

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der  
Medizinischen Fakultät Charité- Hochschulmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Histologische Eigenschaften des humanen vorderen Kreuzbandes und seiner autologen Sehnentransplantate**

**Myofibroblastenverteilung und Korrelation mit der Ausbildung einer  
Kollagentertiärstruktur**

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

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von Markus Weiß  
aus Solingen

Gutachter/in :  
1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Weiler  
2. Priv.-Doz. Dr. med. S. Greiner  
3. Prof. Dr. med. W. Petersen

Datum der Promotion: 24.02.2012

Herrn PD Dr. med. Andreas Weiler möchte ich für die Realisierung und die freundliche Überlassung des Themas danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Frank N. Unterhauser, der mir mit seinem wissenschaftlichen und freundschaftlichen Rat jederzeit eine große Hilfe war und es verstand, mich mit seiner Geduld und Ausdauer zu motivieren.

Die Durchführung dieses Projekts wurde nur durch die freundliche Beratung und Unterstützung von dem Leiter der Forschungsabteilung Prof. Dipl. Ing. Georg Duda, und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Hardung und Frau Princ möglich, ihnen gilt mein besonderer Dank. Des Weiteren möchte ich Herrn Dipl. Ing. Devakar Epari und Dr. Bill Taylor für ihre technische Hilfe und die freundschaftliche Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen.

Meiner Familie in ewiger Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Kreuzbandverletzungen</b>	<b>11</b>
1.1.1	Historisches	13
1.1.2	Therapie	14
1.1.2.1	Patellarsehne	15
1.1.2.2	Quadricepssehne	17
1.1.2.3	Sehnen des M. tibialis anterior und des M. gracilis („hamstrings“)	18
1.1.2.4	Allografts und synthetische Bandersatzmaterialien	19
<b>1.2</b>	<b>Anatomie</b>	<b>21</b>
1.2.1	Makroskopie	21
1.2.2	Mikroskopische Anatomie	23
1.2.2.1	Zelluläre Bestandteile	23
1.2.2.2	Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes	29
1.2.3	Extrazellulärmatrix	29
1.2.4	Innervation	30
<b>1.3</b>	<b>Transplantatremodeling</b>	<b>30</b>

1.3.1	Initiale Phase ( Nekrose und Degradation )	31
1.3.2	Revitalisierungsphase ( Reparatur und Proliferation )	31
1.3.3	Remodelingphase ( bis zu 2 Jahren )	32
1.3.4	Klinische Relevanz der Remodelingphase	32
<b>1.4</b>	<b>Kollagentertiärstruktur (Crimp)</b>	<b>32</b>
<b>1.5</b>	<b>Ziel der Untersuchung</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Transplantatauswahl</b>	<b>37</b>
<b>2.2</b>	<b>Histologische Aufarbeitung</b>	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>Konventionelle Färbungen</b>	<b>38</b>
<b>2.4</b>	<b>Immunhistologie</b>	<b>38</b>
2.4.1	Theorie der Immunhistologie	38
2.4.2	Immunhistochemische Färbungen	39
2.4.3	Immunhistologische Darstellung der Myofibroblasten	40

<b>2.5</b>	<b>Auswertung und Datenanalyse</b>	<b>41</b>
2.5.1	Konventionelle Lichtmikroskopie	42
2.5.2	Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild	42
2.5.3	Myofibroblasten	43
2.5.4	Polarisationsmikroskopie	43
2.5.5	Kollagencrimp	43
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Natives vorderes Kreuzband</b>	<b>46</b>
3.1.1	Makroskopie	46
3.1.2	Mikroskopie	46
3.1.3	Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz des vorderen Kreuzbandes	48
<b>3.2</b>	<b>Semitendinosussehne</b>	<b>49</b>

3.2.1	Makroskopie	49
3.2.2	Mikroskopie	50
3.2.3	Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Semitendinosussehne	50
<b>3.3</b>	<b>Gracilissehne</b>	<b>52</b>
3.3.1	Makroskopie	52
3.3.2	Mikroskopie	52
3.3.3	Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Gracilissehne	53
<b>3.4</b>	<b>Tibialis anterior Sehne</b>	<b>55</b>
3.4.1	Makroskopie	55
3.4.2	Mikroskopie	55
3.4.3	Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Tibialis anterior Sehne	56
<b>3.5</b>	<b>Quadricepssehne</b>	<b>58</b>
3.5.1	Makroskopie	58
3.5.2	Mikroskopie	58
3.5.3	Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Quadricepssehne	59



<b>3.6</b>	<b>Patellarsehne</b>	<b>60</b>
3.6.1	Makroskopie	60
3.6.2	Mikroskopie	61
3.6.3	Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Patellarsehne	63
<b>3.7</b>	<b>Zusammenfassender Vergleich</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>

<b>Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Grafikverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>Untersuchungsmaterialien</b>	<b>98</b>
<b>Erklärung an Eides Statt</b>	<b>100</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>101</b>
<b>Studienbegleitende Tätigkeiten</b>	<b>103</b>
<b>Liste der bisherigen Veröffentlichungen</b>	<b>103</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Kreuzbandverletzungen

Das vordere Kreuzband (im folgenden VKB) ist eine der am häufigsten verletzten Bandstrukturen im menschlichen Körper, wobei die komplette Ruptur die häufigste Verletzung des Kniegelenks darstellt. Das Verhältnis von Verletzungen des vorderen zum hinteren Kreuzband beträgt in etwa 10:1 (137). Die Hauptfunktion der Kreuzbänder besteht darin, Femur und Tibia im Kniegelenk in der Sagittalebene so zu stabilisieren, so dass beide Knochen nicht gegeneinander verschoben werden können. Bei Insuffizienz oder Verletzung der Kreuzbänder lässt sich die Tibia nun in der Sagittalebene gegenüber dem Femur verschieben und es kommt zu einer Subluxation der Tibia. Dies führt zu einem erheblichen Stabilitätsverlust, welcher die Funktion des Gelenkes einschränkt (31,50,115) und sekundär zur Folge hat, dass es bei anhaltender körperlicher Belastung zu einer progredienten Schädigung der Menisken und des Gelenkknorpels kommt und sogar zu einer frühzeitigen Arthrose des betroffenen Gelenkes führen kann (6,43,103,152). Daher wird das VKB, welches im Gegensatz zu den Kollateralbändern und teilweise auch dem hinteren Kreuzband (HKB) eine geringe bis nicht vorhandene Selbstheilungstendenz besitzt, in den meisten Fällen operativ rekonstruiert.

In den Industrienationen steigt aufgrund der aktiven Freizeitgestaltung, vor allem durch Risikosportarten wie Snowboarden, Skifahren und dem Betreiben von Kontaktsportarten wie Fußball oder Basketball die Inzidenz von VKB Rupturen stetig an und liegt bei ca. einer VKB-Ruptur beziehungsweise einem VKB-Ersatz pro 1000 Einwohner pro Jahr (140). Der typische Verletzungsmechanismus ist ein Flexion-Valgus-Außenrotationstrauma, welches häufig mit Verletzungen des medialen peripheren Bandapparates (Innenband, posteromediale Ecke und Innenmeniskus) einhergeht (140, Tabelle 1), wobei Hyperextensionstraumen, Valgusstress und hintere tibiale Translationen („dash board injuries“) eher zu einer Ruptur des hinteren Kreuzbandes führen.

<u>Bewegungsmechanismus</u>	<u>Betroffene Strukturen</u>
Außenrotation/Abduktion	VKB, Innenband, Kniegelenkluxation
Valgusverbiegung	Innenband, POL, HKB, VKB, Kniegelenkluxation
Varusverbiegung	Außenband, VKB, HKB, Kniegelenkluxation
Extension/Innenrotation	VKB
Hyperextension	VKB, HKB, Innen- und Außenband, hintere Kapsel
Hintere tibiale Translation	HKB, Innen- und Außenband, Kniegelenkluxation

Tabelle 1: Bewegungsmechanismus und die dabei betroffenen Strukturen bei Verletzungen des Kapsel-Band-Apparates am Kniegelenk VKB= Vorderes Kreuzband, HKB= Hinteres Kreuzband, POL= Posterior Oblique Ligament ;aus Ulmer M.G., Imhoff A. B.: Bandverletzungen am Kniegelenk I, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2006, 303-328

Im Laufe der Jahre wurden die Operationstechniken optimiert und dadurch die Resultate verbessert. Heute hat sich die arthroskopische, beziehungsweise die arthroskopisch assistierte Rekonstruktion der VKB-Ruptur mit verschiedenen Transplantaten durchgesetzt, wobei das Wissen und Verständnis der funktionellen Anatomie „die wichtigste Grundlage des Chirurgen zur Rekonstruktion und Heilung“ darstellt (41). Dieses Wissen und Verständnis konnte mit Hilfe intensiver biologischer, biomechanischer und tierexperimenteller Studien und Versuche mit verschiedenen Transplantaten und Operationstechniken vertieft und ausgeweitet werden, um eine optimale Heilung und damit Rekonstruktion der verletzten Strukturen zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit soll darauf eingegangen werden, welches autologe Transplantat bei einem histologisch-morphologischen Vergleich dem VKB am Ähnlichsten erscheint und klären, ob es einen Zusammenhang zwischen den zellulären Bestandteilen und der Kollagentertiärstruktur (Crimp) in den Transplantaten und im VKB gibt.

### 1.1.1 Historisches

Schon im antiken Griechenland um 200 v. Chr. sind erste anatomische Beschreibungen der Kreuzbänder des Kniegelenks von Galen von Pergamon überliefert. 1845 wurde erstmals von Bonnet (24) in Kadaverstudien beschrieben, dass rupturierte Kreuzbänder eine Auswirkung auf die Kniegelenksmechanik haben und zu einer Subluxation der Tibia gegenüber dem Femur zu Folge haben und zu einem Hämarthros führen können. Diese bahnbrechenden Erkenntnisse in seinem Werk „Über die Behandlungen von Gelenkerkrankungen“ waren ein Meilenstein der Erkennung und Behandlung von Verletzungen und Erkrankungen in der modernen Gelenkchirurgie .

Aus den Jahren 1900 und 1903 sind erstmals stabilisierende Eingriffe am Kniegelenk aus England überliefert, wobei Mayo Robson versuchte, rupturierte vordere Kreuzbänder mittels einer Primärnaht zu rekonstruieren (91). Nachdem man erkannte, dass die Primärnaht insuffizient war, versuchte man auf autologes Kollagengewebe umzusteigen, um damit die VKBs zu rekonstruieren. Hey Groves beschrieb 1917 als erster eine Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels eines proximal gestielten Streifens aus dem Tractus Iliotibialis (66). Außerdem empfahl er die Rekonstruktion des hinteren Kreuzbandes mittels Pes Anserinus Sehnen durchzuführen. Alle modernen Rekonstruktionsverfahren basieren auf dieser Idee der Kniestabilisierung. Nicht nur die Stabilisierung des Knies, sondern zunächst einmal die exakte Diagnose von Kreuzbandverletzungen steht bei der Behandlung im Vordergrund und wurde 1913 von Jones und Smith mit dem so genannten „Pivot Shift“ beschrieben (76), der heutzutage neben dem Lachman-Test als einer der wichtigsten Tests zur Überprüfung der Stabilität der Kreuzbänder gilt.

1918 gelang es dem Japaner Kenji Takagi (20,21,30,83) erstmals mit einem Zystoskop in ein Kniegelenk zu schauen, was in den Jahren zwischen 1919 bis 1930 zu einer rasanten Entwicklung von Arthrographie und Arthroskopie führte und die Diagnostik und Therapie erheblich vereinfachte. Im Jahre 1938 erschien dann von Ivar Palmer eine umfassende Studie über die Verletzung des vorderen Kreuzbandes, in der er eingehend über die Anatomie, Biomechanik und Pathologie berichtet und Vorschläge zur Therapie darlegte (112).

In den darauf folgenden Jahren entwickelte sich die Kreuzbandchirurgie rasant weiter, wobei unter anderem O'Donoghue mit seiner Publikation „Surgical treatment of the major injuries to ligaments of the knee joint“ einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis von Diagnostik und Therapie leistete (109). In dieser Zeit bis in die siebziger Jahre wurde die operative Versorgung und Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes kontrovers diskutiert, was vor allem daran lag, dass in den klinischen Studien nicht zwischen isolierten VKB-Rupturen und komplexen Knieverletzungen differenziert wurde. Mitte der Siebziger Jahre wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass ein adäquater VKB-Ersatz für eine Stabilisierung der

gesamten Kniemechanik sorgt und somit die negativen Folgen wie Meniskusläsionen, Knorpeldegenerationen und Arthrose verhindern beziehungsweise verzögern kann (10,46,47,90,92,108).

Wurden bislang verschiedene autologe Transplantate wie die Hamstringsehnen (Sehnen der Mm gracilis und semitendinosus) (86), iliotibiales Band (67), und Patellarsehne (Campell 1930 und 1936) (32) zur VKB-Plastik verwendet, ging man Anfang der Achtziger Jahre dazu über, künstliches Material als VKB-Ersatz zu verwenden. Materialien wie Nylon, Dacron (110,117,120) Polypropylen (56,79), sowie Carbonfäden (33,73,121,149) fanden eine breite Anwendung. Diese Behandlungsmethode wurde aber schnell wieder verlassen, da es aufgrund von Abriebpartikeln der verwendeten Materialien zu ernststen Komplikationen im Sinne von synovialen Fremdkörperreaktionen und letztendlich Rupturen kam (38,55,56,110,117). In den darauf folgenden Jahren wurden Studien durchgeführt, in denen zwischen operativer und konservativer Therapie des VKB-Ersatzes unterschieden wurde (10,46,152) und man zu dem Schluss kam, dass ein intaktes vorderes Kreuzband die wichtigste Voraussetzung für eine komplikationsarme Langzeitfunktion der Kniemechanik darstellt und eine Rekonstruktion bei Ruptur angestrebt werden sollte.

In Zukunft wird auch in der Kreuzbandchirurgie die Robotik und die Navigation eine Hilfestellung bieten und eine größere Beachtung finden, ähnlich wie dies aktuell in den großen unfallchirurgisch/orthopädischen Zentren bei der Hüftendoprothetik und bei der Becken- und Wirbelsäulenchirurgie der Fall ist. Die Operateure haben nun mit Hilfe dieser computergestützten Technik die Möglichkeit, die Positionierung der Transplantatverankerungspunkte an Tibia und Femur zu optimieren (138) und so eine Fehlpositionierung zu vermeiden. Der Nachteil dieser Verfahren besteht unter anderem darin, dass sich jeder Patient präoperativ einer ausführlichen bildgebenden Diagnostik unterziehen muss, sowie einer invasiven Installation von Referenzpunkten (z. B. Schanz 'sche Schrauben in Femur und Tibia). Diese neuen Techniken können als Hilfe angesehen werden, die individuelle anatomische Kniegelenksstruktur des Patienten zu analysieren. Das biologische und biomechanische Grundverständnis des Operateurs ersetzen können sie allerdings nicht.

### 1.1.2 Therapie der Kreuzbandverletzungen

Zunächst gilt zu erwähnen, dass es eine Vielzahl von möglichen Transplantaten gibt, um das vordere Kreuzband zu ersetzen. Man unterscheidet zwischen Sehmentransplantaten mit anhängendem Knochenblock (Patellar- und Quadricepssehne) und freien Sehmentransplantaten (Gracilis- und Semitendinosussehne, tractus iliotibialis Streifen, plantaris longus Sehne). Des Weiteren kann man zwischen autologem Gewebe des Patienten und Allografts (= Leichengewebe, z. B. Achillessehne und

Sehne des M. tibialis anterior) differenzieren (Tabelle 2). Außerdem gibt es gewisse Entscheidungshilfen und -kriterien, die dem Operateur die Transplantatwahl erleichtern sollen, wie unter anderem die Transplantatfixation, die Entnahmemorbidität, die Verfügbarkeit und die mechanischen und strukturellen Eigenschaften des Transplantats (Tabelle 3).

Autologe Gewebe:

Patellarsehnentransplantat (Bone-Tendon-Bone/BTB)

Pes anserinus-Sehnentransplantat (Semitendinosus-/ggf. zusätzlich Gracilissehne, mindestens 3 fach)

Quadricepssehnentransplantat

Tractus-iliotibialis-Streifen

Plantaris-longus-Sehne

Allografts (Leichengewebe):

Patellarsehnentransplantat

Achillessehnentransplantat

Pes anserinus-Sehnentransplantat

Tabelle 2: Derzeit empfohlene Transplantate zum Ersatz der Kreuzbänder; aus Höher J. und Tiling T.: Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie , Chirurg (2000) 71: 1045-1054

### 1.1.2.1 Patellarsehne (Bone patellar tendon bone = BPTB)

Das zentrale Drittel der Patellarsehne mit anhängenden Knochenblöcken aus der Patella und der Tuberositas tibiae (BPTB- Transplantat) weist eine vielfach höhere Steifigkeit und Belastbarkeit als das native VKB auf (104) und ist zudem noch das am häufigsten verwendete Transplantat für die Rekonstruktion des vorderen und hinteren Kreuzbandes (70). Es wird meistens ein ca. 9-11 mm breites

Transplantat verwendet, wobei die Knochenblöcke mithilfe von Meißel, Säge oder oszillierender Hohlsäge (27) entnommen werden und das Transplantat dann mittels endoskopischer Technik in den femoralen und tibialen Bohrtunnel eingebracht wird. Die Primärfixation erfolgt durch Einschlagen des Knochenblocks in press-fit Technik (27,67), durch Interferenzschrauben (83) (Abbildung 1) oder extraartikulär über Fadenarmierung (132). Bei einer adäquaten Fixation ist mit einer Einheilung der Knochenblöcke innerhalb von 4 Wochen zu rechnen (98). Die Vorteile dieser Behandlungsmethode liegen in der initialen hohen Fixationsfestigkeit und Steifigkeit (13,14,68,75,83,88,89,93), die daraus resultiert, dass das Transplantat durch die anhängenden Knochenblöcke nicht aus den Bohrtunneln herausgleiten kann. Diese initiale Fixationsfestigkeit ermöglicht auch einen frühzeitigen Beginn der Rehabilitationsmaßnahmen, die für die Heilung einen entscheidenden Faktor darstellen (100,105). Des Weiteren ermöglicht diese Methode eine annähernd isometrische Transplantatplatzierung, was wiederum wichtig für die postoperative Kniestabilität ist und positive Auswirkungen auf das Langzeitüberleben des Transplantates hat (48,49,107).

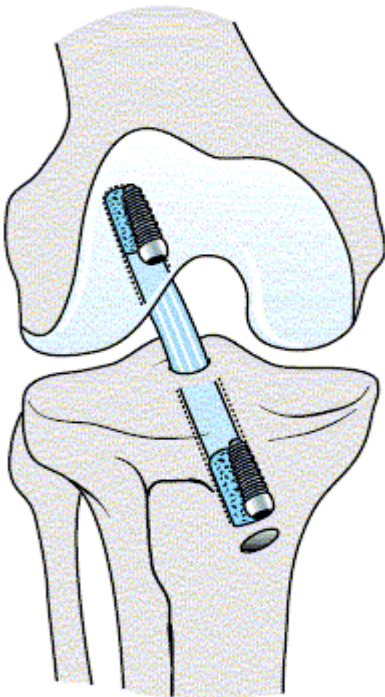


Abbildung 1: Knochen-Knochen-Fixation (BPTB-Technik) mit Interferenzschrauben (Patellarsehnentransplantat) aus Ulmer M.G., Imhoff A. B.: Bandverletzungen am Kniegelenk I, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2006, 303-328

Diese Methode hat jedoch zum Nachteil, dass Schmerzen im Entnahmebereich auftreten können, was zu einer gestörten Funktion des Streckapparates führen und mit Quadricepsatrophie und Kraftminderung



einhergehen kann. Die Komplikation einer Patellafraktur wird mit unter 1% angegeben (70). In bis zu 25% der Fälle können retropatellare Symptome oder Schmerzen beim Knien durch den Knochendefekt der Tuberositas tibiae auftreten (122), weshalb bei islamischen Patienten (kniende Gebetsposition) oder bei Berufsgruppen mit kniender Tätigkeit (z.B. Fliesenleger) das Patellarsehnentransplantat nicht empfehlenswert ist. Weiterhin besteht die Gefahr einer Patellarsehnenruptur, femoropatellärer Schmerzen, persistierenden Bewegungseinschränkungen, sowie die Möglichkeit einer Hoffahernie (140). Daher betrachtet man diese Operationsmethode heute eher kritisch und wendet sie zunehmend zurückhaltender an.

Initiale mechanische und strukturelle Eigenschaften des Transplantats zum Zeitpunkt Null
Entnahmemorbidität
Transplantatfixation
Dauer und Qualität der Einheilung und biologischer Umbau (Remodeling)
Einsatz als VKB- bzw. HKB- Ersatz
Notwendigkeit anderer Rekonstruktionen (bei komplexen Bandverletzungen, Knieluxationen)
Verfügbarkeit bei Sekundäreingriffen bzw. Revisionen

Tabelle 3: Entscheidungskriterien zur Transplantatauswahl aus Höher J. und Tiling T : Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie , Chirurg (2000) 71: 1045-1054

### 1.1.2.2 Quadricepssehne

Das zentrale Quadricepssehnentransplantat ist sowohl für den Ersatz des vorderen sowie des hinteren Kreuzbandes geeignet (22,51,134), wobei die Quadricepssehne nur von wenigen Operateuren als Routinetransplantat verwendet wird. Das Quadricepssehnentransplantat nimmt in der Kreuzbandchirurgie eine Zwitterstellung zwischen den Hamstringsehnen und dem Patellarsehnentransplantat ein, da es an einem Ende einer knöchernen Einheilung und am anderen Ende einer Knochen-Band-Heilung bedarf. Die Quadricepssehne kann durchaus als Alternative vor allem bei Revisions- und Rekonstruktionseingriffen

angesehen werden (140). Über die Entnahmemorbidity gibt es sehr wenige Literaturangaben, sie soll jedoch, verglichen mit der Entnahmemorbidity der Patellarsehne, geringer sein (67).

### 1.1.2.3 Sehnen des M. semitendinosus und des M. gracilis („hamstrings“)

Seit ca. 15 Jahren werden zunehmend Pes anserinus-Sehnentransplantate zum Ersatz der Kreuzbänder verwendet, um die eben beschriebenen Nachteile bei der Verwendung eines Patellarsehnentransplantats, wie z.B. die erhöhte Entnahmemorbidity, zu umgehen. Derzeit wird ein mindestens drei-, besser aber ein viersträngiges freies Transplantat empfohlen, bei dem entweder die Semitendinosussehne allein, oder aber in Kombination mit der Gracilissehne (3,125) verwendet wird. Zur Primärfixation können die Enden mit Fäden (z. B. Ethibond) oder Polyester tapes (z. B. Mersilene) armiert und diese extrakortikal mit Titanplättchen, Titanringen oder über Schrauben geknüpft (87), direkt mit Knochenklammern am Periost fixiert (29) oder mit speziellen Interferenzschrauben (Metall oder resorbierbar) im Knochenkanal verblockt werden (125,147) (Abbildung 2).

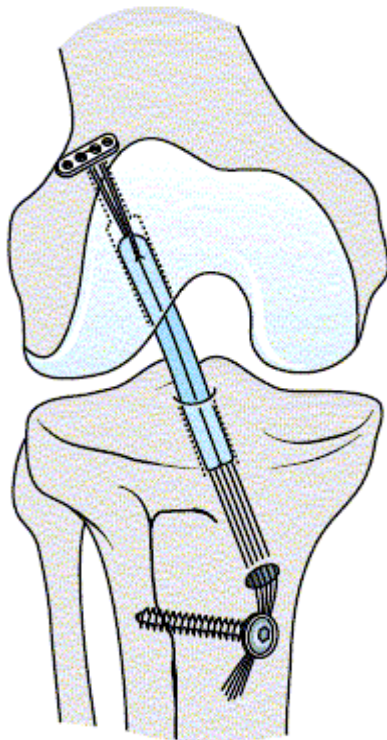


Abbildung 2: indirekte extrakortikale Fixation mittels

Endobutton und Suture plate aus Ulmer M.G., Imhoff A. B.: Bandverletzungen am Kniegelenk I, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2006, 303-328

Die Einheilung der Sehnentransplantate in den Knochenkanal wird nach tierexperimentell durchgeführten Untersuchungen mit 8-12 Wochen angegeben (118,145). Die Entnahmemorbidity der Pes anserinus-Sehnen besteht initial in einer möglichen Hämatombildung in der Muskelloge und einem Kraftdefizit für die Flexion im Kniegelenk und für die Innenrotation des Unterschenkels. Das Kraftdefizit kann nach Literaturangaben innerhalb von 9-12 Monaten nach der Entnahme kompensiert werden (152). Vorteilhaft ist nicht nur die geringere Entnahmemorbidity bei einem kosmetisch günstigeren Hautschnitt im Vergleich zur Patellarsehne, sondern auch eine initiale hohe Reißfestigkeit mit der Möglichkeit eine exakte anatomische Rekonstruktion durchführen zu können. Da die Hamstringsehnen den geforderten Eigenschaften eines „idealen“ Transplantats sehr nahe kommen (Tabelle 4) verwenden viele Operateure diese Transplantate heutzutage bevorzugt (140).

