

Orthopädische Universitätsklinik  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. W. Neumann)

**Die Rolle des Vaskulären Endothelialen  
Wachstumsfaktors  
in der Meniskusheilung  
Eine experimentelle Studie am Tiermodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr.med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Nicki Gießmann  
aus Brandenburg an der Havel  
Magdeburg 2004

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

Gießmann, Nicki:

Die Rolle des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors in der Meniskusheilung am Tiermodell. – 2004. - 55 Bl.: 12 Abb., 2 Tab.

### Kurzreferat

Das Heilungspotential von Meniskusläsionen, insbesondere der avaskulären Zone, ist trotz Naht nur unbefriedigend [62, 82]. Die Angiogenese, deren potentester Induktor der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist, scheint maßgeblich am Erfolg einer Heilung von verletztem Gewebe beteiligt zu sein [13, 41]. Derzeit ist nur wenig über das Vorhandensein und die Rolle von VEGF im Meniskus sowie die Mechanismen der Meniskusheilung bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei 41 New Zealand White Rabbits eine Läsion in der vaskulären bzw. avaskulären Zone des medialen Meniskus gesetzt und nach 1, 2, 5 und 10 Wochen auf das Vorhandensein von VEGF, Vaskularisierung und Heilung untersucht. In der vaskulären Zone konnten im Heilungsverlauf eine Angiogenese, signifikant erhöhte VEGF-Konzentrationen und nach 10 Wochen in allen Menisken eine Heilung der Läsion festgestellt werden. In der avaskulären Zone fand man innerhalb der zehn Wochen ebenfalls signifikant erhöhte VEGF-Konzentrationen, jedoch weder Angiogenese noch Heilung der Läsionen. Die avaskuläre Zone des Meniskus scheint eine Resistenz gegen angiogenetische Einflüsse zu besitzen, die im Rahmen der Anpassungsvorgänge an die Kraftübertragung erworben wird und Angiogenese sowie Heilung trotz hoher VEGF-Konzentrationen inhibiert [72, 74].

Schlüsselwörter: Meniskusheilung, VEGF, Angiogenese, Tiermodell

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Versuchstiere</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Operatives Vorgehen</b>	<b>12</b>
2.2.1 Setzen der Meniskusläsion	12
2.2.2 Postoperative Versorgung der Tiere	14
2.2.3 Entnahme der Menisken	15
<b>2.3 Laboruntersuchungen</b>	<b>16</b>
2.3.1 Immunhistochemische Färbung	16
2.3.2 Qualitativer Nachweis von VEGF-mRNA mittels RT-PCR	17
2.3.3 Quantitativer Nachweis von VEGF mittels ELISA	19
<b>2.4 Statistische Auswertung</b>	<b>21</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Makroskopische Beurteilung der Meniskusproben</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Lichtmikroskopische Beurteilung der Meniskusproben (Immunhistochemische Methoden)</b>	<b>23</b>
3.2.1 Färbung von Gefäßen (Faktor VIII - Färbung)	23
3.2.2 Färbung von VEGF	24
3.2.3 Färbung von VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk1/KDR)	25
<b>3.3 Nachweis von VEGF-RNA (RT-PCR)</b>	<b>27</b>
<b>3.4 VEGF-Konzentrationen im Meniskus während der Heilung (ELISA)</b>	<b>28</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>29</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>42</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>44</b>
<b>7 DANKSAGUNG</b>	<b>53</b>
<b>8 ERKLÄRUNG DES AUTORS</b>	<b>54</b>
<b>9 LEBENSLAUF DES AUTORS</b>	<b>55</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BMP-2	Bone Morphogenetic Protein
cDNA	copy-DNA
ChM-I	Chondromodulin-I
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	messenger-RNA
PAI-1	Plasmin Aktivator Inhibitor-1
PBS	Phospate Buffered Sialine
PCNA	Proliferating-Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
TGF(-beta)	Transforming Growth Factor(-beta)
TIMP-1	Tissue Inhibitory Metalloproteinase-1
tRNA	transport-RNA
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor

## 1 EINLEITUNG

Meniskusläsionen kommen in allen Altersschichten vor und treten bei Männern 2,5-mal häufiger als bei Frauen auf [78]. Des Weiteren wird berichtet, dass die größte Inzidenz von Meniskusverletzungen bei männlichen Patienten zwischen dem 21. und 40. Lebensjahr liegt. Im Gegensatz dazu ist die Inzidenz von Meniskusverletzungen bei weiblichen Patienten ab dem 10. Lebensjahr relativ konstant. Bei etwa einem Drittel aller Patienten mit einer Meniskusläsion besteht zusätzlich eine Verletzung des vorderen Kreuzbandes.

Die Menisken wurden über eine lange Zeit als entbehrliche anatomische Strukturen des Kniegelenks gesehen. Bei symptomatischen Meniskusverletzungen bestand die Therapie der Wahl in der totalen Meniskektomie durch Arthrotomie, ohne Rücksicht auf Lokalisation, Typ und Größe der Läsion. Dieses Vorgehen brachte schnell symptomatische Besserung.

Fairbank [23] stellte 1948 erstmals in klinischen und radiologischen Untersuchungen die schädigenden Langzeiteffekte einer totalen Meniskektomie fest und schloss daraus, dass den Menisken wichtige Funktionen bei der Lastverteilung zukommen. Die Effekte, die durch Fairbank schon 1948 beschrieben wurden, konnten in neueren Langzeitstudien bestätigt werden. In einer Studie von Roos et al. [81] gaben Patienten 19 Jahre nach Meniskektomie eine signifikante Zunahme von Symptomen und funktionellen Einschränkungen im Vergleich zu Kontrollen an. McNicholas et al. [57] zeigten bei 36% ihrer Patienten 30 Jahre nach totaler Meniskektomie radiologische Veränderungen im Sinne einer Gelenkspaltverschmälerung.

Basierend auf diesen Erfahrungen wird den Menisken eine biomechanische Bedeutung für die Gelenkprotektion zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Menisken eine Rolle bei der Stabilisierung, Lastübertragung und -verteilung, Schockabsorption und Schmierung des Kniegelenks besitzen [1, 30, 58, 85].

Durch die partielle Meniskektomie sollte künftig unter Berücksichtigung der Funktionen der Menisken und in Anbetracht der schlechten Langzeitergebnisse der totalen Meniskektomie möglichst viel Meniskusgewebe erhalten werden. Klinische und arthroskopische Studien zeigen, dass durch partielle Meniskektomie gute Langzeitergebnisse erzielt werden können [24, 66, 84]. Jedoch lassen sich auch trotz partieller Resektion degenerative Veränderungen nicht verhindern. Kruger-Franke et al. [51] konnten in einer Langzeitstudie bei 33% der Patienten 7 Jahre nach partieller Meniskektomie radiologisch degenerative Kniegelenksveränderungen im Sinne von Gelenkspaltverschmälerungen nachweisen.

Seit ca. 20 Jahren wird der Meniskusrekonstruktion große Bedeutung zugemessen. Erste Versuche einer Meniskusnaht gehen bereits auf 1885 zurück [4]. Jedoch sind nicht alle Meniskusläsionen für eine Rekonstruktion geeignet. Neben der Rissform ist die Lokalisation der Läsion ein entscheidender Faktor für den Erfolg einer Meniskusnaht. Morgan et al. [62] reevaluierten in Re-Arthroskopien den Erfolg von Meniskusrekonstruktionen nach Läsion in der peripheren Zone des Meniskus und stellten in 84% der Fälle eine Heilung fest, wobei 65% komplette und 19% inkomplette Heilung beschrieben wurde. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Morgan et al. bei peripheren Läsionen konnten Rubman et al. [82] bei arthroskopisch rekonstruierten Läsionen der inneren Zone des Meniskus in Re-Arthroskopien lediglich eine Heilungsrate von 63% feststellen. Hier waren nur 25% komplett und 38% inkomplett geheilt. Somit scheint die Lokalisation der Läsion eine erhebliche Rolle bei der Meniskusheilung zu spielen.

Die Menisken bestehen aus einem Gewebe, das Fibrochondrozyten enthält, die in einer Knorpelgrundsubstanz (Matrix) aus größtenteils Wasser, Kollagen und Proteoglykanen liegen [10, 17, 45, 55]. Die Durchblutung der Menisken beschränkt sich auf ihre Peripherie [75]. Arnoczky und Warren [5] beschrieben erstmals die Durchblutung der Menisken und teilten sie, ausgehend vom Grad der Vaskularisierung, in verschiedene Zonen ein. Die durchbluteten kapselnahen Anteile, die der äußeren Zirkumferenz anliegen,

werden auch als Zone I, periphere Zone, vaskuläre Zone oder rot-rote Zone bezeichnet. Die sich nach innen anschließende Zone, die nur noch gering durchblutet ist, wird auch Zone II, mittlere Zone oder rot-weiße Zone genannt. Die nicht durchbluteten Anteile, die bis an die innere Zirkumferenz reichen und den größten Anteil am Meniskus haben, werden auch als Zone III, innere Zone, avaskuläre Zone oder weiß-weiße Zone bezeichnet.

Da der Heilungsprozess von verletztem Gewebe stark von dessen Vaskularisierung abhängt, ist anzunehmen, dass die fehlende Blutversorgung der inneren Zone des Meniskus ursächlich an dessen schlechterem Heilungspotential beteiligt ist [13, 41, 49].

Ähnlich wie z.B. bei der Wundheilung spielt auch bei der Heilung von Meniskuskäsionen die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierender Mikrovaskularisierung eine wichtige Rolle. Dieser Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet. Sie wird durch proangiogenetische Faktoren, wie die Fibroblast Growth Factor (FGF) Familie, Transforming Growth Factor (TGF) alpha und beta, Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Cyclooxygenase-2 (COX-2), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha, Interleukin 8 (IL-8) etc., Angiogenin und die Angiopoetine, die Liganden des Tie-2 Rezeptors, und antiangiogenetische Faktoren, wie Thrombospondin, Angiostatin und Endostatin, geregelt [15, 21, 26]. Diese Faktoren sind unter normalen Bedingungen ausgewogen.

Eine Schlüsselfunktion unter den proangiogenetischen Faktoren scheint jedoch der 1983 von Senger et al. [86] erstmals beschriebene Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) zu besitzen. Es werden verschiedene Isoformen des VEGF unterschieden, die durch alternatives Splicing entstehen: VEGF<sub>115</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> [26, 90]. VEGF stimuliert die Angiogenese an Endothelzellen und die Mobilisierung und Differenzierung von epithelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark [8, 35, 92]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, im Wachstum und auch im ausgewachsenen Organismus. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Verlust des Genes für VEGF zu schweren Defekten in der Vaskularisierung und zum Tod des

Embryos führt [16, 27]. Wird die Funktion von VEGF unterdrückt, kommt es im wachsenden Organismus zu einer Suppression der Vaskularisierung der Wachstumsfugen mit vermindertem Längenwachstum [36]. Im reifen Organismus ist VEGF für die Angiogenese während der Wundheilung und des Ovulationszyklus wichtig [26, 28]. VEGF spielt auch in der pathologischen Angiogenese eine Rolle, z.B. in der Tumorangiogenese; im größten Teil der Karzinome ist die VEGF-Expression hoch reguliert [26]. Weiterhin ist VEGF an der Pathogenese der Rheumathoidarthritis beteiligt, bei der es, im Gegensatz zu degenerativen Gelenkerkrankungen, in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden kann [25].

VEGF ist ein Glykoprotein, das von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden kann und parakrin sowie autokrin auf Endothelzellen, welche in Arterien, Venen und Lymphgefäßen zu finden sind, wirkt [26]. Dort bindet VEGF an die Tyrosinkinaserzeptoren VEGF-R1 (flt-1) und VEGF-R2 (flk-2). Ein Defekt einer dieser Rezeptoren führt während der Embryonalentwicklung zum intrauterinen Fruchttod [31, 87]. An dem Rezeptor gebunden, induziert VEGF eine Kette von Effekten, beginnend mit einer Vasodilatation und einer gesteigerten Gefäßpermeabilität [21]. Dadurch gelangen große Mengen makromolekularer Plasmaproteine, wie Fibrinogen und Plasminogen, aus dem Gefäßlumen ins perivaskuläre Gewebe und bilden dort ein vorläufiges fibrinreiches Gerüst für migrierende Endothelzellen. Bevor diese einwandernden Zellen ein neues tubuläres Netzwerk formen, werden die ursprünglichen Gefäße und die umliegende Matrix durch verschiedene Proteinase, unter ihnen die Matrix-Metalloproteinase (MMPs), destabilisiert [21].

Die Transkription des VEGF-Gens und somit die Bildung von VEGF unterliegt einer Regulation, in der Hypoxie eine Schlüsselfunktion besitzt [26, 54, 59, 60, 73, 76]. Dabei führt ein niedriger Sauerstoffpartialdruck zu einer erhöhten Expression von VEGF-messenger-RNA (mRNA). Weiterhin sind auch andere Faktoren, z.B. IGF 1, EGF und TGF-beta, in der Lage, eine VEGF-mRNA-Expression zu induzieren [32, 96]. Die Zahl der VEGF-Rezeptoren kann ebenfalls durch Hypoxie gesteigert werden [91].



