

tion oder der Schwere der Gewebeschädigung nach den Bewertungssystemen von CRUSE und FOORD bzw. KNIGHTON vorgenommen.

Die Therapie der chronisch-posttraumatischen Wunde umfaßt vier Schritte: Débridement, Planung, Weichteilverschluß und Rekonstruktion funktioneller Strukturen. Ziel der gesamten Maßnahmen ist eine stabile Defektdeckung ohne Gefahr einer Infektpersistenz. Für den Weichteilverschluß sind plastisch-rekonstruktive Methoden erforderlich, die vom einfachen Spalthauttransfer bis hin zur freien mikrochirurgischen Lappentransplantation reichen.

SUMMARY

The chronic posttraumatic wound

Chronic posttraumatic wounds usually result from inadequate treatment of primary traumas due to under-estimation of the underlying soft-tissue injuries. Depending on the etiology of the wound germ flora mainly consists of Staphylococcus aureus, Staph. epidermidis or hemolyzing Streptococci. Histopathologic characterization allows definition of three distinct types of chronic injuries: the chronic proliferative wound, the anergic and the chronic postinfective wound. In clinical practice wounds are classified with respect to their bacterial contamination or their degree of tissue damage according to the evaluation systems of CRUSE and FOORD or KNIGHTON. Therapy of chronic posttraumatic wounds involves four steps: Débridement, planning, soft-tissue closure, and reconstruction of functional structures. Primary goal of these measures is a stable closure of the defect without risk of persistent infections. Wound closure requires reconstructive plastic surgery, ranging from skin-grafting to free microsurgical flapping.

Für die Autoren:

Prof. Dr. med. Günter Germann
Chefarzt der Abteilungen für Verbrennungen, Plastische und Handchirurgie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Ludwigshafen
Ludwig-Guttman-Straße 13
67071 Ludwigshafen

Literatur bei der Redaktion

Biologische Eigenschaften von Myofibroblasten

G. Gabbiani

Abteilung für Pathologie, Universität Genf, Centre Médical Universitaire, Genf, Schweiz

Die Vorgänge, die während der Wundheilung zur Retraktion des Granulationsgewebes führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Unser Labor hat vor einigen Jahren beschrieben, daß Fibroblasten, die aus Granulationsgewebe isoliert wurden, einige ultrastrukturelle Eigenschaften von glatten Muskelzellen besitzen. Dabei handelt es sich unter anderem um Bündel von Mikrofilamenten mit vereinzelt hierin vorkommenden dichten Körpern. Diese sogenannten Myofibroblasten wurden für retraktile Vorgänge wie die Kontraktion von Granulationsgewebe, die Retraktion von parenchymalen Organen, die Fibromatose und die Stroma-Retraktion bei Epithel-Tumoren verantwortlich gemacht. Das Auftreten von Myofibroblasten im Zusammenhang mit Retraktionsphänomenen spricht für diese Hypothese. Der direkte Nachweis für das Vorhandensein und die Aktivität kontraktiler Bestandteile in Myofibroblasten wurde jedoch erst durch die Entwicklung von entsprechenden Techniken zur Lokalisierung und Quantifizierung von Proteinen des Zytoskeletts und von kontraktiven Proteinen in den betroffenen Organen möglich. Dabei war auch das fortgeschrittene Verständnis zur Morphologie und Biochemie von Elementen des Zytoskeletts und von kontraktiven Proteinen in den unterschiedlichen Zellen von großem Nutzen.

MORPHOLOGIE DES ZYTOSKELETTS

Heute wissen wir, daß das Zytoskelett von Mesenchymzellen aus Intermediärfilamenten besteht, die aus einem einzigen Protein, dem sogenannten Vimentin, aufgebaut sind. Anders ist es bei Muskelzellen. Hier wurde nachgewiesen, daß die meisten Intermediärfilamente zusätzlich Desmin, ein ver-

wandtes, aber nicht identisches Protein, enthalten. Glatte Gefäßmuskelzellen weisen immer Vimentin und nur einen geringen Anteil an Desmin auf. Inzwischen wurde Desmin auch in zahlreichen nicht-muskulären Mesenchymzellen wie Endothelzellen, Podozyten und Stromazellen unterschiedlicher Lokalisation gefunden.