Leichte und rasche Entnahme/Verfügbarkeit
Keine Entnahmemorbidity (Schmerz, Funktionsverlust, etc.)
Vollständige Reproduktion der Insertionsanatomie und der Funktion individueller Faserbündel des intakten Kreuzbandes
Möglichkeit der rigiden Verankerung
Rasche Revaskularisierung und Einheilung an den Fixationspunkten
Endgültige mechanische und ultrastrukturelle Eigenschaften sollten dem Kreuzband eines jungen Erwachsenen entsprechen

Tabelle 4: Eigenschaften des „idealen“ Transplantats zum Kreuzbandersatz; aus Höher J. und Tilling T :Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie, Chirurg (2000) 71: 1045-1054

#### 1.1.2.4 Allografts und synthetische Bandersatzmaterialien

Als „Allografts“ werden homologe Gewebe bezeichnet, die von humanen Leichenspendern stammen. Allografts werden heute hauptsächlich bei komplexen Revisionseingriffen verwendet (70,140), wobei die Entnahmemorbidity entfällt, ein besseres kosmetisches Ergebnis erzielt werden kann und die Operationsdauer verkürzt wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit, das Transplantat intraoperativ beliebig zu dimensionieren (Tabelle 5).

keine Morbidität an der Entnahmestelle kürzere Operationsdauer besseres kosmetisches Resultat unbegrenzte Verfügbarkeit des Materials auch bei Rekonstruktion multipler Bandstrukturen geringere Inzidenz postoperativer Bewegungseinschränkungen Möglichkeit, das Transplantat beliebig zu dimensionieren
---

Tabe

lle 5 : Vorteile bei der Verwendung von Allografts als Transplantat aus. Marks P.H, Cameron M. und Fu F.H.: Die Rekonstruktion der Kreuzbänder mit allogenen Transplantaten-Techniken, Ergebnisse, Perspektiven; Orthopäde (1993) 22: 386-391

Allerdings darf das Risiko der Übertragung von Krankheiten (AIDS, HCV, HBV), sowie die immunogene Potenz des Transplantats nicht außer Acht gelassen werden (Tabelle 6).

Risiko der Übertragung von Erkrankungen (AIDS, HCV, HBV) Risiko der immunogenen Potenz des Transplantats
---

Tabelle 6: Nachteile bei der Verwendung von Allografts als Transplantat aus Marks P.H, Cameron M. und Fu F.H.: Die Rekonstruktion der Kreuzbänder mit allogenen Transplantaten- Techniken, Ergebnisse, Perspektiven ; Orthopäde (1993) 22: 386-391

In klinischen und tierexperimentellen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass auch Allografts, ähnlich wie autologe Transplantate, einen Remodelingprozess durchlaufen, das heißt, es findet eine aktive Einsprossung und Einwachung von Bindegewebszellen statt. Dieser Prozess verläuft allerdings langsamer als bei den autologen Transplantaten (9,71), was unter anderem daran liegen könnte, dass durch die Tiefkühlbehandlung der Transplantate und das anschließende Auftauen Schädigungen der Zell- und Bindegewebsmatrix entstehen, welche den Heilungsprozess beeinträchtigen (80). Des Weiteren wird auch darauf verwiesen, dass durch die erforderliche Sterilisation die Vitalität des allogenen Transplantats geschädigt oder gar zerstört werden kann und die dadurch resultierende verlängerte Einheilungszeit ein entsprechend adaptiertes postoperatives und rehabilitatives Nachbehandlungsregime erforderlich macht (46). Klinische Studien zeigen, dass die für eine Kreuzbandplastik verwendeten Allografts erst nach sieben Jahren zu vergleichbaren Ergebnissen wie bei der Verwendung von autologen Transplantaten führen (61,101,103). Da der Bedarf an Allografts sowohl in Europa als auch in den USA bei Weitem nicht gedeckt

werden kann, sollte der Einsatz für eine primäre VKB-Plastik speziellen Einzelfällen (z.B. Hochleistungssportler) vorbehalten sein.

Bei bisher verwendeten synthetischen Bandersatzmaterialien (Gore-Tex, Dacron, Kohlefaser, etc.) hat der Abrieb der Bänder zu einer zum Teil erheblichen synovialen Entzündungsreaktion geführt, was letztendlich zu einem Versagen des Transplantats führte (38,55,56,110,117). Heute finden synthetische Bandersatzmaterialien praktisch keine Verwendung mehr.

Es lässt sich bei der Therapie der Kreuzbandverletzungen festhalten, dass bislang hauptsächlich biomechanische Vergleichsstudien der verschiedenen Transplantate veröffentlicht wurden. Biologische oder histomorphologische Vergleiche wurden zwar durchgeführt, aber es handelte sich um Sehnen transplantate von unterschiedlichen Spendern. In der vorliegenden Arbeit werden nun erstmalig die verschiedenen Sehnen transplantate vom gleichen Spender bezüglich Biologie und Histomorphologie untersucht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass kein Sehnen transplantat an sich als das ideale Rekonstruktionsmaterial angesehen werden kann, wobei der erfahrene orthopädische Chirurg durch Kenntnis und operatives Geschick individuell das für den Patienten optimale Transplantat auswählen kann. Ein Trend weg von der Patellarsehne hin zu den Hamstringsehnen ist allerdings deutlich erkennbar (140).

## **1.2 Anatomie**

### **1.2.1 Makroskopie**

Obwohl sich die beiden Kreuzbänder des Kniegelenkes außerhalb der Gelenkhöhle befinden, werden sie aufgrund ihres synovialen Überzuges als Binnenbänder bezeichnet. Sie sind zwischen den Area intercondylaris anterior und posterior tibiae sowie der Fossa intercondylaris femoris ausgespannt. Das vordere Kreuzband zieht vom hinteren Bereich der tibialen Innenfläche des Condylus lateralis femoris nach distal medial und inseriert in der Area intercondylaris tibiae anterior. Seine vorderen Faseranteile (antero-mediales Bündel) verbinden sich mit dem Vorderhorn des Meniscus medialis. Das vordere Kreuzband ist in sich torquiert (116).

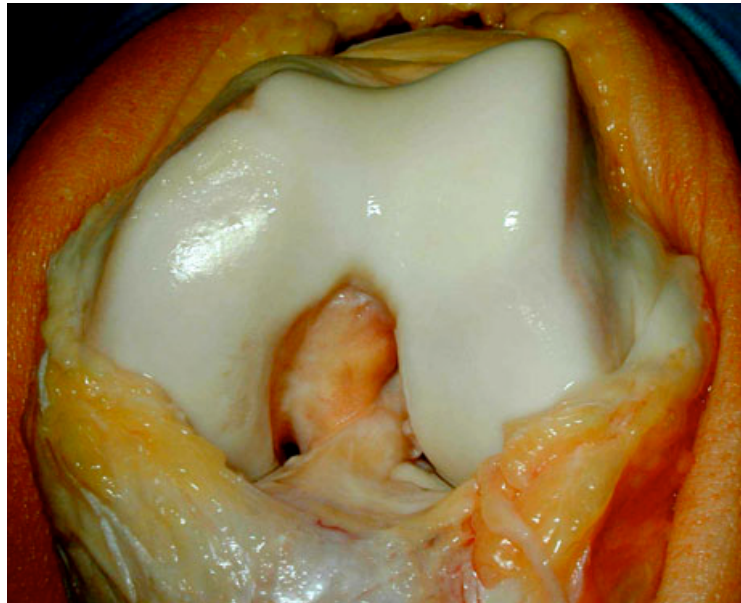


Abbildung 3: Humanes Kniegelenk mit Blick auf Kreuzbänder und Femurkondylen

Es lassen sich verschiedene Faserbündel (anteromediales, postero-laterales und intermediäres Bündel ) von unterschiedlicher Stärke und Länge unterscheiden, wobei die freie intramedulläre Länge des gesamten VKBs bei 31-38 mm liegt (74). Das antero-mediale Bündel inseriert bei ca. 41% des sagittalen Tibiadurchmessers von anterior, das postero-laterale Bündel bei ca. 51%, also ungefähr im Zentrum des Tibiaplateaus (140). Das hintere Kreuzband ist kräftiger als das vordere. Es entspringt fächerförmig an der fibularen Innenfläche des Condylus medialis femoris und verläuft distal schräg nach posterior-lateral, wo es in den Knochen der Area intercondylaris tibiae posterior und in die Tibiahinterkante einstrahlt. Am hinteren Kreuzband lassen sich zwei Hauptzüge, ein antero- laterales und ein postero-mediales Bündel abgrenzen. Der Verlauf der beiden Kreuzbänder wechselt in Abhängigkeit von der Stellung des Kniegelenkes.

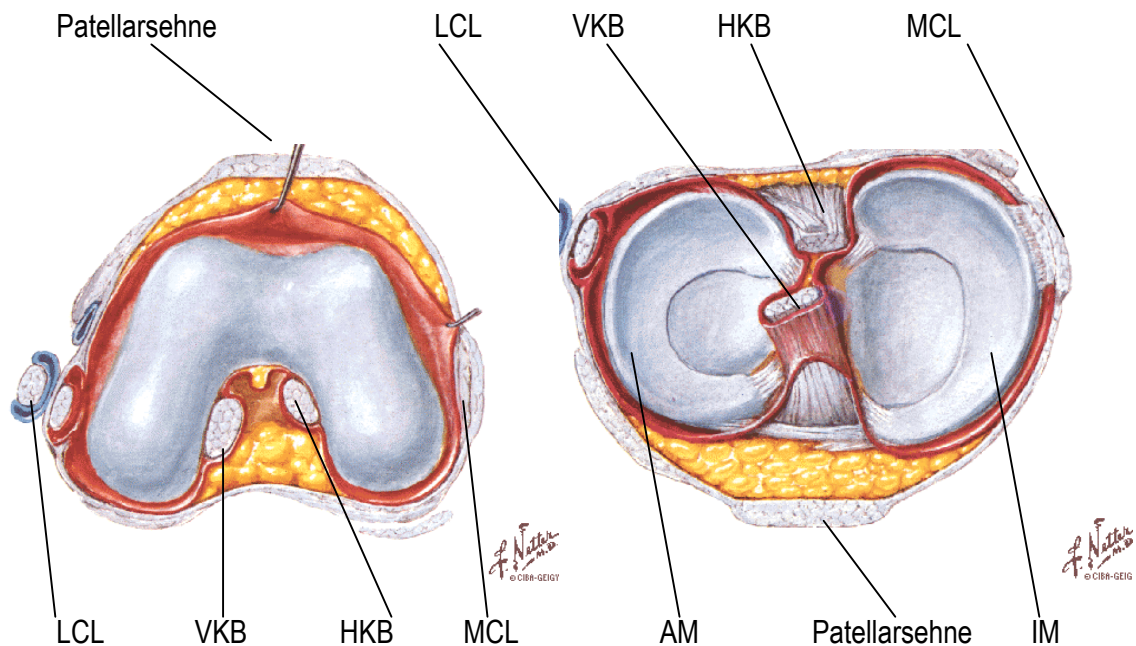


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ursprungs und Ansatzes der Kreuzbänder im Kniegelenk (aus F.H. Netter Interactive Atlas of human anatomy): Links: Ansicht der Femurcondylen von inferior. Rechts: Ansicht des Tibiaplateaus mit Menisken von superior. (VKB = vorderes Kreuzband, HKB = hinteres Kreuzband, MCL = mediales Kollateralband, AM = Aussenmeniskus, IM = Innenmeniskus)

Bei gebeugtem Kniegelenk nimmt das vordere Kreuzband eine horizontale Verlaufsrichtung ein, wobei der antero-mediale Teil angespannt ist, während sich die Lage des hinteren Kreuzbandes gegenüber der Extensionsstellung wenig verändert. Die unterschiedliche Länge und Anordnung der Faserbündel in den Kreuzbändern sorgt dafür, dass, abgesehen von der maximalen Außenrotation, in jeder Stellung des Kniegelenkes ein Teil der Bänder angespannt ist. Vorderes sowie hinteres Kreuzband werden von einer gut durchbluteten Synovialhülle umschlossen und sind somit vom Gelenkbinnenraum getrennt (41,113).

## 1.2.2 Mikroskopische Anatomie

### 1.2.2.1 Zelluläre Bestandteile

Histologisch zeigen die Insertionsstellen des VKB an Femur und Tibia einen charakteristischen Vier-Zonen-Aufbau. Zone 1 besteht aus einer freien Bandstruktur mit parallel ausgerichteten Kollagenfasern, in Zone 2 findet sich unverkalkter Faserknorpel, in Zone 3 kommt hauptsächlich Kalkfaserknorpel vor und Zone 4 besteht aus lamellärem Knochen. Hierbei durchlaufen die parallel ausgerichteten Kollagenfasern der freien

Bandstruktur (Zone 1) die Schichten des unverkalkten (Zone 2) und des verkalkten Knorpels (Zone 3) und inseriert letztendlich im lamellären Knochen (Zone 4) (8,16,18,34,36,41,42,69,81,82,123,129).

Dieser Vier-Zonenaufbau der Insertion wirkt als ein dämpfendes Federungssystem, durch dessen graduelle Versteifung Zug-, Scher- und Schubkräfte abgefangen und kompensiert werden können (8,17,18,41,84,123). Hauptbestandteil des VKB auf zellulärer Ebene sind die Fibroblasten, die von einer Extrazellulärmatrix umgeben sind. Die Form der Zellen variiert je nach Aktivitätszustand zwischen spindelförmig (Fibrozyten, wenig Syntheseaktivität) und rundzellig- ovoid (Fibroblasten, starke Syntheseaktivität). Sie regeln den Auf- und Abbau der Extrazellulärsubstanzen. Damit haben die Fibroblasten einen entscheidenden Anteil am Aufbau des Kollagengerüsts im Transplantat, vor allem auch während des Remodeling-Prozesses nach VKB-Ersatz.

Eine weitere wichtige Zellpopulation, die im VKB nachgewiesen wurde, sind die so genannten Myofibroblasten. Man vermutet, dass sie durch eine Modulation von Fibroblasten durch ein komplexes Zusammenspiel von Mediatoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Komponenten der Extrazellulärmatrix) entstehen (128). Außerdem kommen freie Zellen vor, wie zum Beispiel die Histozyten, Mastzellen, Plasmazellen und diverse Granulozyten, die für die Immunabwehr zuständig sind und über die Blutgefäße ins Bandgewebe gelangen (4,139).

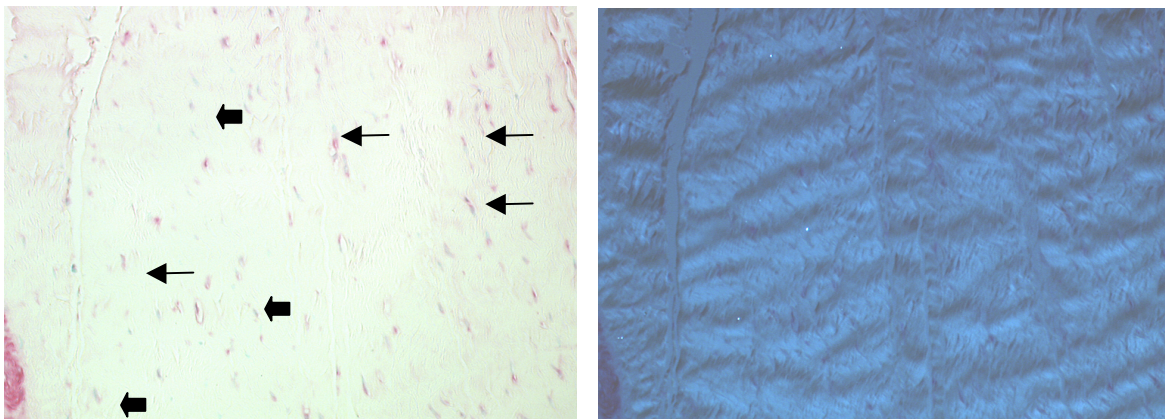


Abbildung 5: Vorderes Kreuzband

links: immunhistochemische Darstellung der Myofibroblasten mittels ASMA-Antikörper ( grüner Zellkern und rote Anfärbung des alpha smooth muscle actin, schmale Pfeile) und der Fibroblasten (grüner Zellkern, dicke Pfeile)

rechts: das gleiche Präparat unter polarisiertem Licht, es ist deutlich die wellenförmige Struktur der Kollagentertiärstruktur erkennbar (Kollagencrimp)



Der Name Myofibroblast wurde vor einigen Jahren für fibroblastische Zellen vorgeschlagen, die sich im Granulationsgewebe befinden und dort für die Gewebearchitektur wichtige zytoplasmatische Mikrofilamente ausbilden. Myofibroblasten werden unter anderem als essentielle zelluläre Bestandteile für die Wundkontraktion und -heilung angesehen (128), wobei sie im Laufe der Zeit dann auch in anderen Geweben nachgewiesen wurden, wie zum Beispiel in den Alveolarsepten der Lunge (78), beim Einheilungsprozess des Ligamentum colaterale mediale des Kaninchens (45), sowie im intakten (96), rupturierten und heilenden (95) humanen vorderen Kreuzband. Aber auch in pathologischen Geweben wie bei der Leberzirrhose (19), der Nieren- (99) und Lungenfibrose (2) und in metaplastischen Stromaveränderungen als Reaktion auf Neoplasien (126) wurden Myofibroblasten gefunden (Tabelle 7).

Ort/Gewebe des Myofibroblastennachweises	Repräsentative Referenz
Morbus Dupuytren	Gabbiani und Majno (1972)
Leberzirrhose	Bhathal (1972)
Kapsel der Nebenniere	Bressler (1973)
Lungenfibrose	Adler und Craighead (1981)
Submukosa des Uterus	Glasser und Julian (1986)
Stroma im Hoden	Skalli et al (1986)
Retikularzellen der Milz	Toccanier-Pelte et al (1987)
Theka externa des Ovars	Czernobilsky et al (1989)
Knochenmark	Charbord et al (1990)
Lungensepten	Kapanci et al (1992)
Lig. coll. mediale des Kaninchens	Faryniarz und Gabbiani (1996)
Intaktes humanes vorderes Kreuzband	Murray und Spector (1999)
Rupturiertes u. heilendes humanes VKB	Murray und Spector (2000)
Sehnentransplantat bei VKB Ruptur	Weiler et al (2001)
Arthrofibrotisches Gewebe im Knie	Unterhauser et al (2003)

Tabelle 7: Nachweis von Myofibroblasten in verschiedenen pathologischen und gesunden Geweben

Des Weiteren gelten sie als pathognomisches Korrelat der Dupuytren'schen Kontraktur (54), was anschaulich die kontraktile Potenz der Myofibroblasten im Gewebe darstellt (Abbildung 6).

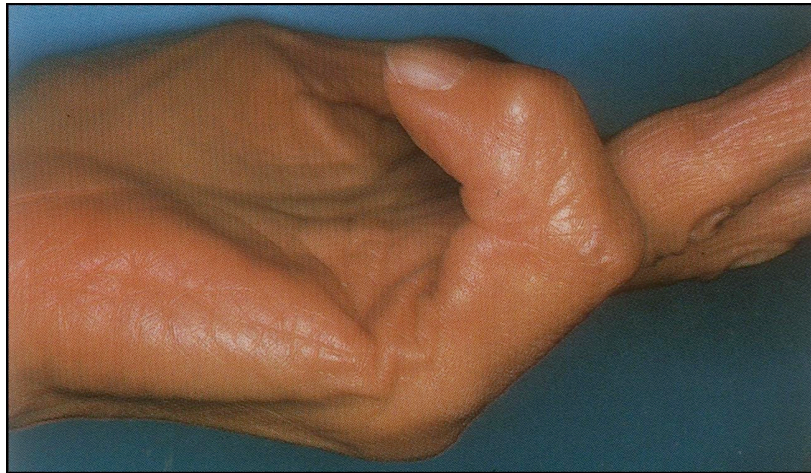


Abbildung 6: Morbus Dupuytren der linken Hand

Von den zellulären Eigenschaften ist bekannt, dass sie Gemeinsamkeiten sowohl mit glatten Muskelzellen (kontraktile Potenz) als auch mit Fibroblasten (Kollagenproduktion) haben (45), wobei die kontraktile Kräfte sich dahingehend unterscheiden, dass die Zellkontraktion bei glatten Muskelzellen  $Ca^{++}$  abhängig und reversibel ist, bei Myofibroblasten jedoch von einer Rho/Rho Kinase gesteuert und irreversibel (40) und eher von isometrischer als von isotonischer Natur ist (124).

Myofibroblasten enthalten eine Isoform des kontraktile Proteins Aktin, das  $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA). Aktin ist ein weit verbreitetes Zytoskelett-Protein, das bei Vorgängen wie Phagozytose, Zellmigration und Kontraktion eine wichtige Rolle spielt und in sechs verschiedenen Isoformen vorkommen kann. Diese werden von verschiedenen Genen kodiert und unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz, wobei die beiden so genannten „non-muscle-actin-Isoformen“ ( $\beta$ - und  $\gamma$ -cytoplasmic-actin) bei fast allen Zellen im Zytoplasma zu finden sind. Im Gegensatz dazu kann man noch vier zellspezifische muscle-actin-Isoformen differenzieren, die je nach Vorkommen eine Identifikation verschiedener Muskelzellen ermöglichen. Dies sind einmal  $\alpha$ -skeletal actin,  $\alpha$ -cardiac actin, sowie die in glatten Muskelzellen typischerweise auftretenden Isoformen  $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA) und  $\gamma$ -smooth muscle actin (64,142,143). Die ASMA-Isoform wurde sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Perizyten und im kontraktilem Apparat fibroblastenähnlicher Myofibroblasten entdeckt und gilt als Marker dieser Zellen (130). Man vermutet, dass sich Myofibroblasten neben den Fibroblasten auch aus glatten Gefäßmuskelzellen, Perizyten und Stromazellen entwickeln können, jedoch ist es noch nicht hinreichend geklärt, ob nur bestimmte Subtypen von Fibroblasten sich in Myofibroblasten umwandeln können, oder alle Fibroblasten diese Fähigkeit besitzen (124).

Myofibroblasten lassen sich durch drei morphologische Hauptmerkmale identifizieren, nämlich durch

Aktinmikrofilamente („stress fibers“), die parallel zur Zelllängsachse verlaufen und hauptsächlich entlang der Zellmembran zu finden sind, durch Interzellulär- und Gapjunctions und durch Zell-Stromaverbindungen (Fibronexus), die es den Myofibroblasten ermöglichen, Zugkräfte auf die umgebende Extrazellulärmatrix auszuüben (Abbildung 7,15,124,128).

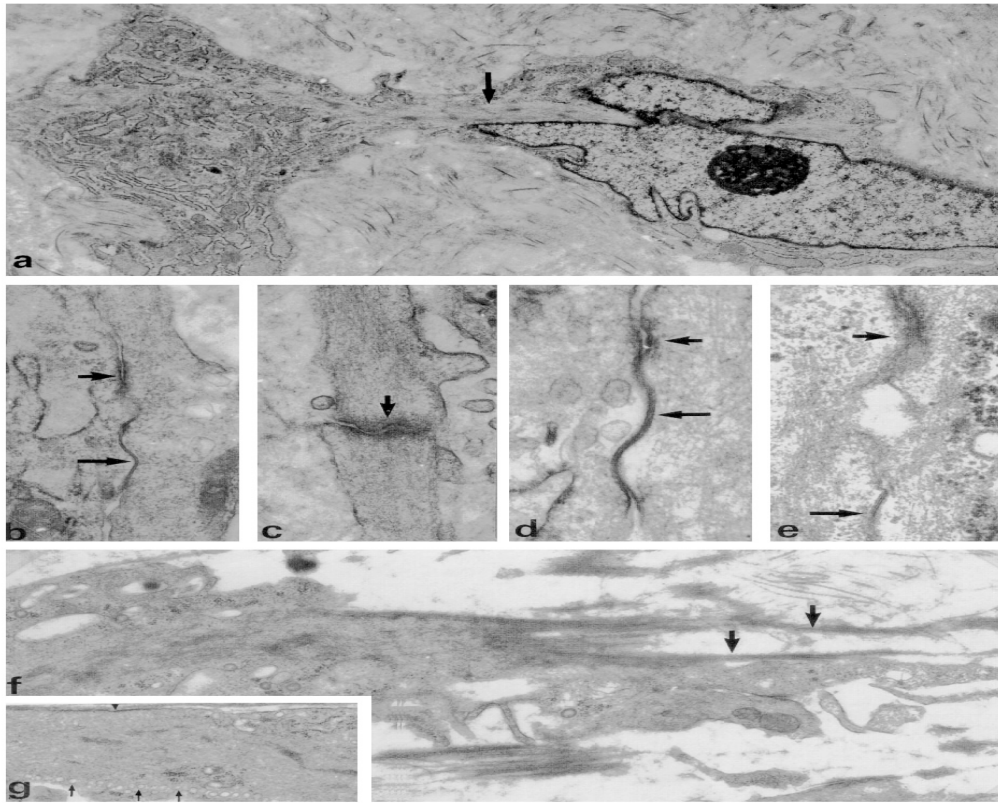


Abbildung 7: Ultrastrukturelle Eigenschaften der Myofibroblasten.(a) Ein typischer Myofibroblast im menschlichen Granulationsgewebe mit einer irregulären Form, einem gut ausgebildetem rauem endoplasmatischem Retikulum und einem Bündel zytoplasmatischer Mikrofilamente im Zytoplasma („stress fibers“) (b, c, d und e ) Interzellulärjunctions zwischen Myofibroblasten. (b) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) gefolgt von einer Gapjunction ( langer Pfeil ) im humanen Granulationsgewebe. (c) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) in einer tiefen muskuloaponeurotischen Fibromatose (d) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) gefolgt von einer Gapjunction (langer Pfeil) bei Morbus Dupuytren (e) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) gefolgt von einer Gapjunction (langer Pfeil) im Stroma eines invasiven duktales Mammakarzinoms (f) Gut entwickelte Fibronexus im humanen Granulationsgewebe (g) Basallamina im menschlichen Granulationsgewebe. Vergrößerungen:(a) 1:10000; (b) 1:32000; (c) 1:39000; (d) 1:78000; (e) 1: 58000; (f) 1:17500; (g) 1:18900

Aus: Schürch, W.:The Myofibroblast:A quarter century after its discovery, Am J Surg Pathol, Volume 22(2) Februar 1998.141-147

Während der Remodelingphase, die noch näher beschrieben wird, kommt es zur Einsprossung von Granulationsgewebe und zum Ab- bzw. Umbau des vorhandenen alten Kollagengewebes durch Fibroblasten, die neues Kollagen produzieren. Gleichzeitig werden auch Fibroblasten zu Myofibroblasten

umgewandelt. Dies geschieht durch ein Zusammenwirken von Mediatoren, wobei Wachstumsfaktoren, Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Komponenten der Extrazellulärmatrix eine entscheidende Rolle spielen (Abbildung 8).