Während VEGF, Angiogenese und Meniskusheilung in der Literatur mittlerweile sehr umfangreich beschrieben sind, ist bisher nur wenig über das Vorhandensein und die Rolle von VEGF in den Kniegelenksmenisken, insbesondere im Zusammenhang zu den Mechanismen der Meniskusheilung, speziell des avaskulären Bereiches bekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll im Tiermodell der Verlauf der Meniskusheilung nach Setzen einer Meniskusläsion unter besonderer Beachtung des Vorkommens von VEGF untersucht werden.

Es werden folgende Hypothesen aufgestellt:

- 1) In der inneren Zone des Meniskus wird bei einer Läsion weniger VEGF exprimiert als in der Peripherie.
- 2) Die geringe Expression von VEGF ist ursächlich an der Avaskularität der inneren Zone beteiligt.
- 3) Durch die Avaskularität kann das schlechte Heilungspotential zentraler Läsionen erklärt werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden 41 Kaninchen im Alter zwischen 5 und 7 Monaten (New Zealand White Rabbits Hsd: MZW, HARLAN, Deutschland) verwendet, deren Gewicht bei  $3,65 \pm 0,41$  kg lag. Die Tiere wurden im Tierlabor des Zentrums für Neurowissenschaftliche Innovation und Technologie ZENIT GmbH, Magdeburg gehalten und operiert.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens 14 Tage an die Umgebung des zentralen Tierlabors gewöhnt und unter klimatisierten Bedingungen ( $18^{\circ}\text{C}$ ,  $60 \pm 15\%$  rel. Luftfeuchte, bei 16-fachem Luftwechsel pro Stunde) bei Wasser- und Futtergabe ad libitum (Haltungsdiät für Kaninchen, Altromin, Lage) und bei Tag-Nacht-Zyklus (je 12 h) in Einzelhaltung in Käfigen (EC2, Scanbur BK, Dänemark) gehalten.

Den Tierversuchen war durch das zu dieser Zeit zuständige Regierungspräsidium Dessau (Aktenzeichen 43.3-42502/2-431) zugestimmt worden.

Die verwendeten Tiere wurden für den Versuch in 8 Gruppen (Tabelle 1) randomisiert, wobei der technische Ablauf der Versuche in allen Gruppen in gleicher Weise erfolgte. Abhängig von der Gruppe wurde eine während eines operativen Eingriffes gesetzte Meniskusläsion entweder im meniskosynovialen Übergang (Rot-Rote Zone; periphere Läsion) oder nahe der inneren Zirkumferenz (Weiß-Weiße Zone; zentrale Läsion) des Innenmeniskus platziert.

<b>Gruppe</b>	n	Ort der Meniskuläsion	Lebensdauer bis Entnahme der Menisken
<b>1rr</b>	5	Meniskosynovialer Übergang	1 Woche
<b>1ww</b>	5	Innere Zirkumferenz	1 Woche
<b>2rr</b>	5	Meniskosynovialer Übergang	2 Wochen
<b>2ww</b>	5	Innere Zirkumferenz	2 Wochen
<b>5rr</b>	5	Meniskosynovialer Übergang	5 Wochen
<b>5ww</b>	5	Innere Zirkumferenz	5 Wochen
<b>10rr</b>	5	Meniskosynovialer Übergang	10 Wochen
<b>10ww</b>	3	Innere Zirkumferenz	10 Wochen

Tabelle 1: Einteilung der Tiere in Gruppen, abhängig von der Lokalisation der gesetzten Meniskuläsion und der geplanten Heilungsdauer bis zur Entnahme der Menisken; Tiere, die während des operativen Eingriffes verstarben, wurden nicht auf die Gruppen verteilt

## 2.2 Operatives Vorgehen

### 2.2.1 Setzen der Meniskuläsion

Den Tieren wurde in einem ersten Eingriff an einem der Knie eine künstliche Meniskuläsion gesetzt. Die Menisken des anderen Knies wurden nicht berührt. Die Anästhesie erfolgte zu Beginn der Versuche mit Phenobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos). Die Substanz wurde über einen intravenösen Zugang an einer Ohrvene in einer Dosis von 60mg / kg Körpergewicht appliziert. Diese Dosis entsprach der Empfehlung des Herstellers. Innerhalb von ca. drei bis zehn Minuten fielen die Tiere in Narkose. Anschließend wurde das zu operierende Knie mittels eines elektrischen Rasierers vom Fell befreit und auf dem Operationstisch, der durch eine Rotlichtlampe angewärmt wurde, positioniert (Abb. 1). Das Knie wurde mit Braunoderm® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert und das Operationsfeld mit einem Lochtape abgedeckt und einer OP-Folie abgeklebt (Abb. 2).



Abbildungen 1 und 2: Operationsfeld vor Setzen der Meniskuläsion

Es folgte ein sagittaler paramedianer Hautschnitt über der Patella mit nachfolgender medialer Arthrotomie. Die Patella wurde anschließend nach lateral luxiert und der mediale Meniskus dargestellt. Mit einem Miniskalpell wurde dann eine longitudinale Läsion von ca. 5mm Länge gesetzt, die sich je nach Gruppe entweder im meniskosynovialen Übergang oder nahe der inneren Zirkumferenz befand (Abb. 3). Das Gelenk wurde mit 0.9% NaCl-

Lösung gespült und die Wunde verschlossen. Für die Kapselnaht kamen resorbierbare Fäden vom Typ 4-0 Vicryl® (Ethicon, Norderstedt), für die Hautnaht nicht resorbierbare Fäden vom Typ 3-0 Prolene (Ethicon, Norderstedt) zum Einsatz. Es wurde Flüssigpflaster (Hansaplast®, Beiersdorf, Hamburg) auf die genähte Wunde aufgesprüht und die Tiere wieder in den Käfig zurückgelegt, wo sie schnell wieder erwachten. Die durchschnittliche Zeit von Injektion des Narkotikums bis zum Hautschnitt betrug 20 min, die Zeit vom Hautschnitt bis zur Naht ca. 15 min.

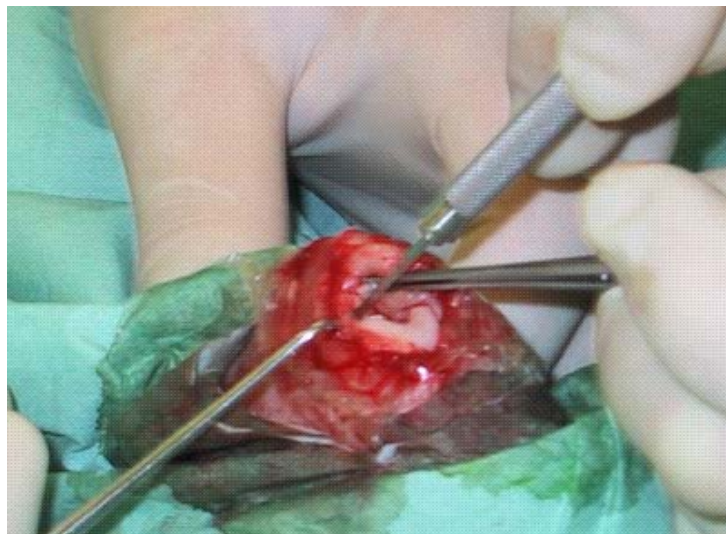


Abbildung 3: Longitudinaler Einschnitt in den medialen Meniskus

Im weiteren Verlauf entschied man sich, die Narkose der Tiere von Narcoren® auf Ketaminhydrochlorid (Ketanest®, Parke Davis GmbH Berlin) und 2% Xylazinhydrochlorid (Rompun® Bayer Vital, Leverkusen) umzustellen, da mit der ursprünglichen Narkosetechnik nicht in allen Fällen eine ausreichende Analgesie erreicht wurde. Während des Eingriffes kam es in einigen Fällen zu starken Schmerzreaktionen des Tieres, so dass es nötig war, eine weitere Gabe Narcoren® vorzunehmen. Drei Tiere starben intraoperativ, was wahrscheinlich auf eine Überdosis Narcoren® zurückzuführen war. Eine Sektion der Tiere zur genauen Bestimmung der Todesursache erfolgte nicht.

Für die weiteren Versuche wurden die Tiere mit 60 mg / kg Körpergewicht Ketanest® und 4 mg / kg Körpergewicht Rompun®, welches den empfohlenen Dosen des Herstellers entsprach, analgesiert und relaxiert. Die Applikation erfolgte als intramuskuläre Injektion in die

Glutealregion; es war somit kein venöser Zugang mehr nötig. Die Tiere fielen innerhalb von ca. 10 Minuten in Narkose. In 2 Fällen kam es während des Eingriffes zu Reaktionen des Tieres, woraufhin Ketanest® nachinjiziert wurde.

### 2.2.2 Postoperative Versorgung der Tiere

Den ersten Tieren wurde am postoperativen Tag das zentral wirksame Schmerzmittel Buprenorphin-HCl (Temgesic®, Boehringer, Mannheim) i.m. appliziert. Da sich nach der Operation weiterer Tiere jedoch zeigte, dass sie sich sehr schnell wieder erholten und bereits am ersten postoperativen Tag genau so mobil und aktiv waren wie nicht operierte Tiere, wurde ab sofort auf die Gabe von Schmerzmitteln verzichtet. So ließen sich ein zusätzlicher Stressfaktor und ein zusätzliches Infektionsrisiko ausschalten. Das verwendete Hansaplast® Flüssigpflaster zum Schutz der Wunde erwies sich als vollkommen ausreichend (Abb. 4). In 2 Fällen riss postoperativ die Hautnaht, und es kam zu Wunddehiszenzen. Unter erneuter Narkose wurden die Tiere mit einer zweiten Naht versorgt. Ansonsten waren alle Wundheilungsverläufe unauffällig. Bei regelmäßiger Kontrolle der Hautnaht wurde darauf verzichtet, das Nahtmaterial nach einer bestimmten Zeit zu entfernen, da die Verhältnisse an den Narben trotz nicht resorbierbarer Hautfäden auch nach mehreren Wochen reizlos waren und die Hautfäden oft nicht mehr erkennbar waren (Abb. 5).



Abb. 4: Wunde mit Flüssigpflaster, postop.



Abb. 5: Wunde nach 10 Tagen

### 2.2.3 Entnahme der Menisken

In Abhängigkeit von der Gruppe wurden die Tiere nach einer definierten Zeit der Meniskusheilung getötet. Daraufhin wurden sowohl der manipulierte Meniskus als auch der intakte Meniskus (Referenzmeniskus) entnommen. Die Tötung der Tiere geschah mittels Überdosis Phenobarbital-Natrium (320 mg, entspricht 2 ml Narcoren®), welches über einen venösen Zugang in eine Ohrvene appliziert wurde. Es folgte das Rasieren beider Knie und das sterile Abdecken des Operationsfeldes. Mit Durchtrennung der Patellarsehne und des übrigen Bandapparates des Knies wurde ein ausreichender Zugang zum medialen Meniskus geschaffen (Abb. 6). Es wurden die Heilungsverhältnisse am Meniskus makroskopisch überprüft, insbesondere das Vorhandensein von Gefäßen und die eventuelle Persistenz der Läsion. Anschließend wurde der Meniskus entnommen und im Bereich der Läsion radiär geteilt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Der Teil des Meniskus, der zum Nachweis von VEGF mittels ELISA bestimmt war, wurde in Phosphate buffered Saline (PBS; Invitrogen, Japan) aufbewahrt und später bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zu dem Teilstück des Meniskus, das zum Nachweis von mRNA durch PCR bestimmt war, wurde zur Hemmung von RNasen RNA-later (Qiagen, Valencia, CA, USA) gegeben und es wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Gewebestücke für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in 4% Formaldehyd fixiert. Die Menisken des kontralateralen, nicht operierten Knies wurden in Analogie zu den Proben ebenfalls in entsprechenden Lösungen fixiert.

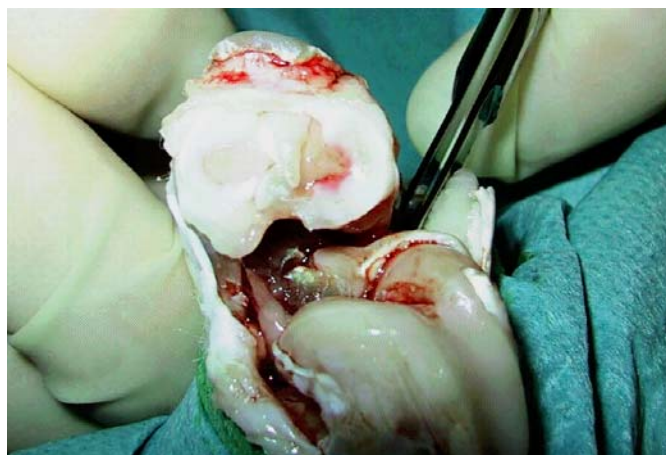


Abbildung 6: Operationssitus bei Entnahme der Menisken

## 2.3 Laboruntersuchungen

Die Laboruntersuchungen wurden am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter dem Direktorat von Prof. Dr. med. B. Tillmann durchgeführt.

