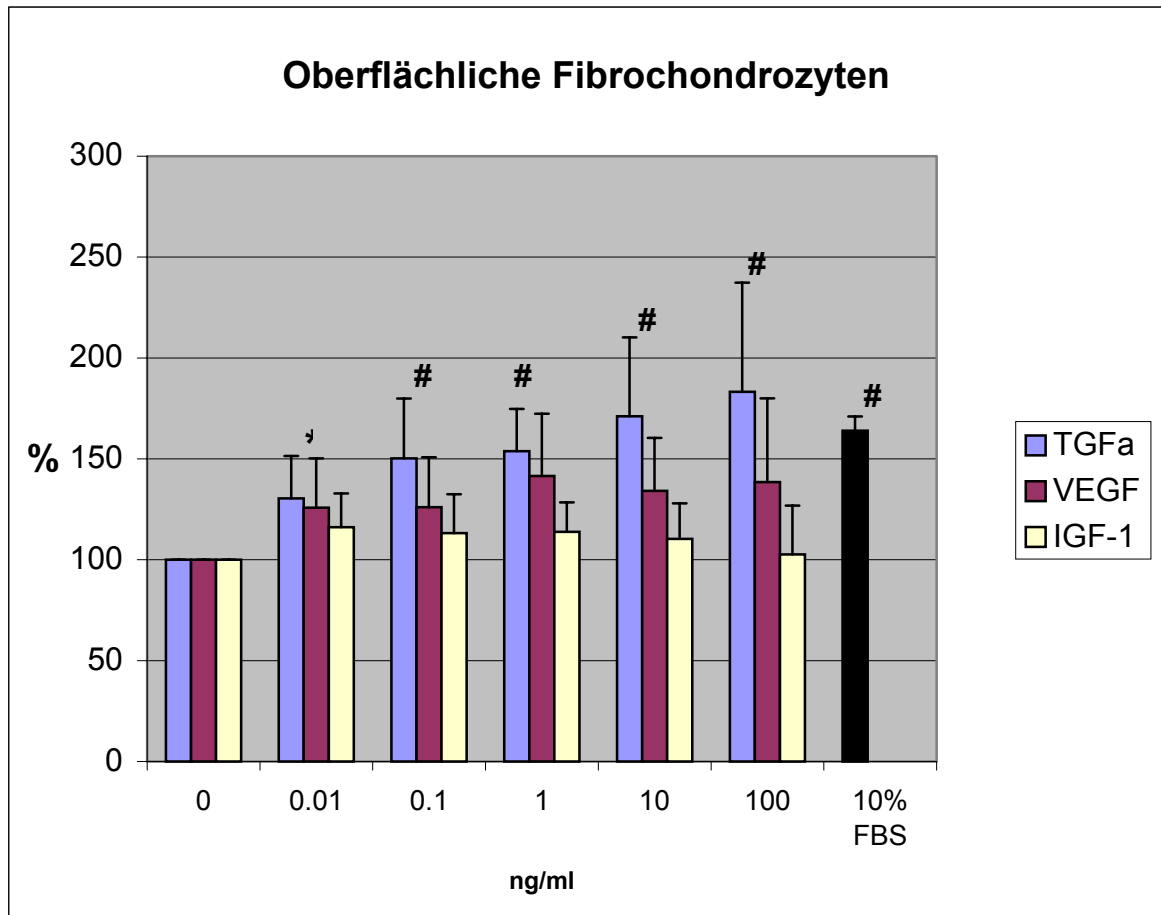


Abb. 22 Mittelwerte±Standardabweichungen von Prozentzahlen 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den **oberflächlichen** Regionen humaner Menisci mit Wachstumsfaktoren; Kontrollen mit 0% ng/ml sowie Medium enthaltend 10% FBS. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs 0 ng/ml.

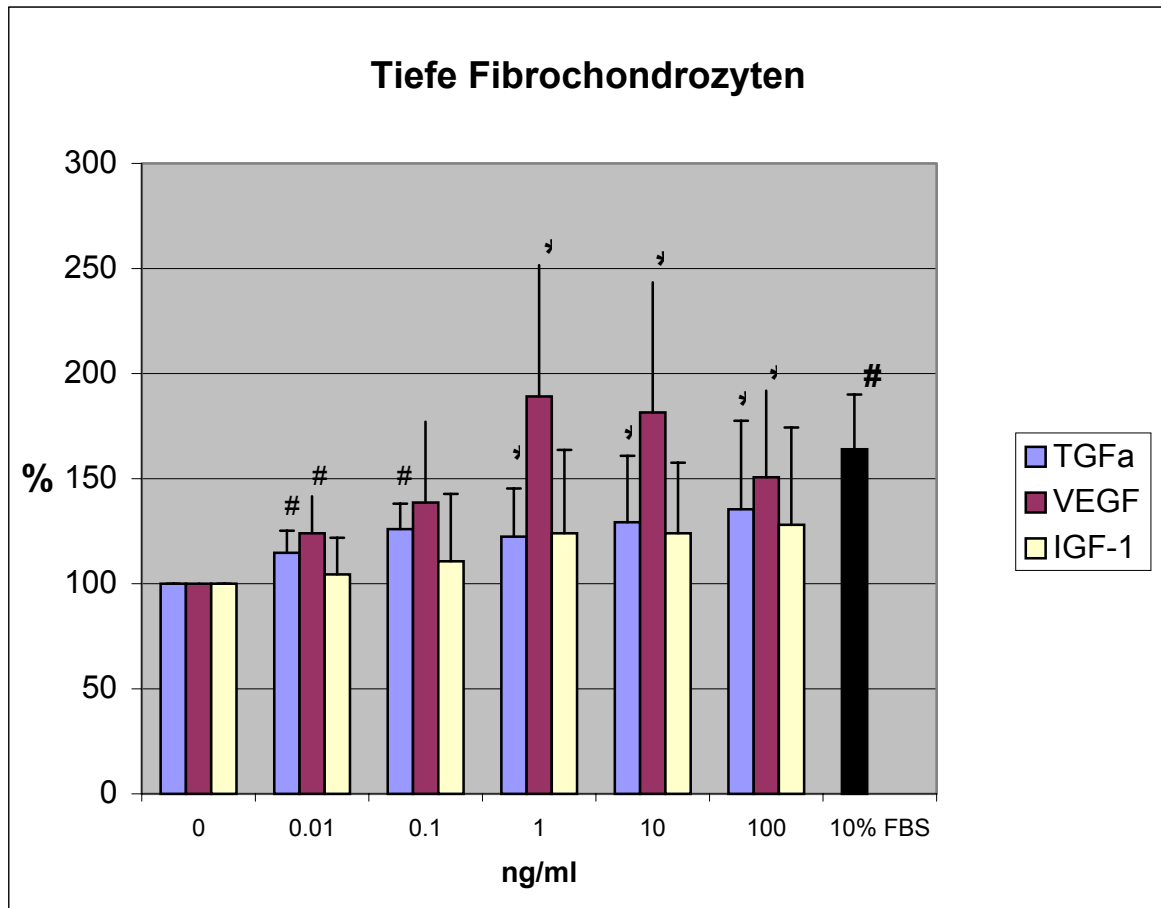


Abb. 23 Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Prozentzahlen 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den **tiefen** Regionen humaner Menisci mit Wachstumsfaktoren; Kontrollen mit 0% ng/ml sowie Medium enthaltend 10% FBS. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs 0 ng/ml.