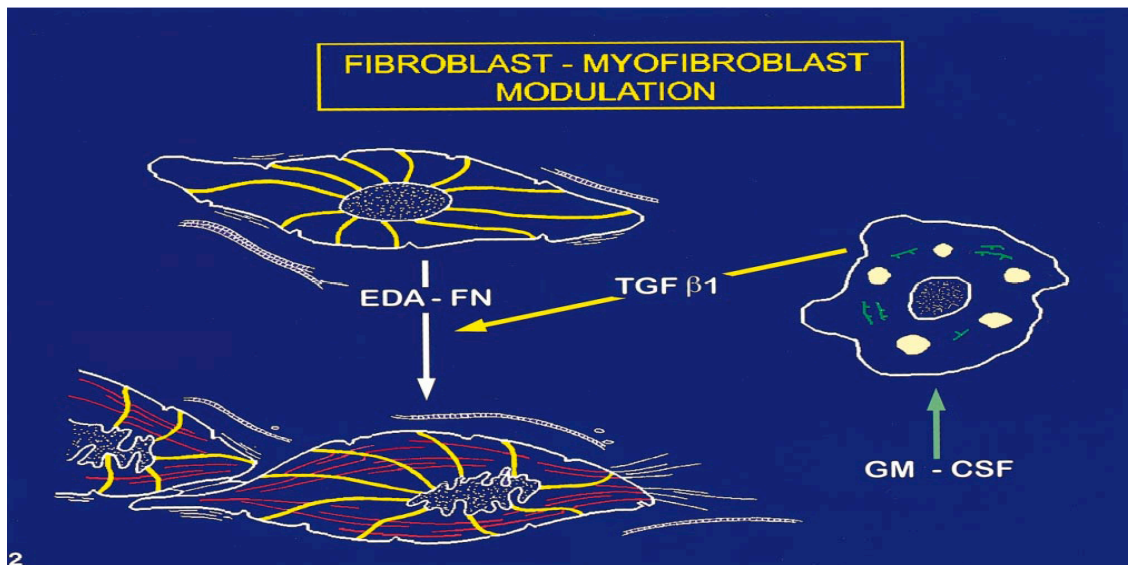


Abbildung 8: Model der Fibroblasten-Myofibroblasten Modulation: TGFβ 1 wird von Thrombozyten (nicht abgebildet) und Makrophagen freigesetzt, wahrscheinlich als eine Konsequenz von GM-CSF Stimulation. Das freigesetzte TGFβ 1 aktiviert stromaständige Fibroblasten zur Synthese und Organisation eines dreidimensionalen ECM Gerüsts, das Fibronectin enthält. Gemeinsam mit TGFβ 1 induziert es den myofibroblastischen Phänotypen. (TGF β1 = transformed growth factor β1; GM-CSF=germcell-colonie stimulating factor; ECM= extracellular matrix; ED-A FN = fibronectin)

Aus: Guido Serini „Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation“ Experimental Cell Research 250, 273-283 (1999)

Myofibroblasten sind also aufgrund ihrer oben dargelegten morphologischen Struktur und der daraus resultierenden kontraktile Fähigkeit mitverantwortlich für die strukturelle und funktionelle Stabilität von Gewebe. Fehlen sie, verursacht dies eine Dilatation von Gewebe, wie zum Beispiel Mikroaneurysmen der Kapillaren oder Lungenemphyseme (128). Sind sie jedoch pathologisch erhöht, so ist das Resultat, dass Kontrakturen (M. Dupuytren) und hypertrophische Narben entstehen (124). Aufgrund dieser Beobachtungen und dem oben beschriebenen Nachweis der Myofibroblasten im nativen und heilenden Gewebe des medialen Kollateralbandes am Knie des Kaninchens (45), vermuteten Faryniarz et al, dass sie eine entscheidende Rolle in der Gewebekontraktion spielen und auch zur Wiedererlangung der in-situ Spannung des heilenden Bandes erheblich beitragen können. Als dann später Murray und Spector ebenfalls diese Zellen im intakten (96) sowie im rupturierten (95) humanen vorderen Kreuzband nachwiesen, vermuteten sie, dass die kontraktile Potenz der Myofibroblasten für das Zusammenziehen der

Extrazellulärmatrix und die Ausbildung der Kollagentertiärstruktur, dem so genannten Kollagen-Crimp verantwortlich ist und sie ein integraler zellulärer Bestandteil des humanen vorderen Kreuzbandes sind.

### 1.2.2.2 Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes

Versorgt wird das vordere Kreuzband hauptsächlich aus den Ästen der A. genicularis media und teilweise aus den Endästen der Aa genicularis inferior medialis et lateralis, die aus der Arteria poplitea entspringen (7,113). Diese Gefäße bilden einen Gefäßplexus in der das VKB und HKB umhüllenden Synovialfalte. Der Zustrom aus den Aa. Genicularis inferior medialis et lateralis erfolgt dabei über den Hoffa'schen Fettkörper.

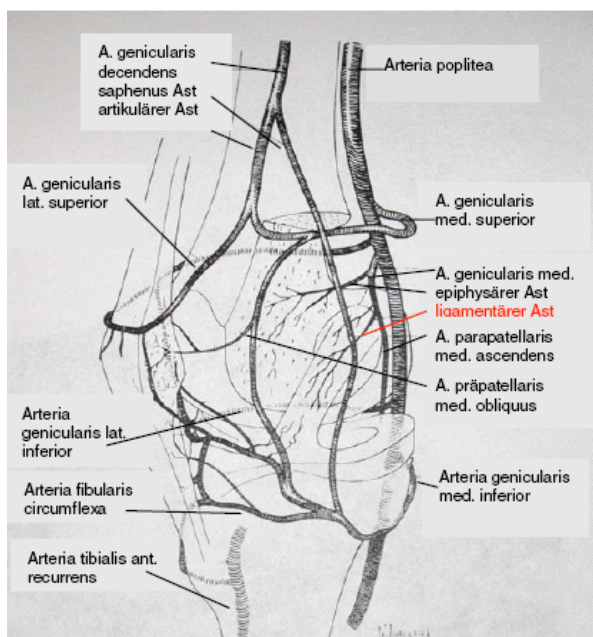


Abbildung 9: Schematische Zeichnung von Lage und Verlauf der knieversorgenden Arterien.

Aus dem synovialen Gefäßplexus dringen kleinere Gefäße in das VKB ein und bilden hier mit endoligamentären Gefäßen Anastomosen, wobei der mittlere Anteil des VKB schlechter durchblutet ist als der femorale und tibiale Ansatz. Die Blutversorgung des VKB über Gefäße aus dem angrenzenden Knochen ist hingegen vernachlässigend gering (7).

### 1.2.3 Die Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix besteht hauptsächlich aus ungeformten Grundsubstanzen (Mucopolysaccharide, Glykoproteine und Proteoglykane), die aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften Wasser an sich binden

können und so den Zusammenhalt der geformten faserigen Anteile gewährleisten. Das vordere Kreuzband besteht zu 60% seines Feuchtgewichts aus Wasser. Die festen faserigen Bestandteile bestehen hauptsächlich aus Kollagenen und auch zu geringeren Anteilen aus Elastinen und retikulären Fasern. Die Kollagene, die 75% des Trockengewichts ausmachen, setzen sich beim VKB zu 90% aus Kollagen Typ I und nur zu 10% Kollagen Typ III zusammen (139).

#### 1.2.4 Innervation

Neural wird das vordere Kreuzband von einem ausgedehnten Nervengeflecht durchsetzt, welches aus den Ästen des Nervus articularis posterior aus dem Nervus tibialis besteht und ca. 1% des Volumen des Bandes ausmacht. Nervenfasern treten über umgebendes Bindegewebe in das VKB ein und enden dort in freien Nervenendigungen und drei morphologisch verschiedenen Mechanorezeptoren, nämlich die Ruffini- und Pacinikörperchen sowie dem Golgi-Apparat. Die freien Nervenendigungen, die für die Vermittlung von Schmerzreizen zuständig sind, machen nur einen kleinen Teil des intraligamentären Nervengeflechtes aus. Hierdurch erklärt sich vielleicht die Tatsache, dass vielen Patienten, die sich eine Ruptur des VKB zugezogen haben, ein initialer Schmerz nicht Erinnerungswürdig ist und Schmerzen erst mit der Ergußbildung einsetzen. Die Ruffinikörperchen sind im Kniegelenk statische und dynamische Mechanorezeptoren, die die statische Knieposition, den intraartikulären Druck sowie das Ausmaß von Bewegung und Geschwindigkeit im Kniegelenk messen können. Pacinikörperchen sind bei Beschleunigung und Verlangsamung der Gelenkbewegung aktiv, in Ruhe dagegen sind sie inaktiv. Über das Ausmaß der Spannung des Kreuzbandes gibt der Golgi-Apparat Rückmeldung. Diese Rezeptoren haben vor allem protektiven Charakter, denn sie steuern durch Rückkopplungsmechanismen auf neuronaler Ebene die Kontraktion und Relaxation der knieumgebenden Muskulatur und haben somit einen starken Einfluss auf die Gelenkstabilität (60,74). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nach einem Ersatz des vorderen Kreuzbandes mittels autologer Semitendinosus- und Gracilistransplantate eine sensorische Reinnervation im Sinne eines Transplantatremodelings erfolgte und sich somit positiv auf die Kniegelenksfunktion auswirkt (106).

### 1.3 Transplantatremodeling

Amiel et al haben 1986 in histologischen Untersuchungen nachgewiesen, dass es nach dem Ersatz des

vorderen Kreuzbandes mit Sehnentransplantaten beim Kaninchen während des Heilungsprozesses zu einer Umwandlung des transplantierten Sehngewebes zu einer bandähnlichen Struktur kommt, welche eine funktionelle Adaptierung an das vordere Kreuzband zeigte. Dieser Ligamentisierungs -oder Remodelingprozess der Sehnentransplantate zu einem bandähnlichen Ersatzgewebe stellt heute die biologische Grundlage für Sehnentransplantationen dar (5,25).

Aufbauend auf den Beobachtungen die Amiel veröffentlichte, hat Bosch 1993 den Remodelingprozess genauer definiert und festgestellt, dass die Transformation sowohl von struktureller als auch von biochemischer Natur ist und das verwendete Transplantat nach dem durchgeführten Kreuzbandersatz drei fließend in einander übergehende Heilungsphasen, ähnlich der Wundheilung, durchläuft. Weiler et al. konnten außerdem 2000 diesen Remodelingprozess mittels einer kontrastmittelverstärkten MRT-Untersuchung am Schafsmodell nachweisen (146).

### 1.3.1 Initiale Phase ( Nekrose und Degradation, unmittelbar postoperativ bis ca. 2 Wochen)

Die Festigkeit eines VKB-Ersatzes hängt postoperativ hauptsächlich von der Art der chirurgischen Fixation ab. Die initiale Phase ist zunächst von Degeneration und partieller ischämischer Nekrose gekennzeichnet, da das Transplantat funktionell avaskulär transplantiert wird. Nach zwei Wochen findet sich peripher teils vitales Fasergewebe, sowie erste reparative Prozesse mit Einsprossung von zell- und gefäßreichem Granulationsgewebe, wohingegen es zentral zu Nekrosen mit ausgeprägtem Zell- und Strukturverlust kommt. Des Weiteren finden sich ultrastrukturelle Zellveränderungen, wie Mitochondrienschwellung, Dilatation und Degranulation des endoplasmatischen Retikulums und Desintegration der Kollagenfibrillen, was auch für die partielle Nekrose und Degeneration des Transplantates spricht. Es liegt auf der Hand, dass diese strukturellen Veränderungen zu einer Verminderung der mechanischen Eigenschaften des Transplantatgewebes führen.

### 1.3.2 Revitalisierungsphase ( Reparatur und Proliferation, ca. 2. bis 16. postoperative Woche )

Die Revitalisierungsphase ist gekennzeichnet durch ein rasches Fortschreiten der Revaskularisation und Repopulation des Transplantates von peripher nach zentral. Dabei lässt sich vermehrt Kollagen Typ III, Fibronectin und ein erhöhter Glycosaminoglykan (GAG) Gehalt nachweisen, was als ein Zeichen für reparativ-proliferative Prozesse gilt. Dies führt aber zunächst auch zu einem Organisationsverlust der Extrazellulärmatrix und somit auch zu einer Abnahme der mechanischen Eigenschaften, so dass acht

Wochen postoperativ die geringste Elastizität und Zugfestigkeit festgestellt werden kann. In der 16. postoperativen Woche erreicht der Revitalisierungsprozess dann auch die zentralen Transplantatabschnitte.

### 1.3.3 Remodelingphase (bis zu 24 Monate)

Bis zum sechsten Monat postoperativ organisiert sich die Extrazellulärmatrix zunehmend, was sich unter anderem durch eine zunehmende Längsorientierung der Kollagenfaserbündel, eine fortschreitende Normalisierung der Zellzahl und den verminderten Gehalt von Kollagen Typ III und Fibronektin bemerkbar macht. Das Ende der Remodelingphase lässt sich nicht genau bestimmen, man geht aber davon aus, dass der Umbauprozess von einem Sehnentransplantat zu einem VKB-nahen narbigen Ersatzgewebe bis zu 24 Monate dauern kann, wobei sich die mechanischen Eigenschaften aufgrund der nicht vollständigen biologischen Adaption nach 2 Jahren nicht mehr verbessern.

### 1.3.4 Klinische Relevanz des Remodelings

Während der Remodeling-Phase zeigt sich eine Verminderung der mechanischen Eigenschaften des Transplantates. Dies führt dazu, dass das Transplantat während dieses Prozesses besonders vulnerabel für mechanischen Stress ist und es leicht zu Verletzungen im Sinne von (Teil) Rupturen kommen kann. Aufbauend auf diesem Wissen, schützt man heute in der Nachbehandlung und Rehabilitation das Transplantat in der vulnerablen Phase vor Überlastung und geht später erst zur Vollbelastung über (140).

## 1.4 Kollagentertiärstruktur (Kollagencrimp)

Kollagen ist in der Extrazellulärmatrix des Organismus neben Wasser am weitesten verbreitet und macht ca. 30 % am Gesamteiweiß aus. Es ist ein Glykoprotein, das am Aufbau aller Binde- und Stützgewebe beteiligt ist. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Kollagenfasern entstehen durch Zusammenlagerung unterschiedlich vieler Kollagenfibrillen. Die Kollagenfasern sind in Sehnen so lang wie diese selbst und haben im entspannten Zustand einen wellenförmigen Verlauf (Crimp)(115). Bei der Kollagenbildung lässt sich ein „hierarchisches“ Bauprinzip aufzeigen, an dessen Anfang die intrazelluläre Synthese von drei Polypeptidketten (Sekundärstruktur) steht. Diese formen eine Tripelhelix, woraus Protofibrillen gebildet



werden ( Tertiärstruktur). Aus fünf Protofibrillen entsteht durch Vernetzung und Aneinanderlagerung eine Mikrofibrille. Mehrere Mikrofibrillen wiederum schließen sich zu Subfibrillen zusammen, die sich zu unterschiedlich dicken Fibrillen zusammenlagern und letztendlich die Fasern (Faszikel) der Sehne formen (Abbildung 10). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass diese Beschreibung nicht die einzig mögliche ist, es gibt momentan keine Standardnomenklatur für die Kollagenfibrillen in der Sehne, was an ihrer großen Variabilität liegen könnte (77). Bei der Fibrillenbildung lagern sich die Kollagenmoleküle parallel so zueinander, dass sie jeweils um ein Viertel ihrer Länge gegenüber dem seitlichen Nachbarmolekül versetzt sind, was die Ursache für die charakteristische Querstreifung der Kollagenfibrillen ist.

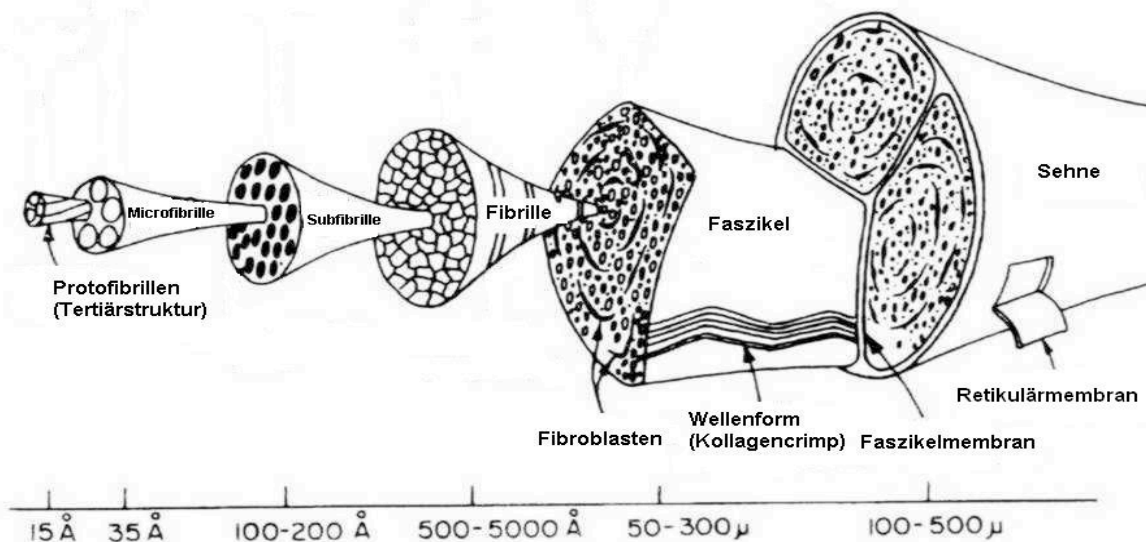


Abbildung 10: Hierarchischer Aufbau des Fibrinkollagens. Drei Polypeptidketten (Sekundärstruktur) bilden eine Tripelhelix, woraus Protofibrillen entstehen ( Tertiärstruktur). Aus fünf Protofibrillen entsteht eine Mikrofibrille, die durch Vernetzung und Aneinanderlagerung eine Subfibrille formen. Diese wiederum lagern sich zu unterschiedlich dicken Fibrillen zusammen woraus letztendlich die Fasern ( Faszikel) der Sehne gebildet werden. Modifiziert nach J. Kastelic, A. Galeski and E. Baer: " The multicomposite structure of tendon" *Connective Tissue Research* Vol. 6, pp 11-23, 1978

Aufgrund der verschiedenen Helixstrukturen in den Kollagenmolekülen unterscheidet man mehrere Kollagentypen, wobei heute zwischen bis zu 19 Kollagentypen differenziert werden können. Typ I Kollagen, das mehr als 80% des Kollagens im Körper ausmacht, kommt in Geweben mit großer Festigkeit ( Haut,

Knochen, Dentin, straffen Bindegewebe, Sehnen und Faserknorpel) vor, wobei die Kollagen I Fibrillen mit durchschnittlich 45-180 nm relativ dick sind. Typ II Kollagen wird hauptsächlich im nucleus pulposus, im Glaskörper, sowie im hyalinen und elastischen Knorpel vorgefunden, und die Kollagenfibrillen mit 10-80 nm relativ dünn ausfallen. Typ III Kollagen kommt im Endomysium und Endoneurium, in Gefäßwänden, der Haut und im Stroma innerer Organe vor, wobei die Fibrillen bei einem Durchmesser von ca. 30 nm locker angeordnet sind. Typ IV Kollagen ist in der Lamina densa der Basallamina enthalten (115).

Kollagenfibrillen sind zugfest, sie leisten einer Deformation im Gewebe Widerstand und ordnen sich dementsprechend stets der Richtung maximaler Dehnung an und nehmen so bei mechanischer Beanspruchung Zugspannung auf, wobei sie in vitro bis zu 5 % ihrer Ausgangslänge in unbelastetem Zustand dehnbar sind. Durch erhöhte Dehnung werden sie länger, bei herabgesetzter Zugbelastung schrumpft das Bindegewebe (115). Außerdem ist Kollagen in den Prozess der funktionellen Anpassung der Binde- und Stützgewebe einbezogen, d.h. bei erhöhter Beanspruchung kann man eine Zunahme des Kollagens, z.B. in Sehnen und Bändern, beobachten. Hierbei passen sich die Kollagenfibrillen in ihrer Länge der langfristig herrschenden Zugbeanspruchung im Gewebe an und bilden entsprechend ihrer Funktion und biomechanischen Belastung unterschiedliche Crimpformen aus („form follows function“) (72), wobei es zwischen Sehnen- und Bandgewebe teilweise erhebliche biochemische und biomechanische Unterschiede gibt. In Sehnen herrscht aufgrund der Zugbelastung hauptsächlich eine parallele Ausrichtung der Faszikel vor, wohingegen es bei Bändern eher zu einer multiaxialen Struktur kommt (26).

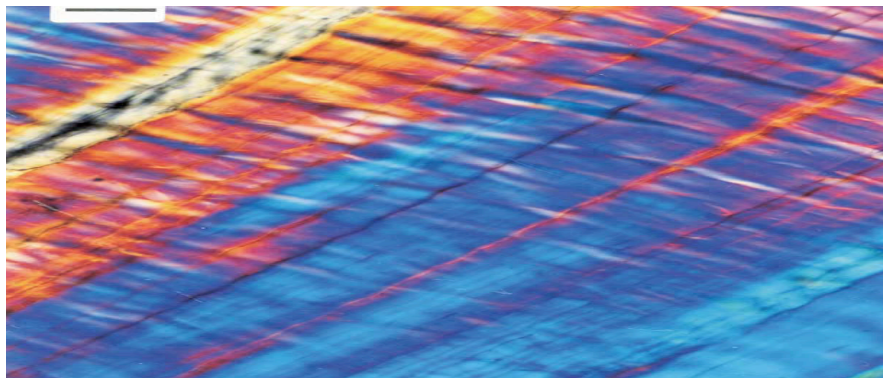


Abbildung 11: Interferenz Farbbilddarstellung von Kollagencripp mit Polychromatischem Licht: Kollagenfibrillen sind optisch anisotrop und zeigen bei longitudinaler Ausrichtung eine positive Doppelbrechung. Mit Hilfe polarisationsoptischer Untersuchungen kann ihre Verlaufsrichtung ermittelt werden. Aus: B. de Campos Vidal „Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy“ / Micron 34 (2003) 423-432

Das Kollagennetzwerk in der Sehnen-/Bändermatrix formt also ein regelmäßiges, sinusartiges Muster, den so genannten Kollagencrimp (Abbildung 10 und 11). Diese Struktur wirkt innerhalb des Gewebes wie ein Puffer oder Schock- Absorber, indem sie kleine longitudinale Verlängerungen einzelner Fibrillen ermöglicht, ohne das Gewebe zu beschädigen. Diese Eigenschaft der begrenzten Verlängerung des Kollagencrimp schützt das Gewebe vor potentiellen Verletzungen, die durch plötzlich auftretende Zug-, Rotations- und Scherkräfte auftreten können. (115).

## 1.5 Ziel der Untersuchung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es,

1.) eine Beschreibung des momentanen „Ist-Zustandes“ der Transplantate und des vorderen Kreuzband bezüglich ihrer histomorphologischen Struktur durchzuführen und so einerseits das VKB mit den zum Ersatz verwendeten autologen Sehnen-Transplantaten zu vergleichen und

2.) im speziellen Vergleich herauszufinden, wie sich die Myofibroblastenverteilung bezüglich einer möglichen Korrelation mit der Kollagentertiärstruktur (Crimp) im vorderen Kreuzband und in den Transplantaten verhält (148). Letztendlich sollen diese beiden Punkte zur weiteren Aufklärung der Funktion der Myofibroblasten beitragen.

1.) Ein wichtiger Aspekt dieser Studie ist zu untersuchen, welches Allograft dem vorderen Kreuzband histomorphologisch am nächsten steht. So könnte eventuell ein Transplantat, welches dem VKB sehr ähnlich ist, den oben beschriebenen phasenhaften Remodelingprozess, oder auch Ligamentisation (Amiel et al.), verkürzen und so die Einheilung erleichtern. Dies erscheint wichtig, da es bei der initialen Phase zu einer partiellen Nekrose und Degeneration des Transplantats und zu einer Desorganisation des Gewebes kommt und daraus eine mechanische Schwächung der Kreuzbandplastik resultiert (26). Ein histomorphologisch nahe stehendes Transplantat könnte möglicherweise diesen Effekt abschwächen.

2.) Wie zuvor schon dargestellt, ließen sich Myofibroblasten in verschiedenen Geweben nachweisen (siehe Tabelle 7). Auch in pathologischen Geweben, wie Morbus Dupuytren (54) und der Narbenhypertrophie (124) oder bei Lungenemphysemen und Mikroaneurysmen der Kapillaren (128), sind aufgrund einer pathologisch erhöhten oder erniedrigten Myofibroblastenzahl und der damit verbundenen erhöhten oder

erniedrigten kontraktilen Fähigkeit, Gewebedysfunktionen bezüglich ihrer strukturellen und funktionellen Stabilität zu beobachten.

Der Grund für die kontraktile Potenz der Myofibroblasten lässt sich einerseits durch die eben erwähnten morphologischen Eigenschaften erklären, wobei hier vor allem durch Zell-Stroma-Verbindungen (Fibronexus) eine Kraftübertragung von den Myofibroblasten auf die umgebende Extrazellulärmatrix möglich ist (15,124,128).

Andererseits lassen sich auch von immunhistochemischer Seite durch den Nachweis der Isoform des kontraktilen Proteins Aktin ( $\alpha$ - smooth muscle actin, ASMA) Hinweise für kontraktile Aktivitäten vermuten (130). Ein weiterer Nachweis für die kontraktile Potenz der Myofibroblasten ist, dass sie unter laborexperimentellen Bedingungen auf einer Membran kultiviert, diese Membran zusammengezogen haben (63) und in dreidimensionalen Kollagen-Gels platziert, diese zur Kontraktion brachten (11). Außerdem wurde von Murray und Spector die Beobachtung gemacht, dass die Regionen im humanen VKB, die höchste Myofibroblastenzahl aufweist, sich auch die kürzeste Crimplänge messen ließ und sie so die These aufstellten, dass diese Zellen für die Ausrichtung und die Formation der Kollagenstruktur verantwortlich sein könnten (96). In der vorliegenden Studie soll mit Hilfe der Immunhistochemie die Myofibroblasten dargestellt, die Crimplänge vermessen und untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der Myofibroblastenzahl und der Crimplänge gibt.