### 2.3.1 Immunhistochemische Färbung

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbemethode bestand in dem Auftragen spezifischer Antikörper gegen Strukturen, die nachzuweisen waren (Primärdetektion), und der anschließenden Zugabe eines zweiten Antikörpers, der ein Enzym gekoppelt hatte, welches die Färbungen in den Schnitten hervorrief (Sekundärdetektion). Es wurden jeweils Antikörper gegen VEGF, VEGF-Rezeptoren und Faktor VIII eingesetzt, um VEGF-haltige Zellen, VEGF-Rezeptoren, bzw. Gefäße sichtbar zu machen.

Die Proben für die immunhistochemische Untersuchung wurden direkt nach der Entnahme in 4%Formaldehyd aufbewahrt und bei 4°C gelagert. Später wurden sie in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Proben wurden mittels Mikrotom 6µm starke Schnitte angefertigt, die auf Histobond-Objektträgern aufgetragen wurden. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert. Nach einer Mikrowellenbehandlung bei 750W in 3% Wasserstoffperoxyd und 0.01M Citratpuffer, pH 6,0, für 2x 5 min erfolgte die Primärdetektion mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGF (Konzentration 1:40 in TBS; sc7269 monoklonalen Maus IgG2a, Santa Cruz Biotechnology CA, USA) sowie gegen VEGFR-1/Flt-1 und VEGFR-2/Flk-1 (Konzentration 1:80; sc316-G, polyklonales Meerschweinchen IgG; Santa Cruz). Anschließend wurden die Schnitte in TBS-Puffer gespült, dann zusammen mit dem biotinylierten und Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (DAKO A/S, Dänemark, Verdünnung 1:200 in TBS) für 45min inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 2-3 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser



gewaschen und mit Aqua Tex (Merck, Darmstadt) bedeckt. Von jedem Präparat wurde ein Schnitt mit dem Sekundärantikörper allein inkubiert. Weiterhin wurden Positivkontrollen an Geweben mit bekannten Antigenbindungsstellen durchgeführt.

Die Faktor VIII Immunreaktivität wurde semiquantitativ entsprechend der Methode von McDougall et al. [56] analysiert. Unter einer 200-fachen Vergrößerung wurde die Stärke der Vaskularisierung beurteilt. Es wurde zwischen keiner Vaskularisierung, geringer Vaskularisierung, mittlerer Vaskularisierung und starker Vaskularisierung unterschieden.

Für die konventionelle lichtmikroskopische Betrachtung der Proben wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hematoxylin Eosin (HE) bzw. Toluidinblau gefärbt.

### **2.3.2 Qualitativer Nachweis von VEGF-mRNA mittels RT-PCR**

Bei der Reverse Transcriptase – Poly Chain Reaction wird RNA durch die Reverse Transkriptase in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben, welche anschließend amplifiziert wird, um Mengen zu erhalten, die mit Hilfe einer Farbreaktion überhaupt erst sichtbar werden. Durch Einsatz eines spezifischen Primers, der nur an der gesuchten cDNA bindet, wird selektiv nur die gesuchte cDNA amplifiziert.

Die entsprechenden Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in RNA-later bei 4°C aufbewahrt. Die Lösung verhinderte eine Zerstörung der RNA durch unspezifische RNasen. Da sich kollagenfaseriges Bindegewebe nicht direkt in herkömmlichen Geräten homogenisieren lässt, musste es zuvor unter Stickstoffkühlung in einem Achatmörser pulverisiert werden. Von zellarmen und dafür extrazellulärmatrixreichen Geweben, wie Sehnen oder Gelenkknorpel, mussten für die Isolierung mindestens 20 mg eingesetzt werden, um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erhalten. Um die RNasen des Gewebestückchens zu inaktivieren, wurde das Gewebepulver in stark denaturierendem Guanidiniumisothiocyanat und β-Mercaptoethanolhaltigen Puffer gelöst. Um das Gemisch aus Gewebepulver und Puffer

weiter zu homogenisieren, eine effektive Debrisabtrennung durchzuführen und um die Viskosität durch das Vorhandensein von Makromolekülen zu reduzieren, wurde ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 15000 rpm (Mikrozentrifuge Eppendorf) durch eine Biopolymermembran (Qiagen, Valencia, CA, USA) durchgeführt. Diese Methode minimierte zudem Verluste, die bei herkömmlichen Verfahren auftraten und gerade bei zellarmen Geweben nicht tolerierbar waren. Das Homogenat wurde anschließend ein weiteres Mal für 3 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol versetzt, um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen. Das Gemisch wurde in ein Mikroreaktionsgefäß mit einer Silikagelmembran gegeben und anschließend bei 8000 x g (10000 rpm/Mikrozentrifuge) zentrifugiert. Obwohl die Silikagelmembran so beschaffen ist, dass die DNA nicht binden kann, wurde jetzt ein zusätzlicher DNA-Verdau-Schritt mit DNase I eingefügt (15 min RT). In den folgenden Schritten wurde mit verschiedenen Puffern die RNA von Verunreinigungen freigewaschen, indem der Puffer auf die RNA bindende Membran pipettiert wurde, um anschließend zentrifugiert zu werden. Die RNA wurde abschließend mit 2 x 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Bei -70°C konnte die RNA für mehrere Wochen gelagert werden. Durch diese Prozedur wurden in erster Linie RNA Moleküle isoliert, die länger als 200 Nukleotide sind. Kleine Nukleotide, wie 5,8 S RNA, 5S RNA oder transport-RNA (tRNA) binden die Silikagelmembran nicht quantitativ.

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA kann anhand eines RNA-Geles nachvollzogen werden, in welchem die Banden nach erfolgter Ethidiumbromid-Inkubation der 28 S bzw. 18 S rRNA bei 5,0 bzw. 1,9 kb begutachtet werden können.

Durch das Prinzip der One-Step RT-PCR wird eine maximale Ausbeute bei minimaler Kontaminationsgefahr ermöglicht. Zu Beginn der Reaktion wurden alle Komponenten der reversen Transkription und der Polymerasekettenreaktion zusammenpipettiert. Die reverse Transkriptase arbeitet in dem ersten Schritt bei 50°C für 30 Minuten. Wird die Temperatur im zweiten Schritt auf 95°C erhöht, so ändert sich die Konformation der Taq-Polymerase. Bei diesen hohen Temperaturen

kommt es zu keinerlei unspezifischen Bindungen der Primer, so dass die Bedingungen eines „Hot Starts“ erfüllt sind. Die reverse Transkriptase wird bei der Temperaturerhöhung denaturiert.

Eine Besonderheit der verwendeten Splice-Varianten RT-PCR für die einzelnen VEGF Splice-Varianten ist die Tatsache, dass die Primer mit Bereichen hybridisieren, die in allen Varianten vorkommen. So bindet der Sense Primer an Exon 1 und der Antisense Primer an Exon 8. Herausgespleißt werden bei VEGF<sub>165</sub> Exon 6 und bei VEGF<sub>121</sub> Exon 6 und 7. Zusätzlich hat diese Form der RT-PCR den Vorteil, dass Splice-Varianten nur auf RNA-Ebene vorkommen, so dass man sicher sein kann, keine genomische DNA amplifiziert zu haben.

Die amplifizierte RNA konnte mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### **2.3.3 Quantitativer Nachweis von VEGF mittels ELISA**

Beim VEGF Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay wurde ein Primärantikörper verwendet, der nur VEGF bindet. Alle nicht gebundenen Bestandteile wurden in Waschschritten entfernt. Mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers bildeten sich Antikörper-VEGF-Antikörper-Enzym-Komplexe. Ein zugesetztes Substrat wurde je nach Menge des Antikörper-VEGF-Antikörper-Enzym-Komplexes mehr oder weniger stark verändert, und der daraus resultierende Farbumschlag konnte im Fotometer gemessen werden.

Die zum Nachweis von VEGF entnommenen Proben der Menisken wurden direkt nach Gewinnung in 1,5 ml Eppendorfgefäße mit PBS-Lösung (Phosphate buffered saline) gegeben. Kurze Zeit später wurden die Proben wieder aus der Lösung genommen und bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Da sich kollagenfaseriges Bindegewebe nicht direkt in herkömmlichen Geräten homogenisieren lässt, musste es zuvor unter Stickstoffkühlung in einem Achatmörser pulverisiert werden. Die so gewonnenen Proben wurden gewogen und mit PBS versetzt. Die Massen der Proben betragen

ca.  $18 \pm 10$  mg. Der größte Anteil der Proben wurde mit 500  $\mu$ l PBS + 0,5% BSA versetzt und anschließend mit einem speziellen Mixer (Retsch, Deutschland) homogenisiert. Die Menge an Homogenat reichte in diesem Fall für eine spätere Doppelbestimmung. Da einige wenige Proben jedoch sehr kleine Massen hatten, entschied man sich hier, die zugesetzte Menge an PBS auf 200  $\mu$ l zu verringern, um die in der Lösung befindliche Menge an VEGF nicht so weit zu verdünnen, dass sie eventuell unter die spätere Nachweisgrenze fällt. In diesem Fall reichten die so gewonnenen Volumina jedoch nur für Einfachbestimmungen. Die verschiedenen Gewichte und Lösungsvolumina wurden später bei Errechnung der Konzentrationen wieder berücksichtigt.

Das anschließende Zentrifugieren bei 13000 rpm über 10 min in einer Eppendorf-Zentrifuge ließ die nicht gelösten Anteile wie Zelldetritus als Sediment absinken, während der klare Überstand unter anderem das im weiteren Verlauf nachzuweisende VEGF enthielt.

In Vorbereitung des eigentlichen Assay wurde eine Flachboden-Mikrotiterplatte (CoStar 3590) mit einer Lösung von Catching-Antikörpern (AF-293-NA, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) befüllt. Diese Antikörper binden an freie Aldehydgruppen am Boden der Wells der Mikrotiterplatte. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 350 $\mu$ l eines PBS-Waschpuffers (PBS mit 0,05% Tween-20) pro Well, 5 min Schütteln und dann Ausklopfen auf Zellstoff) folgte das Blocking (PBS mit 1% BSA; 5% Sucrose; 0,05% NaN<sub>3</sub>) der übrigen freien Aldehydgruppen. Vor dem anschließenden Auftragen der Proben und des Standards wurde wieder dreimal gewaschen. Von den Proben (Überstand nach Zentrifugieren, s.o.) wurden 200 $\mu$ l pro Well aufgetragen. Analog wurde mit den Standardproben verfahren. Diese enthielten menschliches rekombinantes VEGF<sub>165</sub> (PreproTech, Rocky Hill, NJ, USA) in den Konzentrationen 125pg/ml, 250pg/ml, 500pg/ml und 1000pg/ml. VEGF wurde nun von den Catching-Antikörpern am Boden der Mikrotiterplatte gebunden. Nicht gebundene Bestandteile wurden durch 3-maliges Waschen entfernt. In der folgenden Detektion gab man biotinylierte Detektionsantikörper (BAF 293, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) hinzu, die sich an das VEGF lagerten. Nicht gebundene Detektionsantikörper wurden durch 3-maliges

Waschen entfernt. Zur Enzymkopplung wurde Streptavidinperoxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zum Binden an die Detektionsantikörper aufgetragen, nicht gebundene Bestandteile wurden durch 3-maliges Waschen entfernt. In der Nachweisreaktion wurde das Substrat Tetramethylbenzidin in die Mikrotiterplatte zugegeben und von den dort gebundenen Enzymen chemisch verändert, so dass es zum Farbumschlag kam. Nach 30 s wurde eine Stopplösung zugegeben, die die farbgebende Reaktion anhielt. Zuletzt konnte man die Extinktionen der Farben in den Wells bei einer Wellenlänge von 450nm im SLT-Photometer messen (550 nm Referenz).

An den Extinktionen der Standardproben orientierend, wurden auf diese Weise die Gesamtkonzentrationen aller Splice-Varianten des VEGF in den Proben nachgewiesen.

## **2.4 Statistische Auswertung**

Alle Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse zwischen der operierten und nicht operierten Seite erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon Tests. Eine Zwei-Faktor-ANOVA wurde für die VEGF Expression in Abhängigkeit von der Heilungszeit und Lokalisation der Läsion verwendet. Im Falle einer Signifikanz erfolgte Bonferroni's Post Hoc Test. Dem statistischen Signifikanzniveau lag ein Alpha-Wert von  $p < 0,05$  zugrunde. Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS 9.0 verwendet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Makroskopische Beurteilung der Meniskusproben

Bei der Entnahme der Menisken wurde das Gewebe makroskopisch beurteilt. Sowohl bei den peripheren als auch bei den zentralen Läsionen zeigte sich nach einer und nach zwei Wochen keine Heilung (Tabelle 2). Es konnte eine starke Hypertrophie der Synovialis beobachtet werden, die in fünf Fällen die Läsion bedeckte. Nach fünf Wochen waren vier von fünf peripheren Läsionen verheilt. Die Synovialis zeigte sich weiterhin hypertroph, auf der Meniskusoberfläche waren kapilläre Gefäße zu erkennen. Demgegenüber zeigten die Menisken in der zentralen Zone nach fünf Wochen weder Heilung noch Vaskularisierung. Nach zehn Wochen waren alle Meniskusläsionen der Peripherie verheilt, während die der zentralen Zone nach wie vor keine Heilung zeigten.