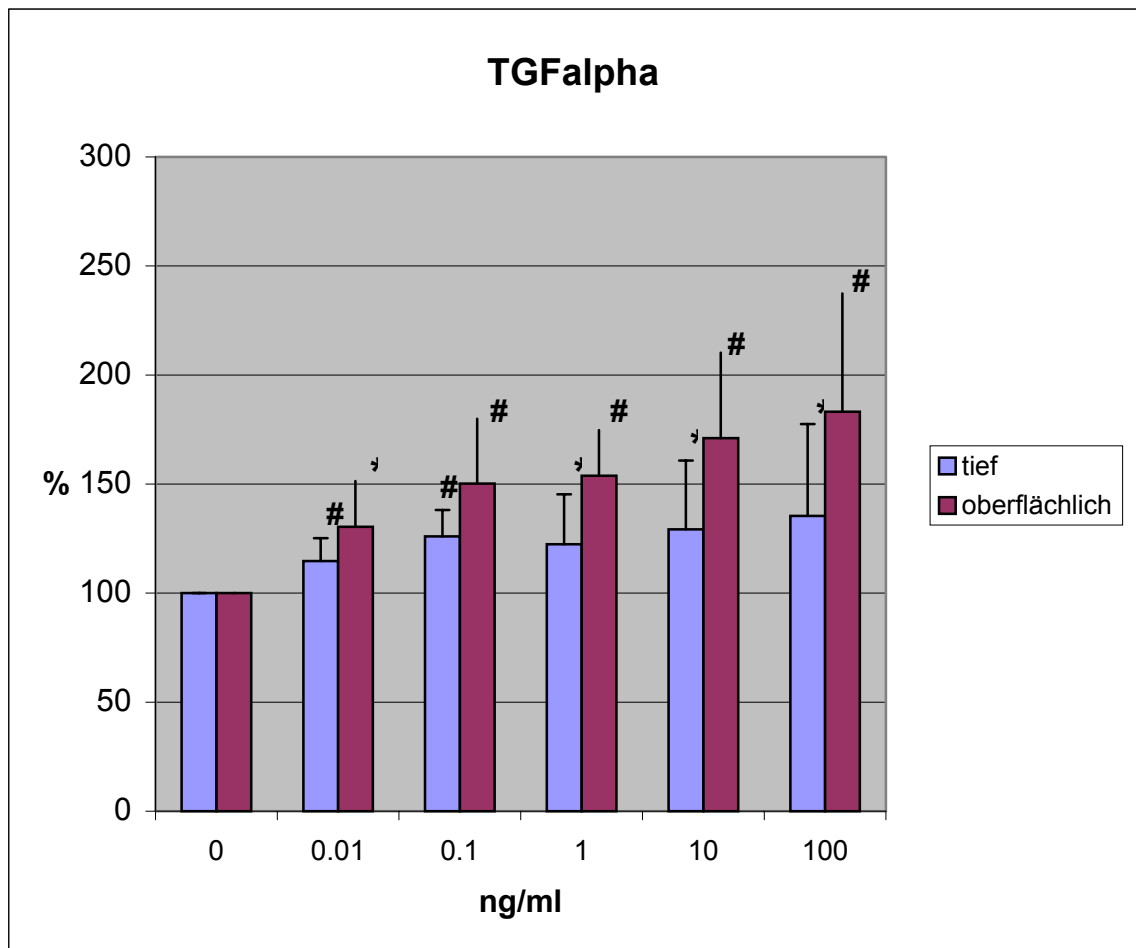


Abb. 24 Vergleich der Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Prozentzahlen 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den tiefen und oberflächlichen Regionen humaner Menisci mit **TGF α** ; Kontrollen mit 0% ng/ml sowie Medium enthaltend 10% FBS. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs 0 ng/ml.

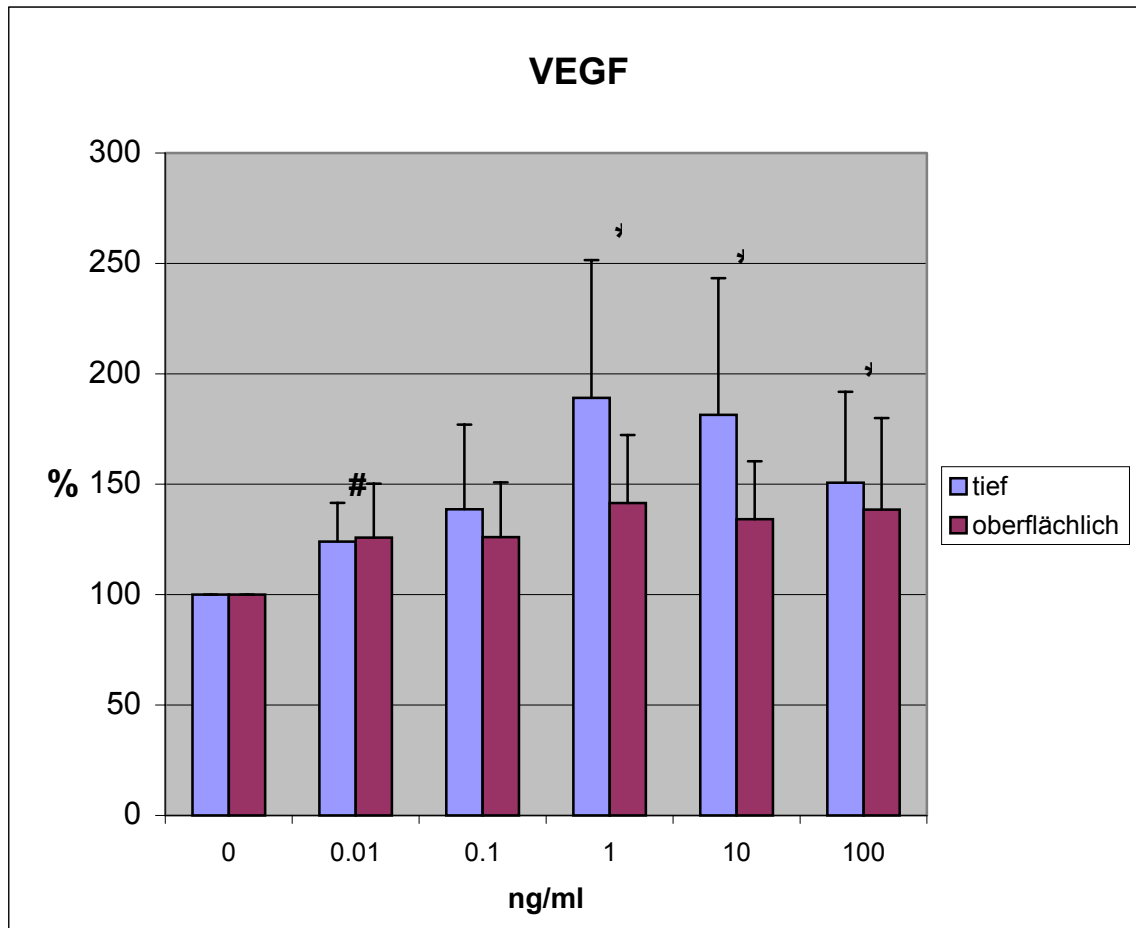


Abb. 25 Vergleich der Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Prozentzahlen 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den tiefen und oberflächlichen Regionen humaner Menisci mit **VEGF**; Kontrollen mit 0% ng/ml sowie Medium enthaltend 10% FBS. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs 0 ng/ml.