Des Weiteren soll geklärt werden, ob innerhalb der untersuchten Gewebe charakteristische Unterschiede bezüglich des morphologischen Erscheinungsbildes und der Verteilung von Myofibroblasten bestehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Transplantatauswahl

Die untersuchten Sehnen-Transplantate und zwei Kreuzbänder wurden von einer 38-jährigen Multiorganspenderin und zwei weitere Kreuzbänder wurden von einem Multiorganspender im Alter von 42 Jahren entnommen. Aufgrund bakterieller Kontamination konnten sie klinisch nicht mehr verwendet werden und wurden von der Gewebebank zu Forschungszwecken freigegeben.

### 2.2 Histologische Aufarbeitung

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden sie entsprechend ihrer Länge in 3 bis 24 x 1 cm große Segmente unterteilt und entsprechend von proximal nach distal nummeriert (Abbildung 12).

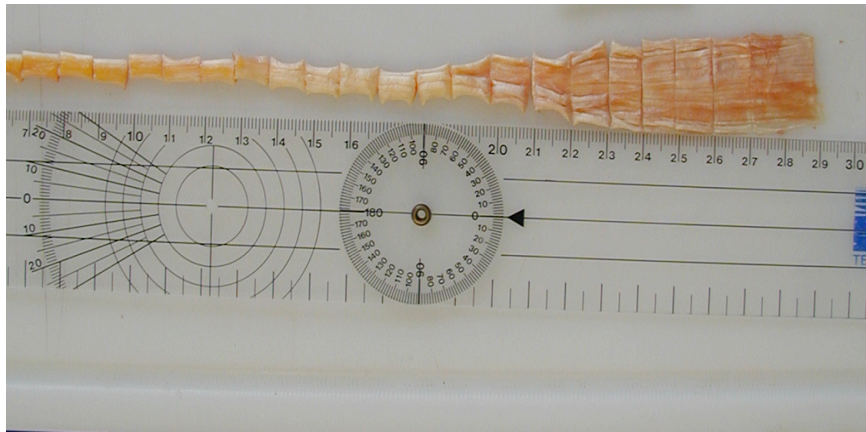


Abbildung 12: Beispiel Semitendinosussehne: natives Präparat nach der Unterteilung in 1cm große Segmente

Danach wurden die Segmente zunächst für mindestens 48 Stunden in 5% Formalinlösung<sup>1</sup> fixiert und über 18 Stunden lang in einem Gewebeeinbettautomaten automatisch entwässert<sup>2</sup>. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin<sup>3</sup> eingebettet und mit einem Mikrotom<sup>4</sup> 3-4 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Diese wurden für die konventionelle Lichtmikroskopie und die immunhistologischen Färbungen auf unbehandelte, silanisierte Objektträger<sup>5</sup> aufgezogen.

---

1 Formaldehyd, E. Merck 64271 Darmstadt

2 Hi-Tec® Gewebeeinbettautomat "1500" Typ DDM-P800, 35418 Busek

3 Paraplast Plus® Tissue Embedding Medium, Sherwood Medical Co. St. Louis, Mo USA

4 Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH 69226 Nußloch

5 (Super Frost®, Menzel-Gläser Deutschland)

## 2.3 Konventionelle Färbungen

Zur Übersicht wurden Färbungen mit Haematoxin<sup>6</sup> und Eosin<sup>7</sup> durchgeführt, um die Zellen differenziert darzustellen und zu unterscheiden. Des Weiteren wurde die Trichromfärbung nach Masson– Goldner gewählt, die eine Beurteilung der Extrazellulärmatrix und die Differenzierung von Kollagenfibrillen und Epithelgewebe ermöglicht.

## 2.4 Immunhistologie

### 2.4.1 Theorie der Immunhistologie

Immunhistochemische Färbemethoden ermöglichen es antigene Strukturen (Epitope) von Zellen und Gewebsabschnitten durch spezifische Antikörper nachzuweisen und zu identifizieren. 1941 verwendete Coons erstmalig Antikörper, die mit fluoreszierendem Farbstoff markiert waren (35). Seitdem hat sich die Sensivität und Spezifität dieser Methode immer weiter verbessert. Heute werden spezifische Antikörper eingesetzt, die durch Isotope, partikuläres Material (z. B. Erythrozyten), Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme markiert sind und durch entsprechende Verfahren dargestellt werden können. Als wesentliche Voraussetzung für die Wertigkeit der Methoden und Untersuchungen gilt die Spezifität der verwendeten Antikörper für das zu markierende Antigen, sowie die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Strukturen. Diese hängt sowohl von den chemischen Eigenschaften des Antigens, als auch von der Vorbehandlung (Fixierung, Einbettmedium, Färbeprotokoll) ab. Grundsätzlich unterscheidet man polyklonale von monoklonalen Antikörpern (23,39), wobei in der Immunhistochemie fast ausschließlich Antikörper der Klasse IgG und IgM zum Einsatz kommen.

---

<sup>6</sup> Harris Haemalaun

<sup>7</sup> Eosin Y Solution Aqueous, Sigma Diagnostics St. Louis Missouri 63178 USA

## Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörperpräparationen entstammen von verschiedenen B-Lymphozyten (Plasmazellen) und sind somit heterogen bezüglich ihres Antigenbindungsspektrums. Sie reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens gegen das sie gebildet wurden. Somit wird die Sensivität und Reaktivität der Färbemethode erhöht, da mehrere Bindungsstellen des Antigens erkannt und besetzt werden. Sie haben jedoch den Nachteil, dass sie durch Kreuzreaktionen mit ähnlichen antigenen Determinanten falsch positive Ergebnisse erzeugen können. Aus diesem Grund wurde Normalserum zur Bindung und Absättigung der „falsch positiven Determinanten“ verwendet, um diesen Effekt abzuschwächen bzw. zu verhindern (148).

## Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörperpräparationen stammen von einem einzigen B-Zell-Klon. Diese Zellklone werden durch Fusion einer antigenspezifischen Plasmazelle und einer nichtsekretorischen Myelomzelle gewonnen. Die B-Lymphozyten sind in der Lage spezifische Antikörper zu produzieren, während die Myelomzellen für die Stabilität, Langlebigkeit und Kultivierbarkeit des Hybrides sorgen. Durch klonale Vermehrung können theoretisch unendlich viele Antikörper produziert werden. Alle Antikörper eines Plasmazellklons sind immunchemisch identisch, homogen und reagieren nur gegen ein spezifisches Epitop des Agens, gegen welches sie produziert wurden. Somit haben monoklonale Antikörper eine sehr hohe Antigen-Spezifität. Bei zerstörter oder strukturell veränderter antigenen Determinante ( durch Präparation: Temperatur, pH,-Wert, Fixierung, usw. ) kann es jedoch zu falsch negativen Ergebnissen kommen und damit zu einer verminderten Sensivität der monoklonalen Antikörper (23).

### 2.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Alle Serienschnitte für die immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst in Xylol entparafiniert, in der absteigenden Alkoholreihe hydriert und in Pufferlösung<sup>9</sup> feucht gehalten. Um eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Antikörperbindungen zu unterdrücken, wurde eine 20-minütige Applikation von equinem Normalserum<sup>9</sup> bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.4.3 Immunhistologische Darstellung der Myofibroblasten

Myofibroblasten enthalten eine Isoform des Aktins (alpha-smooth-muscle Aktin, ASMA, s.o.), was als wichtiger Faktor für ihre kontraktile Fähigkeiten angesehen wird (96), und können mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (anti ASMA- Antikörper<sup>10</sup>) markiert und immunhistochemisch dargestellt werden. Der monoklonale Antikörper richtet sich dabei gegen die terminale NH<sub>2</sub> Region, die als die Region der größten Antigenität des alpha-smooth-muscle Aktin gilt (131). Dabei werden nicht nur Myofibroblasten, sondern auch Perizyten und glatte Gefäßmuskeln dargestellt (130) und dienen als Positivkontrolle für ASMA -positive Zellen. Myofibroblasten und Perizyten wurden morphologisch aufgrund von Zellform, Nähe zu Gefäßen und Verteilung zwischen den Kollagenfasern differenziert. Bei der immunhistologischen Darstellung wurden ausschließlich Querschnitte verwendet. Die entparaffinierten und hydrierten Präparate wurden keiner Vorbehandlung unterzogen und konnten direkt nach 20 minütiger Applikation mit Normalserum und dem anti-ASMA-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 bei 4 Grad Celsius über Nacht inkubiert werden.

---

8 Tris-Puffer TBS, Herstellung siehe Anhang

9 Normal Horse Serum; Vector Lab. Inc., Burlingame, Ca, USA

10 Mouse anti human alpha smooth muscle actin monoclonal antibody, Dako A/S , Dänemark, Kat Nr. : A0082



Am Folgetag wurde bei allen Präparaten, nach zweimaliger Spülung im TBS-Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten, ein biotinylierter Sekundärantikörper<sup>11</sup> aufgetragen. Nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wurde das Gewebe für weitere 50 Minuten mit einem Avidin-Biotin-Komplex<sup>12</sup>, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase als Reporterenzym, inkubiert. Als Substrat diente Neufuchsin<sup>13</sup>, welches durch die alkalische Phosphatase zu einem roten Chromogen reduziert wird und somit die markierten Strukturen rot färbt. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün<sup>14</sup> gegengefärbt, die Präparate entwässert und abschließend mit einem Xylol-löslichen Einschlußmedium<sup>15</sup> eingedeckt.

Zur Bestimmung einer Hintergrundfärbung aufgrund unspezifischer Bindungsstellen wurden bei allen immunhistochemischen Färbungen Negativkontrollpräparate mit Pufferlösung statt mit Antikörperlösung inkubiert. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden bei der Färbung mit alpha-smooth-muscle Aktin-Antikörpern die glatten Gefäßmuskelzellen herangezogen.

## **2.5 Auswertung und Datenanalyse**

Für die histologische Befundung wurde auf die Methoden der herkömmlichen Durchlichtmikroskopie und der Polarisationsmikroskopie zurückgegriffen. Alle histologischen Präparate wurden an einem konventionellen Mikroskop<sup>16</sup> untersucht und Objektive mit der Vergrößerung von 1,6x, 2,5x, 5x, 10x, 20x und 40x gewählt.

---

11 Horse anti –mouse IgG secondary antibody, Vector Lab. Inc., Burlingame, Ca, USA

12 ABC Kit; Vector Lab., Burlingame, Ca, USA

13 Dako ChemMate, Dako A/S, Dänemark

14 Diagnostica Merck, Darmstadt, Deutschland

15 Vitro-Clud, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

16 Leica DMRB Mikroskop, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, 35530 Wetzlar

Für die Polarisationsmikroskopie wurden zwei zusätzliche Polarisationsfilter in den Lichtgang zwischengeschaltet. Wegen des hierdurch vermehrt absorbierten Lichtes kamen nur Objektive bis zu 20x Vergrößerung zur Anwendung. Die Dokumentation der histologischen Befunde der Durchlicht – und Polarisationsmikroskopie erfolgte über ein digitales Bildbearbeitungssystem<sup>17</sup>.

### 2.5.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

Mit Hilfe der konventionellen Lichtmikroskopie werden die Schnittpräparate nach vorheriger Färbung in unterschiedlichen Vergrößerungen analysiert. Durch die Anwendung verschiedener Farbstoffe werden die morphologischen Strukturen entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich dargestellt und können somit von einander abgegrenzt werden. Hierdurch lassen sich Aussagen über die feingewebliche Zusammensetzung der Präparate treffen.

### 2.5.2 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild

Nach oben genannter histologischer Aufarbeitung wurden die Präparate von proximal nach distal ihren Segmenten entsprechend ausgewertet und von jedem Segment ein repräsentatives Präparat analysiert. Es wurden 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder in 200 -facher Vergrößerung untersucht und bezüglich ihrer Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Gesamtzellzahl pro Fläche und prozentualer Myofibroblastenanteil evaluiert.

---

<sup>17</sup> KS 400 Imaging System Release 3.0 Carl Zeiss Vision, Eching, Germany

### 2.5.3 Myofibroblasten

Zur immunhistologischen Darstellung ASMA-exprimierender Myofibroblasten wurden die Präparate im Längsschnitt mit anti-alpha-smooth-muscle-Aktin gefärbt und ausgezählt. Jede Zelle mit unklarer Immunreaktivität wurde aus den Zählungen ausgeschlossen. Perizyten und Myofibroblasten wurden aufgrund ihrer morphologischen Erscheinungsform wie Zellform, Lage im Verhältnis zu Gefäßen und ihre Verteilung zwischen den Kollagenfasern voneinander unterschieden (44).

In je 10 Gesichtsfeldern (0,44 x 0,44 mm, 200-fache Vergrößerung) pro Schnitt wurde die Anzahl der ASMA-positiven Myofibroblasten sowie ASMA-negativen Fibroblasten ermittelt und der prozentuale Anteil an Myofibroblasten bezogen auf die Gesamtzellzahl und pro Fläche (mm<sup>2</sup>) berechnet.

### 2.5.4 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie ist eine optische Methode, die Aussagen über die Ordnung von Molekülverbänden und über die strukturelle Beschaffenheit der Präparate ermöglicht. Hierbei wird das von einer Lichtquelle ausgesendete, in allen Achsen schwingende, diffuse Licht durch eine in den Lichtgang eingebrachte Folie, den Polarisator, zerlegt. Dabei entsteht ein außerordentlicher, d. h. nur in definierten Achsen schwingender Lichtstrahl und ein ordentlicher, d.h. in alle übrigen Schwingungsebenen schwingender Strahl. Der Polarisator lässt nur den außerordentlichen Strahl passieren, der übrige diffus streuende ordentliche Strahl wird durch Reflexion eliminiert. Trifft nun das in einer definierten Achse strahlende Licht auf gleichsinnig ausgerichtete Molekülverbände, wird die Lichtachse durch diese gleichsinnig gedreht. Eine in den weiteren Lichtgang eingebrachte Folie, der Analysator, lässt nun verstärkt das in der definierten Drehachse schwingende Licht hindurch. Hierdurch leuchten Strukturen, die das Licht durch gleichsame Ausrichtung gleichsinnig drehen, heller auf und lassen das zu untersuchende Präparat plastisch erscheinen (111).

### 2.5.5 Kollagencrimp

Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie können Aussagen über die Kollagentertiärstruktur getroffen werden. Zur Untersuchung der Kollagenfibrillenfrequenz bzw. der Crimpdistanz (= Abstand zwischen zwei

Crimpformationen) wurden die Schnitte unter polarisiertem Licht mit einer kalibrierten Skala vermessen und die Anzahl der Crimpformationen, dem so genannten „Kollagencrimp“ (engl. crimp= Welle, Locke) ermittelt und dann in ein Verhältnis zu einer definierten Strecke in  $\mu\text{m}$  gesetzt.

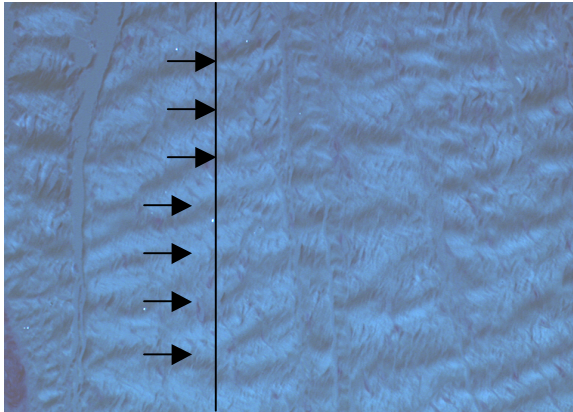


Abbildung 13: Darstellung des Kollagencrimp (200x) mittels polarisiertem Licht und Auswertung der Crimpdistanz bzw. der Kollagenfibrillenfrequenz (= Anzahl der Crimpformationen oder „Wellenberge“ pro definierter Strecke; in diesem Beispiel 7 ) im humanen vorderen Kreuzband.

So konnte über die Anzahl der Crimpformationen pro definierter Strecke die Crimpdistanz und somit die Kollagencrimpfrequenz errechnet werden (Abbildung 13 und 14), die sich antiproportional zueinander verhalten. Dies wurde in den gleichen 10 Gesichtsfeldern eines Präparates, in denen zuvor die Gesamtzell- und Myofibroblastenzahl ermittelt wurde, durchgeführt um letztendlich eine mögliche Korrelation zwischen Myofibroblastenzahl und Crimpdistanz bzw. Kollagenfibrillenfrequenz zu untersuchen.

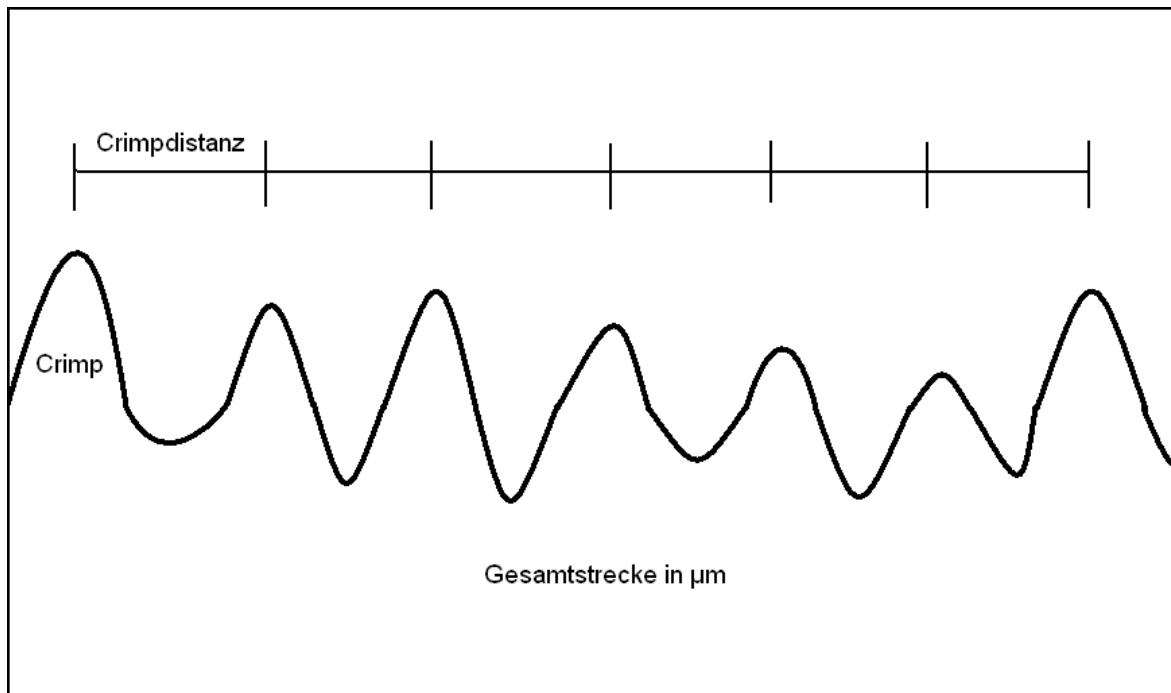


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Kollagenfibrillen (Seitansicht): Je geringer die Crimpdistanz ist (= Abstand zwischen zwei Wellenbergen), desto höher ist auch die Kollagencrimpfrequenz, sie verhalten sich antiproportional zueinander

## 2.6 Statistische Auswertung

Alle histologischen Analysen und Zellzählungen wurden exemplarisch von zwei unabhängigen Untersuchern überprüft und ausgewertet. Die Variabilität der Ergebnisse eines Untersuchers lag bei 11,2%, die inter-observer Variabilität der Ergebnisse zwischen den Untersuchern lag bei 12,5 %.

Zur statistischen Datenanalyse wurde Pearson's Korrelationsanalyse (Power 80%) verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Natives vorderes Kreuzband

##### 3.1.1 Makroskopie

Es wurden vier gut erhaltene, intakte vordere Kreuzbänder von 3,5 cm Länge, ohne synovialen Überzug und ohne makroskopisch erkennbare Schäden oder Beeinträchtigung der Struktur verwendet.

##### 3.1.2 Mikroskopie

Bei der mikroskopischen Untersuchung konnten beim Kreuzband anhand der Zellmorphologie der Myofibroblasten drei histologisch verschiedene Zonen differenziert werden. Die Unterscheidung der Myofibroblasten erfolgte aufgrund der Form des Zellkernes, wobei drei verschiedene Zelltypen gefunden werden konnten, nämlich fusiforme oder spindelförmige Zellen, ovoide bzw. ovale und schließlich runde Myofibroblasten.

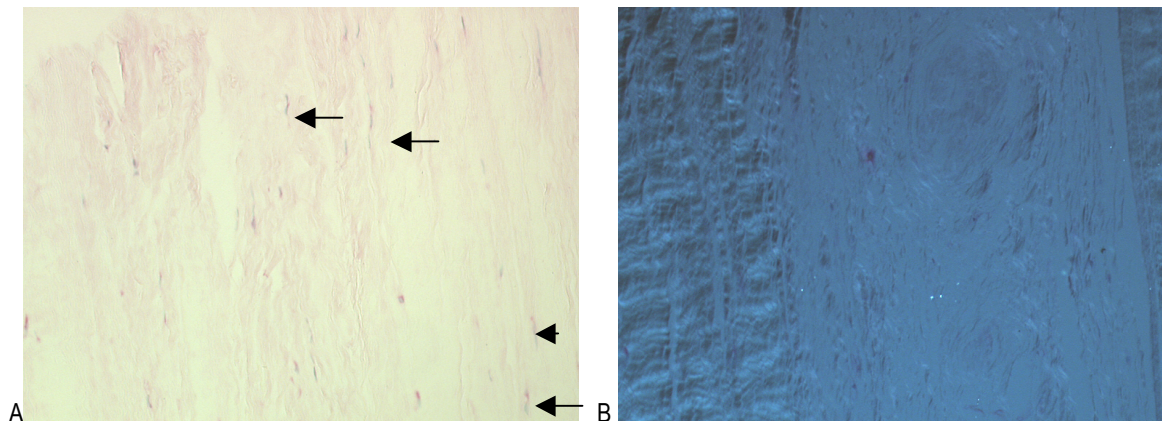


Abbildung 15: Humanes vorderes Kreuzband: A) Immunhistochemische Darstellung der spindelförmigen (fusiformen) Myofibroblasten (Pfeile) mit dem typischen Anfärbeverhalten für die  $\alpha$ -smooth muscle actin Isoform im proximalen Anteil des vorderen Kreuzbandes (200x) B) das gleiche Präparat unter polarisiertem Licht (200x) zur Darstellung der Kollagentertiärstruktur (Crimp)

Diese drei verschiedenen morphologischen Strukturen der Myofibroblasten wurden zuvor schon in der Literatur beschrieben. Ovoide Zellen fand man in zentralen Arealen des humanen VKB, die sich dort auch,

wie hier festgestellt, in Kolumnen darstellten (siehe unten)( 96).

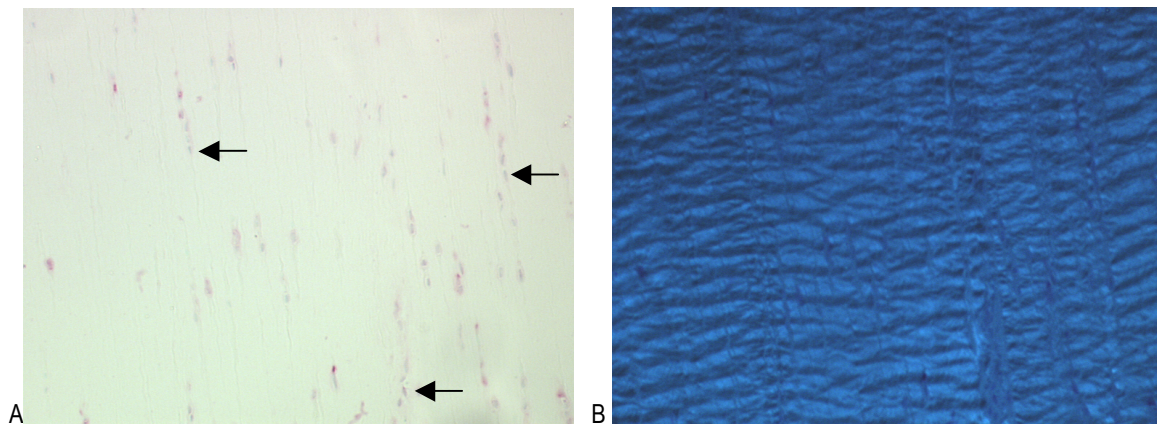


Abbildung 16: A) Humanes vorderes Kreuzband mit der immunhistochemischen Darstellung von ovoiden (ovalen) Myofibroblasten mit kolumnenförmigen Auftreten (Pfeile) im proximalen Anteil des vorderen Kreuzbandes B) Darstellung des gleichen Präparates unter polarisiertem Licht (200x): es imponiert eine intakte hochfrequente Kollagentertiärstruktur

Diese drei morphologisch verschiedenen Myofibroblastenformen waren nicht gleichmäßig im humanen Vorderen Kreuzband verteilt, sondern konnten eindeutig histologischen Zonen zugeordnet werden.