Dauer der Heilung	Verheilte Läsionen	
	peripher	zentral
1 Woche	0 / 5	0 / 5
2 Wochen	0 / 5	0 / 5
5 Wochen	4 / 5	0 / 5
10 Wochen	5 / 5	0 / 3

Tabelle 2: makroskopische Heilung der Meniskusläsionen: während in der peripheren Zone nach zehn Wochen alle Läsionen verheilt waren, persistierten sämtliche zentrale Läsionen auch nach zehn Wochen

## **3.2 Lichtmikroskopische Beurteilung der Meniskusproben (Immunhistochemische Methoden)**

### **3.2.1 Färbung von Gefäßen (Faktor VIII - Färbung)**

Mittels Antikörper gegen Faktor VIII wurden Gefäße in mikroskopischen Schnitten der Menisken dargestellt. Dies gelang bei allen peripheren Meniskuläsionen. Nach einer Woche der Heilung wurde in vier von fünf Schnitten von peripheren Läsionen eine starke Vaskularisierung gefunden, während in der inneren Zirkumferenz keine angefärbten Gefäße gesehen wurden. Nach zwei Wochen waren noch drei von fünf Menisken mit Läsionen der peripheren Zone stark vaskularisiert, während die Vaskularisierung nach fünf und zehn Wochen nur noch mittel bis gering war.

Während des gesamten Heilungszeitraumes konnte in der inneren Zirkumferenz keine Vaskularisierung festgestellt werden.

### 3.2.2 Färbung von VEGF

Mittels monoklonaler Antikörper wurde in histologischen Schnitten der Menisken VEGF dargestellt.

Die Heilung war in der Frühphase (1 und 2 Wochen) noch inkomplett und der Wundspalt zwischen innerem und peripherem Läsionsrand weiterhin sichtbar. Die angrenzende Synovialis war verdickt, und die Synovialiszellen zeigten eine starke VEGF-Expression. Subsynoviale Blutgefäße zeigten gleichfalls eine starke Färbung von VEGF.

Die Zellen im Bereich von Meniskuläsionen im vaskularisierten Bereich unterschieden sich in ihrem Phänotyp von denen, die sich im Bereich von Meniskuläsionen des avaskulären Anteils zeigten.

In der Meniskusperipherie wurden inflammatorische Zellen, Fibrochondrozyten (offener Pfeil) und Endothelzellen (geschlossener Pfeil) gefunden (Abbildung 7). Die überwiegende Mehrheit der Zellen zeigte eine starke Färbung von VEGF.

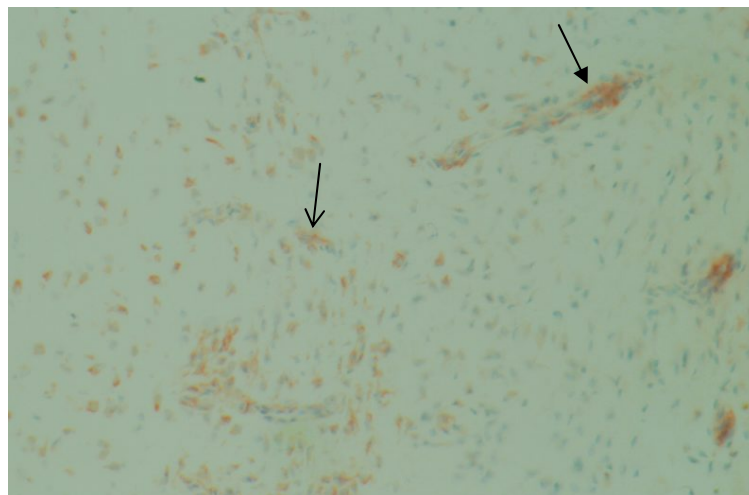


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung von VEGF positiven Fibrochondrozyten (offener Pfeil) und Endothelzellen (geschlossener Pfeil) in Gewebe einer peripheren Meniskuläsion nach zwei Wochen (Vergrößerung: x 180)



Die Anzahl der Zellen im zentralen Meniskus war geringer im Vergleich zur Meniskusperipherie. Ca 60% der Zellen reagierten immunhistochemisch positiv bei der Färbung von VEGF. Endothelzellen und Kapillaren wurden nicht gefunden (Abbildung 8).



Abbildung 8: Meniskusgewebe aus der inneren Zirkumferenz nach zwei Wochen. Die VEGF-positiven Fibrochondrozyten sind rot angefärbt (geschlossener Pfeil). Endothelzellen fanden sich hier keine. (Vergrößerung: x 180)

Die Proben der kontralateralen, nicht operierten Menisken besaßen gleichfalls VEGF positive Fibrochondrozyten, Endothelzellen und Synovialzellen.

### 3.2.3 Färbung von VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk1/KDR)

In histologischen Schnitten der Menisken wurden die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk 1/KDR) mit Hilfe polyklonaler Antikörper gefärbt.

Beide Rezeptoren konnten in allen manipulierten Menisken nachgewiesen werden. An nicht manipulierten Menisken fiel der Nachweis

von VEGFR-1 und VEGFR-2 negativ aus. VEGFR-1-positive Reaktionen waren nur an Endothelzellen von Kapillaren nachweisbar (Abbildung 9). In größeren Gefäßen wie Arteriolen oder Venolen wurden auch VEGFR-1-positive glatte Muskelzellen gefunden. Ein ähnliches Muster bot der immunhistochemische Nachweis für VEGFR-2 im Bereich der Meniskusperipherie (Abbildung 10).

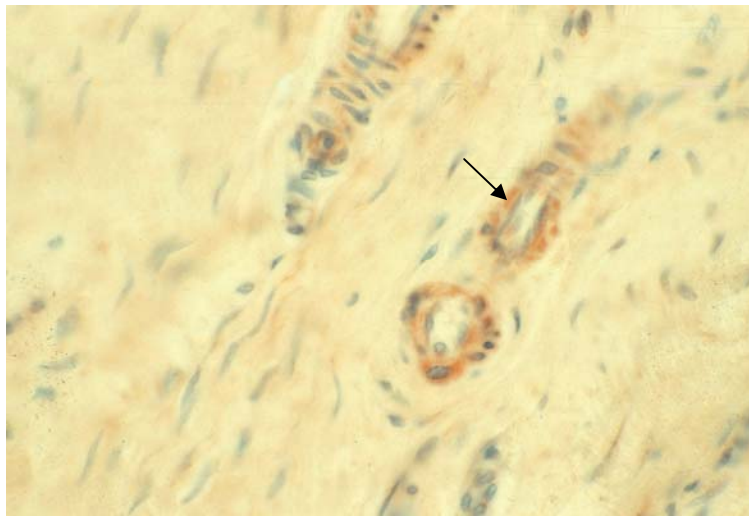


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von VEGFR-1-positiven Zellen (schwarzer Pfeil) aus dem Bereich der Meniskusperipherie nach 2 Wochen (Vergrößerung: x 260)

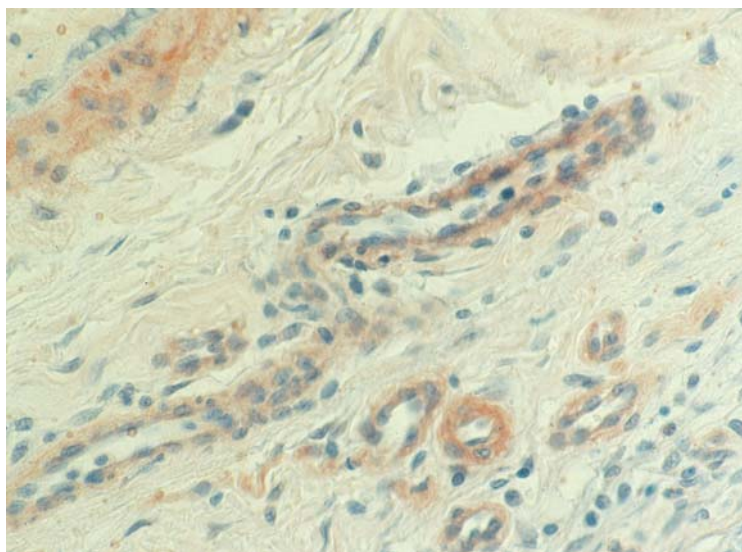


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von VEGFR-2-positiven Zellen aus der Meniskusperipherie nach 2 Wochen (Vergrößerung: x 260)

Fibrochondrozyten im Bereich der inneren Zirkumferenz waren in ihrer Anzahl deutlich geringer. Einige der Zellen reagierten positiv gegenüber dem VEGFR-2-Antikörper, aber nicht gegenüber dem VEGFR-1-Antikörper (Abbildung 11).

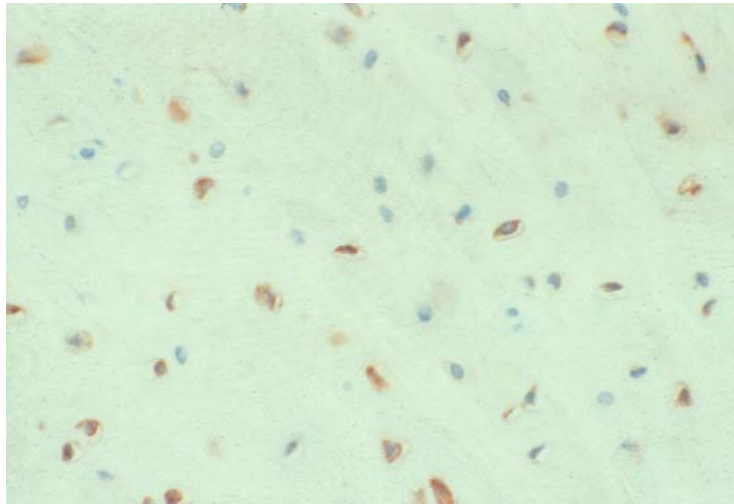


Abbildung 11: Immunhistochemische Nachweis von VEGFR-2-positiven Zellen aus dem Bereich der inneren Meniskuszone nach 2 Wochen (Vergrößerung: x 260)

### 3.3 Nachweis von VEGF-RNA (RT-PCR)

Durch RT-PCR gelang es, aus allen Meniskusproben VEGF-RNA zu amplifizieren und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt im UV-Licht sichtbar zu machen. Da alle Splice-Varianten von VEGF-RNA gleichermaßen amplifiziert wurden und sich später gleich darstellen, ließen sich keine Aussagen darüber machen, welche Splice-Varianten nachgewiesen wurden.

### 3.4 VEGF-Konzentrationen im Meniskus während der Heilung (ELISA)

Die quantitative Analyse ergab sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen signifikant höhere VEGF-Konzentrationen im Bereich der Meniskusläsion im Vergleich zum normalem Meniskusgewebe (Abb. 12).

Nach einer Woche wurde im Bereich der inneren Zirkumferenz eine VEGF-Konzentration von  $1537 \pm 129$  pg/ml Gewebe festgestellt. Die VEGF-Konzentration der Meniskusperipherie lag mit  $727,2 \pm 129,2$  pg/ml nur etwa halb so hoch ( $p < 0,001$ ).

Im weiteren Verlauf nahm die VEGF-Konzentration im Bereich der peripheren Läsion deutlich ab. Nach zwei Wochen bestand bereits kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Peripherie ( $600 \pm 70$  pg/ml) und der inneren Zirkumferenz ( $709,4 \pm 343,4$  pg/ml).

Die VEGF-Konzentrationen waren in beiden Läsionsbereichen signifikant höher gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Trotz stetiger Abnahme der VEGF-Konzentration in der Peripherie und der inneren Zone bestand auch nach fünf und zehn Wochen eine signifikant höhere VEGF-Konzentration als im Vergleich zur Kontrolle.