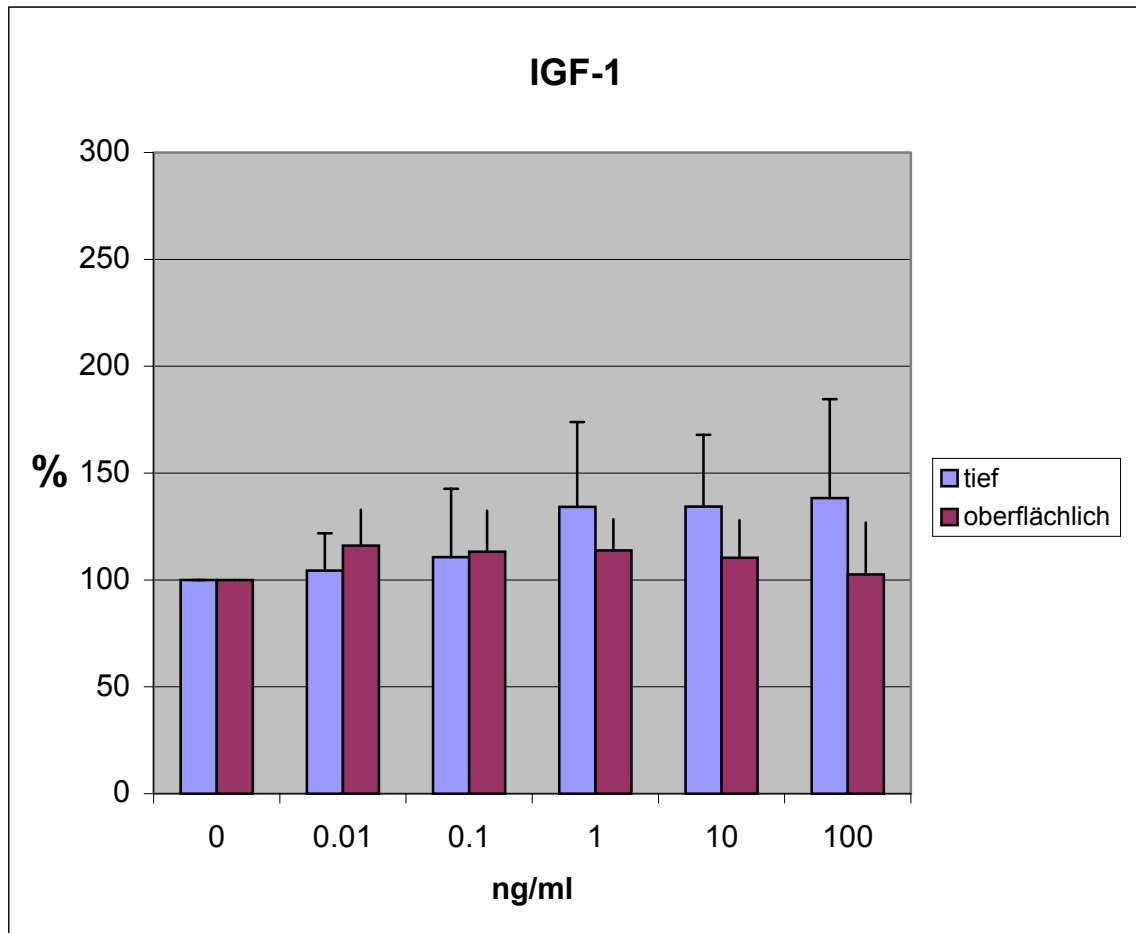


Abb. 26 Vergleich der Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Prozentzahlen 96 h nach Stimulation der Fibrochondrozyten aus den tiefen und oberflächlichen Regionen humaner Menisci mit **IGF-1**; Kontrollen mit 0% ng/ml sowie Medium enthaltend 10% FBS. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs 0 ng/ml.

4. DISKUSSION

4.1. Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Meniskusheilung

In Anbetracht der Rolle der Menisci im Kniegelenk und der Konsequenzen einer Meniskektomie ist die Entwicklung biologischer Interventionen zur Meniskuserhaltung von großer Bedeutung [45]. Dabei war vor allem die beim Spontanverlauf fehlende Heilung in den avaskulären Zonen der Menisci seit Jahrzehnten von besonderem Interesse [3,37,59]. Durch Herstellung der Vaskularisierung in den nicht-durchbluteten zentralen Anteilen der Menisci mit Interposition eines gestielten synovialen Lappens oder durch künstliche, an die durchblutete Meniskusbasis führende Kanäle wurde im Tierexperiment die Heilung von avaskulären Meniskusrissen verbessert [4,21]. Trotz der Erfolge im Experiment waren diese Methoden nicht auf den großen humanen Meniskus nicht übertragbar und finden in der klinischen Praxis auch wegen technischer Schwierigkeiten keine Anwendung.

Arnoczky et al. haben als erste die Wirkung von Wachstumsfaktoren zur Heilung von Meniskusdefekten genutzt [5]. Sie verwendeten autologe Fibringerinnsel als natürliches Reservoir für Wachstumsfaktoren, um Heilung von Meniskusrupturen in den avaskulären Zonen der Menisci an Hunden zu demonstrieren. Das Fibrinkoagel schien dabei als chemotaktischer und mitogener Stimulus für die einwandernden Reparaturzellen, die potentiell vorhandenen Wachstumsfaktoren, insbesondere das aus Thrombozyten stammende PDGF, wurden von den Autoren jedoch nicht in Erwägung gezogen. Henning et al. führten diese Methode an einer Vergleichsserie von 153 Patienten mit instabilen Meniskusrupturen durch [30]. Obwohl sie über

deutliche Anhebung der Heilungsraten berichten, setzte sich die Einführung des Fibringerinnsels in Meniskusdefekte in der arthroskopische Kniechirurgie nicht durch.

Nach Erkennung der Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Regenerationsprozesse in den Geweben des muskuloskeletalen Systems wurde die Wirkung verschiedener Zytokine auch für den Meniskus untersucht [8,24,27,37,61,72]. Webber und seine Mitarbeiter leisteten auf diesem Gebiet Pionierarbeit und beschrieben als erste den Effekt von PDGF, IGF-1 und EGF auf die Proliferation der Meniskuszellen [72,73]. Obwohl bis heute eine Reihe von weiteren Wachstumsfaktoren für die Proliferation, Matrixsynthese und Chemotaxis der meniskalen Fibrochondrozyten beschrieben wurde, sind die vorhandenen Daten und Erkenntnissen über Meniskusmaterial denjenigen über hyalinen Knorpel und Chondrozyten weit unterlegen [44]. Einerseits sind bei weitem nicht alle heute definierten und für den Meniskus in Frage kommenden Zytokine untersucht, zum anderen wurden alle bisherigen Experimente nur an tierischen Fibrochondrozyten durchgeführt [8,27,37,61,72]. In der vorliegenden Arbeit wird weltweit erstmals über die Wirkung von humanen rekombinanten Wachstumsfaktoren auf humane Meniskuszellen berichtet [43]. Wegen der Fülle der heute bekannten Zytokine mussten die vorliegenden Experimente auf drei Wachstumsfaktoren, TGF α , VEGF und IGF-1 beschränkt werden, weitere Untersuchungen werden in Zukunft folgen.

4.2. Wirkung der untersuchten Wachstumsfaktoren

Transforming growth factor α (TGF- α) ist ein aus 50 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das funktionell und strukturell dem Epidermal cell growth factor (ECGF) ähnelt [35]. Vorkommen und Wirkung dieses Zytokins sind vor allem aus der Embryogenese und Kanzerogenese bekannt, da TGF α häufig in humanen Malignomen nachgewiesen wird [16]. Hong und seine Mitarbeiter haben zum Beispiel eine im Vergleich zum Leiomyom signifikant erhöhte Expression von TGF α , ECGF sowie VEGF und eine gesteigerte Dichte der Mikrogefäße in humanem Leiomyosarkom nachgewiesen [31]. Soparkar et al. haben Polyethylenkugeln mit Agarosegel-TGF α -Gemisch in Fett- und Muskelgewebe von Kaninchen implantiert und dabei 2-6-mal erhöhte Fibroblasten-Infiltration und Vaskularisation in der sich um die Implantate gebildeten Kapsel gemessen und diesen Effekt mitunter auf das TGF α zurückgeführt [60]. TGF α wird zusammen mit IGF-1, TGF α sowie den Interleukinen 1 und 6 eine wichtige Funktion zur Erhaltung der Homöostase aber auch Degradation des Knorpels zugeschrieben, denn TGF α stimuliert die Produktion von proteolytischen Enzymen und inhibiert Aggrecan-Synthese [65].