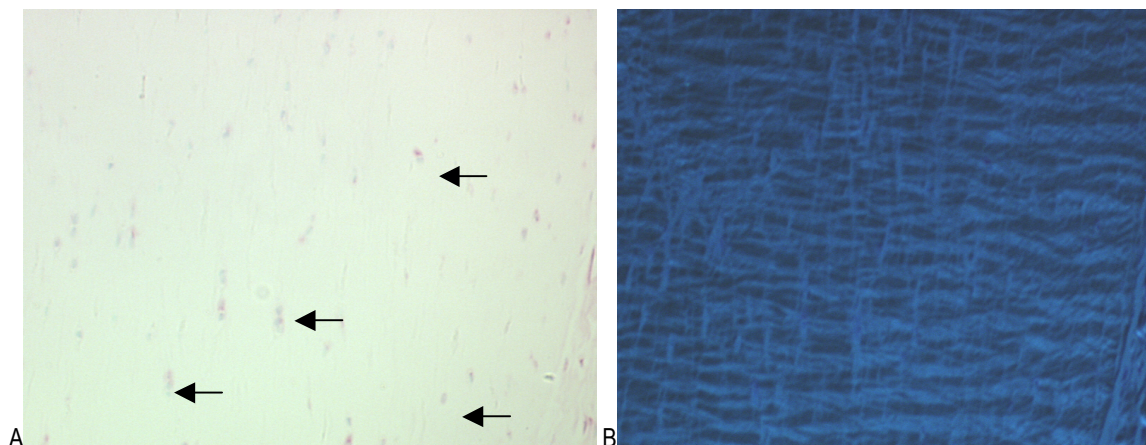
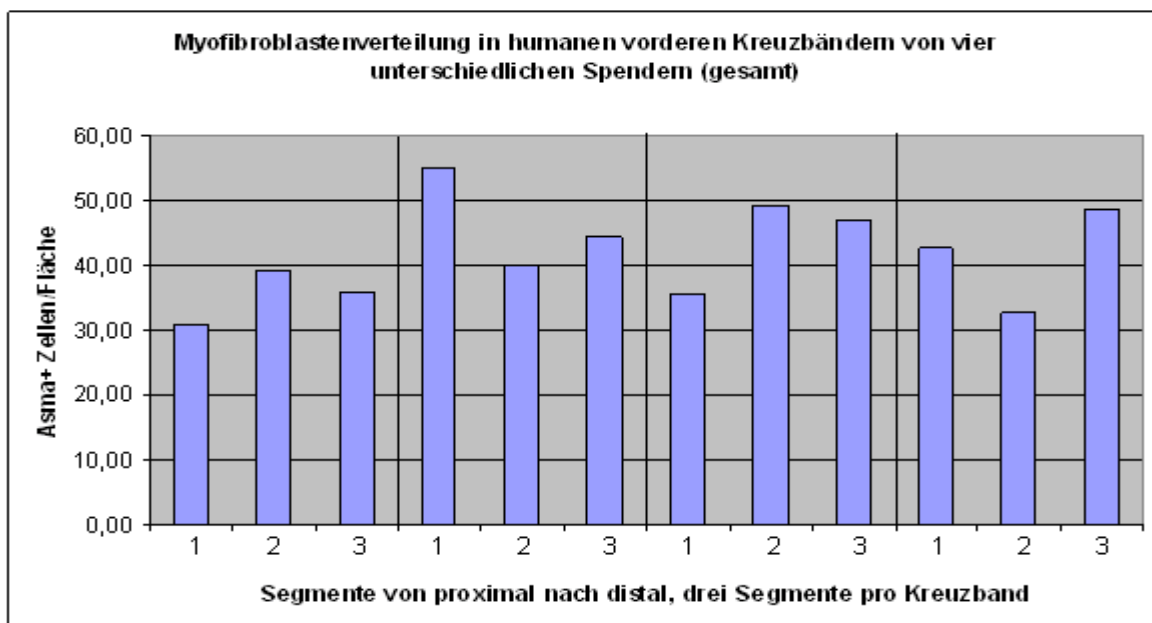


Abbildung 17: A) Immunhistochemische Darstellung des humanen vorderen Kreuzbandes mit dem Nachweis von runden (spheroiden) Myofibroblasten mit positiven roten Anfärben von  $\alpha$ -smooth muscle Aktin im distalen Anteil des VKB B) Darstellung der hochfrequenten Kollagentertiärstruktur unter polarisiertem Licht (200x) des gleichen Präparates

Wie oben bereits dargestellt, verteilen sich die zellmorphologisch verschieden Myofibroblasten nicht gleichmäßig im humanen vorderen Kreuzband, sondern sie lassen sich überwiegend in drei anatomischen unterschiedlichen Arealen vorfinden. Die spindelförmigen und die ovoiden Myofibroblasten zeigten sich hauptsächlich im proximal - femoralen Drittel des vorderen Kreuzbandes und die runden Myofibroblasten ließen sich verstärkt in dem restlichen distal - tibialen Anteil nachweisen, wobei die ovoiden Zellen eine Übergangszone zwischen den spindelförmigen und den runden Myofibroblasten bildeten.

### 3.1.3 Gesamtzellzahl, Myofibroblastenzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz des vorderen Kreuzbandes

Beim kurzen humanen vorderen Kreuzband konnten von vier unterschiedlichen Spendern je 3 Segmente untersucht werden (Grafik 1). Dort lässt sich mit einer durchschnittlichen Gesamtzellzahl von 88,74/ mm<sup>2</sup> die zweithöchste Zelldichte pro Fläche nach der Quadricepssehne feststellen. Davon waren im Mittel 41,75 Zellen pro mm<sup>2</sup> ASMA-positiv, was 47,26% der Gesamtzellzahl entspricht und vergleichbar mit den Werten der Sehnentransplantate ist, wobei allerdings die Semitendinosussehne (41,02%) und die Quadricepssehne (43,47%) weniger Myofibroblasten im Verhältnis zur Gesamtzellzahl als das VKB aufwiesen. Die Crimpdistanz beträgt beim humanen vorderen Kreuzband 24,75/ µm, womit das VKB den niedrigsten Wert für den Abstand zwischen den Crimpformationen zeigt und somit die höchste Frequenz der Kollagentertiärstruktur aller untersuchten Präparate hat.



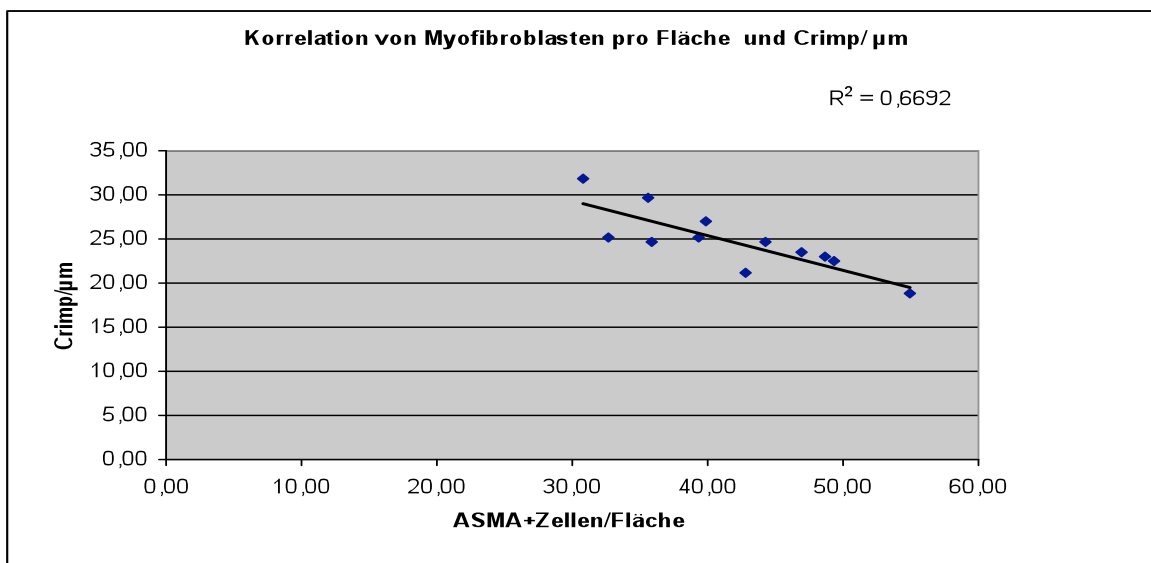
Grafik 1: dargestellt ist die Anzahl der gesamten (ovoiden, spindelförmigen und fusiformen) Myofibroblasten/Fläche in den einzelnen Segmenten von proximal nach distal in den 4 verschiedenen vorderen Kreuzbändern. Eine signifikante Häufung von Asma+ Zellen in einer bestimmten anatomischen Region lässt sich, im Gegensatz zur Häufigkeit von morphologisch unterschiedlichen Myofibroblasten (siehe Histologie), nicht feststellen

Die zahlenmäßige Myofibroblastenverteilung zeigt sich im gesamten Band relativ homogen, eine anatomische Region mit einer signifikanten Myofibroblastenhäufung konnte nicht festgestellt werden, es



gibt lediglich Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild in den verschiedenen anatomischen Regionen (siehe Histologie), nicht aber in der Häufigkeit des Vorkommens.

Beim humanen vorderen Kreuzband lässt sich, wie bei den autologen Sehnentransplantaten auch, eine eindeutige Korrelation von Myofibroblastenhäufigkeit/mm<sup>2</sup> und Crimp/μm feststellen. Je höher die Anzahl von Asma-positiven Zellen pro Fläche ist, desto geringer ist der Abstand zwischen den einzelnen Wellenbergen (=Crimpdistanz), was wiederum eine höhere Frequenz bedeutet.



Grafik 2 : Korrelation von Asma-positiven Zellen (Myofibroblasten) pro Fläche und Crimp pro μm im humanen vorderen Kreuzband : mit  $R^2 = 0,6692$  hat das VKB eine deutliche Korrelation zwischen Myofibroblastenhäufigkeit und Crimpdistanz

Das humane vordere Kreuzband hat auch mit  $R^2 = 0,6692$  eine ähnlich hohe Korrelation wie die Sehnentransplantate, wobei die Gracilissehne die niedrigste und die Patellarsehne die höchsten Korrelationen aufweisen (Grafik 2).

## 3.2 Semitendinosussehne

### 3.2.1 Makroskopie

Es zeigte sich eine intakte, circa 23 cm lange Semitendinosussehne (siehe Abbildung 18).

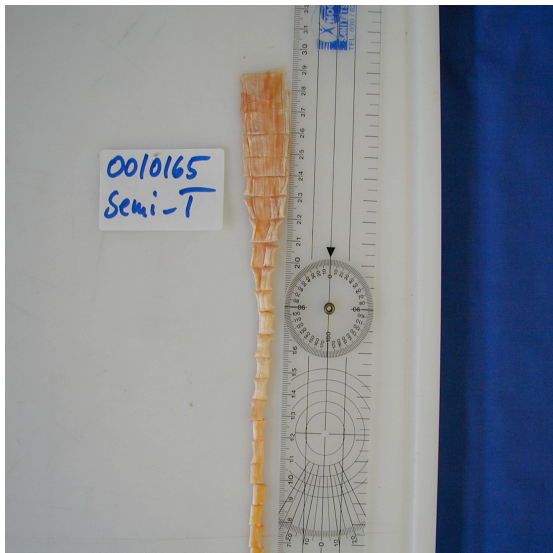


Abbildung 18: Semitendinosussehne: vor der Formalinfixierung, Dehydratation und Einbettung in Paraffin wird das Transplantat in 1 cm große Segmente unterteilt

### 3.2.2 Mikroskopie

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Semitendinosussehne konnten hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten nachgewiesen werden. Ovoide oder runde Zellformen kamen vereinzelt vor, eine spezielle schwerpunktmäßige Verteilung wie beim VKB zeigte sich allerdings nicht.

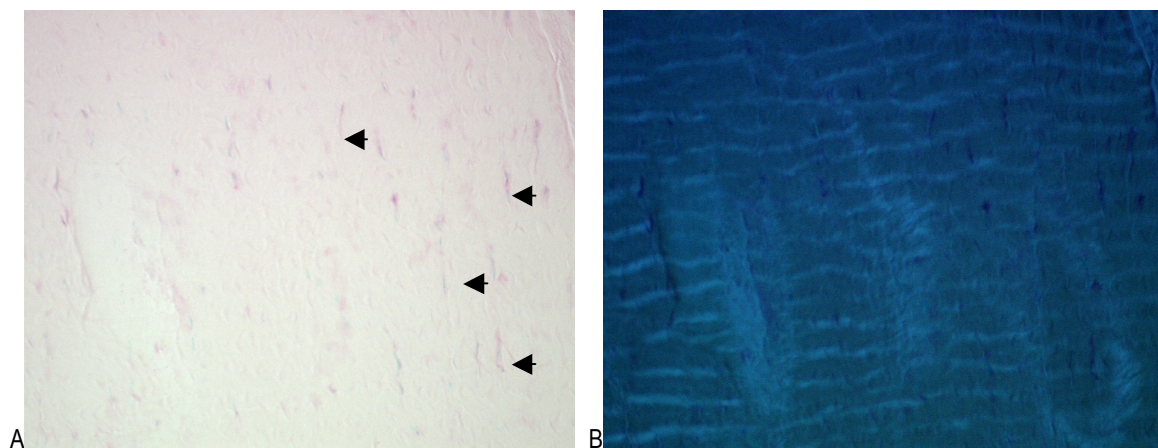
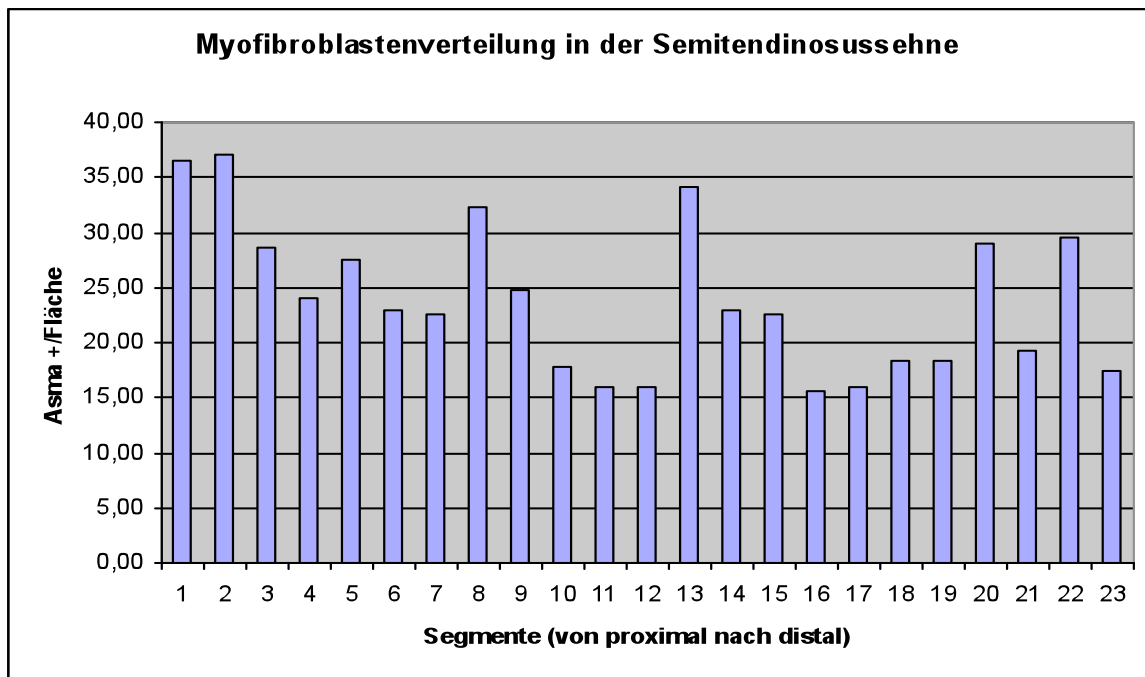


Abbildung 19: A) Semitendinosussehne: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten), die hier spindelförmig imponieren und sich in der Sehne als der dominierende Zelltyp zeigen B) Darstellung des gleichen Präparates unter polarisiertem Licht (200x)

### 3.2.3 Gesamtzellzahl, Myofibroblastenzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Semitendinosussehne

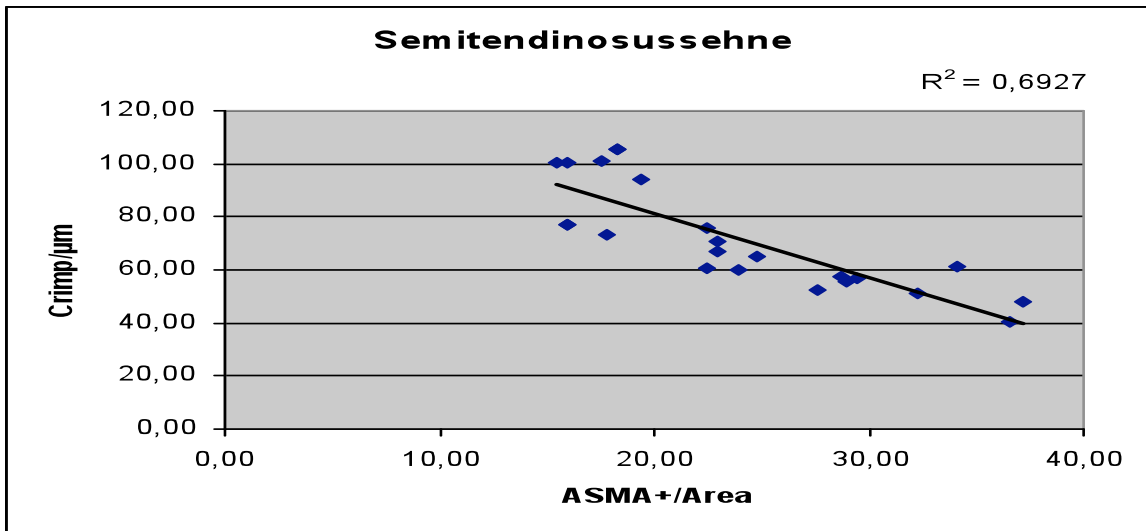
Bei der Semitendinosussehne, die mit 23 Segmenten ein relativ langes Transplantat darstellt, beträgt die

durchschnittliche Gesamtzellzahl 52,67/ mm<sup>2</sup> und die durchschnittliche Myofibroblastenzahl 21,60/ mm<sup>2</sup>, was einen Anteil von 41,02% an der Gesamtzellzahl ausmacht. Die Crimpdistanz beträgt im Mittel 79,08/ µm und hat nach der Tibialis anterior Sehne (82,41/ µm) die zweitniedrigste Frequenz. Die spindelförmigen Myofibroblasten verteilen sich in der gesamten Sehne relativ homogen, eine anatomische Region mit einer erhöhten Myofibroblastenhäufigkeit lässt sich allerdings in den beiden proximalen Segmenten (1 und 2) sowie im Segment 13 ausmachen (siehe Abbildung).



Grafik 3 : Dargestellt ist die Myofibroblastenzahl in den Segmenten 1 (proximal) bis 23 (distal) der Semitendinosussehne mit einer erhöhten Myofibroblastenzahl in den Segmenten 1 und 2 sowie Segment 13

Es lässt sich des Weiteren eine signifikante Korrelation ( $R^2=0,6927$ ) zwischen Myofibroblastenhäufigkeit pro Fläche und Crimpdistanz nachweisen (siehe unten), die ähnlich der des humanen vorderen Kreuzbandes (0,6692), der Tibialis anterior Sehne (0,6407) und der Quadricepssehne (0,6555) ist.



Grafik 4: Korrelation zwischen Myofibroblastenhäufigkeit pro Fläche und Crimpdistanz der Semitendinosussehne: Es lässt sich ein eindeutige Korrelation ( $R^2 = 0,6927$ ) feststellen, je höher die Myofibroblastenanzahl ist, desto kürzer ist der Abstand zwischen den einzelnen Crimpformationen (Crimp/µm)

### 3.3 Gracilissehne

#### 3.3.1 Makroskopie

Es zeigte sich eine 19 cm lange Gracilissehne, die bis auf leichte Auffaserungen im mittleren Bereich der Sehne makroskopisch intakt war.

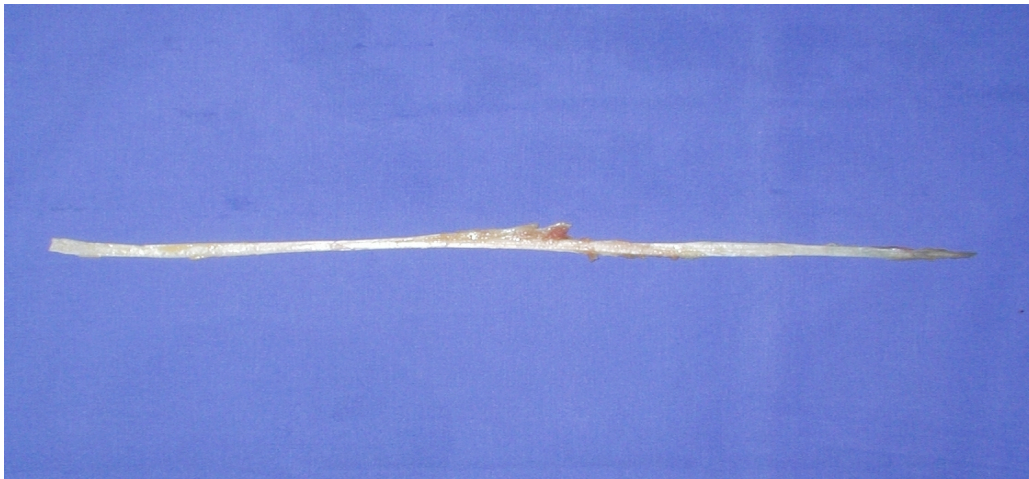


Abbildung 20: Gracilissehne: makroskopisch intaktes Transplantat, bis auf leichte Auffaserungen im mittleren Anteil, vor der Unterteilung in 1cm große Segmente

### 3.3.2 Mikroskopie

Auch bei der Gracilissehne lassen sich ähnlich wie bei der Semitendinosussehne und der Tibialis anterior Sehne hauptsächlich Myofibroblasten vom spindelförmigen Typ nachweisen, die in der gesamten Sehne ubiquitär vorkommen. Ovoide oder spheroidale Myofibroblasten finden sich sehr selten.

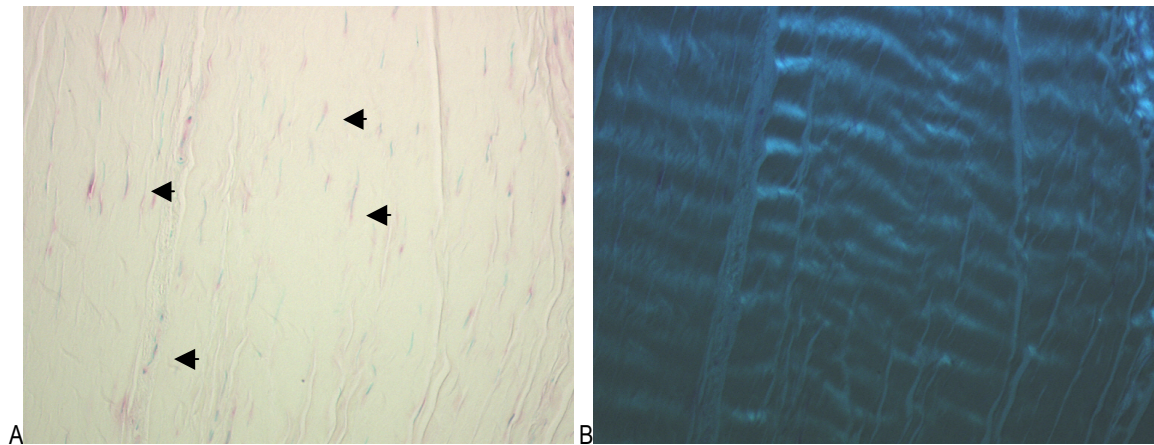
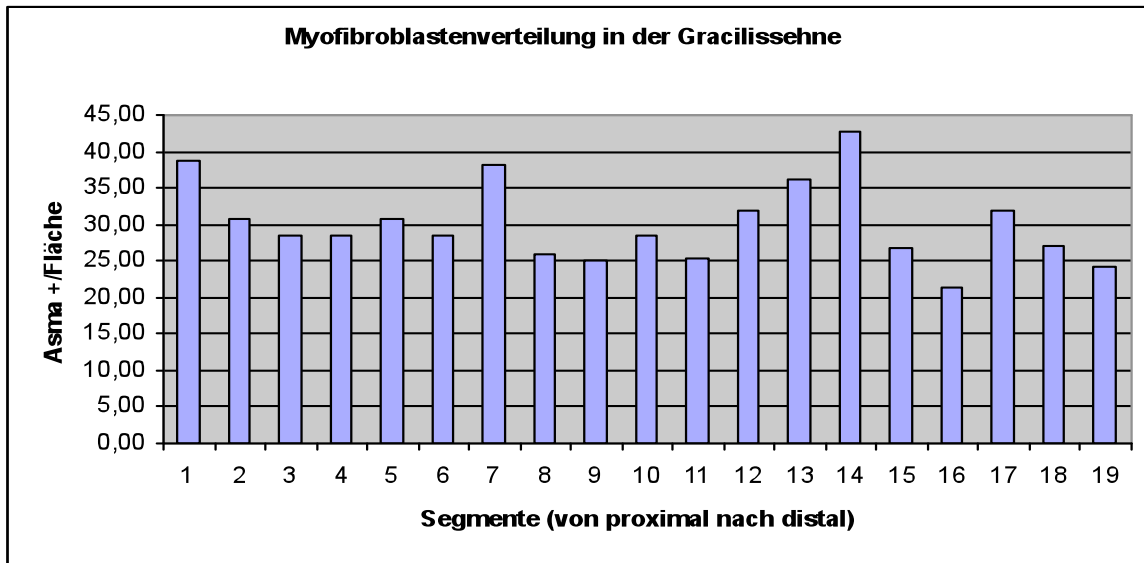


Abbildung 21: A) Gracilissehne: proximales Segment mit dem immunhistochemischen Nachweis von multiplen spindelförmigen  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten), mit B) Darstellung des Kollagencripp (polarisiertes Licht 200x)

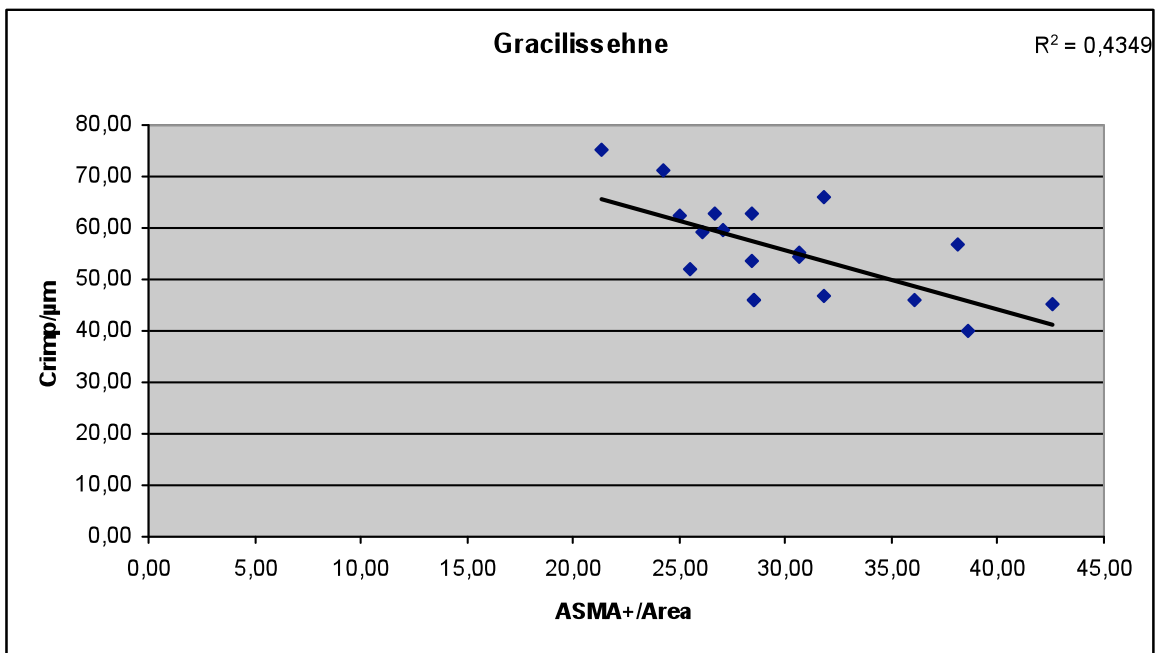
### 3.3.3 Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Gracilissehne

Die Gracilissehne zeigt sich mit 19 Segmenten ebenfalls als ein langes Transplantat, wobei hier die durchschnittliche Gesamtzellzahl mit 58,97/ mm<sup>2</sup> ähnlich wie bei der Semitendinosussehne liegt. Die durchschnittliche Anzahl von Alpha smooth muscle actin positiven Zellen beträgt 28,90/ mm<sup>2</sup>, was vergleichbar mit der Anzahl der in der Semitendinosussehne und der Tibialis anterior Sehne ist. Die ASMA+ Zellen machen einen Anteil von 49,0% an der Gesamtzellzahl aus, vergleichbar mit der Semitendinosussehne (41,02%) und dem humanen vorderen Kreuzband (47,26%). Die Crimpdistanz beträgt 57,55/  $\mu$ m und ist somit nicht so ausgeprägt wie beim VKB. Die hauptsächlich spindelförmigen Myofibroblasten zeigen innerhalb der Sehne ein relativ homogenes Verteilungsmuster, charakteristische anatomische Regionen mit erhöhter Myofibroblastenanzahl finden sich nicht. Ausnahmen bilden Segment 1, 7 und 14 mit einer hohen Myofibroblastenanzahl/ Fläche und Segment 16 mit einer niedrigen Anzahl (siehe Diagramm).