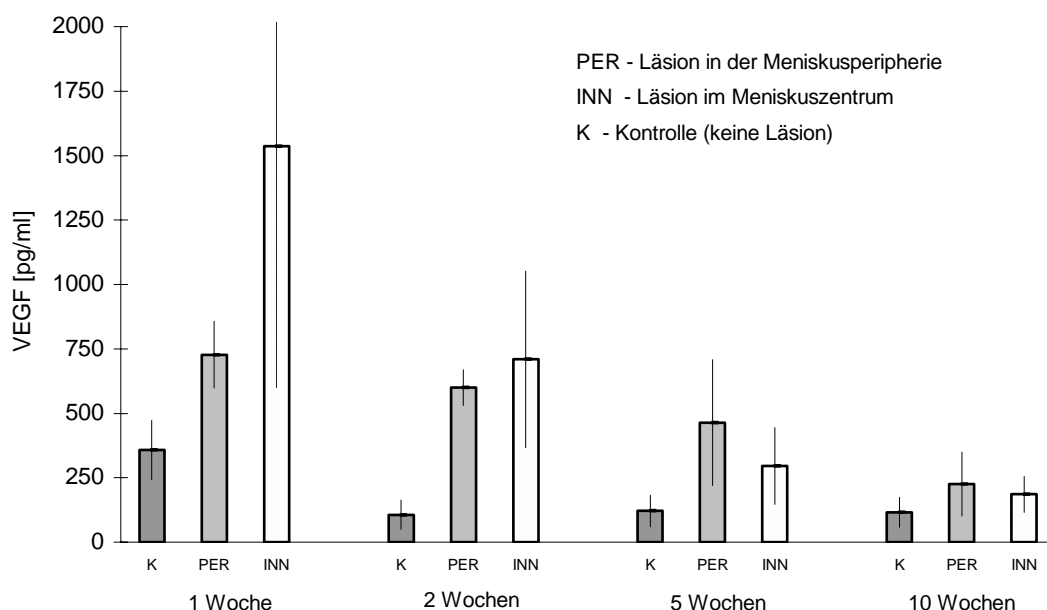


Abbildung 12: VEGF-Konzentrationen im Gewebe von Menisken mit peripherer Läsion und zentraler Läsion im Vergleich zu Menisken ohne Läsion

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das Heilungsverhalten von Menisken nach Setzen einer Läsion untersucht. Dabei war von besonderem Interesse, ob im Meniskus VEGF, der potenteste Wachstumsfaktor der Angiogenese, nachweisbar ist und inwieweit sich die VEGF-Expression durch eine Läsion verändert. Für diese Frage wurde das Kaninchenmodell (New Zealand White Rabbit) verwendet, welches bereits für zahlreiche Studien zur Meniskusheilung genutzt wurde [41, 48, 68, 69, 79, 80, 98].

Nach fünf Wochen waren vier von fünf und nach zehn Wochen alle peripheren Meniskusläsionen verheilt. Ein guter Erfolg der Heilung von Läsionen der äußeren Zone des Meniskus wurde in der Literatur bereits beschrieben [6, 13, 48, 49, 102]. Dagegen war innerhalb dieser zehn Wochen keine der zentralen Läsionen geheilt. Das schlechte Heilungspotential der zentralen Zone des Meniskus stimmt mit dem Ergebnis vieler anderer Arbeiten überein [6, 34, 44, 47-49, 80, 94].

Grundlage für die unterschiedliche Heilungstendenz scheint die nicht gleichmäßige Vaskularisierung der Menisken zu sein. Die gute Vaskularisierung der Peripherie erlaubt eine erfolgreiche Meniskusheilung; die innere Zone des reifen Meniskus dagegen weist keine Vaskularisierung auf [5, 6, 20, 39, 74, 80]. Arnoczky und Warren [6] stellten in ihren Untersuchungen fest, dass nur in den äußeren 15-25% der Meniskusperipherie Gefäße nachweisbar sind. In der vorliegenden Arbeit fielen bei der makroskopischen und mikroskopischen Betrachtung der Menisken bei den peripheren Läsionen nach ein bis zwei Wochen eine starke bis mittlere Vaskularisierung und nach fünf und zehn Wochen nur noch eine geringe bis mittlere Vaskularisierung auf. Während dessen waren bei zentralen Meniskusläsionen zu keinem untersuchten Zeitpunkt makroskopische oder mikroskopische Anzeichen einer Vaskularisierung feststellbar.

Die Vaskularisierung der Menisken ist jedoch nicht zeitlebens gleichermaßen auf die äußere Meniskusperipherie beschränkt, sondern

verändert sich während des Wachstums und bis ins hohe Lebensalter [20, 74]. Peterson und Tillmann [74] stellten fest, dass die Gefäßversorgung der Menisken beim Feten der 22. Gestationswoche auf das laterale Drittel beschränkt ist, beim Neugeborenen und 11-Monatigen den gesamten Meniskus erschließt, beim 18-Monatigen nur die innere Zone ausspart, bei einer 18-Jährigen nur noch im äußeren Drittel und in allen Menisken ab dem 50. Lebensjahr nur noch im äußeren Viertel zu finden waren. Man kann somit annehmen, dass die Vaskularisierung der Menisken mit der Geburt vollständig ist und nach dem ersten Lebensjahr kontinuierlich abnimmt. Die Ursache dieses Rückganges lässt sich eventuell durch Zunahme des Druckes auf die Menisken mit Erlernen des Laufens erklären. Nach der Theorie der „kausalen Histogenese“ (Pauwels) entsteht bei intermittierender Schub- und Druckbelastung, die Petersen und Tillmann [75] als zutreffende Belastungsform für die innere Zone des Meniskus sehen, Faserknorpel. Es kann zusammengefasst werden, dass sich das Meniskusgewebe mit steigendem Lebens-, also Belastungsalter, von zentral her, wahrscheinlich zum Zwecke der Anpassung an die mechanische Funktion, kontinuierlich in Faserknorpel umformt und auf diesem Wege seine Gefäßversorgung einbüßt, bis nur noch periphere Teile über eine Blutversorgung verfügen. Dieser Mangel an Vaskularisierung hat mehrere negative Auswirkungen auf das Regenerationspotential der Menisken. Erstens können Entzündungsmediatoren ohne Blutgefäße schlechter in entsprechende Gewebe vordringen, zweitens werden bereits existierende Gefäße gebraucht, um ein Aussprossen neuer Gefäße (Angiogenese) mit VEGF induzieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass während der Heilung von Meniskusläsionen signifikant erhöhte VEGF-Konzentrationen im Bereich des verletzten Gewebes im Vergleich zu intaktem Meniskusgewebe des kontralateralen Knies gemessen werden können. Der Verlauf der VEGF-Konzentration während der Heilung der Menisken mit zentraler Läsion hob sich deutlich von denen mit peripherer Läsion ab. Nach einer Woche war die Konzentration von VEGF im Zentrum etwa doppelt so hoch wie die der Peripherie, nach zwei Wochen bestanden keine Unterschiede und nach fünf

und zehn Wochen lag in der inneren Zone eine geringere Konzentration vor. Man findet somit zu Beginn der Heilung zentraler Meniskusläsionen im Vergleich zu peripheren weitaus höhere Konzentrationen VEGF, die sich im weiteren Zeitverlauf schneller den Verhältnissen im intakten Meniskus nähern. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass hohe VEGF-Konzentrationen in Läsionsbereichen im avaskulären Meniskus messbar sind, trotz dieses potenten angiogenetischen Stimulus die Angiogenese jedoch ausbleibt. Es stellt sich die Frage, ob Unterschiede zwischen zentralem und peripherem Meniskusgewebe bestehen, die diese verschiedenen Heilungspotentiale bedingen, oder es Faktoren gibt, die eine Angiogenese des zentralen Meniskus inhibieren?

Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten, dass unterschiedliche Zellen in der Meniskusperipherie und im Meniskuszentrum angefärbt wurden. Bei den peripheren Läsionen waren es inflammatorische Zellen, Fibrochondrozyten und Endothelzellen sowie angrenzende Synovialzellen, die eine stark positive Reaktion gegenüber VEGF zeigten. Dagegen enthielten in der inneren Zone der Menisken allein Fibrochondrozyten VEGF. Diese Fibrochondrozyten kamen zahlenmäßig jedoch nicht so stark wie in der Peripherie vor.

In der Beschreibung des Feinbaus des Meniskus durch Petersen und Tillmann [75] fallen wesentliche Unterschiede des Aufbaus der inneren und der äußeren Zone des Meniskus auf. Die Zellen des Meniskus wurden in Chondrozyten, Fibroblasten und Übergangsformen eingeteilt. Humane Menisken besitzen in der inneren Zone Chondrozyten, die zwischen unmaskierten Kollagenfibrillen liegen. Dieser Faserknorpel überzieht auch die Oberfläche des übrigen Meniskus. In der Peripherie besteht der Meniskus aus straffem parallelfaserigem Bindegewebe mit darin liegenden länglichen Fibroblasten. Zwischen beiden Zonen findet man eine Intermediärzone mit beiden Zellformen sowie Intermediärtypen. Ghadially et al. [39, 40] beschrieben die Ultrastruktur von Menisken in sehr ähnlicher Weise und fanden ebenfalls Chondrozyten, Fibroblasten, die jedoch fast ausschließlich nahe der Gelenkkapsel zu finden waren, und sogenannte Zwischenformen. In Läsionsnähe beschrieben sie darüber hinaus Myofibroblasten und ein

vermehrtes Auftreten von Fibroblasten. Weiterhin wurden Mastzellen (nur in peripheren Meniskusteilen) und degenerierte nekrotische Zellen gefunden. Weitere Arbeiten berichten ebenfalls, dass es sich bei den Fibrochondrozyten der inneren Zone am ehesten um Chondrozyten handelt, da ein erhöhtes Vorkommen von Proteoglykanen und das Beobachten einer Territorialmatrix um die Zellen herum für diesen Zelltyp spricht, während in der Meniskusperipherie eher Fibroblasten anzutreffen sind [19, 39, 93]. Nakata und Shino [65] konnten in Kulturen von isolierten Zellen aus humanen Menisken ebenfalls drei verschiedene morphologische Formen erkennen: längliche fibroblastenähnliche Zellen, polygonale Zellen und kleine runde chondrozytenähnliche Zellen. Bhargava et al. [9] beobachteten, dass der Anteil an phänotypisch fibroblastenähnlichen Zellen in der inneren Zone des Meniskus 20%, in der mittleren 30% und in der äußeren 40% betrug.

Die Unterscheidung der beiden histologisch dominierenden Zelltypen, Fibroblasten und Chondrozyten, gelang nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell. Kumagae [52] stellt fest, dass die Fibrochondrozyten des Meniskus in der Charakteristik der Proteoglykansynthese am ehesten artikulären Chondrozyten gleichen. Im Gegensatz dazu kommen Wildey und McDevitt [100] in ihren Versuchen an Monolayerkulturen von Meniskuszellen, Fibroblasten der Patellarsehne und Chondrozyten des femoralen Gelenkknorpels zu der Erkenntnis, dass die Meniskuszellen in der Expression von mRNA für Matrixproteine am ehesten den Fibroblasten ähneln, nicht den Chondrozyten. Zu vereinen sind diese beiden kontroversen Erkenntnisse wohl am ehesten mit dem Modell zwei verschiedenartiger Zellen, den Fibroblasten und Chondrozyten, die, wie histologische Untersuchungen zeigen, unterschiedlich auf die verschiedenen Zonen des Meniskus verteilt sind. Das Vorkommen von diesen beiden funktionell verschiedenen Zellarten im Meniskus wurde in der Literatur mehrfach beschrieben [14, 39, 88, 93, 97]. Die Hauptfunktion dieser Zellen ist die Synthese der extrazellulären Matrix, die den Menisken ihre Eigenschaften gibt.

Neben der unterschiedlichen Zellverteilung könnte auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ein möglicher Grund für die



schlechte Heilung von Läsionen der inneren Zirkumferenz sein. Die Knorpelgrundsubstanz der Menisken besteht aus Wasser, Proteoglykanen und Kollagenen [30, 45]. Weitere Bestandteile, wie kalzifizierte Körper und Fettrümmer, wurden beschrieben, scheinen aber in ihrer geringen Menge nicht wesentlich an der Strukturbildung der Matrix beteiligt zu sein [38]. Jedoch gibt es in der Art und jeweiligen Zusammensetzung dieser Bestandteile Unterschiede in den Zonen des Meniskus. Diese Unterschiede leisten möglicherweise einen Beitrag zum besseren Heilungspotential der Meniskusperipherie. Das innere Drittel des Meniskus besteht zu 70% aus Kollagen, zusammengesetzt aus 60% Kollagen Typ II und 40% Kollagen Typ I, während die äußeren zwei Drittel des Meniskus aus 80% Kollagen, zusammengesetzt aus hauptsächlich Kollagen Typ I und lediglich Spuren von Kollagen Typ III und IV (< 1%), bestehen [17]. Im reifen Meniskus sind höhere mRNA Konzentrationen für Kollagen Typ II messbar als im unreifen Meniskus [43]. Wahrscheinlich nimmt der Gehalt an Kollagen Typ II im Zusammenhang mit der steigenden Belastung des Kniegelenkes im Laufe der postnatalen Entwicklung zu [58]. Diese Vermutung steht ganz im Einklang mit der Annahme, dass der Faserknorpel der inneren Zirkumferenz ebenfalls im Zusammenhang mit der steigenden Belastung der Menisken im Laufe der postnatalen Entwicklung immer mehr Anteil am Meniskus gewinnt, da Kollagen Typ II lediglich im inneren Drittel des Meniskus, der schließlich aus Faserknorpel besteht [75], von den dort vorkommenden Chondrozyten gebildet wird [100]. Nakano et al. [63] beschrieben in ihrer Arbeit sehr genau die biochemische Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Meniskus. Zusammenfassend stellten sie fest, dass sich die Zusammensetzung der Matrix entlang des Querschnittes des Meniskus kontinuierlich verändert. Auch hier werden diese Veränderungen mit der erhöhten Druckbelastung der inneren Zirkumferenz in Zusammenhang gebracht. Während einige weitere Autoren ebenfalls in verschiedenen Zonen des Meniskus unterschiedliche Zusammensetzungen der Matrix beschrieben [2, 22, 64], kommen andere zu dem Ergebnis, dass keine solche regionalen Unterschiede in der Matrix des Meniskus bestehen [30]. Spindler et al. [89] wiesen an Kaninchen im peripheren Drittel des Meniskus eine höhere totale Kollagensynthese nach als in den zentralen zwei Dritteln und

schlussfolgerten, dass in der Peripherie eventuell ein höheres Heilungspotential besteht. Im Gegensatz dazu konnten Tanaka et al. [93] in Zellkulturen menschlicher Fibrochondrozyten keinen quantitativen Unterschied bezüglich der Kollagensynthese in der peripheren und zentralen Zone zeigen. Auffällig war jedoch, dass die Kollagensynthesleistung mit dem Alter der Menisken abfällt. Auch Kumagae [52] konnte in seinen Untersuchungen keinen Unterschied in der Kollagensynthese zwischen Peripherie und Zentrum feststellen, jedoch eine höhere Synthese an Proteoglykanen im Meniskuszentrum, wie sie auch von anderen Autoren schon mehrfach beschrieben wurde [19, 52, 93].