Ein weiterer Marker für den Gewebeer sprung und damit zur morphologischen Unterscheidung von Geweben ist das Vorhandensein einer spezifischen Isoform von Aktin. Die sechs bekannten Säugetiere, die eine solche Aktin-Isoform bilden, weisen hierfür eine gewebspezifische Verteilung auf. Insbesondere ist das aus glatten Muskelzellen isolierte α -Aktin in sämtlichen glatten Muskelzellen vorhanden. Schließlich können auch Isoformen der schweren und leichten Myosin-Ketten unter normalen Bedingungen für die glatte Muskulatur typisch sein und damit zur Identifizierung von Zellen herangezogen werden, die an verschiedenen pathologischen Veränderungen beteiligt sind.

Mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern haben wir bei Myofibroblasten folgende vier Phänotypen des Zytoskeletts definiert:

- ▶ Phänotyp V, der von Myofibroblasten gebildet wird, die nur für Vimentin positiv sind;
- ▶ Phänotyp VA, der von Myofibroblasten gebildet wird, die für Vimentin und α -Aktin der glatten Muskelzellen positiv sind;
- ▶ Phänotyp VAD, der von Myofibroblasten gebildet wird, die für Vimentin, α -Aktin der glatten Muskelzellen und Desmin positiv sind;
- ▶ Phänotyp VD, der von Myofibroblasten gebildet wird, die für Vimentin und Desmin positiv sind.

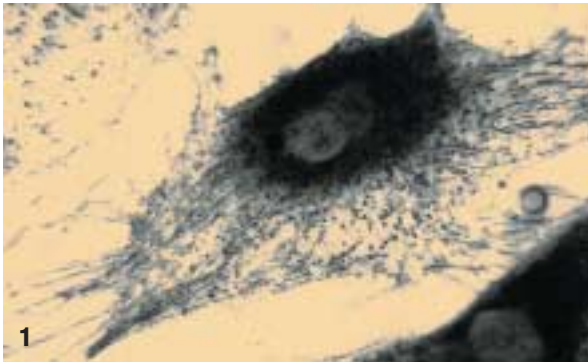


Abb. 1
Dunkelfeldaufnahme eines vereinzelt Hautfibroblasten (x250). In den Randzonen sind als fädige Strukturen deutlich Elemente des Zytoskeletts zu erkennen, die zum Teil Verbindungen zur umgebenden Matrix herstellen.

FUNKTION UND ENTSTEHUNGSWEISE

Bei der Untersuchung von normal heilendem Granulationsgewebe unter diesen Gesichtspunkten wurde während der Kontraktion ein hoher Anteil von Myofibroblasten nachgewiesen, die das für glatte Muskulatur typisches α -Aktin, aber kein Desmin oder Myosin der glatten Muskulatur bilden und somit – zumindest teilweise – Eigenschaften von glatten Muskelzellen annehmen. Nach Beendigung der Kontraktion und vollständiger Epithelisierung der Wunde gehen die Myofibroblasten, die α -Aktin der glatten Muskulatur enthalten, wahrscheinlich durch Apoptose zurück, und die Narbe entwickelt sich auf klassische Weise weiter. Sie wird weniger zellulär und setzt sich aus typischen Fibroblasten mit stark entwickeltem endoplasmatischem Retikulum ohne weitere Mikrofilamente oder α -Aktin der glatten Muskulatur zusammen.