Grafik 5: Dargestellt ist die Myofibroblastenzahl pro Fläche in den einzelnen Segmenten der Gracilissehne, wobei hier ein relativ homogenes Verteilungsmuster ohne anatomisch-regionale Häufung auffällt, mit Ausnahme von Segment 1,7 und 14 (hohe Anzahl) und 16 (niedrige Anzahl)

Eine signifikante Korrelation zwischen Myofibroblastenhäufigkeit pro Fläche und Crimp/  $\mu\text{m}$  lässt sich allerdings auch bei der Gracilissehne eindeutig feststellen ( $R^2 = 0,4349$ ), jedoch ist diese Korrelation nicht so ausgeprägt wie bei den anderen untersuchten Präparaten (siehe Grafik).



Grafik 6: Myofibroblastenzahl pro Fläche und Crimpfrequenz (Crimp/ $\mu\text{m}$ ) in der Gracilissehne: es lässt sich eine eindeutige Korrelation ( $R^2 = 0,4349$ ) feststellen, es findet sich hier allerdings die geringste Korrelation der untersuchten Präparate

### 3.4 Tibialis anterior Sehne

#### 3.4.1 Makroskopie

Es zeigt sich eine circa 20 cm lange Tibialis anterior Sehne, die makroskopisch intakt war und keine auffälligen Beschädigungen oder Beeinträchtigungen aufweist (siehe Abbildung).



Abbildung 22: Tibialis anterior Sehne: vor der Unterteilung in 24 je 1cm gleichgroße Segmente und der entsprechenden immunhistochemischen Behandlung.

#### 3.4.2 Mikroskopie

Auch bei der Tibialis anterior Sehne konnten hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten nachgewiesen werden, die sich in der gesamten Sehne ubiquitär verteilen und keine speziellen Verteilungsmuster aufweisen.

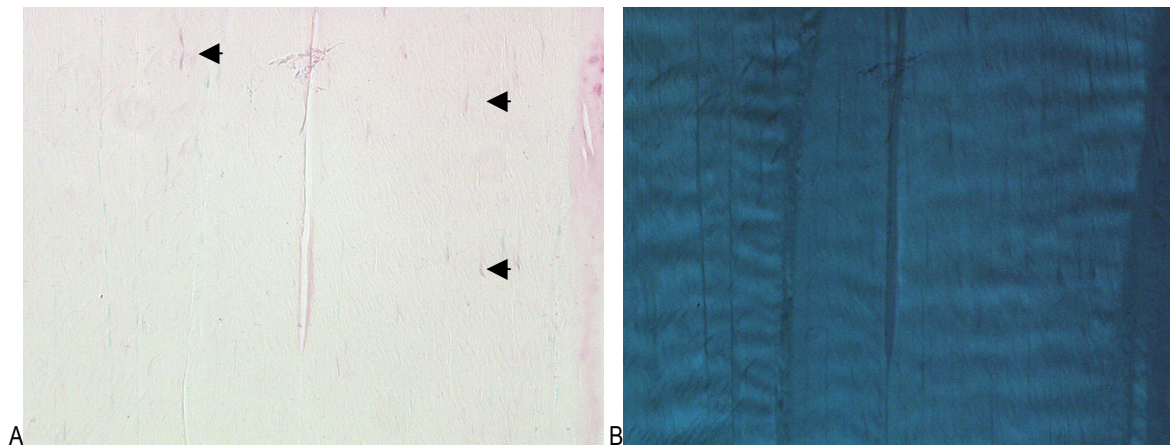
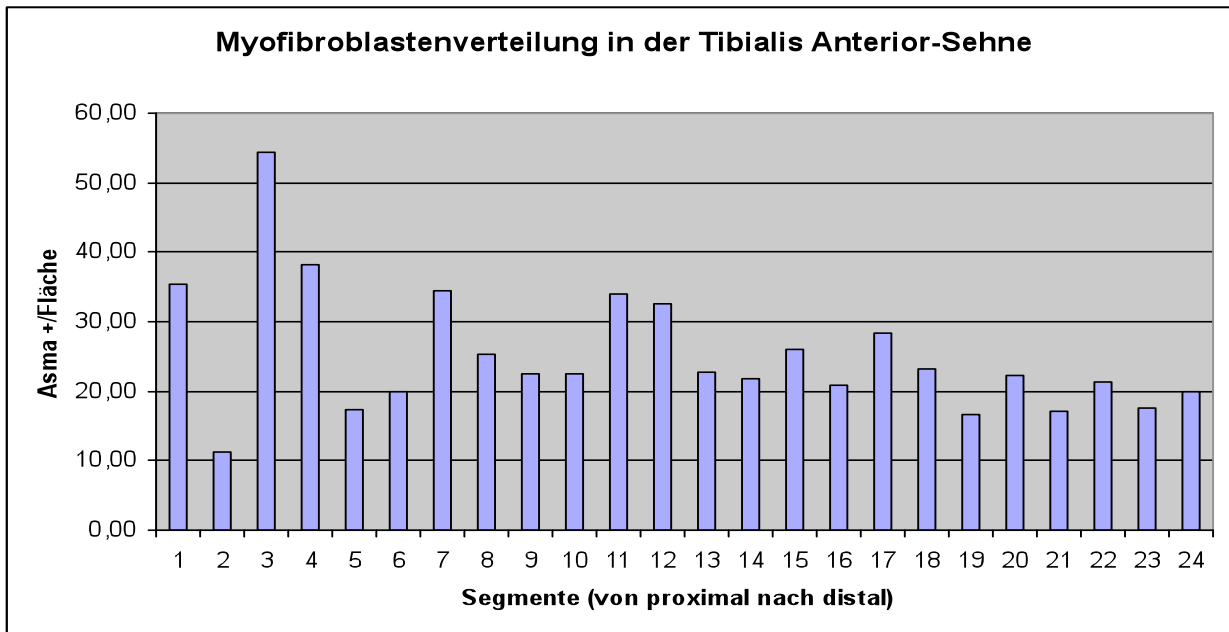


Abbildung 23: A) Tibialis anterior Sehne, proximales Segment der Sehne mit immunhistochemischen Nachweis von wenigen spindelförmigen Myofibroblasten (Pfeile), die ubiquitär in allen Segmenten nachweisbar sind B) das selbe Präparat unter polarisiertem Licht (200x) mit der Darstellung der eher niedrigfrequenten Kollagentertiärstruktur

### 3.4.3 Gesamtzellzahl, Myofibroblastenzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Tibialis Anterior-Sehne

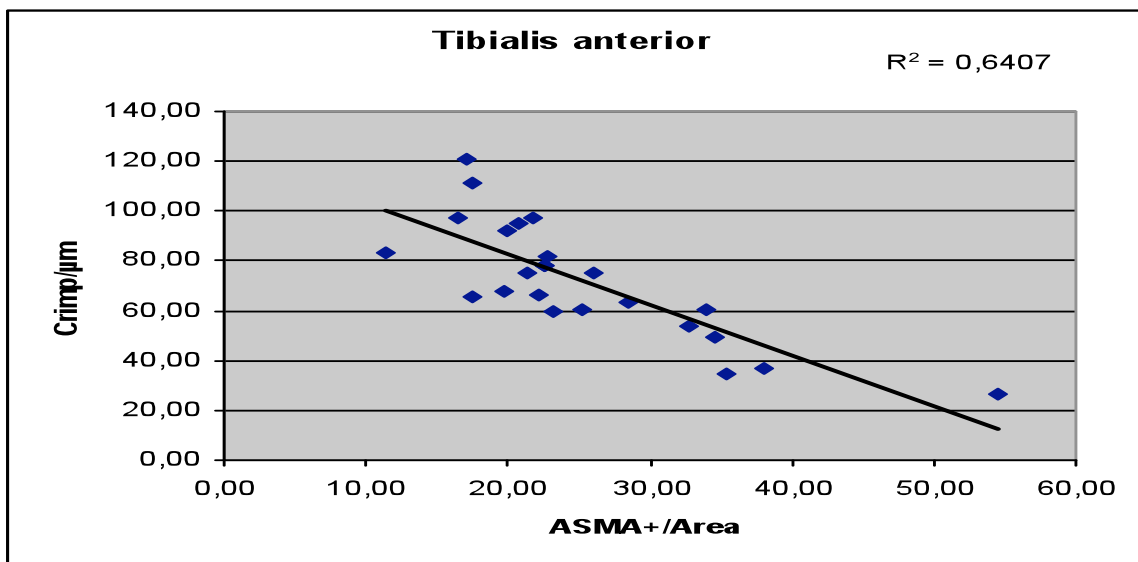
Die Tibialis anterior-Sehne ist mit 24 Segmenten das längste Präparat, welches untersucht wurde, wobei sie mit einer durchschnittlicher Gesamtzellzahl von 43,61 Zellen pro Fläche die geringste Gesamtzellzahl aller Präparate aufweist. Die mittlere Myofibroblastenzahl pro Fläche beträgt 21,45/ mm<sup>2</sup> und ist somit ähnlich wie bei den anderen langen Sehnentransplantaten (Gracilissehne 28,90/ mm<sup>2</sup>, Semitendinosusehne 21,60/ mm<sup>2</sup>). Dies entspricht 49,19% der Gesamtzellzahl. Die Crimpdistanz hat mit 82,41/ µm den höchsten Wert aller untersuchten Präparate, das heißt, der Abstand zwischen zwei Crimpformationen (Wellenberge) ist, verglichen mit den anderen Präparaten, vergrößert und somit die Kollagentertiärstruktur nicht so ausgeprägt. Bei der Verteilung der Myofibroblasten in der Sehne fällt auf, dass im zweiten Segment sehr wenige, im dritten Segment aber sehr viele Myofibroblasten vorkommen. Ansonsten sind die Myofibroblasten abgesehen von den Segmenten 2 und 3 relativ homogen in der Sehne verteilt und auch hier gibt es keine anatomische Region mit einem überdurchschnittlich gehäuftem Vorkommen.





Grafik 7: Myofibroblastenverteilung in der Tibialis Anterior-Sehne von proximal nach distal. Es fällt auf, dass in Segment 2 sehr wenige Myofibroblasten, in Segment 3 sehr viele Myofibroblasten vorkommen, eine Häufung in einer bestimmten anatomischen Region lässt sich jedoch nicht feststellen

Wie bei allen untersuchten Präparaten zeigt sich auch bei der Tibialis anterior-Sehne eine eindeutige Korrelation zwischen Myofibroblastenanzahl pro Fläche und Crimp/µm, in diesem Fall beträgt  $R^2 = 0,6407$ .



Grafik 8: Darstellung von Myofibroblastenanzahl (Asma+) pro Fläche und Crimp/µm in der Tibialis anterior-Sehne: es lässt sich eine eindeutige Korrelation mit  $R^2 = 0,6407$  feststellen

### 3.5 Quadricepssehne

#### 3.5.1 Makroskopie

Es stellt sich eine makroskopisch intakte, circa 6 cm lange Quadricepssehne mit distalem Knochenblock dar (Abbildung 24).



Abbildung 24: Quadricepssehne mit distalem patellarem Knochenblock und proximalem freien Sehnenende mit muskulären Restanteilen, vor der Einteilung des Präparates in einen medialen und einen lateralen Anteil in 1cm große Segmente und immunhistochemischer Aufbereitung

#### 3.5.2 Mikroskopie

Bei der mikroskopischen Auswertung der Quadricepssehne fällt auf, dass sich wieder die drei morphologisch verschiedenen Myofibroblastentypen ähnlich wie beim humanen vorderen Kreuzband und der Patellarsehne, zeigen (siehe Abbildung).

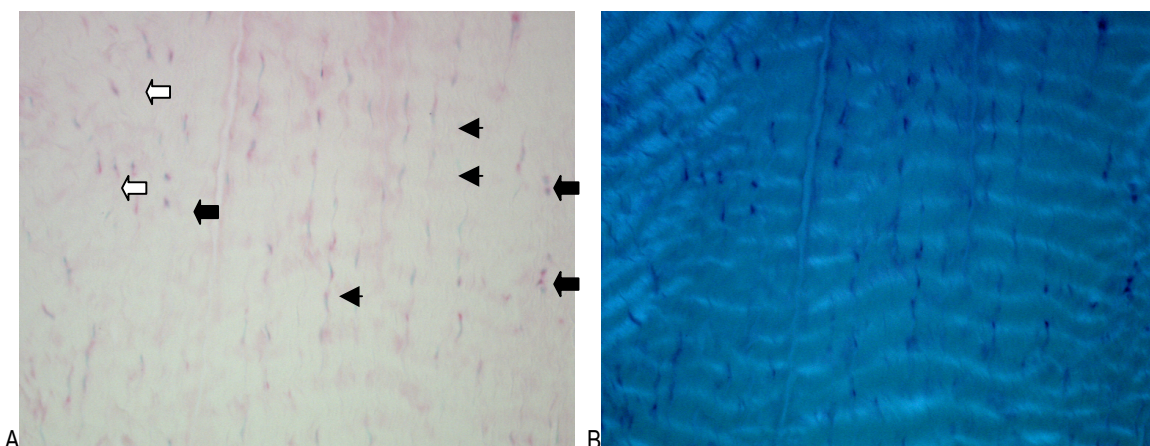
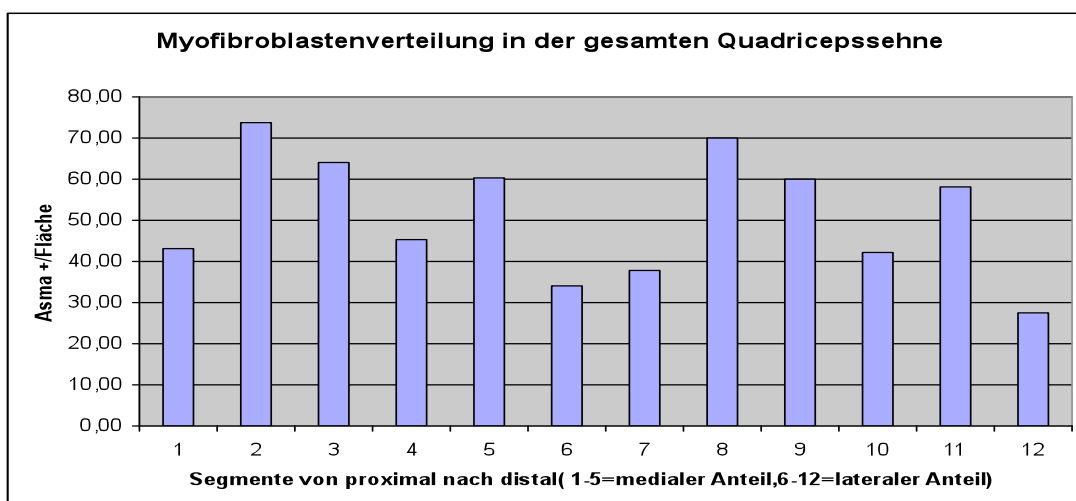


Abbildung 25 : A) Quadricepssehne mit dem immunhistochemischen Nachweis von multiplen runden (dicke schwarze Pfeile), ovoiden (dicke helle Pfeile) und spindelförmigen (schmale Pfeile) Myofibroblasten, die in der gesamten Sehne nebeneinander nachweisbar sind, bis auf den letzten distalen Abschnitt, dort sind hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten vorzufinden B) das selbe Präparat unter polarisiertem Licht (200x) mit regelmäßiger hochfrequenter Crimpstruktur

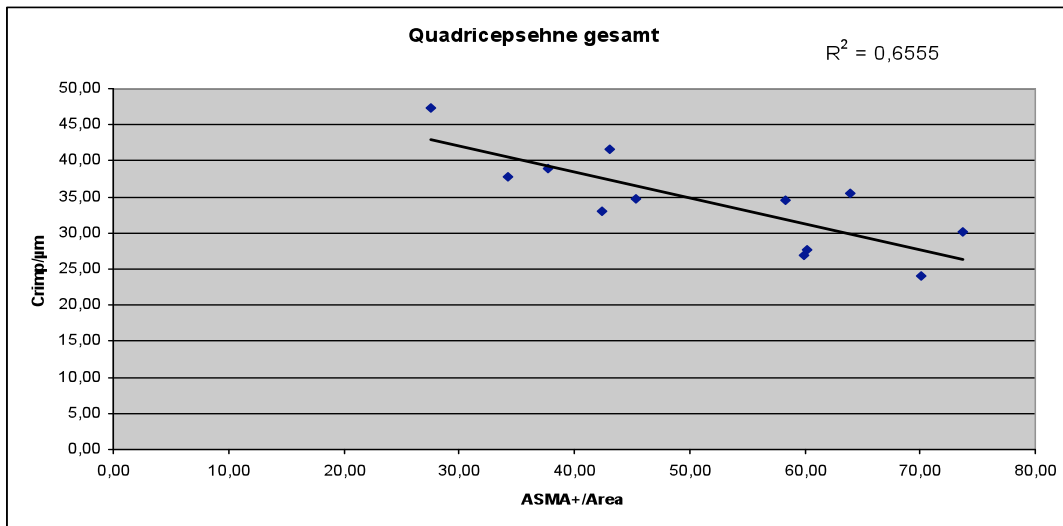
Im Gegensatz zum VKB und zur Patellarsehne treten die runden, ovoiden und spindelförmigen Myofibroblasten aber gemeinsam nebeneinander in den Präparaten auf. Sie lassen sich hauptsächlich in den proximalen und medialen Segmenten nachweisen, in den letzten distalen Abschnitten herrschen wieder spindelförmige Zellformen vor.

### 3.5.3 Gesamtzellzahl, Myofibroblastenzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Quadricepssehne

In der gesamten Quadricepssehne (medialer und lateraler Anteil) zeigt sich die höchste durchschnittliche Gesamtzellzahl mit 118,24/ mm<sup>2</sup> und die höchste Myofibroblastenzahl mit 51,41/ mm<sup>2</sup> von allen untersuchten Präparaten, wobei der Myofibroblastenanteil an der Gesamtzellzahl mit 43,47% ähnlich der Werte des VKB und der anderen Transplantate ist. Die Wavedistance weist mit 33,20/ µm einen sehr niedrigen Wert auf. Dies zeigt sich auch sehr deutlich in der Histologie, wo eine hochfrequente Crimpstruktur imponiert, was für eine geringe Wavedistance spricht. Bei der Myofibroblastenverteilung fällt auf, dass jeweils in den proximalen Segmenten ( 1= medial; 6=lateral) und in den distalen Segmenten (5=medial; 12= lateral) wenige Myofibroblasten vorkommen, wohingegen in den mittleren Segmenten der Sehne (Segment 2 u. 3 des proximalen und Segment 8 u. 9 des distalen Anteils) vermehrt Myofibroblasten vorzufinden sind.



Grafik 9: Myofibroblastenzahl pro Fläche in den einzelnen Segmenten des medialen und lateralen Anteils der Quadricepssehne. Jeweils in den proximalen Segmenten( 1 und 6 ) des medialen und lateralen Anteils sowie im distalen Segment des lateralen Anteils (12) der Sehne fällt eine verminderte Myofibroblastenzahl auf



Grafik 10: Korrelation von ASMA+ Zellen pro Fläche und Crimp/μm in der gesamten Quadricepssehne (medialer und lateraler Anteil) : es lässt sich eine eindeutige Korrelation mit  $R^2 = 0,6555$  feststellen

Eine eindeutige Korrelation von Alpha-smooth actin positiven Zellen pro Fläche und Crimp/μm lässt sich auch bei der Quadricepssehne mit  $R^2 = 0,6555$  feststellen. Diese Korrelation entspricht den Werten des vorderen Kreuzbandes (0,6692), der Tibialis anterior Sehne (0,6407) und Semitendinosussehne (0,6927).

### 3.6 Patellarsehne

#### 3.6.1 Makroskopie

Es zeigt sich ein makroskopisch intakter, medialer Anteil einer Patellarsehne ohne erkennbare Läsionen oder Beeinträchtigungen mit proximalem und distalem Knochenblock, sowie ein lateraler Patellarsehnenanteil, ebenfalls ohne Beschädigungen.

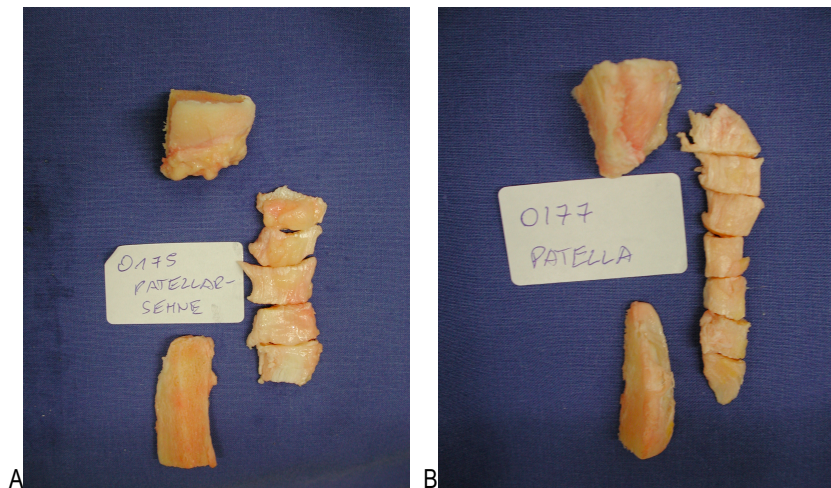


Abbildung 26: A) medialer Anteil der Patellarsehne mit patellarem und tibialen Knochenblock und Unterteilung der Sehne in 5 gleiche, ca. 1cm große Segmente B) laterale Patellarsehne mit patellarem und tibialen Knochenblock und Unterteilung der Sehne in 7 gleiche, ca. 1cm große Segmente

### 3.6.2 Mikroskopie

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich ein ähnliches Bild wie beim humanen VKB und der Quadricepssehne, auch konnten bei der Patellarsehne die schon zuvor beschriebenen drei morphologisch verschiedenen Myofibroblastenformen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte hier eine charakteristische Verteilung der spindelförmigen, ovoiden und runden Zellformen festgestellt werden, welche bestimmten anatomischen Regionen der Sehne entsprach.

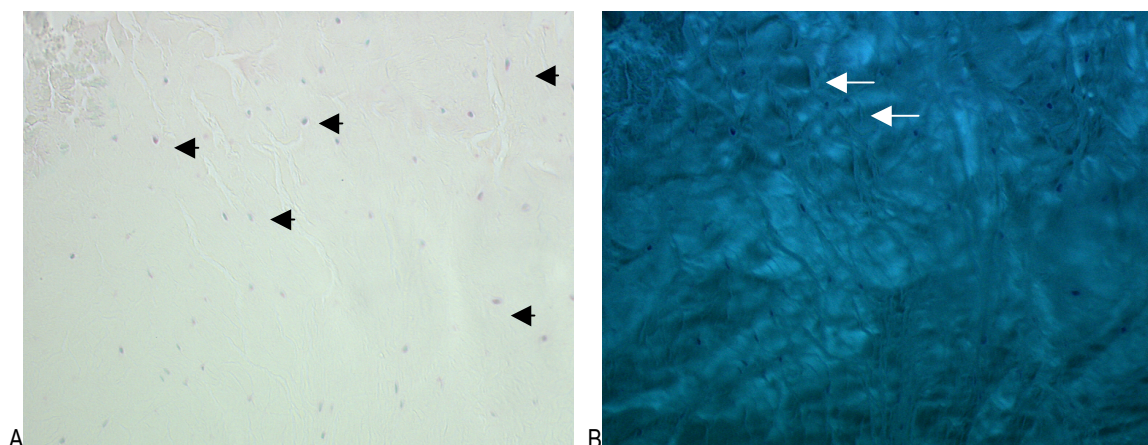


Abbildung 27: A) Proximaler Anteil der Patellarsehne: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten), es imponieren hauptsächlich spheroide (runde) Zellen in dieser Region (Pfeile) B) Darstellung des selben Präparates unter polarisiertem Licht (200x), es zeigt sich ein sehr inhomogenes Crimpmuster mit teilweise lokal hohen Crimpfrequenzen (weiße Pfeile)

Auffällig war eine Verteilung der runden (spheroiden) Myofibroblasten in dem proximalen Segment (siehe Abb.27) mit einer unregelmäßigen Kollagentertiärstruktur und teilweise regionalen hohen Crimpfrequenzen.