Kasemkijwattana und seine Mitarbeiter haben die Wirkung von TGF α zusammen mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren, einschließlich Epidermal growth factor (EGF), basic Fibroblast growth factor (bFGF), acidic Fibroblast growth factor (aFGF), Transforming growth factor α (TGF α), Nerve growth factor (NGF), PDGF und IGF-1, an Kaninchen Meniskuszellen untersucht [37]. Von den untersuchten Wachstumsfaktoren zeigte TGF α dabei einen am

meisten ausgeprägten Effekt auf die Zellproliferation und Produktion der Matrixbestandteile der Kaninchen Fibrochondrozyten. Im vorliegenden Experiment mit humanen Fibrochondrozyten wurde die im Tierexperiment nachgewiesene hervorragende mitogene Wirkung von $TGF\alpha$ bestätigt. Die $TGF\alpha$ stimulierte dabei, als einziges der untersuchten Wachstumsfaktoren, die Fibrochondrozyten sowohl aus den oberflächlichen als auch aus den tiefen Schichten des humanen Meniskus. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann $TGF\alpha$ als ein, bisher nur wenig beachtetes Zytokin zur Behandlung von avaskulären Meniskusläsionen betrachtet werden, insbesondere wenn sich in Zukunft die aus dem Tierexperiment bekannte positive Wirkung dieses Wachstumsfaktor auf die Matrix-Synthese auch im Versuch mit humanen Meniskuszellen bestätigt.

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), ist ein Wachstumshormon-abhängiges Zytokin, das für die Stimulation von Chondrozyten bekannt ist [67]. Eine der wichtigsten Funktionen von IGF-1 scheint dabei die Regulierung der enchondralen Ossifikation der Epiphysen durch Beeinflussung der Wachstumsfugen-Chondrozyten zu sein [32,66,67]. Trippel et al. demonstrierten einen stimulierenden Effekt von IGF-1 auf die Proliferation und Matrixsynthese von Epiphysen-Chondrozyten in Monolayer-Kulturen [66]. Hunziker und seine Mitarbeiter haben IGF-1- und Wachstumshormon-Infusionen bei hypophysektomierten Ratten durchgeführt und dabei einen eindrucksvollen Effekt von IGF-1 sowohl auf differenzierte Chondrozyten als auch auf die Differenzierung von Stammzellen zu Chondrozyten beschrieben [32]. Rekombinantes humanes IGF-1 zeigte jedoch auch einen stimulierenden

Effekt auf die Zellproliferation und Matrix-Synthese von Fibrozyten aus Kaninchen-Beugesehnen [1]. Durch die Verwandtschaft der Fibrochondrozyten mit den Chondrozyten einerseits und den Fibrozyten andererseits wurde in dieser Studie deshalb auf einen positiven mitogenen Effekt dieses Zytokins auf die humanen Meniskuszellen spekuliert [22]. Wie aber schon durch Webber et al., Bhargava et al und Kasemkijwattana et al zeigten., konnte in den vorliegenden Experimenten ebenfalls kein stimulierender Effekt auf die Proliferation weder der oberflächlichen noch der tiefen humanen Fibrochondrozyten demonstriert werden [8,37,74]. Ein gewisser positiver Effekt von IGF-1 auf die Steigerung der DNA-Synthese von Kaninchen-Fibrochondrozyten wurde für IGF-1 nur in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren gesehen [74]. Bhargava et al. zeigten allerdings einen signifikanten dosis-abhängigen chemotaktischen Effekt von IGF-1 auf bovine Fibrochondrozyten, der nur für aus den peripheren 2/3 stammenden Meniskuszellen und nicht für Zellen aus dem zentralen Drittel des Meniskus galt [8]. Aufgrund der bereits bekannten und der durch die vorliegenden Experimente neu hinzugekommenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass IGF-1 sich zur Steigerung der mitotischen Aktivität vom menschlichen Meniskuszellen nicht durchsetzen wird.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein essentieller Mediator der Angiogenese [18], dessen Wirkung aus experimentellen Untersuchung an den Geweben des muskuloskeletalen Systems bekannt ist [20,27]. Das VEGF steuert die Bildung von Kapillaren und ist dadurch essentiell an vielen wesentlichen Vorgänge der Heilung beteiligt [20]. Am Meniskus konnten

Hashimoto et al. demonstrieren, dass Verwendung von einem bovinen Endothelial cell growth factor (ECGF) in Kombination mit einem Fibringerinnsel die Heilung in avaskulären Zonen des Hundemeniskus durch Steigerung der Kapillareinsprossung vom menisko-synovialen Übergang aus verbessert werden konnte, eine genauere Analyse der Vorgänge wurde jedoch nicht geliefert [27]. In der vorliegenden Arbeit wird somit erstmals überhaupt die Wirkung von humanem VEGF auf die Proliferation der Fibrochondrozyten untersucht. Das VEGF zeigt einen positiven Effekt auf die Proliferation der tiefen humanen Fibrochondrozyten, während keine signifikante Wirkung auf die oberflächlich gelegenen Meniskus-Zellen nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse belegen somit die Präsenz von Zellen in den tiefen Schichten der avaskulären Zonen des humanen Meniskus, die durch das angiogene Zytokin VEGF signifikant zur Proliferation stimuliert werden. Da das Design der vorliegenden Studie keine genauere Information über die stimulierbaren Zellen und den genauen Mechanismus des aufgezeigten Effekts erlaubt, sind weitere Untersuchungen in Zukunft notwendig. Insbesondere die Frage nach der Morphologie der proliferierenden Zellen ist von großem Interesse: proliferieren die Fibrochondrozyten oder sind es sich in den tiefen Schichten des Meniskus befindliche Endothelzellen „im Ruhezustand“, die durch VEGF zur überproportionalen Proliferation angeregt werden oder kommt es durch die VEGF-Wirkung zur Differenzierung von Fibrochondrozyten zu gefäßbildenden endothelialen Zellen? Leider lassen sich solche Fragen durch in-vitro Versuche nicht beantworten, denn der Phänotyp der Zellen ändert sich nicht selten, wenn diese aus ihrem normalen

dreidimensionalen Milieu entfernt werden. Trotz verbleibender Aufgaben für die Zukunft deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass VEGF eins der möglichen Wachstumsfaktoren mit Potential zur Heilung von avaskulären Meniskusdefekten ist.