Es wird deutlich, dass es in der Zusammensetzung der Knorpelgrundsubstanz Unterschiede zwischen innerer und äußerer Zone gibt, die bei der Vielzahl an Proteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen sehr komplex sind. Dabei besteht die Möglichkeit, dass dieser unterschiedliche molekulare Aufbau der verschiedenen Zonen durchaus eine unterschiedliche Heilungspotenz mitbedingt.

Die Heilung von Läsionen des vaskulären Bereichs des Meniskus ist ein extrinsischer Vorgang, da nicht die ortsständigen Meniskuszellen selbst, sondern Zellen und Faktoren die via Blut antransportiert werden, hauptverantwortlich für die Reparatur der Läsion sind. Durch operative Techniken ist es möglich, auch zentrale Meniskusläsionen zu reparieren [6, 7, 34, 37, 50, 69, 95]. Ghadially et al. [41] schlossen 1986, dass bis dahin bekannte Techniken, Läsionen des avaskulären Meniskus zu heilen, immer nur eine extrinsische Heilung hervorriefen, da Zellen, die eine Narbe in einer Meniskusläsion bilden, immer extrinsischer Natur sind. Beispielsweise wird durch die Synovial-Flap-Technik Synovialgewebe in die Läsion eingebracht. Der Heilungserfolg dieser Technik wurde in der Literatur mehrfach beschrieben [18, 34, 37, 41, 50, 95]. Arnoczky und Warren [6] gelang es, longitudinale Inzisionen in der avaskulären Zone zu reparieren, indem ein „vaskulärer Versorgungskanal“ zwischen Läsion und Meniskusperipherie geschaffen wurde. Entlang dieses Kanals konnten sie einsprossende Gefäße beobachten, und nach zehn Wochen hatte sich eine komplette Narbe gebildet. Okuda und Ochi [69] gelang es 1999, durch Anrauen (Raspeln) der

femorale Oberfläche von medialen Menisken von Kaninchen, denen zuvor eine Läsion von 5 mm in der avaskulären Zone gesetzt wurde, eine Heilung zu induzieren. Durch Raspeln bis in eine Tiefe von 0,5 mm aus Richtung Synovialis bis zur Läsion schafften Okuda und Ochi wahrscheinlich ähnliche Verhältnisse für die Heilung der Läsion wie Arnoczky und Warren [6] mit ihrem „vaskulären Versorgungskanal“. Eine weitere Möglichkeit der Heilung von Läsionen des avaskulären Meniskus bildet das Einbringen von Fibrin Clots in die Läsionen [7, 44]. Dabei hat der Fibrin Clot die Eigenschaft, als ein chemotaktischer und mitogener Stimulus für reparierende Zellen und als Gerüst für den Heilungsprozess zu wirken [7]. In einem In-vitro-Organkulturversuch konnten Webber et al. [98] 1989 zeigen, dass avaskuläres Meniskusgewebe, das mit Fibrin Clots versehen wurde, selbständig zur Heilung fähig ist. Sie beschrieben das Invasionsverhalten der Meniskuszellen in gereinigten Fibrin Clots. Es konnte gezeigt werden, dass Meniskuszellen fähig sind, ihre umgebene Matrix zu verlassen und in einen Fibrin Clot zu wandern, um dort wiederum ein Gewebe zu formen, welches dem ursprünglichen entspricht. Dazu waren nicht nur der Fibrin Clot als Gerüst für immigrierende Zellen nötig, sondern auch ein Zusatz von Serum. Jedoch waren keinerlei Zellen aus dem Blut oder Synovialzellen an den Reparaturvorgängen beteiligt. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im Meniskus neben extrinsischen auch intrinsische Heilungsvorgänge bestehen. Ein in Meniskuläsionen operativ eingebrachter Fibrin Clot scheint diese intrinsische Heilung zu induzieren. Durch das Fehlen von Blutgefäßen ist der innere Teil des Meniskus jedoch nicht in der Lage, anscheinend essentielle Faktoren für die intrinsische Heilung, wie ein Fibringerüst und Serumfaktoren, selbständig bereitzustellen. Somit scheint auch die intrinsische Heilungsfähigkeit von extrinsischen Faktoren abhängig zu sein.

Proliferation und Regeneration von Zellen und Gewebe unterliegt dem Einfluss eines komplexen Zusammenspiels von Faktoren und Zytokinen. Nachdem Okuda et al. [69] zeigten, dass durch Anrauen (Raspeln) der femoralen Oberfläche von Menisken eine Heilung von Läsionen der avaskulären Zone induziert werden kann, untersuchten Ochi et al. [68] die

Zytokine, welche nach einem solchen Anrauen exprimiert werden, um mehr über deren Einfluss an der Heilung von Meniskusläsionen zu erfahren. Es wurden nach 1, 7 und 14 Tagen signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1 alpha, TGF-beta 1, PDGF, und Proliferating-Cell Nuclear Antigen (PCNA) auf der femoralen Oberfläche des angerauten Meniskus im Vergleich zum kontralateralen nicht angerauten Meniskus gefunden. Ochi et al. [68] schlossen daraus, dass das Netzwerk dieser Zytokine auf der femoralen Oberfläche der Menisken der Schlüssel zur Erklärung der Mechanismen der Gefäßinvasion und Meniskusheilung durch Anrauen der Menisken zu sein scheint. Bhargava et al. [9] berichteten über den dosisabhängigen Effekt einer Reihe von Faktoren auf die DNA-Synthese und die chemotaktische Migration von Chondrozyten. Die Effekte wurden für Meniskuszellen aus der inneren, mittleren und äußeren Zone getrennt gemessen. Die Anwesenheit von 10% fetalem bovines Serum im Vergleich zu 0,1% fetalem bovines Serum erhöhte die DNA-Synthese in allen 3 Zonen um ein Vielfaches. Die DNA-Synthese der äußeren Zone ist dabei um 40% höher als die der inneren Zone. Zellen der inneren Zone könnten dadurch eventuell ein geringeres Proliferations- und deshalb auch Regenerationspotential als Zellen der äußeren Zone besitzen. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass PDGF-AB, HGF und BMP-2 in jeweils optimalen Konzentrationen ähnlich stark die DNA-Synthese aller Zonen des Meniskus stimulieren können, jedoch PDGF-AB und HGF die Zellmigration 3-4 mal stärker stimuliert als IGF-1, IL-1, Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) und EGF. Spindler et al. [88] demonstrierten an Kulturen von Meniskusexplantaten, dass die DNA-Synthese des äußeren Drittels des Meniskus auf die Gabe von PDGF-AB hin bis auf das 2,5fache gesteigert werden kann, setzten aber höhere Konzentrationen PDGF-AB ein (200ng/ml) als Bhargava et al.[9]. Es gelang ihnen jedoch mit allen eingesetzten PDGF-AB-Konzentrationen, im Gegensatz zu Bhargava et al., nicht, eine DNA-Synthesesteigerung in den inneren zwei Dritteln des Meniskus zu induzieren. Dies ist möglicherweise durch den Einsatz von kompletten Menisken mit intakter Matrix, die eine Barriere zwischen den Zellen und den Wachstumsfaktoren darstellt, zu erklären.

Der Wachstumsfaktor TGF-beta scheint einflussreiche Effekte auf die Zellen des Meniskus zu besitzen. Collier und Gosh [19] konnten mit ihren

Versuchen zeigen, dass TGF-beta die Produktion von Proteoglykanen durch Fibrochondrozyten in allen Zonen des Meniskus um bis zu 100% steigern kann. Des Weiteren kann TGF-beta in vitro die Differenzierung von Stammzellen in Richtung Knorpelbildung induzieren und außerdem auch die Knorpelsyntheseleistung bereits differenzierter Zellen deutlich erhöhen [61]. Mit sehr hohen Konzentrationen TGF-beta 1 ist es in vitro sogar möglich, in Zellen von Fascia lata die Synthese von Knorpelsubstanz zu induzieren [61]. Tanaka et al. [93] konnten mit TGF-beta ebenfalls die Proteoglykansyntheseleistung in Kulturen von Fibrochondrozyten steigern. Collier und Gosh beobachteten weiterhin, dass TGF-beta außerdem die Zellteilung in Fibrochondrozyten-Monolayer-Kulturen stimulierte. TGF-beta scheint somit ein potenter Faktor für die Syntheseleistungssteigerung und damit auch der Regenerationsfähigkeit von Meniskusgewebe zu sein. Ergebnisse einer Studie von Goto et al. [42] belegen diese Annahme. Durch Gentransfer (TGF-beta 1-cDNA) gelang es ihnen, in Meniskuszellen eine 8- bis 15-fach gesteigerte Synthese von Proteoglykanen und Kollagenen zu induzieren. TGF-beta hat jedoch nicht nur über die stimulierende Wirkung auf Chondrozyten einen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit von Meniskusgewebe, sondern auch über die Beeinflussung der Angiogenese. TGF-beta 1 kann, abhängig von seiner Konzentration, sowohl proangiogenetisch als auch antiangiogenetisch wirken. In geringen Konzentrationen hat TGF-beta 1 durch „Recruitment“ inflammatorischer Zellen, welche Angiogenesefaktoren ausschütten, einen proangiogenetischen Effekt [104]. In höheren Konzentrationen hat es durch Hemmung der angiogenetischen Effekte anderer Faktoren einen antiangiogenetischen Einfluss [33]. Von Chondrozyten exprimiertes TGF-beta 1 scheint ein Faktor zu sein, der für die Avaskulärität der Wachstumsfugen von Knochen verantwortlich ist [101]. Dieser Effekt ist so stark, dass Knorpelgewebe, welches in anderes Gewebe transplantiert wurde, ein Gefäßwachstum hemmen kann [12]. Pepper et al. [70, 71] konnten in ihren Studien ebenfalls den hemmenden Effekt des von Chondrozyten gebildeten TGF-beta auf das Aussprossen neuer Gefäße zeigen. Dabei hemmt TGF-beta durch Induktion des physiologischen Faktors Plasmin Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) den proteolytischen Effekt von Proteasen. Diese Proteasen werden

normalerweise von kapillären Endothelzellen unter angiogenetischen Einflüssen gebildet. Durch Gabe von Anti-TGF-beta-Antikörpern konnten Pepper et al. die antiangiogenetischen Einflüsse des TGF-beta hemmen. Mittels exogener Zufuhr von TGF-beta konnten die antiangiogenetischen Einflüsse wiederhergestellt werden. TGF-beta wirkt somit durch Stimulierung von Chondrozytenproliferation einerseits positiv und durch Hemmung der Angiogenese andererseits negativ auf die Regenerationsfähigkeit von Menisken, insbesondere des avaskulären Teils. Die nachweisbaren Mengen von TGF-beta-mRNA sind in reifen Menisken signifikant höher als in unreifen Menisken [43], was mit der durch höhere Konzentrationen an TGF-beta verstärkt unterdrückten Angiogenese und damit zunehmenden Avaskularität in reifen Menisken korreliert.

Hiraki [46] beschrieb 1991 erstmals das knorpelspezifische Matrixprotein Chondromodulin-I (ChM-I). Dieser starke antiangiogenetische Faktor ist in besonders hohen Mengen in der Interterritorialmatrix der avaskulären Teile von Knorpelgewebe, besonders um Lakunen zu finden und bildet eine Barriere gegen die Einflüsse proangiogenetischer Faktoren [53]. ChM-I scheint somit einen Teil der angiogenetischen Resistenz des inneren Teils des Meniskus auszumachen.