Bei länger anhaltenden retraktiven Vorgängen, insbesondere bei Nieren-, Lungen- oder Leberfibrose, sind Myo-

fibroblasten, die α -Aktin der glatten Muskelzellen bilden, stets vorhanden, wobei ein Teil von ihnen zusätzlich Desmin bildet. Bisher wurden noch keine Myofibroblasten beschrieben, die Myosin der glatten Muskulatur bilden können.

Aufgrund dieser Ergebnisse meinen wir, daß Fibroblasten bei der Entstehung von fibrokontraktiven Erkrankungen kontraktile Eigenschaften entwickeln und die zentripetale Kraft erzeugen, die schließlich zur Retraktion führt. Zu diesem Zweck besitzen Myofibroblasten die Fähigkeit, Verbindungen zur umgebenden Matrix auszubilden und somit eine Wirkung auf das gesamte Gewebe auszuüben. In Fibroblastenkulturen konnte gezeigt werden, daß eher Zug- als Kontraktionskräfte für retraktile Vorgänge auf dem Substrat verantwortlich sind. In Analogie mit diesen Beobachtungen sind wir daher weiterhin der Meinung, daß die retraktile Wirkung von Myofibroblasten bei fibrotischen Veränderungen eher

auf isometrischer (Spannungsentwicklung bei konstanter Länge) als auf isotonischer Kontraktion (Verkürzung bei konstanter Spannung) beruhen.

EXPERIMENTELLE BEFUNDE ZUM MECHANISMUS DER MYOFIBROBLASTENBILDUNG

Zu klären bleibt, welche Mechanismen bei Fibroblasten zur Ausprägung von Eigenschaften am Zytoskelett führen, die denen von glatten Muskelzellen ähneln, unter Einbezug der Faktoren, die in vivo sowie in vitro die Bildung von α -Aktin der glatten Muskelzellen und von Desmin steuern. Die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine solche Wirkungsweise sind Zytokine, die von Gefäßzellen, Entzündungszellen und fibroblastischen Zellen selbst lokal freigesetzt werden können. Aber auch Komponenten der extrazellulären Matrix, für die nachgewiesen wurde, daß sie Form, Replikation und Ausbildung zytoskelettaler Eigenschaften bei Fibroblasten und glatten Muskelzellen beeinflussen können, sind als Mediatoren denkbar.

Der Einfluß von γ -Interferon

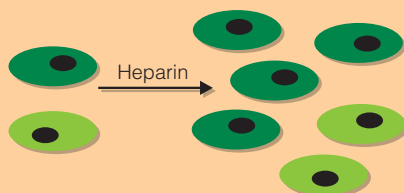
Wir haben festgestellt, daß γ -Interferon, ein Zytokin, das hauptsächlich von T-Helfer-Lymphozyten gebildet wird, in der Lage ist, die Bildung von α -Aktin der glatten Muskulatur sowohl in der glatten Muskulatur selbst als auch in den Fibroblasten zu hemmen. Bei Anwendung von γ -Interferon bei Dupuy-Knoten kommt es zu einer Besserung der Kontraktionen und bei hypertrophen Narben ist, zusätzlich zur Abnahme der Größe der Läsionen, ein Verschwinden von α -Aktin der glatten Gefäßmuskulatur aus den Myofibroblasten zu beobachten. Auch wenn diese ersten Ergebnisse noch bestätigt werden müssen, denken wir, daß die Arbeit in diese Richtung nicht nur zum Verständnis der Pathogenese von fibrokontraktiven Erkrankungen beiträgt, sondern auch zukünftige Behandlungswege aufzeigen kann.