4.3. Zellpopulationen des Meniskus

Die Diskussion über verschiedene Populationen von Meniskuszellen wurde erst durch die Arbeit Ghadially und seinen Mitarbeitern begonnen [22]. Abgesehen von den Endothelzellen aus den Gefäßen der durchbluteten peripheren Anteile der Menisci wurden erstmals zwei morphologisch unterschiedliche Populationen von Fibrochondrozyten licht- und elektronenmikroskopisch identifiziert (siehe auch 2.1.2.1.). Ein funktioneller Unterschied dieser Zellen wurde von diesen Autoren jedoch nicht untersucht. Erst Spindler et al. gelang es, durch unterschiedliches Proliferationsverhalten nach Gabe von PDGF regionale Unterschiede von Meniskuszellen aus den zentralen und peripheren Regionen des Meniskus in-vitro nachzuweisen [61]. Sie zeigten in ihren Experimenten, dass Zellen aus den peripheren, durchbluteten Regionen des Meniskus vom Schaf eine signifikant höhere Proliferationsrate nach PDGF-Zugabe zeigten als Zellen aus den avaskulären peripheren Meniskus-Arealen. In ihrer Publikation beschreiben sie auch, dass die Isolierung von zwei verschiedenen Populationen aus den peripheren und zentralen Regionen der Menisci gelungen sei und beschrieben die peripheren Zellen als schneller wachsend und eher fibroblastisch, und die zentralen Zellen als sehr langsam wachsend und morphologisch eher chondrozytisch [61]. Diese Ergebnisse

wurden jedoch, obwohl in dieser Publikation bereits als Manuskript in Vorbereitung angekündigt, bisher nicht in einer Medline-gelisteten Arbeit veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit wird ein unterschiedliches regionales proliferatives Verhalten von oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten von humanen Menisci nach Zugabe von drei verschiedenen Wachstumsfaktoren demonstriert. Somit unterstützen die Ergebnisse meiner Experimente die Einteilung der Meniskuszellen in oberflächliche und tiefe Fibroblasten [22]. Durch die gewonnenen Daten kann erstmals der von Ghadially et al. beschriebene morphologische Unterschied auch funktionell durch unterschiedliche Zytokin-Antwort der Zellen demonstriert werden. Die Aufteilung der Fibrochondrozyten in periphere und zentrale kann dagegen weder widerlegt noch bestätigt werden, da im vorliegenden Versuch nur Zellen aus den avaskulären zentralen Meniskusarealen untersucht wurden. Insgesamt wird deutlich, dass noch viele Fragen bezüglich der Morphologie und Funktion von Meniskuszellen bestehen und in Zukunft viel Forschungsarbeit auf diesem Gebiet geleistet werden muß.

4.4. Methodik der histologischen Darstellung

In den vorliegenden Experimenten wurde eine neuartige histologische Darstellung von Meniskuszellen in der Gewebekultur entwickelt. Neben den gut bekannten histologischen Färbungen des Meniskus-Gewebes bzw. der Fibrochondrozyten mit Hämatoxylin/Eosin oder Safranin-O-Färbung wurde

eine bisher nicht beschriebene Doppelfärbung von Meniskuszellen mit MTT und Ethidiumbromid angewendet.

MTT, ein Tetrazolium-Salz, das nur in den Mitochondrien lebender und biologisch aktiver Zellen zu blaugefärbtem Substrat Formazan umgewandelt wird, wird seit der Erstbeschreibung durch Mosmann zur Feststellung der Zell-Vitalität in in-vitro Kulturen verwendet [49]. Die durch Reduktion des MTT entstehende Blaufärbung korreliert mit der Vitalität der Zellen und wurde ursprünglich spektralphotometrisch durch Absorptionsmessungen z.B. in einem ELISA-Reader bei 560 und 690 nm bestimmt [46,70]. Sun und seine Mitarbeiter haben bereits nach einer 5-minütigen Inkubation von Hepatozyten zur Reduktion von MTT zu dem blauen Farbstoff beobachtet und die Zell-Vitalität auch direkt lichtmikroskopisch bestimmt [62]. Diese Idee wurde im vorliegenden Experiment aufgegriffen und erstmals zur Bestimmung der Zell-Vitalität in Gewebekultur verwendet. In den Experimenten mit Kaninchen-Gewebe zeigte sich, dass die hoch-verdünnte MTT-Lösung bereits nach ca. 1 Stunde durch die gesamten Menisci in Gewebekultur diffundierte und in allen vitalen Zellen zu blauem Formazan reduziert wurde. Die Blaufärbung der Zellen wurde durch das Einfrieren der Menisci und deren Fixierung mit Glutraldehyd nicht gestört, und konnte nach Anfertigung der histologischen Schnitte problemlos lichtmikroskopisch beurteilt werden. Eine Gegenfärbung der histologischen Präparate mit Eosin bewährte sich dagegen nicht, weil durch diese Prozedur der blaue Farbstoff aus den Zellen ausgewaschen wurde.

Das Ethidium Bromid ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenz-Farbstoff, der sowohl in-vivo als auch in-vitro an die DNA der Zellen bindet und diese markiert [68]. Im Fluoreszenz-Mikroskop werden die Kerne der markierten Zellen im grünen Spektrumbereich zwischen 530 und 560 nm angeregt und im roten Spektrumbereich oberhalb 580 nm visualisiert. Im vorliegenden Experiment konnte durch das Auftragen von ca. 10 µl der ETB-Lösung auf die histologischen Meniskus-Präparate eine hervorragende Färbung aller Zellkerne erreicht werden und im Fluoreszenz-Mikroskop dargestellt werden.

Durch die vorgenommene Doppelfärbung der Präparate konnten an den Meniskus-Sektionen zunächst fluoreszenzmikroskopisch alle vorhandenen Zellkerne und gleich anschließend durch Umschalten auf Lichtmikroskop nur die vitalen Zellkerne der Fibrochondrozyten dargestellt werden. Durch den direkten Vergleich der Bilder war dadurch die Aussage über den Anteil vitaler Fibrochondrozyten in der Meniskus-Gewebekultur möglich. Durch diese Methode konnte insbesondere nachgewiesen werden, daß alle sich in den tiefen Meniskus-Schichten befindlichen Fibrochondrozyten auch tatsächlich über Wochen in Gewebekultur vital bleiben. Diese Aussage wäre bei den herkömmlichen histologischen Färbungen wie Hämatoxylin/Eosin oder Safranin-O verloren gegangen.

4.5. Ausblick in die Zukunft

Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Studie können als Grundlagen bei der Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung von Meniskusdefekten oder für das Tissue Engineering des Meniskus dienen. Die gewonnenen Daten sind

dennoch nur ein kleiner Bestandteil der Forschungsarbeit, die in Zukunft auf diesem Gebiet erfolgen wird und muss. Obschon die Kenntnisse über die biologischen Vorgänge in den Geweben des muskuloskeletalen Systems in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren enorm zunahmen, ist unser heutiges Wissen bezüglich der Wirkungsweise der Wachstumsfaktoren noch sehr eingeschränkt [45,67]. Einzelne Zytokine mit positivem Effekt auf Proliferation, Matrix-Synthese oder Differenzierung der Chondro-, Myo- oder Fibroblasten sind zwar bekannt, deren agonistisches und antagonistisches Wirken und Zusammenspiel ist aber keineswegs aufgeklärt [67]. Es ist gut möglich, dass auch bei den Wachstumsfaktoren, ähnlich wie bei den Komplement- oder Gerinnungsfaktoren, ganze Wirkungskaskaden existieren, auf deren Ende die Heilung und Regeneration des verletzten Gewebes steht. Die Liste der Zytokine ist nicht komplett, denn in regelmäßigen Abständen werden neue Substanzen entdeckt, die für die biologischen Abläufe bei Wachstum, Regeneration oder Untergang des Gewebes mitwirken. Weitgehend unbekannt ist auch die zeitliche Steuerung und die Mengen/Konzentrationen der Zytokine bei der Heilung und Regeneration. Die aus der Embryogenese bekannten Daten deuten darauf hin, dass die Expression eines Zytokins zeitlich begrenzt ist und durch die Freisetzung des nächsten Zytokins abgelöst wird [16].