Endostatin ist ein antiangiogenetischer Faktor, der erstmals von O'Reilly et al. [67] beschrieben wurde. Petersen et al. [72] berichteten über die Rolle von Endostatin im Knorpel und Faserknorpel. Endostatin ist in hohen Konzentrationen im fetalen Meniskus nachweisbar, liegt nach der Geburt in geringeren Konzentrationen vor, mit steigendem Lebensalter sind dann wieder hohe Endostatin-Konzentrationen im Meniskus vorhanden. Lokalisiert ist Endostatin im fetalen Meniskus entlang der Basalmembran von Gefäßen und in der perizellulären Matrix von Fibroblasten und Chondrozyten. Die Expression vom Endostatin im Meniskus im Laufe des Lebens korreliert sehr stark mit dem Fehlen von Blutgefäßen abhängig vom Lebensalter [74]. In Lebensabschnitten, in denen die Vaskularisierung des Meniskus gering ist, finden sich hohe Konzentrationen von Endostatin und umgekehrt.

Wie Petersen und Pufe [72] ebenfalls zeigten, wird Endostatin in Chondrozyten-Kulturen unter dem Einfluss intermittierenden hydrostatischen Druckes in höheren Mengen synthetisiert als unter normostatischen

Verhältnissen. Somit ist die Endostatin-Expression möglicherweise eine Ursache dafür, dass die Vaskularisierung der besonders druckbelasteten Regionen der inneren Zone des Meniskus im Laufe der Individualentwicklung, insbesondere in der Zeit, in der der aufrechte Gang erlernt wird, geringer wird und schließlich ganz verschwindet. Auf der anderen Seite werden bei Zugbelastung, welche die typische Belastungsform im peripheren Teil des Meniskus darstellt, proangiogenetische Faktoren wie CTGF und einige MMPs vermehrt gebildet und die Expression der antiangiogenetisch wirksamen Tissue Inhibitory Metalloproteinase (TIMP-1) inhibiert [103]. Es kann somit angenommen werden, dass Endostatin ein entscheidender Faktor ist, der, besonders in den druckbelasteten Zonen des Meniskus von den Chondrozyten gebildet, die Gefäßinvasion in dieses hoch angepasste Gewebe potent inhibiert. Dies gilt auch im Falle einer Meniskusläsion unter Expression hoher Mengen des sehr potenten Angiogenesefaktors VEGF. Analog zum altersabhängigen Anstieg der Endostatin-Konzentration im Meniskus sind auch mRNAs anderer antiangiogenetischer Faktoren wie TIMP-1 und PAI-1 in reifen Menisken in höheren Konzentrationen anzutreffen als in unreifen Menisken [43]. Anscheinend kann die innere Zone des Meniskus erst durch Avaskularität, die durch diese Faktoren bedingt wird, optimal ihrer Funktion gerecht werden. Eine Vaskularisierung würde wahrscheinlich die Eigenschaften des Meniskus verändern, ähnlich wie dies beim Pannusgewebe des Knorpels vorliegt.

PDGF hat, neben dem bereits erwähnten stimulierenden Effekt auf Meniskuszellen [68], einen proangiogenetischen Effekt, da es die Synthese von VEGF verstärkt [3, 73]. Dass PDGF im Meniskusgewebe exprimiert werden kann, wurde von Ochi et al. [68] beschrieben, die Menisken einen Wachstumsstimulus durch Anraspeln der Oberfläche gaben. Sie wiesen in diesem Versuch auch eine Expression von IL-1 alpha im Meniskusgewebe nach. IL-1 alpha ist durch Induktion der VEGF-Expression ebenfalls ein potenter angiogenetischer Faktor [83].

Da in dem vorliegenden Versuch VEGFR-1 Rezeptoren nur auf Endothelzellen nachweisbar waren, konnten sie im Meniskuszentrum nicht gefunden werden. Hier waren nur VEGFR-2 Rezeptoren auf den

Fibrochondrozyten zu sehen. Das Fehlen von VEGFR-1 Rezeptoren und Endothelzellen in der inneren Zone ist eine Ursache für deren schlechte Regenerationspotenz. Der dort befindliche Faserknorpel besitzt keine Zielzellen, an denen VEGF ein Aussprossen neuer Gefäße induzieren könnte. Die am nächsten gelegenen potentiellen Zielzellen sind Endothelzellen weiter peripher gelegener, vaskularisierter Meniskusabschnitte. Möglicherweise sind die in diesem Falle zu überwindende Distanz und der damit verbundene VEGF-Gradient zu groß, um dort wirksame VEGF-Konzentrationen aufzubauen. Phillips et al. [77] gelang es, in der Hornhaut des Auges, einem avaskulären Gewebe ähnlich dem zentralen Teil des Meniskus, mittels Applikation von VEGF eine Einsprossung von Blutgefäßen zu induzieren. Diese Neovaskularisierung war von keiner inflammatorischen Reaktion begleitet, sondern ein direkter angiogenetischer Effekt von VEGF. Ob analog zum Versuch von Phillips et al. auch im avaskulären Meniskus durch Applikation noch viel höherer Mengen VEGF eine vaskuläre Aussprossung von peripheren Meniskusabschnitten her induziert werden kann, bleibt zu untersuchen.

Hypoxie ist ein bedeutender Faktor für die Induktion der VEGF-Synthese [54, 59, 60, 73]. Die Avaskularität und die damit verbundene Minderversorgung der zentralen Meniskusabschnitte mit Sauerstoff bedingen eine geringe Sauerstoffspannung, die ursächlich für eine erhöhte VEGF-Expression sein kann. Dies ist ein möglicher Grund für die kurzzeitig höheren VEGF-Konzentrationen im Gewebe vom zentralen Meniskus im Vergleich zur Meniskusperipherie.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten auch in den Menisken der jeweils nicht operierten Seiten, den Referenzmenisken, VEGF-mRNA, VEGF sowie VEGF-positive Zellen nachgewiesen werden. Dies kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein, z.B. Stress, den die Tiere durch die Operation erfahren hatten, oder auch unphysiologische Belastung des Knies, und somit des Referenzmeniskus, in der postoperativen Phase. Nach einer Woche besaß die Konzentration von VEGF im nicht operierten Meniskus die höchsten Werte. Wie hoch die VEGF-Expression im Meniskus von unoperierten Tieren ist, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.



In der vorliegenden experimentellen Studie wurden Kaninchen (New Zealand White Rabbits) eingesetzt. Die relativ kleinen Menisken der Kaninchen bedingten recht geringe Probemengen. Sämtliche Labormethoden sind durch die relativ kleinen Probemengen empfindlicher gegenüber nicht beeinflussbaren Störfaktoren. Die Möglichkeit des Einsatzes von Versuchstieren mit größeren Menisken, z.B. Schafe oder Schweine, könnte dieses Problem minimieren. Die 41 zur Verfügung stehenden Kaninchen waren mit einem durchschnittlichen Alter von ca. 5-7 Monaten bereits ausgewachsen. Dies war von großer Bedeutung, da VEGF auch während des Wachstums von Organen und Geweben eine entscheidende Rolle spielt und während dieser Phase in erhöhten Konzentrationen im Gewebe anzutreffen ist [29]. Eine signifikant erhöhte Konzentration von VEGF im Gewebe wurde in eigenen Versuchen bei unverletzten Menisken von 1 und 3 Wochen alten Kaninchen nachgewiesen. Darüber hinaus wurden zwischen unreifen und reifen Menisken Unterschiede in der Gewebsstruktur und Expression von Zytokinen [10, 43] sowie auch alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede im Syntheseverhalten von Fibrochondrozyten bei Kaninchen [99] beschrieben.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden Läsionen des medialen Meniskus in ihrer Heilung betrachtet. Ob diese Ergebnisse auf den lateralen Meniskus übertragen werden können, bleibt fraglich und müsste erst untersucht werden, da es zwischen medialem und lateralem Meniskus Unterschiede in der Matrix und dem Syntheseverhalten der Zellen gibt [19, 43].

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Läsionen der zentralen Zone des Meniskus im Gegensatz zu denen der Peripherie nicht heilten und keine Vaskularisierung aufwiesen. Paradoxerweise konnten jedoch währenddessen in der zentralen Zone VEGF-Konzentrationen nachgewiesen werden, die höher lagen als die der Peripherie.

Die Ursache der Avaskularität und des schlechteren Heilungspotentials liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Eigenschaften von zentralem und peripherem Meniskusgewebe. Der Meniskus verliert im Laufe des Lebens von zentral her kontinuierlich seine Vaskularisierung. Im reifen Meniskus unterscheiden sich die innere und äußere Zone wesentlich in den nachgewiesenen Zellen, der Extrazellulärmatrix, den exprimierten Zytokinen und dem Vaskularisierungsmuster. Diese baulichen und funktionellen Veränderungen des zentralen Meniskus scheinen Anpassungsvorgänge an die Funktion der Kraftübertragung zu sein, haben aber gleichzeitig ein schlechteres Regenerations- und Heilungspotential der inneren Zone zur Folge.

Im Laufe der Reifung der Menisken scheint sich in deren zentraler Zone eine Resistenz gegen angiogenetische Einflüsse zu entwickeln, die durch physiologische Konzentrationen VEGF nicht überwunden werden kann. Die Zellen des avaskulären Meniskus haben jedoch weiterhin die Fähigkeit, im Falle einer Läsion VEGF zu produzieren, wahrscheinlich zum Zwecke einer Induktion der Angiogenese zur Begünstigung der Heilung.

Im Rahmen der Anpassungsvorgänge scheint die besonders auf den zentralen Meniskus einwirkende Druckbelastung die Expression von Faktoren zu induzieren, die die Entstehung von avaskulärem Faserknorpel positiv beeinflusst. Endostatin z.B. wird bei Einwirkung von Druck exprimiert und wirkt antiangiogenetisch. Die im Meniskus nachweisbaren Konzentrationen Endostatin korrelieren mit dem Verlust der Vaskularisierung der Menisken im Laufe des Lebens. TGF-beta wird von Chondrozyten des zentralen Meniskus gebildet und kann antiangiogenetisch wirken.

Durch bestimmte Rekonstruktionstechniken ist es möglich, auch zentrale Meniskusläsionen zur Heilung zu bringen. Diese Techniken beruhen

größtenteils auf dem Einbringen von fremdem Gewebe in die Läsion, wodurch die Faktoren, die für eine Heilung nötig sind, aber nicht im avaskulären Teil des Meniskus vorkommen, in die Läsion gelangen. Neben dieser extrinsischen Heilung des Meniskus konnte in experimentellen Studien auch eine intrinsische Heilungsfähigkeit von avaskulärem Meniskusgewebe nachgewiesen werden, welche jedoch nur durch Faktoren induziert werden kann, die nur außerhalb dieses Gewebes vorkommen.

Es bleibt zu untersuchen, ob noch höhere Konzentrationen VEGF, die künstlich in zentrale Meniskuläsionen eingebracht werden, die antiangiogenetischen Barrieren überwinden und eine Vaskularisierung von peripheren Abschnitten des Meniskus her für die Dauer der Heilung induzieren können, ähnlich wie es an der Kornea von Kaninchen bereits gelungen ist.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aagaard H, Verdonk R: Function of the normal meniscus and consequences of meniscal resection. *Scand J Med Sci Sports* 1999;9:134-140.
- 2 Adams ME, Ho YA: Localization of glycosaminoglycans in human and canine menisci and their attachments. *Connect Tissue Res* 1987;16:269-279.
- 3 Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, Albanil A, Connors R, Stringham JC, Karwande SV: PDGF(BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF(BB), and PDGF(AB). *J Surg Res* 2002;107:203-209.
- 4 Annandale T: An operation for displaced semilunar cartilage. *Br Med J*: 1885;1:779.
- 5 Arnoczky SP, Warren RF: Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982;10:90-95.
- 6 Arnoczky SP, Warren RF: The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med* 1983;11:131-141.
- 7 Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM: Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:1209-1217.
- 8 Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18:3964-3972.
- 9 Bhargava MM, Attia ET, Murrell GA, Dolan MM, Warren RF, Hannafin JA: The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med* 1999;27:636-643.
- 10 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;28:265-274.
- 11 Brandau O, Aszodi A, Hunziker EB, Neame PJ, Vestweber D, Fassler R: Chondromodulin I is dispensable during enchondral ossification and eye development. *Mol Cell Biol* 2002;22:6627-6635.

- 12 Brem H, Folkman J: Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med* 1975;141:427-439.
- 13 Cabaud HE, Rodkey WG, Fitzwater JE: Medical meniscus repairs. An experimental and morphologic study. *Am J Sports Med* 1981;9:129-134.
- 14 Cao M, Stefanovic-Racic M, Georgescu HI, Miller LA, Evans CH: Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine. *J Orthop Res* 1998;16:104-111.
- 15 Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
- 16 Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439.
- 17 Cheung HS: Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 1987;16:343-356.
- 18 Cisa J, Basora J, Madarnas P, Ghibely A, Navarro-Quilis A: Meniscal repair by synovial flap transfer. Healing of the avascular zone in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1995;66:38-40.
- 19 Collier S, Ghosh P: Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* 1995;3:127-138.
- 20 Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G: The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1985;1:58-62.
- 21 Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S: The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002;21:33-49.
- 22 Eyre DR, Wu JJ: Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett* 1983;158:265-270.
- 23 Fairbank TJ: Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* 1948;30:664-670.
- 24 Fauno P, Nielsen AB: Arthroscopic partial meniscectomy: a long-term follow-up. *Arthroscopy* 1992;8:345-349.