Der Einfluß von GM-CSF

Im gleichen Zusammenhang haben wir festgestellt, daß bei Ratten, die wir als experimentelles Modell verwendeten, eine subkutane Gabe des Wachstumsfaktors GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierender Faktor) nicht nur die Proliferation von Fibroblasten und die Bildung von ultrastruk-

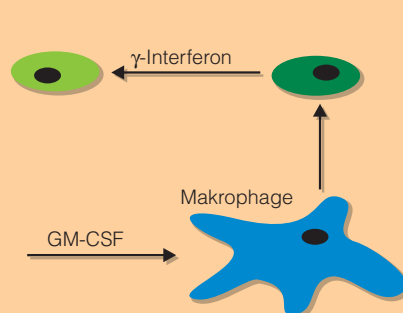
EXPERIMENTELLE BEFUNDE ZUR FIBROBLASTEN-DIFFERENZIERUNG

Selektion (wachsende Zellen)



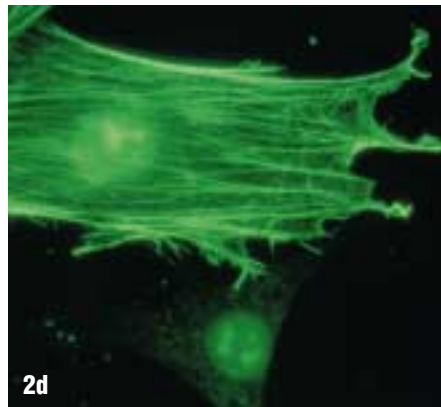
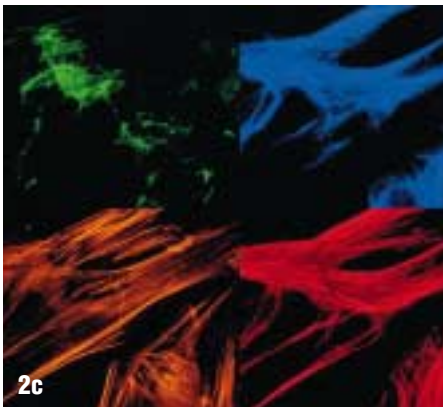
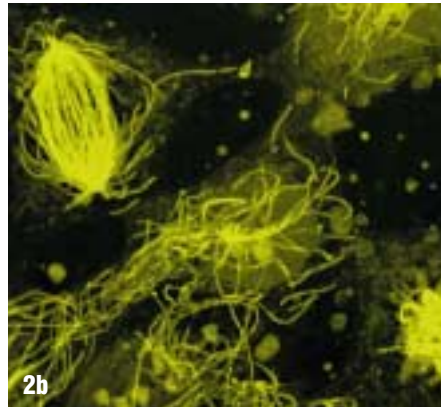
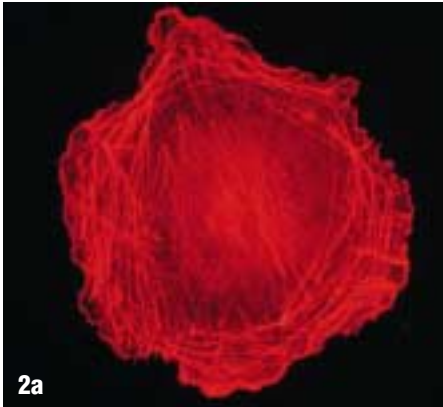
■ Aktin-negativer Fibroblast der glatten Muskulatur α
 ■ Aktin-positiver Myofibroblast der glatten Muskulatur α

Induktion (ruhende und wachsende Zellen)



Heparin fördert die Bildung von α -Aktin der glatten Muskulatur in vivo und in vitro und erhöht somit den Anteil an Myofibroblasten. GM-CSF stimuliert durch indirekte, Makrophagen-vermittelte Wirkung die Bildung von Myofibroblasten. Im Gegensatz dazu bewirkt γ -Interferon eine Reduktion von α -Aktin der glatten Muskulatur und hat somit eine antifibrotische Wirkung.

Graphik nach Desmoulière/Gabbiani



Immunfluoreszenz-Markierung von Hautfibroblasten zur Identifizierung einzelner Komponenten des Zytoskeletts (x125).

Abb. 2a
Darstellung von Aktin in einer transformierten Zelle. Eine Aktin-Mutation führt hier zur Abrundung der Zelle und schränkt ihre Bewegungsfähigkeit ein.