Eine der potentiellen Möglichkeiten zur Steuerung und Anlieferung von Wachstumsfaktoren könnte in Zukunft die sogenannte Gentherapie sein [42]. Das Prinzip der Gentherapie besteht im Transport exogener DNA in die Zelle. Eine Genexpression findet statt, wenn die DNA in den Zellkern gelangt und

dort transkribiert wird. Nach der Transkription wird die gebildete mRNA aus dem Zellkern transportiert und dient in den Ribosomen als Matrix zur Herstellung des kodierten Wachstumsfaktors. Durch die Integration der Wachstumsfaktor-DNA in die Zellkerne der voll-integrierten und funktionsfähigen Zellen im Gewebe wird eine kontinuierliche und regulierte Freisetzung der Zytokine hypothetisiert. Diese bisher mit sehr vielen ungeklärten Sicherheitsfragen behaftete Methode befindet sich bereits erfolgreich im experimentellen Stadium. Goto et al. gelang es, die DNA eines Markergens in Hunde-Menisci zu transferieren und dessen Expression unter in-vivo Bedingungen für mehrere Wochen aufrechtzuerhalten [24]. In einer weiteren, in-vitro Studie hatte die gleiche Arbeitsgruppe aus Pittsburgh demonstriert, dass ein retroviraler Gentransfer von TGF β in meniskale Fibrochondrozyten die Matrixsynthese dieser Zellen signifikant steigern kann [25]. Diese bahnbrechende Arbeiten sind meines Erachtens der Beginn einer neuen Ära in der Behandlung von Meniskusverletzungen. Die Zukunft wird zeigen, ob ein Gentransfer von TGF α oder VEGF, die sich durch die Resultate der vorliegenden Studie zur Steigerung der Proliferation der meniskalen Fibrochondrozyten empfehlen, die Lösung zur Behandlung der avaskulären Meniskusläsionen ermöglicht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der Effekt von drei verschiedenen Wachstumsfaktoren, Transforming growth factor α (TGF α), Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), auf die Proliferation zweier verschiedener Populationen menschlicher Meniskuszellen gemessen.

Unter Verwendung von 16 Menisci aus 4 weißen Neuseeland Kaninchen wurde zunächst das Verhalten von Menisci in einer Gewebekultur untersucht. Die steril entnommenen Kaninchen-Menisci wurden dabei in einem Nährmedium in vitro inkubiert und nach 1,2,3 und 4 Wochen unter Verwendung einer Doppel-Fluorochromierung histologisch untersucht. Die Doppelfärbung mit MTT (Tetrazolium Salz) und Ethidium Bromid wurde neu etabliert und ermöglichte in den histologischen Präparaten die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen.

Das Experiment zeigte, dass es unter Bedingungen in-vitro zu einem kompletten Abwandern der oberflächlichen Meniskuszellen kommt, während die in den tieferen Schichten liegenden Zellen im Meniskusgewebe verbleiben. Diese neue Erkenntnis wurde im zweiten Teil der Arbeit zur Trennung von oberflächlichen und tiefen humanen Fibrochondrozyten aus Meniskusbiopsien von 6 Patienten mit irreparablen Korbhenkelrupturen, 2 Frauen und 4 (Mittelwert 34 Jahre) verwendet. Nach 4 Wochen in Gewebekultur wurden die tiefen Fibrochondrozyten enzymatisch aus den Menisci, die oberflächlichen vom Boden der Kulturflaschen gewonnen, bis zur zweiten Passage gezüchtet und anschließend im serumlosen Medium mit den

Wachstumsfaktoren $TGF\alpha$, VEGF und IGF-1 in 6 verschiedenen Konzentrationen (0, 0.01, 0.1, 1, 10 und 100 ng/ml) inkubiert. Die Zellzählung wurde nach 96 Stunden maschinell durchgeführt.

Die Proliferation der oberflächlichen und tiefen humanen Fibrochondrozyten wurde konzentrationsabhängig signifikant durch $TGF\alpha$ gesteigert. Die mitogene Wirkung von VEGF konnte dagegen nur die Population der tiefen Fibrochondrozyten nachgewiesen werden, während IGF-1 keinen signifikanten Effekt auf die menschlichen Meniskuszellen zeigte. Somit konnte erstmals, nach bereits bekannten morphologischen Unterschieden zwischen meniskalen Fibrochondrozyten, auch ein unterschiedliches regionales proliferatives Verhalten von oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten nachgewiesen werden.

Folgende Antworten können auf die zu Anfang der Arbeit gestellten Fragen gemacht werden:

1. Ist die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der humanen Fibrochondrozyten mit dem aus den Tierexperimenten bekannten Effekt vergleichbar?

Ja. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente mit $TGF\alpha$, VEGF und IGF-1 belegen, dass das mitogene Potential von Zytokinen im Tierexperiment mit dem im Humanversuch zumindest für die untersuchten Wachstumsfaktoren vergleichbar ist.

2. Kann der Vaskularität-induzierende VEGF die Proliferation humaner, aus der avaskulären Meniskuszone stammenden Fibrochondrozyten steigern?

Ja. Das angiogene Zytokin VEGF zeigte einen signifikanten mitogenen Effekt auf die aus den tiefen Meniskusschichten stammenden Fibrochondrozyten gezeigt. Künftige Versuche müssen jedoch klären, ob durch VEGF tatsächlich auch die Vaskularisierung der avaskulären Regionen der Menisci erreicht werden kann.

3. Reagieren oberflächliche und tiefe meniskale Fibrochondrozyten unterschiedlich auf die verschiedenen verwendeten Wachstumsfaktoren?

Ja. In der vorliegenden Arbeit wurde ein unterschiedliches regionales proliferatives Verhalten von oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten von humanen Menisci nach Zugabe von drei verschiedenen Wachstumsfaktoren demonstriert.

6. LITERATUR

1. Abrahamsson, S.O., Lundborg, G., Lohmander, L.S.
Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon.
J. Orthop. Res. 9 (1991) 495 - 502
2. Adams, M.E., Hukins, D.W.L.
The extracellular matrix of the meniscus.
In: "Knee meniscus: Basic and clinical foundations",
Mow, V.C., Arnoczky, S.P., Jackson, D.W. (Eds.), Raven Press Ltd.,
New York, 1992, 1st edition, 15 - 28
3. Arnoczky, S.P., Warren, R.F.
Microvasculature of the human meniscus.
Am. J. Sports Med. 10 (1982) 90 - 95
4. Arnoczky, S.P., Warren, R.F.
The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog.
Am. J. Sports Med. 11 (1983) 131 - 141
5. Arnoczky, S.P., Warren, R.F., Spivak, J.M.
Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs.
J. Bone Joint Surg. [Am] 70 (1988) 1209 - 1217
6. Arnoczky, S.P.
Gross and vascular anatomy of the meniscus and its role in meniscal healing, regeneration, and remodeling.
In: "Knee meniscus: Basic and clinical foundations",
Mow, V.C., Arnoczky, S.P., Jackson, D.W. (Eds.), Raven Press Ltd.,
New York, 1992, 1st edition, 1 - 14

7. Beaupre,A., Choukroun,R., Guidouin,R., Garneau,R., Gerardin,H.C.A., Tordion,G.
A study of the menisci of the knee by scanning electron microscopy.
Rev. Chir. Orthop. 67 (1981) 713 - 719
8. Bhargava,M.M., Attia,E.T., Murrell,G.A., Dolan,M.M., Warren,R.F., Hannafin,J.A.
The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells.
Am. J. Sports Med. 27 (1999) 636 - 643
9. Bird,M.D.T., Sweet,M.B.E.
Canals in the semilunar meniscus. Brief report.
J. Bone Joint Surg. [Br] 70 (1988) 839 - 839
10. Bolano,L.E., Grana,W.A.
Isolated arthroscopic partial meniscectomy. Functional radiographic evaluation at five years.
Am. J. Sports Med. 21 (1993) 432 - 437
11. Bourne,R.B., Finlay,J.B., Papadopoulos,P., Andreae,P.
The effect of medial meniscectomy on strain distribution in the proximal part of the tibia.
J. Bone Joint Surg. [Am] 66 (1984) 1431 - 1437
12. Burr,D.B., Radin,E.L.
Meniscal function and the importance of meniscal regeneration in prevention late medial compartment osteoarthritis.
Clin. Orthop. 171 (1982) 121 – 126
13. Clark,C.R., Ogden,J.A.
Development of the menisci of the human knee joint.
J. Bone Joint Surg. [Am] 65 (1983) 538 - 547
14. Collier,S., Ghosh,P.

Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus.

Osteoarthritis Cartilage 3 (1995) 127 - 138

15. Day,B., Mackenzie,W.G., Shim,S.S., Leung,G.

The vascular and nerve supply of the human meniscus.

Arthroscopy 1 (1985) 58 - 62

16. Derynck,R.

Transforming growth factor alpha.

Cell 54 (1988) 593 - 595

17. Fairbank T.J.

Knee joint changes after meniscectomy.

J. Bone Joint Surg. [Br] 30 (1948) 664 - 670

18. Ferrara,N., Davis-Smyth,T.

The biology of vascular endothelial growth factor.

Endocr. Rev. 18 (1997) 4 - 25

19. Fife,R.S.

Identification of link proteins and a 116,000-dalton matrix protein in canine meniscus.

Arch. Biochem. Biophys. 240 (1985) 682 - 688

20. Gerber,H.P., Vu,T.H., Ryan,A.M., Kowalski,J., Werb,Z., Ferrara,N.

VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.

Nature Medicine 5 (1999) 623 - 628

21. Gershuni,D.H., Skyhar,M.J., Danzig,L.A., Camp,J., Hargens,A.R.,

Akeson,W.H.

Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci.

J. Bone Joint Surg. [Am] 71 (1989) 1363 - 1370

22. Ghadially, F.N., Thomas, I., Yong, N., Lalonde, J.-M.A.
Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages.
J. Anat. 125 (1978) 499 - 517
23. Ghosh, P., Taylor, T.K.F.
The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction.
Clin. Orthop. 224 (1987) 52 - 63
24. Goto H., Shuler FD, Niyibizi C., Fu, F. H., and Evans CH:
Gene transfer to meniscal lesion: TGF- β 1 gene retrovirally transduced into
meniscal fibrochondrocytes upregulates matrix synthesis.
Abstractband ISAKOS Meeting 1999, Washington D.C., USA
25. Goto, H., Shuler, F.D., Lamsam, C., Moller, H.D., Niyibizi, C., Fu, F.H.,
Robbins, P.D., Evans, C.H.
Transfer of lacZ marker gene to the meniscus.
J. Bone Joint Surg. [Am] 81 (1999) 918 - 925
26. Green, W.T.J.
Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture
and subsequent allografting.
Clin. Orthop. 124 (1977) 237 - 250
27. Hashimoto, J., Kurosaka, M., Yoshiya, S., Hirohata, K.
Meniscal repair using fibrin sealant and endothelial cell growth factor. An
experimental study in dogs.
Am. J. Sports Med. 20 (1992) 537 - 541
28. Heinegard, D., Oldberg, A.
Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous
macromolecules.
FASEB J. 3 (1989) 2042 - 2051
29. Heller, L., Langman, J.
The menisofemoral ligaments of the human knee.

J. Bone Joint Surg. [Br] 46 (1964) 307 - 313

30. Henning,C.E., Lynch,M.A., Yearout,K.M., Vequist,S.W.,
Stallbaumer,R.J., Decker,K.A.

Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot.

Clin. Orthop. 252 (1990) 64 - 72

31. Hong,T., Shimada,Y., Uchida,S., Itami,A., Li,Z., Ding,Y., Kaganoi,J.,
Komoto,I., Sakurai,T., Imamura,M.

Expression of angiogenic factors and apoptotic factors in leiomyosarcoma and
leiomyoma.

Int. J. Mol. Med. 8 (2001) 141 - 148

32. Hunziker,E.B., Wagner,J., Zapf,J.

Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on
developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo.

J. Clin. Invest. 93 (1994) 1078 - 1086

33. Ingman,A.M., Ghosh,P., Taylor,T.K.F.

Variation of collagenous and non-collagenous proteins of human knee joint
menisci with age and degeneration.

Gerontologia 20 (1974) 212 - 223

34. Jackson,J.P.

Degenerative changes in the knee after meniscectomy.

Br. Med. J. 2 (1968) 525 - 527

35. Jhappan,C., Stahle,C., Harkins,R.N., Fausto,N., Smith,G.H.,
Merlino,G.T.

TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and
abnormal development of the mammary gland and pancreas.

Cell 61 (1990) 1137 - 1146

36. Kasemkijwattana, C., Menetrey, J., Goto H., Niyibizi C., Fu, F.H.,
Huard, J.

The use of growth factors, gene therapy and tissue engineering to improve meniscal healing.

Trans. Orthop. Res. Soc. 45 (1999)

37. King,D.

The healing of semilunar cartilage.

J. Bone Joint Surg. [Am] 18 (1936) 333 - 342

38. King,D.

The function of semilunar cartilage.

J. Bone Joint Surg. [Am] 18 (1936) 1069 - 1076

39. King,D.

Regeneration of semilunar cartilage.

Surg. Gynecol. Obster. 62 (1936) 167 - 170

40. Kurosawa,H., Fukubayashi,T., Nakajima,H.

Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci.

Clin. Orthop. 149 (1980) 283 - 290

41. MacConaill,M.A.

The functions of intra-articular fibro-cartilages with special reference to the knee and inferior radio-ulnar joints.

J. Anat. 66 (1932) 210-227

42. Martinek,V., Fu,F.H., Huard,J.

Gene Therapy and Tissue Engineering in Sports Medicine.

Physician and Sports Medicine 28 (2000) 34 - 51

43. Martinek,V., Martinek,S., Pelinkovic,D., Hendi,P., Celechovsky,C., Fu, F.H., Huard,J.

Proliferative stimulation of human fibrochondrocytes originating from the avascular zone with IGF-1, TGF-alpha and VEGF.

J. Jpn. Orthop. Assoc. 75 (2001)

44. McDevitt,C.A., Miller,R.R., Spindler,K.P.
The cells and cell matrix interactions of the meniscus.
In: "Knee meniscus: Basic and clinical foundations",
Mow,V.C., Arnoczky,S.P., Jackson,D.W. (Eds.), Raven Press Ltd.,
New York, 1992, 1st edition, 29 - 36
45. Messner,K., Kohn,D., Verdonk,R.
Future research in meniscal replacement.
Scand. J. Med. Sci. Sports 9 (1999) 181 - 183
46. Miller,R.R., McDevitt,C.A.
A quantitative microwell assay for chondrocyte cell adhesion.
Anal. Biochem. 192 (1991) 380 - 383
47. Miller,R.R., Rydell,P.A.
Primary culture of microvascular endothelial cells from canine meniscus.
J. Orthop. Res. 11 (1993) 907 - 911
48. Moon,M.S., Kim,J.M., Ok,I.Y.
The normal and regenerated meniscus in rabbits.
Clin. Orthop. 182 (1984) 264 - 269
49. Mosmann,T.
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
proliferation and cytotoxicity assays.
J. Immunol. Methods 65 (1983) 55 - 63
50. Mow,V.C., Fithian,D.C., Kelly,M.A.
Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review.
J. Biomech. 17 (1984) 377 - 394
51. Mow,V.C., Proctor,C.S., Kelly,M.A.
Biomechanics of articular cartilage.
In: "Basic biomechanics of the musculoskeletal system",
Nordin,M., Frankel,V.H. (Eds.), Philadelphia, 1989, 2nd edition, 31 - 58