- 25 Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF: Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994;180:341-346.
- 26 Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527-543.
- 27 Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.
- 28 Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4:336-340.
- 29 Ferrara N, Keyt B: Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 1997;79:209-232.
- 30 Fithian DC, Kelly MA, Mow VC: Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop* 1990;252: 19-31.
- 31 Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.
- 32 Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270:12607-12613.
- 33 Frater-Schroder M, Muller G, Birchmeier W, Bohlen P: Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;137:295-302.
- 34 Gao JZ: Experimental study on healing of old tear in the avascular portion of menisci in dogs. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1990;28:726-9.
- 35 Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N: VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002;417:954-958.
- 36 Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-8.

- 37 Gershuni DH, Skyhar MJ, Danzig LA, Camp J, Hargens AR, Akeson WH: Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71:1363-1370.
- 38 Ghadially FN, Lalonde JM: Intramatrix lipidic debris and calcified bodies in human semilunar cartilages. *J Anat* 1981;132:481-490.
- 39 Ghadially FN, Lalonde JM, Wedge JH: Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 1983;136 (Pt 4):773-791.
- 40 Ghadially FN, Thomas I, Yong N, Lalonde JM: Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages. *J Anat* 1978;125:499-517.
- 41 Ghadially FN, Wedge JH, Lalonde JM: Experimental methods of repairing injured menisci. *J Bone Joint Surg Br* 1986;68:106-110.
- 42 Goto H, Shuler FD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH: Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGFbeta(1) gene. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:266-271.
- 43 Hellio Le Graverand MP, Reno C, Hart DA: Gene expression in menisci from the knees of skeletally immature and mature female rabbits. *J Orthop Res* 1999;17:738-744.
- 44 Henning CE, Lynch MA, Yearout KM, Vequist SW, Stallbaumer RJ, Decker KA: Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop* 1990;252:64-72.
- 45 Herwig J, Egner E, Buddecke E: Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 1984;43:635-640.
- 46 Hiraki Y: Molecular cloning of a novel cartilage-specific functional matrix, chondromodulin-I, and its role in endochondral bone formation. *Seikagaku* 1991;63:1449-1454.
- 47 Hough AJ, Jr., Webber RJ: Pathology of the meniscus. *Clin Orthop* 1990;252:32-40.
- 48 Huang TL, Lin GT, O'Connor S, Chen DY, Barmada R: Healing potential of experimental meniscal tears in the rabbit. Preliminary results. *Clin Orthop* 1991;267: 299-305.
- 49 King D: The healing of semilunar cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1936;333-342.

- 50 Kobuna Y, Shirakura K, Nijima M: Meniscal repair using a flap of synovium. An experimental study in the dog. *Am J Knee Surg* 1995;8:52-55.
- 51 Kruger-Franke M, Siebert CH, Kugler A, Trouillier HH, Rosemeyer B: Late results after arthroscopic partial medial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1999;7:81-4.
- 52 Kumagai Y: [Proteoglycan and collagen synthesis of cultured fibrochondrocytes from the human knee joint meniscus]. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1994;68:885-894.
- 53 Kusafuka K, Hiraki Y, Shukunami C, Kayano T, Takemura T: Cartilage-specific matrix protein, chondromodulin-I (ChM-I), is a strong angio-inhibitor in endochondral ossification of human neonatal vertebral tissues in vivo: relationship with angiogenic factors in the cartilage. *Acta Histochem* 2002;104:167-175.
- 54 Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA: Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;270:13333-13340.
- 55 McDevitt CA, Webber RJ: The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop* 1990;252:8-18.
- 56 McDougall JJ, Bray RC: Vascular volume determination of articular tissues in normal and anterior cruciate ligament-deficient rabbit knees. *Anat Rec* 1998;251:207-213.
- 57 McNicholas MJ, Rowley DI, McGurty D, Adalberth T, Abdon P, Lindstrand A, Lohmander LS: Total meniscectomy in adolescence. A thirty-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 2000 Mar ;82 (2):217-221.
- 58 Messner K, Gao J: The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 1998;193:161-178.
- 59 Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994;71:374-379.
- 60 Minchenko A, Salceda S, Bauer T, Caro J: Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:35-39.
- 61 Miura Y, Fitzsimmons JS, Commisso CN, Gallay SH, O'Driscoll SW: Enhancement of periosteal chondrogenesis in vitro. Dose-response for transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1). *Clin Orthop* 1994;301:271-280.



- 62 Morgan CD, Wojtys EM, Casscells CD, Casscells SW: Arthroscopic meniscal repair evaluated by second-look arthroscopy. *Am J Sports Med* 1991;19:632-637.
- 63 Nakano T, Dodd CM, Scott PG: Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *J Orthop Res* 1997;15:213-220.
- 64 Nakano T, Thompson JR, Aherne FX: Distribution of glycosaminoglycans and the nonreducible collagen crosslink, pyridinoline in porcine menisci. *Can J Vet Res* 1986;50:532-536.
- 65 Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, Horibe S, Tada K, Ochi T, Yoshikawa H: Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop* 200;391Suppl: 208-218.
- 66 Neyret P, Donell ST, DeJour D, Dejour H: Partial meniscectomy and anterior cruciate ligament rupture in soccer players. A study with a minimum 20-year followup. *Am J Sports Med* 1993;21:455-460.
- 67 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285.
- 68 Ochi M, Uchio Y, Okuda K, Shu N, Yamaguchi H, Sakai Y: Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing. *Arthroscopy* 2001;17:724-731.
- 69 Okuda K, Ochi M, Shu N, Uchio Y: Meniscal rasping for repair of meniscal tear in the avascular zone. *Arthroscopy* 1999;15:281-286.
- 70 Pepper MS, Montesano R, Orci L, Vassalli JD: Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells by a chondrocyte-derived transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:633-638.
- 71 Pepper MS, Montesano R, Vassalli JD, Orci L: Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation in vitro: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 1991;146:170-179.
- 72 Petersen W, Pufe T., Tsokos M., Hansen U., Tillmann B., Mentlein R. Mechanical factors and cytokines influence the expression of the angiogenesis inhibiting factor endostatin in human cartilage and fibrocartilage. 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Poster #0726. New Orleans 02.-05.02. 2003 .

- 73 Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R: Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003;123(9):485-8.
- 74 Petersen W, Tillmann B: Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand* 1995;66:308-312.
- 75 Petersen W, Tillmann B: Struktur und Vaskularisierung der Kniegelenksmenisken. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999;137:31-37.
- 76 Pham I, Uchida T, Planes C, Ware LB, Kaner R, Matthay MA, Clerici C: Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L1133-L1142.
- 77 Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR: Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1994;8:961-965.
- 78 Poehling GG, Ruch DS, Chabon SJ: The landscape of meniscal injuries. *Clin Sports Med* 1990;9:539-549.
- 79 Roeddecker K, Muennich U, Nagelschmidt M: Meniscal healing: a biomechanical study. *J Surg Res* 1994;56:20-27.
- 80 Roeddecker K, Nagelschmidt M, Koebeke J, Guensche K: Meniscal healing: a histological study in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1993;1:28-33.
- 81 Roos EM, Ostenberg A, Roos H, Ekdahl C, Lohmander LS: Long-term outcome of meniscectomy: symptoms, function, and performance tests in patients with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:316-324.
- 82 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. *AmJ Sports Med* 1998;87-95.
- 83 Salven P, Hattori K, Heissig B, Rafii S: Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J* 2002;16:1471-1473.
- 84 Scheller G, Sobau C, Bulow JU: Arthroscopic partial lateral meniscectomy in an otherwise normal knee: Clinical, functional, and radiographic results of a long-term follow-up study. *Arthroscopy* 2001;17:946-952.

- 85 Seedhom BB: Loadbearing function of the menisci. *Physiotherapy* 1976;62:223.
- 86 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
- 87 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.
- 88 Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK, Davidson JM: Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *J Orthop Res* 1995;13:201-207.
- 89 Spindler KP, Miller RR, Andrish JT, McDevitt CA: Comparison of collagen synthesis in the peripheral and central region of the canine meniscus. *Clin Orthop* 1994;303:256-263.
- 90 Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y: A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor, VEGF 115. *J Biol Chem* 1998;273:3033-3038.
- 91 Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1311-1321.
- 92 Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434-438.
- 93 Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y: Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1999;7:75-80.
- 94 Tenuta JJ, Arciero RA: Arthroscopic evaluation of meniscal repairs. Factors that effect healing. *Am J Sports Med* 1994;22:797-802.
- 95 Veth RP, den Heeten GJ, Jansen HW, Nielsen HK: 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* 1983;181:250-254.

- 96 Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB: Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996;271:29483-29488.
- 97 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.
- 98 Webber RJ, York JL, Vanderschelden JL, Hough AJ, Jr.: An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med* 1989;17:393-400.
- 99 Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ, Jr.: In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex. *Arthritis Rheum* 1986;29:1010-1016.
- 100 Wildey GM, McDevitt CA: Matrix protein mRNA levels in canine meniscus cells in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1998;353:10-15.
- 101 Wing-Hoi C, Kwong-Man L, Kwok-Pui F, Pauline LP, Kwok-Sui L: TGF-beta1 is the factor secreted by proliferative chondrocytes to inhibit neo-angiogenesis. *J Cell Biochem* 2001;81:79-88.
- 102 Wirth CR: Meniscus repair. *Clin Orthop* 1981;157:153-160.
- 103 Wong M, Siegrist M. The expression of angiogenetic factors by articular chondrocytes is differentially regulated by Wong M, Siegrist M and tension. 2003. 49. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Poster #0630. New Orleans 02.-05.02. 2003
- 104 Yang EY, Moses HL: Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 1990;111:731-741.

## 7 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. W. Neumann für die Möglichkeit, unter seinem Direktorat an der Orthopädischen Universitätsklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg promovieren zu dürfen.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. R. Becker aus der Orthopädischen Universitätsklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, der mich während der gesamten Zeit äußerst hilfreich begleitet hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. B. Tillmann für die Möglichkeit, unter seinem Direktorat am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sämtliche Laborarbeiten durchführen zu können. Außerdem gilt Dr. T. Pufe sowie den dortigen labortechnischen Assistenten mein Dank für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und somit großartige Perspektiven ermöglicht haben.

Das Projekt wurde von der Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA) finanziell unterstützt.

## **8 ERKLÄRUNG DES AUTORS**

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Die Rolle des Vaskulären Endothelialen  
Wachstumsfaktors  
in der Meniskusheilung  
Eine experimentelle Studie am Tiermodell**

selbständig angefertigt und bei der Abfassung keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde unter dem Direktorat von Herrn Prof. Dr. med. H. W. Neumann, Orthopädische Universitätsklinik der Otto-von-Guericke-Universität durchgeführt.

Die Abfassung der Dissertation verletzt die Rechte Dritter nicht.

Ich habe die Dissertation an keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule/Universität zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 15.06.04



Nicki Gießmann

## 9 LEBENSLAUF DES AUTORS

**Persönliche Daten:** Nicki Gießmann  
Brielower Aue 22, 14772 Brandenburg  
geb. am 28.03.1977 in Halberstadt, ledig

### Schulausbildung:

1983 - 1985 Besuch der Marx-Engels-Oberschule in Halberstadt  
1985 - 1989 Besuch der Friedens-Oberschule in Halberstadt  
1989 - 1991 Besuch der Gesamtschule Hohenstücken in Brandenburg  
1991 – 1996 Besuch des Bertolt-Brecht-Gymnasiums Brandenburg  
Abitur: Juni 1996

**Zivildienst:** Krankentransport bei der Johanniter Unfallhilfe e.V. in Brandenburg  
08/1996-08/1997

**Studium:** Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Otto-  
von-Guericke-Universität in Magdeburg  
WS 97/98-SS 04  
Abschluss der klinischen Vorprüfung im August 1999  
Abschluss des 1. Staatsexamen im August 2000  
Abschluss des 2. Staatsexamen im September 2002  
Abschluss des 3. Staatsexamen im April 2004

### Famulatur:

02/2000 Praxis für Nuklearmedizin, Brandenburg  
02/2000 Klinik für Vizeralchirurgie der Uniklinik Göttingen  
02/2001 Klinik für Orthopädie der Uniklinik Magdeburg  
09/2001 Praxis für Allgemeinmedizin, Brandenburg  
12/2001 Praxis für Chirurgie, Brandenburg  
02/2002 Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Uniklinik  
Magdeburg

**PJ** Klinik für Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Uniklinik  
Magdeburg  
Klinik für Gynäkologie des Städtischen Klinikums Magdeburg  
Klinik für Chirurgie der University of Durban, Südafrika

Magdeburg, den 15.06.04

.....  
Nicki Gießmann