Im Gegensatz zum VKB, bei dem im proximalen Bereich hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten imponieren, zeigen sich im proximalen Segment der Patellarsehne ebenfalls wie im distalen Segment hauptsächlich runde Myofibroblasten. Diese werden von wenigen spindelförmigen Zellen begleitet. Es zeigt sich auch in diesem Bereich eine partiell inhomogene Kollagentertiärstruktur mit hohen Crimpfrequenzen.

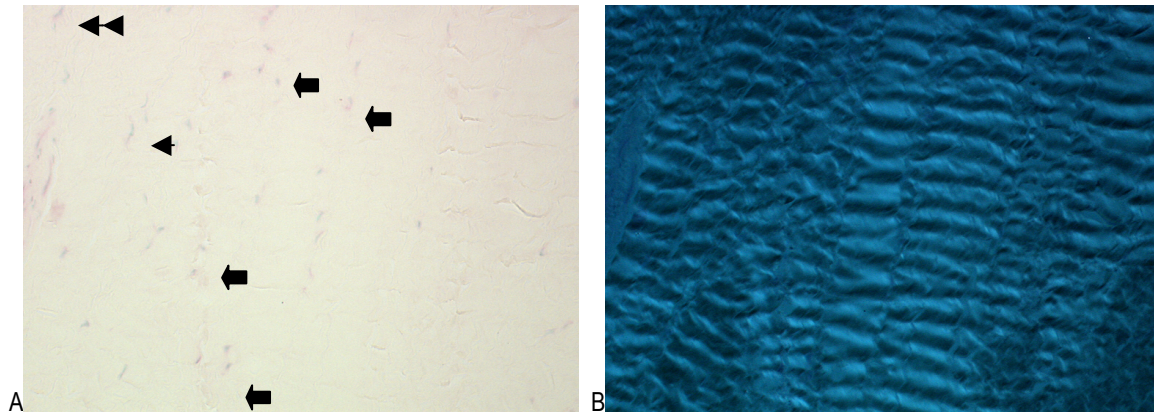


Abbildung 28: A) Patellarsehne: distales Segment mit immunhistochemischen Nachweis von multiplen  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten), die hier hauptsächlich als spheroid (runde) Zellen (dicke Pfeile) imponieren und von fusiformen (spindelförmigen) Myofibroblasten (schmale Pfeile) begleitet werden B) unter polarisiertem Licht zeigt sich dasselbe Präparat mit einer hochfrequenten, partiell inhomogenen Kollagentertiärstruktur

Die ovoide Zellform der Myofibroblasten kann über wenige Segmente im Übergang vom proximalen Anteil der Patellarsehne zum mittleren Anteil nachgewiesen werden.

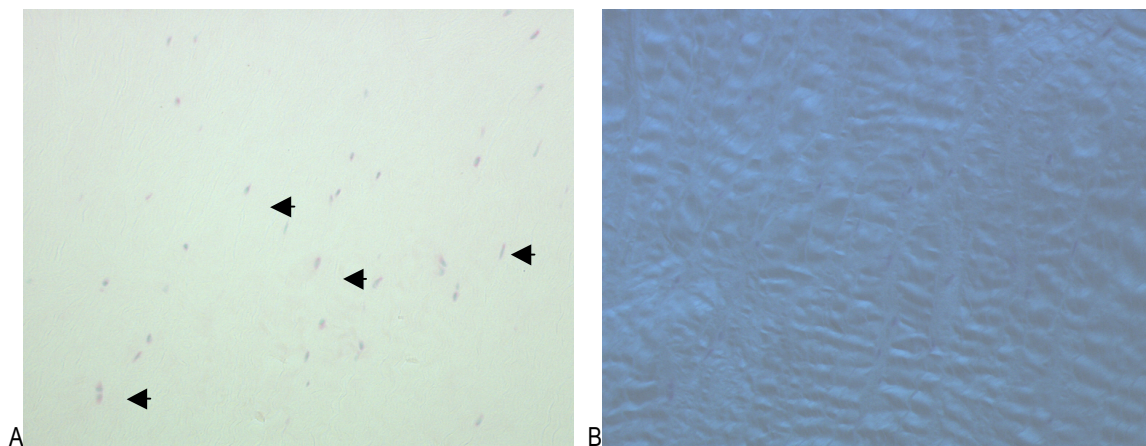


Abbildung 29: A) Patellarsehne: Nachweis von multiplen ovoiden Myofibroblasten (Pfeile) im Übergang vom proximalen Viertel der Sehne zu den restlichen drei Vierteln der Sehne B) hochfrequente Crimpformation des gleichen Präparates unter polarisiertem Licht (200x)

Dieser Übergang ist ähnlich wie beim VKB. Bei der Patellarsehne stellen dann in den restlichen drei Vierteln der Sehne spindelförmige Zellen den größten Anteil der Myofibroblasten dar (beim VKB runde

Myofibroblasten) und bilden so die Hauptzellpopulation.

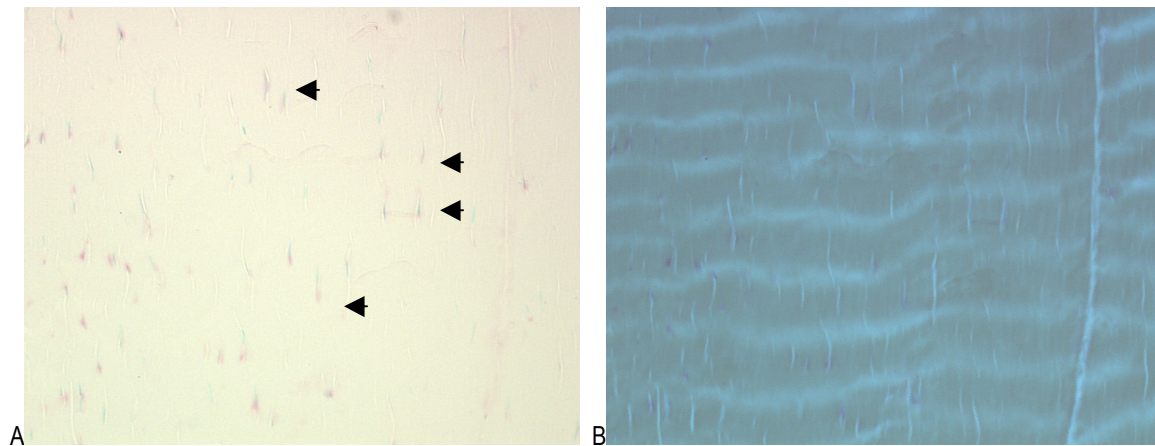


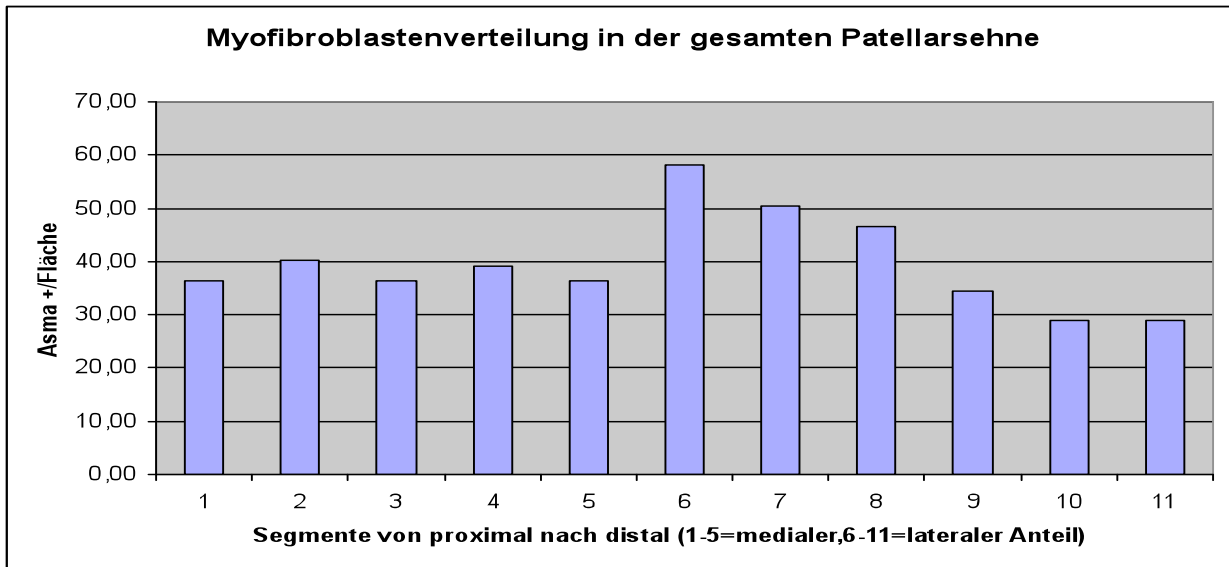
Abbildung 30: A) Patellarsehne: Immunhistochemische Darstellung von spindelförmigen Myofibroblasten (Pfeile) mit vereinzelt runden und ovoiden Zellen in den mittleren Segmenten der Sehne. Spindelförmige Zellen machen höchsten Anteil an Myofibroblasten aus B) niedrigfrequente Kollagentertiärstruktur desselben Präparates unter polarisiertem Licht (200x)

Diese Verteilungsmuster ließen sich sowohl im medialen als auch im lateralen Patellarsehnentransplantat nachweisen.

### 3.6.3 Gesamtzellzahl, Myofibroblastenzahl, Myofibroblastenverteilung und Crimpfrequenz der Patellarsehne

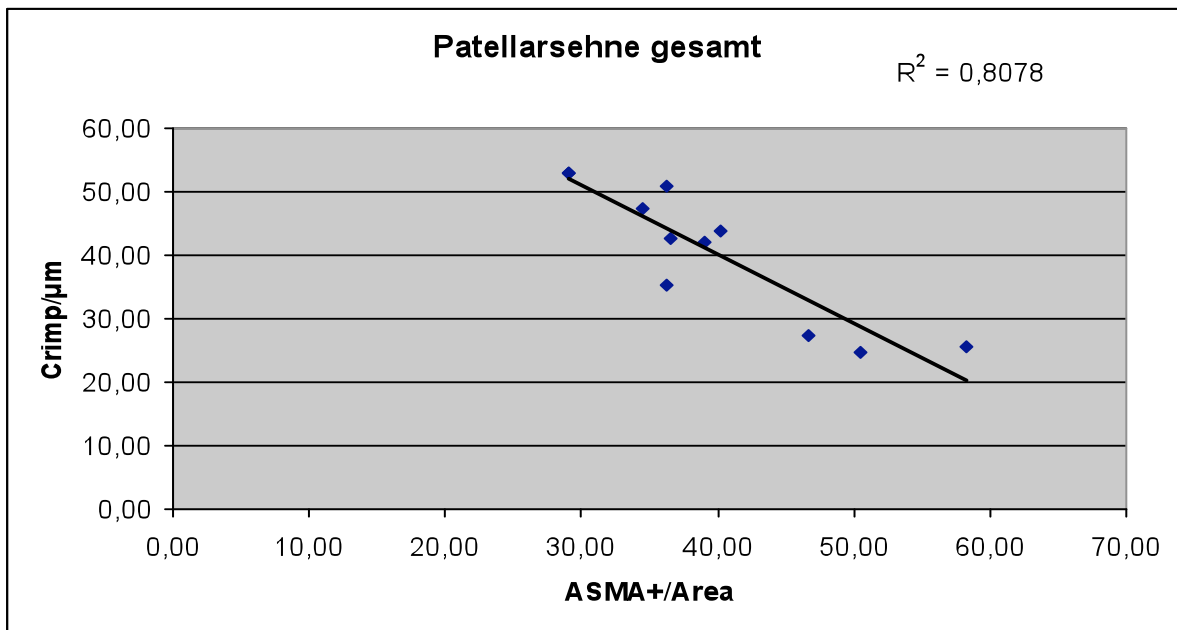
Bei der gesamten Patellarsehne (medialer und lateraler Anteil) zeigt sich mit einer Gesamtzellzahl pro Fläche von 80,83 ein ähnlicher Wert wie beim humanen vorderen Kreuzband. Auch mit 39,74 Myofibroblasten pro Fläche bei einem Anteil von 49,17% an der Gesamtzellzahl lässt sich ein ähnlicher Wert wie beim Kreuzband und der Quadricepssehne feststellen.

Lediglich bei der Crimpdistanz mit 37,48/  $\mu\text{m}$  zeigt die Patellarsehne einen größeren Crimpabstand als das VKB. Im Gegensatz zur unterschiedlichen Morphologie der Myofibroblasten in verschiedenen anatomischen Regionen der Sehne zeigt sich allerdings hinsichtlich der Häufigkeit der Myofibroblasten in den einzelnen Segmenten innerhalb der gesamten Patellarsehne kein Unterschied. Lediglich im ersten proximalen Segment des lateralen Anteils (Segment 6) ist eine größere Häufigkeit von Myofibroblasten nachweisbar.



Grafik 11: Myofibroblastenverteilung innerhalb der gesamten Patellarsehne, es zeigt sich eine relativ homogene Verteilung der Myofibroblasten, lediglich das erste proximale Segment des lateralen Anteils zeigt ein verstärkte Häufung von ASMA+ Zellen pro Fläche

Bei der Korrelation zwischen Myofibroblasten pro Fläche und Crimpfrequenz lässt sich mit  $R^2 = 0,8078$  die höchste Korrelation der untersuchten Präparate feststellen.



Grafik 12: Signifikante Korrelation zwischen Myofibroblasten pro Fläche und Crimpfrequenz der gesamten Patellarsehne: mit  $R^2 = 0,8078$



### 3.7 Zusammenfassender Vergleich:

#### 1. Histomorphologischer Vergleich

Man kann festhalten, dass bei den langen Sehnentransplantaten (Gracilissehne, Semitendinosusehne und Tibialis anterior Sehne) bei der Myofibroblastenpopulation größtenteils spindelförmige Myofibroblasten imponieren und runde oder ovoide Zellformen sehr selten vorkommen (Abbildungen 19, 21, 23).

Bei den kurzen Sehnentransplantaten (Quadricepssehne und Patellarsehne) sowie beim vorderen Kreuzband finden sich runde, ovoide und spindelförmige Myofibroblasten, die sich auch eindeutig anatomischen Regionen zuordnen lassen, wo sie gehäuft auftreten. Bei der Patellarsehne lassen sich im proximalen Bereich runde Myofibroblasten nachweisen, in der Übergangszone von proximal nach distal ovoide Zellen und im distalen Anteil dann runde und spindelförmige Zellen. Im VKB dagegen imponieren im proximalen Anteil spindelförmige und ovoide Myofibroblasten, in der Übergangszone kommen ebenfalls ovoide Zellen vor, im distalen Anteil finden sich hauptsächlich runde Myofibroblasten. Bei der Quadricepssehne lassen sich im proximalen Anteil, in der Übergangszone und im Hauptanteil der Sehne alle Myofibroblastenformen nebeneinander nachweisen, im distalen Bereich finden sich dann hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten, die den Hauptanteil an Myofibroblasten ausmachen (siehe Tabelle 8).

Anatomische Region des Präparates/ Präparat	Proximal	Übergangszone	Distal
Vorderes Kreuzband	spindelförmig/ ovoid	ovoid	rund
Quadricepssehne	spindelförmig/ ovoid/ rund	spindelförmig/ ovoid/ rund	spindelförmig
Patellarsehne	rund	ovoid/ spindelförmig	Spindelförmig/ rund

Tabelle 8: Histomorphologisches Erscheinungsbild der Myofibroblasten in den kurzen Transplantaten und dem vorderen Kreuzband in den verschiedenen anatomischen Regionen

Es lässt sich außerdem festhalten, dass eine signifikante Häufung einer Myofibroblastenanzahl in einer bestimmten anatomischen Region nicht beobachtet werden konnte, lediglich eine unterschiedliche

histomorphologische Erscheinungsform (rund, ovoid und spindelförmig).

Weiterhin war auffällig, dass in den Regionen der Transplantate, wo ovoide oder spindelförmige Myofibroblastenformen gehäuft vorkamen, auch eine höherfrequente Crimpstruktur vorherrschte (Abbildung 16, 28, 29), als in Bereichen, in denen hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten zu finden waren (Abbildung 15, 30).

## 2. Vergleich der mittleren zellulären Verhältnisse

Auch bei dem Vergleich der mittleren zellulären Verhältnisse fällt auf, dass es bei den langen Transplantaten bezüglich Gesamtzellzahl/ Fläche, ASMA+ Zellen/ Fläche und Crimpdistanz Ähnlichkeiten gibt. Bei der Tibialis anterior Sehne ist die geringste Gesamtzellanzahl/ Fläche ( $43,61/ \text{mm}^2$ ) nachweisbar, bei der Semitendinosusehne ( $52,67/ \text{mm}^2$ ) und bei der Gracilisehne ( $58,97/ \text{mm}^2$ ) zeigen sich vergleichbare Werte. Auch bei den ASMA+ Zellen/ Fläche (Tibialis anterior  $21,45/ \text{mm}^2$ , Semitendinosus  $21,60/ \text{mm}^2$  und Gracilis  $28,90/ \text{mm}^2$ ) sowie bei der Crimpdistanz (Tibialis anterior  $82,41/ \mu\text{m}$ , Semitendinosus  $79,08/ \mu\text{m}$  und Gracilis  $57,55/ \mu\text{m}$ ) lassen sich ähnliche Werte nachweisen.

Beim humanen vorderen Kreuzband, bei der Patellarsehne und bei der Quadricepssehne lassen sich hinsichtlich der zellulären Verhältnisse ebenfalls wie in der Histologie Gemeinsamkeiten feststellen. Die Quadricepssehne hat mit einer Gesamtzellzahl/ Fläche von  $118,24/ \text{mm}^2$  die höchste Gesamtzellzahl aller untersuchten Präparate, gefolgt von dem VKB ( $88,74/ \text{mm}^2$ ) und der Patellarsehne ( $80,83/ \text{mm}^2$ ). Auch bei den Myofibroblasten/ Fläche (VKB  $41,75/ \text{mm}^2$ , Quadricepssehne  $51,41/ \text{mm}^2$ , Patellarsehne  $39,74/ \text{mm}^2$ ) und Crimpdistanz (VKB  $57,55/ \mu\text{m}$ , Quadricepssehne  $51,41/ \mu\text{m}$ , Patellarsehne  $39,74/ \mu\text{m}$ ) lassen sich beim vorderen Kreuzband und den kurzen Sehnentransplantaten ähnliche Werte nachweisen (siehe Tabelle 9)

Zelluläre Verhältnisse/ Präparat	Gesamtzellzahl/ Fläche	ASMA+ Zellen/ Fläche	Gesamtzell- zahl/ ASMA+ in %	Crimp/ $\mu\text{m}$
Gracilissehne	58,97/ $\text{mm}^2$	28,90/ $\text{mm}^2$	49,00%	57,55/ $\mu\text{m}$
Semitendinosussehne	52,67/ $\text{mm}^2$	21,60/ $\text{mm}^2$	41,02%	79,80/ $\mu\text{m}$
Tibialis anterior Sehne	43,61/ $\text{mm}^2$	21,45/ $\text{mm}^2$	49,19%	82,41/ $\mu\text{m}$
Vorderes Kreuzband	88,74/ $\text{mm}^2$	41,75/ $\text{mm}^2$	47,26%	24,75/ $\mu\text{m}$
Patellarsehne	80,83/ $\text{mm}^2$	39,74/ $\text{mm}^2$	49,17%	37,48/ $\mu\text{m}$
Quadricepssehne	118,24/ $\text{mm}^2$	51,41/ $\text{mm}^2$	43,47%	33,20/ $\mu\text{m}$

Tabelle 9: Darstellung der mittleren zellulären Verhältnisse und mittleren Crimpdistanz der untersuchten Sehnen-Transplantate, es fällt auf, dass die langen Transplantate ähnliche Werte aufweisen, ebenso die kurzen Transplantate und das vordere Kreuzband. Die ASMA+ Zellen machen nahezu die Hälfte der Gesamtzellzahl aus.

### 3. Nachweis der Korrelation von Myofibroblasten/ Fläche und Crimpdistanz

Es konnte auch bei der Auswertung der Ergebnisse eine eindeutige und signifikante Korrelation bei allen untersuchten Sehnen-Transplantaten, sowie beim humanen vorderen Kreuzband zwischen Myofibroblastenhäufigkeit/Fläche und Crimpdistanz nachgewiesen werden. Am deutlichsten zeigte sich dies bei der Patellarsehne, dort betrug  $R^2 = 0,8078$ .

	VKB	Patellar- sehne	Quadriceps- sehne	Gracilis- sehne	Semitendinosus- sehne	Tibialis- sehne
ASMA+/ mm <sup>2</sup>	41,75 ±9,15	39,74 ±8,94	51,41 ±14,91	28,90 ±5,87	21,60 ±6,17	21,45 ±3,52
Wavedistance/ µm	25,57 ±4,94	37,48 ±10,72	33,20 ±6,61	57,55 ±9,74	79,08 ±19,53	82,41 ±19,20
R <sup>2</sup>	0,67	0,81	0,61	0,42	0,7	0,62
R	-0,81	-0,9	-0,78	-0,68	-0,83	-0,78
p	<0,01	<0,01	<0,02	<0,04	<0,01	<0,01
Power	99%	95%	80%	80%	99%	99%

Tabelle 10: Es zeigt sich, dass bei allen untersuchten Präparaten eine eindeutige Korrelation zwischen ASMA+/Fläche und Wavedistance/µm vorhanden ist, am ausgeprägtesten bei der Patellarsehne. Die Gracilissehne hat die geringste Ausprägung einer Korrelation

Beim humanen vorderen Kreuzband ( $R^2=0,6692$ ), bei der Semitendinosussehne ( $R^2=0,6927$ ), der Tibialis anterior Sehne ( $R^2=0,6407$ ), sowie bei der Quadricepssehne ( $R^2=0,6555$ ) ließen sich ähnliche Werte feststellen. Der Wert der Gracilissehne mit  $R^2=0,4349$  zeigte die geringste Korrelation (siehe Tabelle).

Somit kann man ausgehend von den dargestellten Untersuchungsergebnissen folgendes zusammenfassend festhalten:

- 1.) Beim humanen vorderen Kreuzband, bei der Patellarsehne und auch bei der Quadricepssehne herrschen in bestimmten anatomischen Regionen verschiedene Myofibroblastenformen (rund, ovoid, spindelförmig) vor, bei den langen Transplantaten finden sich hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten.
- 2.) Beim Vergleich der mittleren zellulären Verhältnisse zeigt sich, dass die langen Transplantate untereinander vergleichbare Werte aufwiesen, ebenso das vordere Kreuzband und die kurzen Sehnen-Transplantate.

- 3.) Es besteht eine eindeutige Korrelation zwischen der Myofibroblastenhäufigkeit/ Fläche und der Crimpdistanz (Crimp/ $\mu\text{m}$ ) bei allen untersuchten Präparaten und ist bei der Patellarsehne am ausgeprägtesten. Das vordere Kreuzband, die Semitendinosussehne, die Tibialis anterior Sehne und die Quadricepssehne haben ähnliche Korrelationen, bei der Gracilissehne ist sie am geringsten ausgeprägt
- 4.) Auffällig ist, dass in Regionen mit hauptsächlich runder oder ovoider Zellform eine hochfrequente Crimpformation vorherrscht, in Regionen mit spindelförmiger Zellform eher eine niedrigfrequente.
- 5.) Bei dem vorderen Kreuzband und bei den Sehnentransplantaten machen die Myofibroblasten nahezu bis zur Hälfte der Gesamtzellpopulation aus.

#### **4. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit war es erstmalig in der Literatur möglich, mit Hilfe immunhistochemischer Färbetechniken den Nachweis von Myofibroblasten im humanen VKB und dessen autologen Sehnentransplantate zu erbringen, einen Zusammenhang zwischen der Myofibroblastenhäufigkeit und der Ausbildung einer Kollagentertiärstruktur im Gewebe zu zeigen und näher zu beleuchten, welches Transplantat aufgrund seiner histologischen Eigenschaften dem humanen VKB am ähnlichsten ist.

In der Literatur sind unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben worden, das rupturierte humane vordere Kreuzband mit verschiedenen Auto- und Allografts zu ersetzen. Derzeitig favorisierte autologe Transplantate sind das zentrale Patellarsehnendrittel, Sehnentransplantate des Pes anserinus/Hamstrings (*M. semitendinosus/ M. gracilis*) sowie das zentrale Quadricepssehnen-Transplantat (67), wobei ein Trend zur Verwendung der Hamstringtransplantate erkennbar ist (140). Auch stellen Allografts eine mit Einschränkungen (44) akzeptierte Transplantatform dar, es wird neben den üblichen Autografts auch die Sehne des *M. Tibialis anterior* verwendet (139). Alle erwähnten Transplantate sowie das humane vordere Kreuzband wurden auch in der vorliegenden Studie histologisch untersucht. Entsprechend ihrer funktionellen Aufgabe und Belastung unterscheidet sich das Gewebe der Sehnen von dem Gewebe des Kreuzbandes sowohl morphologisch als auch biochemisch, da Sehnen hauptsächlich einer Zugbelastung, Kreuzbänder hingegen aufgrund ihrer räumlichen Anordnung sowohl Zug- als auch Druck und Torsionskräften ausgesetzt sind (26).