52. Mow,V.C., Ratcliffe,A., Chern,K.Y., Kelly,M.A.
Structure and function relationships of the menisci of the knee.
In: "Knee meniscus: Basic and clinical foundations",
Mow,V.C., Arnoczky,S.P., Jackson,D.W. (Eds.), Raven Press, Ltd.,
New York, 1992, 1st edition, 37 - 57
53. Proctor,C.S., Schmidt,M., Whipple,R.R., Kelly,M.A., Mow,W.C.
Material properties of normal medial bovine meniscus.
J. Orthop. Res. 7 (1989) 771 - 782
54. Rangger,C., Kathrein,A., Klestil,T., Glotzer,W.
Partial meniscectomy and osteoarthritis. Implications for treatment of athletes.
Sports Med. 23 (1997) 61 - 68
55. Roos,H., Lauren,M., Adalberth,T., Roos,E.M., Jonsson,K.,
Lohmander,L.S.
Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes
after twenty-one years, compared with matched controls.
Arthritis Rheum. 41 (1998) 687 - 693
56. Ross,R., Bowen-Pope,D.F., Raines,E.W.
The biology of platelet-derived growth factor.
Cell 46 (1986) 155 - 169
57. Shoemaker,S.C., Markolf,K.L.
The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded
anterior cruciate-deficient knee. Effects of partial versus total excision.
J. Bone Joint Surg. [Am] 68 (1986) 71 - 79
58. Shrive,N.
The weight-bearing role of the menisci of the knee.
J. Bone Joint Surg. [Br] 56 (1974) 381 - 388
59. Smilie,I.S.
Observations on the regeneration of the semilunar cartilages in man.

Br. J. Surg. 31 (1944) 398 - 401

60. Soparkar,C.N., Wong,J.F., Patrinely,J.R., Appling,D.

Growth factors embedded in an agarose matrix enhance the rate of porous polyethylene implant biointegration.

Ophthal. Plast. Reconstr. Surg. 16 (2000) 341 - 346

61. Spindler,K.P., Mayes,C.E., Miller,R.R., Imro,A.K., Davidson,J.M.

Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB).

J. Orthop. Res. 13 (1995) 201 - 207

62. Sun,J., Wang,L., Waring,M.A., Wang,C., Woodman,K.K., Sheil,A.G.

Simple and reliable methods to assess hepatocyte viability in bioartificial liver support system matrices.

Artif. Organs 21 (1997) 408 - 413

63. Sutton, J. B.:

“Ligaments, their nature and morphology”

M.K. Lewis and Co., London, 1897

64. Tapper,E.M., Hoover,N.W.

Late results after meniscectomy.

J. Bone Joint Surg. [Am] 51 (1969) 517 - 526

65. Thumb,N.

Function of cytokines in cartilage degradation.

Wien. Med. Wochenschr. 145 (1995) 99 - 100

66. Trippel,S.B., Wroblewski,J., Makower,A.M., Whelan,M.C.,

Schoenfeld,D., Doctrow,S.R.

Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor.

J. Bone Joint Surg. [Am] 75 (1993) 177 - 189

67. Trippel,S.B.

Growth factors as therapeutic agents.

Instr. Course. Lect. 46 (1997) 473 - 476

68. Vollenweider,I., Groscurth,P.

Comparison of four DNA staining fluorescence dyes for measuring cell proliferation of lymphokine-activated killer cells.

J. Immunol. Meth. 149 (1992) 133 - 135

69. Voloshin,A.S., Wosk,J.

Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study.

J. Biomed. Eng. 5 (1983) 157 - 161

70. Voytik-Harbin,S.L., Brighthman,A.O., Waisner,B., Lamar,C.H., Badylak,S.F.

Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts.

In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal 34 (1998) 239 - 246

71. Walker,P.S., Erkman,M.J.

The role of the menisci in force transmission across the knee.

Clin. Orthop. 109 (1975) 184 - 192

72. Webber,R.J., Harris,M.G., Hough,A.J.J.

Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate.

J. Orthop. Res. 3 (1985) 36 - 42

73. Webber,R.J., Zitaglio,T., Hough,A.J.J.

In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex.

Arthritis Rheum. 29 (1986) 1010 - 1016

74. Webber,R.J., Zitaglio,T., Hough,A.J.J.

Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response.

J. Orthop. Res. 6 (1988) 13 - 23

75. Webber,R.J., York,J.L., Vanderschilden,J.L., Hough,A.J.J.

An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus.

Am. J. Sports Med. 17 (1989) 393 - 400

76. Zimny,M.L., Albright,D.L., Dabeziew,E.

Mechanoreceptors in the human medial meniscus.

Acta Anat. 133 (1988) 35 - 40

7. ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

Mein ganz besonderer Dank für die Fertigstellung dieser Arbeit gilt vor allem

Univ.-Prof. Dr. A.B. Imhoff für die Überlassung des Themas und freundliche Betreuung dieser Arbeit

Prof. Dr. Freddie H. Fu für die Ermöglichung der Durchführung dieses Experiments in den Laboratorien seiner Klinik

Meinem Ehemann, PD. Dr. Vladimir Martinek, für die unterstützende Betreuung unserer Kinder, die jederzeit anregende Kritik bezüglich dieser Arbeit, und die ausdauernde Hilfe beim Erstellen der Abbildungen

Dr. Johnny Huard für die freundliche Aufnahme in seinem Labor

Meiner Mutter Brigitte Bublitz und meiner Oma Christine van Kaldenkerken, die mich durch immerwährende Ermahnungen zur Fertigstellung der Doktorarbeit bewegt haben

C. Celechovsky, P. Hendi und Dr. D. Pelinkovic, für die hilfsbereite Zusammenarbeit im Labor

8. LEBENSLAUF

Name	Martinek, geb. Claßen
Vornamen	Stefanie Maria
Geburtsdatum	05.3.1969
Geburtsort	Leverkusen
Eltern	Brigitte Bublitz, Gesundheitspädagogin Hans-Dieter Claßen, Schulrektor
Ehemann	Dr. med. Vladimir Martinek, Arzt
Kinder	Paulina, geb. 10.7.95 Sarah, geb. 28.10.96 Nadja, geb. 22.1.01

Schullaufbahn

1975 – 1979	Grundschule Bergisch-Neukirchen (Leverkusen)
1979 – 1985	Gymnasium Marianum Leverkusen-Opladen
1985 – 1988	Genoveva- Gymnasium Köln
Mai 1988	Abitur

Studium

1988 – 1995	Studium der Humanmedizin, Universität zu Köln
April 1992	Physikum
Oktober 1993	1. Staatsexamen
April 1995	2. Staatsexamen
1995 – 1998	Immatrikulation Universität München

April 1998 Immatrikulation Universität Freiburg

November 1998 3.Staatsexamen

Famulaturen

August - September 1992 Gefäßchirurgie Universitätsklinik Köln

September 1993 Gynäkologie Köln

August 1994 Orthopädie LMU München

Praktisches Jahr

Oktober 1997 – Februar 1998 Orthopädie Universität Basel, CH

Februar 1998 – Juni 1998 Chirurgie Universität Basel, CH

Juni 1998 – September 1998 Innere Medizin Universität Freiburg

Arzt im Praktikum

März 1999 – September 1999 Melanomklinik u. Poliklinik, University of
Pittsburgh, Pennsylvania, USA

September 1999 – April 2000 Onkologische Chirurgie, University of
Pittsburgh, Pennsylvania, USA

seit 1.1.2002 Praxis für Dermatologie, Allergologie,
Venerologie, Haar