Abb. 2b
Ansicht des Spindelapparates bei in Teilung befindlichen Fibroblasten durch Tubulin-Markierung.

Abb. 2c
Mehrfachmarkierung eines Präparates zur Darstellung von Fibronectin (grün), Vimentin (blau), Aktin (orange) und Tubulin (rot) in derselben Zelle.

Abb. 2d
Nachweis von α -Aktin der glatten Muskulatur in einem vereinzelt Hautfibroblasten mit gleichzeitiger negativer Kontrolle (unten).

turell typischen Myofibroblasten auslöste, sondern bei einem erheblichen Teil dieser Zellen auch zur Ausbildung von α -Aktin der glatten Muskulatur führte. GM-CSF ist vorwiegend für seine hämatopoetische Wirkung bekannt, wobei dem Faktor jedoch auch einige extra-hämatopoetische Funktionen zugeschrieben werden. So stimuliert GM-CSF die Migration menschlicher Endothelzellen und die in vitro-Proliferation verschiedener nicht-hämatopoetischer Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Endothelzellen, Vorläufer der Knochenmarkfibroblasten und verschiedene transformierte Zelllinien. Weiterhin entwickelten sich bei transgenen Mäusen, die GM-CSF bilden, fibrotische Knoten in Bereichen von Makrophagen-Ansammlungen. Diese Läsionen wurden als Folgeerscheinung einer chronischen Aktivierung von Makrophagen durch GM-CSF gedeutet. Eine Langzeitbehandlung mit GM-CSF zeigte jedoch bei Mäusen keine langfristigen Nebenwirkungen. Natürlich bedürfen diese Experimente weiterer Überprüfung. Sie zeigen jedoch, daß ein besseres Verständnis der Wirkung von Zytokinen auf fibroblastische Zellen zur Aufklärung des Mechanismus beitragen kann, der zur Ausbildung eines

kontraktilen Phänotyps bei Fibroblasten führt.

Der Einfluß von Heparin

Es ist allgemein bekannt, daß Heparin und Heparansulfate die Replikation glatter Muskelzellen hemmen und die Bildung von α -Aktin der glatten Muskelzellen in diesen Zellen fördern können. Wir haben beobachtet, daß beide Substanzen ähnliche Wirkungen auch auf fibroblastische Zellen ausüben. Somit könnten auch Heparin und Heparansulfate an der Regulation des Phänotyps von Fibroblasten bei der Wundheilung und bei verschiedenen retraktilen Erkrankungen beteiligt sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Die frühe Beobachtung, daß Fibroblasten ihren Phänotyp im Verlauf der Wundheilung und bei fibrokontraktilen Erkrankungen verändern können, ist durch eine Reihe von biochemischen und funktionellen Ergebnissen bestätigt worden. Hierzu zählt vor allem der Nachweis von α -Aktin der glatten Muskulatur im Zytoskelett der modifizierten Fibroblasten oder Myofibroblasten. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß Myofibroblasten die Schlüsselzellen zum Verständnis von retraktilen

Vorgängen darstellen. Experimentelle Untersuchungen mit γ -Interferon, GM-CSF und Heparin weisen auf die Beteiligung von Zytokinen an der Bildung von Myofibroblasten hin.

SUMMARY

The biology of myofibroblasts

Several biochemical and functional findings corroborate the early observations that fibroblasts modify their phenotype during wound healing and fibrocontractive disease to become myofibroblasts. One of the main features of myofibroblasts is the incorporation of smooth muscle α -actin into their cytoskeleton, supporting the idea that they are the key cells to understand retrac-tile phenomena. Experimental findings with γ -interferon, GM-CSF and heparin indicate involvement of cytokines in the mechanism of myofibroblast formation.

*Prof. Dr. med. Giulio Gabbiani
Abteilung für Pathologie
Universität Genf
Centre Medical Universitaire
1 rue Michel Servet
CH-1211 Genf*

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von „Kidney international“.