Amiel konnte allerdings 1986 histologisch nachweisen, dass während des Heilungsverlaufes beim VKB-Ersatz am Kaninchen die verwendeten Sehnen-Transplantate nun eine funktionelle Adaptierung im Sinne

einer Metamorphose von der Sehne zu einem Ersatzgewebe entsprechend des vorderen Kreuzbandes durchliefen, wobei es Weiler et al. 2000 gelang, diesen Vorgang nicht nur histologisch, sondern auch mit Kontrastmittel-verstärkten MRT- Untersuchungen aufzuzeigen (146). Diesen Prozess der Ligamentisierung oder Remodeling der Sehnentransplantate unterteilte Bosch 1993 in drei verschiedene Abschnitte, beginnend mit der initialen Phase, gefolgt von der Revitalisierungsphase und schließlich die Remodelingphase, die bis zu zwei Jahre dauern kann. In der initialen Phase kommt es aufgrund von partiellen Nekrosen und degenerativen Veränderungen des Transplantates zu einer erheblichen mechanischen Schwächung der Kreuzbandplastik, wobei sich dann 8 Wochen postoperativ in der Revitalisierungsphase biomechanisch die geringste Zugfestigkeit und Elastizität feststellen lässt (25)

Da man davon ausgeht, dass Myofibroblasten eine wichtige Funktion zur Aufrechterhaltung der Matrixhomöostase einer intakten Sehne oder eines Bandes haben, könnte die phenotypische Entwicklung des Fibroblasten zum Myofibroblasten auch mit der Bildung funktioneller Bindegewebsstrukturen einhergehen (62,136) wobei sie in gleicher Weise auch im Prozess der Gewebeumstrukturierung vom Sehnentransplantat zum VKB-Ersatzgewebe während des Remodelings bzw. der Ligamentisierung mitwirken könnten. Weiler et al. haben 2003 in der initialen Phase des Remodelings nach 6 Wochen beim VKB-Ersatz am Schafsmodell in neu gebildeten Kollagenfibrillen spindelförmige Myofibroblasten nachgewiesen, was auf eine wichtige Rolle der Myofibroblasten in der frühesten Phase der Kollagenfibrillenbildung und – formierung hinweist und sie mitverantwortlich für das Wiedererreichen der Bandhomöostase und Kollagenformation sein könnten (141).

In der vorliegenden Arbeit ist unter anderem der Frage nachgegangen worden, welches Sehnentransplantat aufgrund seiner histologischen Eigenschaften bezüglich Myofibroblastenhäufigkeit und -verteilung und Crimpformation dem humanen VKB am nächsten kommt, um den Remodelingprozess zu optimieren und die oben beschriebene Phase der geringsten Zugfestigkeit und Elastizität 8 Wochen postoperativ so positiv wie möglich zu beeinflussen.

Hierbei zeigte sich bei den Ergebnissen, dass die Patellarsehne und die Quadricepssehne dem humanen vorderen Kreuzband vom histologisch-morphologischen Aspekt und von der mittleren zellulären Verhältnissen am ähnlichsten sind.

Dies ließ sich daran feststellen, dass es bei diesen Sehnentransplantaten ähnlich wie beim humanen VKB anatomische Regionen gibt, in denen eine bestimmte Zellform der Myofibroblasten vorherrscht. Des Weiteren ließen sich in den kurzen Sehnentransplantaten alle drei morphologischen Formen der Myofibroblasten nachweisen, wohingegen bei den langen Sehnentransplantaten eher spindelförmige Myofibroblasten zu finden waren. Murray und Spector haben im humanen VKB die Morphologie und die

Verteilung von Myofibroblasten untersucht und festgestellt, dass im proximalen Anteil spindelförmige Zellen vorherrschen, im mittleren Abschnitt ovoide Myofibroblasten und in der distalen Zone spherioide (runde) Zellen zu finden sind (96) was sich auch mit den Ergebnissen unserer Studie deckt. Bei der Patellarsehne finden sich, im Gegensatz zum VKB, im proximalen Segment hauptsächlich runde Myofibroblasten, die von wenigen spindelförmigen Zellen begleitet werden. Die ovoide Zellform der Myofibroblasten zeigt sich dann, ähnlich wie beim VKB, im Übergang vom proximalen zum mittleren Anteil. Den Hauptteil machen die spindelförmigen Myofibroblastenformen aus, wobei diese dann wieder im distalen Anteil der Sehne mit der runden Zellform erscheinen. Auch bei der Quadricepssehne konnten diese unterschiedlichen Myofibroblastenformen gefunden werden. Dort zeigt sich allerdings, dass runde, ovoide und spindelförmige Zellen hauptsächlich nebeneinander vorkommen, bis auf den letzten distalen Abschnitt, in dem dann größtenteils spindelförmige Myofibroblasten imponieren.

Auch bezüglich der zellulären Häufigkeit lässt sich erkennen, dass bei der Patellarsehne und der Quadricepssehne ähnliche Verhältnisse wie beim humanen VKB herrschen. Bei der Gesamtzellzahl (Fibroblasten und Myofibroblasten) pro Fläche zeigt sich bei der Patellarsehne mit 80,83/ mm<sup>2</sup> der nächste Wert am VKB (87,06/ mm<sup>2</sup>), die Quadricepssehne hat mit 118,24/ mm<sup>2</sup> den höchsten Wert aller untersuchten Präparate. Auch bei der Anzahl von ASMA+ Zellen/Fläche sind mit 39,74/ mm<sup>2</sup> (Patellarsehne) und 51,41/ mm<sup>2</sup> (Quadricepssehne) ähnliche Werte wie beim VKB (42,82/ mm<sup>2</sup>) zu verzeichnen. Bei der Crimpdistanz zeigen sich ebenfalls vergleichbare Werte, wobei sich dort eine stärkere Gemeinsamkeit des VKB (24,75/ µm) mit der Quadricepssehne (33,20/ µm) als mit der Patellarsehne (37,48) feststellen lässt.

Somit lässt sich festhalten, dass von den untersuchten allogenen Transplantaten die Patellarsehne und die Quadricepssehne dem humanen vorderen Kreuzband am nächsten kommen. Dies lässt sich einerseits aufgrund der oben geschilderten ähnlichen zellulären Verhältnisse bezüglich Morphologie und Verteilung in bestimmten anatomischen Regionen und andererseits aufgrund der ähnlichen Häufigkeit von Gesamtzellzahl, Myofibroblastenanzahl und Crimpdistanz (Crimpformation) postulieren. Andere Arbeitsgruppen haben Hamstring-Sehnen, Quadricepssehnen und Patella-Sehnen histologisch untersucht und miteinander verglichen und kommen zu dem Ergebnis, dass die Hamstring- und Quadricepssehnen mehr Fibroblasten aufweisen als die Patellarsehnen. (58,59)

In dieser Studie wurde allerdings nicht zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten unterschieden und nicht auf die Form und Verteilung der Fibroblasten eingegangen. Weiterhin wurden die Transplantate nur untereinander verglichen, nicht aber mit dem humanen VKB.

Es ist allerdings fraglich, ob diese einseitige biologisch-morphologische Auswertung der allogenen Transplantate allein ausreicht, um eine eindeutige Empfehlung für eine Transplantatauswahl beim VKB-Ersatz auszusprechen. In der fast 100jährigen Entwicklung der Kreuzbandchirurgie wurden verschiedene körpereigene, körperfremde oder synthetische Gewebe mit unterschiedlichem Erfolg als Kreuzbandersatz verwendet (67) wobei die einzelnen Transplantate spezifische Unterschiede hinsichtlich biomechanischer Eigenschaften, Primärfixation und Einheilung im Knochenkanal aufweisen. Im Allgemeinen gilt jedoch, dass alle heute gebräuchlichen Transplantate eine gleichwertige oder höhere Reißfestigkeit als das intakte VKB zeigen (28,138). Hinzu kommt, dass es für jedes Transplantat mehrere etablierte Operationstechniken gibt, wobei die Transplantatverankerung wiederum einen Einfluss auf die Konstruktmechanik bezüglich Verankerungsfestigkeit bzw. Lockerungsverhalten und Konstruktsteifigkeit hat. Hier wird eine anatomische Verankerung möglichst nahe dem originalen Kreuzband angestrebt (145). Ein weiterer nicht zu unterschätzender Faktor für den Erfolg einer VKB-Rekonstruktion ist sicherlich auch ein adäquates postoperatives Rehabilitationsregime, um muskuläre Defizite und Schmerzen positiv zu beeinflussen (132,133).

Es gibt heute allerdings Bestrebungen, Substanzen wie Wachstumsfaktoren (z. B. TGF- $\beta$ , EGF, PDGF) einzusetzen, die den natürlichen Heilungsverlauf des Transplantates induzieren und regulieren, um den oben beschriebenen Prozess des Remodelings und der Neovaskularisierung positiv zu beeinflussen (139,144).

Könnte nun also die oben beschriebene Zeitspanne der verminderten mechanischen Belastbarkeit des Transplantats in der initialen und Revitalisierungsphase des Remodelings durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren verkürzt oder sogar ausgeschaltet werden, würde dies eine frühere Rückkehr des Patienten zu seinem präoperativen Leistungsniveau zur Folge haben. In der Tat konnte A. Weiler am Schafsmodell zeigen, dass die lokale Applikation von PDGF in ein freies Sehnen transplantat (Achillessehne) das Remodeling deutlich beschleunigt.

Es ist anzunehmen, dass bei Verwendung eines Transplantates, welches histomorphologisch dem VKB ähnlich ist, dieser Prozess noch zusätzlich unterstützt werden kann. Dies herauszufinden war unter anderem ein Ziel dieser Studie und trifft, wie oben beschrieben, auf die Patellarsehne und auf die Quadricepssehne zu. Man sollte allerdings einschränkend dazu bemerken, dass die langen Sehnen transplantate (Gracilissehne, Semitendinosussehne und Tibialis anterior Sehne) hier im Ausgangszustand bzw. „Ist-Zustand“ untersucht wurden, bei der operativen Versorgung werden sie drei- oder vierfach gelegt. Dadurch ändern sich auch entsprechend die biomechanischen Eigenschaften (Maximallast, Steifigkeit) und Querschnittsfläche und somit auch die zellulären Anteile pro Fläche.



Eine weitere Frage, die sich anschließt ist, ob sich diese Ergebnisse der Allografts auch auf Autografts übertragen lassen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Allografts ähnlich wie autologe Transplantate revaskularisiert werden und vital sind, d.h. es findet ein Einwachsen von Bindegewebszellen statt (12,71) wobei dieser Prozess bei Allografts langsamer zu erfolgen scheint (71). Der Grund scheint in dem Vorgang des Einfrierens und Auftauens zu liegen, was Schädigungen der Zell- und Bindegewebsmatrix mit sich bringt (80). Auch die notwendige Sterilisation scheint die Vitalität der Allografts zu beeinträchtigen, was zu einer verlängerten Einheilungsphase führt (44). Langfristige klinische Studien, die die Implantationen von Allografts zum Ersatz des VKB nach sieben Jahren untersuchen, zeigen allerdings vergleichbare Ergebnisse zu autologen Transplantaten (61,101,103).

Somit lässt sich als Quintessenz leicht erkennen, dass ein optimales Operationsergebnis nach einem VKB-Ersatz nicht allein vom Transplantat abhängig ist, sondern von vielen verschiedenen Faktoren. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung ein differenziert abgestimmtes Konzept von patientengerechter Transplantatauswahl zu erarbeiten, eine optimale Transplantatpräparation durchzuführen, eine adäquate Operationstechnik zu wählen und anschließend dem Patienten eine intensive Rehabilitation zukommen zu lassen.

Einer weiteren Frage, die in dieser Studie nachgegangen werden sollte, ist ob ein Zusammenhang zwischen hochdifferenzierten Fibroblasten, den so genannten Myofibroblasten und der Fältelung der Extrazellulärmatrix bzw. der Ausbildung der Kollagentertiärstruktur (Crimp) existiert.

In dieser Studie konnte nun mittels immunhistochemischer Färbemethoden im humanen VKB Myofibroblasten nachgewiesen werden. Dies war schon bekannt (96), jedoch wird dort von einer Prozentzahl von Myofibroblasten zwischen 9%- 28% berichtet. Bei unserer Untersuchung zeigten sich im humanen VKB Prozentzahlen von 47,26 %. Diese Differenz könnte sich damit erklären lassen, dass die Kreuzbänder, die von Murray und Spector ihrer Arbeit untersucht wurden, von einem älteren Patientenkollektiv stammen, bei denen bereits degenerative Veränderungen am Kniegelenk bekannt waren. Sie haben herausgefunden, dass die Myofibroblastenhäufigkeit bei den von ihnen untersuchten VKBs des älteren Patientenkollektivs geringer als bei jüngeren Patienten ist und postulieren, dass im Alter die Zelldichte abnimmt.

Bei unserer Untersuchung wurden vier humane vordere Kreuzbänder von Multiorganspendern mit hoher

Zelldichte untersucht, was sicher nur ein Ausschnitt bezüglich der Myofibroblastenhäufigkeit darstellen kann und somit die Aussagekraft der Studie limitieren könnte.

Erstmalig konnte allerdings nicht nur, wie oben beschrieben, im humanen VKB Myofibroblasten nachgewiesen werden, sondern auch in den für Kreuzbandplastiken verwendeten Sehnentransplantaten. Es gibt in der Literatur viele Belege für den Nachweis dieser  $\alpha$ -smooth muscle actin exprimierenden (ASMA+) Fibroblasten, unter anderem in dem medialen Kollateralband des Kaninchens (45) und auch im vorderen Kreuzband des Schafes und seines Sehnentransplantates (97,148). Weiterhin ist bekannt, dass Myofibroblasten eine entscheidende Rolle während der Gewebekontraktion bei der Wundheilung und bei Organfibrosen spielen (53,124) und basierend darauf die Hypothese aufgestellt wurde, dass sie die Fähigkeit haben, Zugkräfte auf die extrazelluläre Matrix auszuüben und so zu einer Kontraktion des Gewebes führen (45,52,128). Ein deutliches klinisches Beispiel für die kontraktile Potenz der Myofibroblasten ist das Bild der Dupuytren'schen Kontraktur, wobei hier das Vorkommen von Myofibroblasten pathognomisch ist (54). Murray und Spector vermuteten nun, dass Myofibroblasten mittels ihrer gut ausgebildeten Zell-Stroma-Verbindung, den Fibronexus, in kontraktile Interaktion mit der Kollagentertiärstruktur treten und so für dessen Bildung, dem so genannten Crimp, mitverantwortlich sind (96). Diese Hypothese wurde durch ihre Entdeckung gestützt, dass diejenigen Bandzonen des VKB mit dem kürzesten Wellenabstand den größten Anteil an Myofibroblasten zeigten, wobei sie darüber hinaus Myofibroblasten an den Scheitelpunkt der Wellenberge ausmachen konnten. In- vitro Studien unterlegen zusätzlich, dass Myofibroblasten die Fähigkeit besitzen, Membranen oder Zellkulturmedien durch Kontraktion zu verkürzen (11,63,94).

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese untermauert werden und eine eindeutige Korrelation zwischen Myofibroblastenhäufigkeit und Ausbildung der Kollagentertiärstruktur bzw. der Crimpdistanz und somit auch der Kollagenfrequenz gezeigt werden. Dazu wurde die Myofibroblastenhäufigkeit (ASMA+ Zellen/Area) in Relation zur Crimpdistanz (= Abstand zwischen zwei Crimpformationen) gesetzt, um zu sehen, ob Regionen mit einer hohen Myofibroblastenanzahl auch mit einem geringen Abstand zwischen zwei Kollagenwellenbergen (Kollagencrimp) einhergehen.

Die ausgeprägteste Korrelation zeigte sich dann bei der Patellarsehne mit  $R^2$  von 0,8078, gefolgt vom vorderen Kreuzband mit  $R^2 = 0,6692$ . Die Semitendinosussehne ( $R^2 = 0,6927$ ), die Quadricepssehne ( $R^2 = 0,6555$ ) und die Tibialis anterior -Sehne ( $R^2 = 0,6407$ ) hatten eine ähnliche Korrelation, lediglich bei der Gracilissehne ließ sich mit  $R^2 = 0,4349$  eine eher geringe Korrelation feststellen. Damit bestätigt sich ein Zusammenhang zwischen Myofibroblastenhäufigkeit und Crimpfrequenz in allen untersuchten Präparaten, in allerdings unterschiedlicher Ausprägung.

In dieser Studie wurden Zellen in allen untersuchten Präparaten immunhistologisch nachgewiesen, die eine

Genexpression für  $\alpha$ -smooth muscle actin aufwiesen und so eine Subpopulation von Fibroblasten darstellen könnten. Die Definition von Myofibroblasten beinhaltet die Beschreibung einer Zelle mit morphologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften eines Fibroblasten, die außerdem  $\alpha$ -smooth muscle actin exprimiert und Mikrofilamente, Interzellulär- und Gapjunctions und Zell-Stromaverbindungen (Fibronexus) aufweist (15,124,128).

Es ist wichtig festzuhalten, dass die hier dargestellten Fibroblasten, die ein positives Färbeverhalten für  $\alpha$ -smooth muscle actin zeigten, nicht die voll ausgeprägten Mikrofilamente und Fibronexus, die nur im Elektronenmikroskop sichtbar sind, aufweisen könnten und somit das ultrastrukturelle Kriterium für einen Myofibroblasten nur teilweise erfüllen könnten. In einer immunhistologischen Studie, die zusätzlich elektronenmikroskopische Untersuchungen durchführte, wurden  $\alpha$ -smooth muscle actin positive Zellen ohne Mikrofilamente dargestellt (128). Damit zeigt die hier durchgeführte immunhistologische Färbung nur die Präsenz von kontraktilen Protein und kontraktilen Potential, nicht aber zwangsläufig das Vorhandensein eines kontraktilen Apparates, so dass zur weiteren Untermauerung der Ergebnisse eine vergleichende elektronenmikroskopische Analyse notwendig erscheinen könnte. Andere Arbeitsgruppen haben allerdings in der Remodelingphase des heilenden medialen Kollateralbandes des Kaninchens sowohl immunhistochemisch als auch elektronenmikroskopisch eindeutig Myofibroblasten nachgewiesen (45).

Ein weiterer interessanter Aspekt der vorliegenden Arbeit ist, dass es sowohl beim humanen VKB als auch bei der Patellarsehne und bei der Quadricepssehne Regionen gibt, in denen bestimmte Myofibroblastenformen (rund, ovoid, spindelförmig) verstärkt vorkommen.

Beim humanen VKB zeigte sich, dass diese drei morphologisch verschiedenen Myofibroblastenformen nicht gleichmäßig verteilt waren, sondern konnten eindeutigen anatomisch- histologischen Zonen zugeordnet werden, wie auch schon Murray und Spector erstmalig 1998 beschrieben hatten. Spindelförmige Zellen zeigten sich in der äußeren proximalen Zone des humanen vorderen Kreuzbandes, ovoide Zellen fand man in zentralen Arealen, die sich dort in Kolumnen darstellten, was sich auch mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen deckt (96) und eine Übergangszone zwischen den spindelförmigen und den runden Myofibroblasten bildeten. Spheroide oder auch runde Myofibroblasten konnten dann im distalen Anteil nachgewiesen werden.

Bei der Patellarsehne zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie beim VKB, dort konnten auch verschiedene anatomisch- histologische Zonen bezüglich Myofibroblastenmorphologie unterschieden werden.

Die anatomische Verteilung der Myofibroblasten ist allerdings genau umgekehrt wie beim VKB, im

proximalen Viertel der Sehne finden sich hauptsächlich runde Zellen (VKB spindelförmig), dann folgt eine kurze Übergangszone mit ovoiden Myofibroblasten, ähnlich wie beim VKB. Im Hauptanteil der Sehne (ca. drei Viertel) lassen sich bei der Patellarsehne spindelförmige Zellen nachweisen (VKB rund), ähnlich wie beim VKB lassen sich aber im distalen Abschnitt der Sehne wieder runde Myofibroblasten finden.

Bei der Quadricepssehne treten im Gegensatz zum VKB und zur Patellarsehne die runden, ovoiden und spindelförmigen Myofibroblasten aber gemeinsam nebeneinander in den Präparaten auf. Sie lassen sich hauptsächlich in den proximalen und medialen Segmenten nachweisen, in den letzten distalen Abschnitten herrschen wieder spindelförmige Zellformen vor.

Bei allen anderen untersuchten Präparaten lassen sich hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten nachweisen.

Diese Entdeckung der Variation des Vorkommens und Verteilung der Myofibroblastenformen innerhalb des VKB und der Sehnen ist insofern wichtig, als dass sie metabolisch oder phänotypisch unterschiedliche Areale repräsentieren könnten und so entsprechend auf biomechanische Belastung oder Verletzungen adaptiv mit unterschiedlichen Zellformen reagieren könnten und es sich so vermuten lässt, dass die funktionellen Ansprüche an die Myofibroblasten im Gewebe variieren (96). Auffällig ist, dass alle langen Sehnen-Transplantate (Semitendinosus, Gracilis und Tibialis anterior) eine geringe Variation der Myofibroblastenformen (hauptsächlich spindelförmig) aufweisen, was unter anderem ein Hinweis auf einen biomechanisch unidirektionalen Kraftvektor sein könnte.

Eine zusätzliche interessante Feststellung der Arbeit ist die Tatsache, dass es zwar Unterschiede in der Myofibroblastenform und deren Verteilung innerhalb des VKBs und einiger Transplantate gibt (s.o.), die Myofibroblastenhäufigkeit innerhalb der untersuchten Präparate aber relativ homogen ist und beim vorderen Kreuzband, sowie bei den Transplantaten in unserer Untersuchung nahezu bis zu 50% der Gesamtzellzahl ausmachen. Dies könnte die Schlussfolgerung zulassen, dass das ubiquitäre Vorkommen von Myofibroblasten essentiell für die Bandhomöostase sein könnte (62,136).

Weiterhin ist in der vorliegenden Untersuchung aufgefallen, dass es bei unterschiedlichen Myofibroblastenformen auch zu einem unterschiedlichen Crimpverhalten kommt. So konnte beobachtet werden, dass bei dem Vorkommen von runden und auch ovoiden Myofibroblasten eine hochfrequente Crimpformation imponierte (siehe Abb. 16, 28, 29), bei spindelförmigen Zellformen eher eine niedrige Crimpformation vorherrschte (siehe Abb. 15, 30). Dies könnte zur Schlussfolgerung führen, dass die unterschiedlichen Myofibroblastenformen unterschiedliche metabolische Zustände oder Aktivitätsniveaus repräsentieren oder gar phänotypisch unterschiedliche Zellen sind (96), die sich entsprechend den biomechanischen und biologischen Verhältnissen im Gewebe ausrichten und anpassen.

Zusammenfassend lässt sich also postulieren, dass  $\alpha$ -smooth muscle actin positive Zellen, so genannten Myofibroblasten, einen regulären Bestandteil nicht nur des humanen vorderen Kreuzbandes, sondern auch seiner autologen Sehnen transplantate darstellen. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass die Patellarsehne und die Quadricepssehne bezüglich Zellpopulation und histologischen Eigenschaften von allen untersuchten Präparaten dem humanen vorderen Kreuzband am ähnlichsten erscheinen. Auch konnte nachgewiesen werden, dass ein positiver Zusammenhang zwischen Myofibroblastenhäufigkeit und Frequenz des Kollagencrimp besteht und vermutet werden kann, dass Myofibroblasten ein integraler Bestandteil zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase sind.

Es liegt auf der Hand, dass weitere Untersuchungen mehr Licht in die komplexen Verhältnisse, Aufgaben und Funktion von Myofibroblasten bezüglich ihrer Rolle im Gewebeverband bringen können.

Das vordere Kreuzband ist eine sehr wichtige Struktur im Kniegelenk, die die normale Funktion im Kniegelenk gewährleistet, wobei Schädigungen oder Zerstörung des vorderen Kreuzbandes zu frühen degenerativen Verschleißerscheinungen führen können. Aktuell werden Kreuzbandrisse durch isometrisch platzierte allogene oder autogene Sehnen transplantate ersetzt, die sich morphologisch und biochemisch vom VKB unterscheiden. Letztendlich durchlaufen die Transplantate einen Remodelingprozess, um sich dem vorderen Kreuzband morphologisch und strukturell anzupassen.

Der erste Schritt, um diese komplexen Vorgänge besser zu verstehen und zu optimieren erfordert sicherlich die Erforschung und Definition von Vaskularisierung, Innervation, Struktur und Zellpopulation der Transplantate und des VKB.

Diese Arbeit soll dazu ihren Teil bezüglich der Erforschung von Struktur und Zellpopulation beitragen und Anregungen für die Beantwortung neuer Fragen geben.

## 5. Zusammenfassung

Die Actin Isoform Alpha-smooth muscle actin (ASMA) wurde unter anderem im Gewebe von normalen Sehnen und Bändern in Fibroblasten nachgewiesen. Diese hochdifferenzierten Zellen, so genannte Myofibroblasten, könnten innerhalb der Extrazellulärmatrix Zugkräfte ausüben, wie sie bei der Wundheilung vorkommen. Es wird daher vermutet, dass diese Zellen eine bedeutende Rolle bei der Gewebekontraktion spielen. Man hat weiterhin herausgefunden, dass während der Heilung von Bändern und Sehnen die Myofibroblasten hochreguliert werden und man nun davon ausgeht, dass die kontraktile Potenz dieser Zellen für die Formation der Kollagentertiärstruktur, dem so genannten Crimp verantwortlich ist. Bekannt ist außerdem, dass die beim Kreuzbandersatz verwendeten Sehnentransplantate einen so genannten Remodelingprozess durchlaufen und sich auf diese Weise histomorphologisch und strukturell dem VKB angleichen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zunächst einmal herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Myofibroblasten im Gewebe und der Ausbildung bzw. der Frequenz der Kollagentertiärstruktur von Bändern und Sehnen besteht. Des Weiteren wurde untersucht, ob es Unterschiede bezüglich Myofibroblastenform und- verteilung innerhalb der untersuchten Präparate gibt. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob man eine Sehne aufgrund ihrer dem VKB ähnlichen histomorphologischen Konfiguration als Sehnentransplantat für einen vorderen Kreuzbandersatz empfehlen kann, um den Remodelingprozess zu verkürzen.

Semitendinosus-, Gracilis-, Quadriceps- und Tibialis anterior Sehnen und vier vordere Kreuzbänder wurden von menschlichen Multiorganspendern kurz nach deren Tod entnommen und immunhistochemisch aufbereitet um die ASMA-positiven Zellen zu identifizieren. Bei zehn zufällig ausgewählten Regionen pro Segment wurde mit Hilfe der digitalen Bildanalyse die Anzahl der ASMA positiven Zellen festgestellt. Dieselben Regionen wurden dann unter polarisiertem Licht untersucht und die Distanz zwischen den Kollagenwellenbergen (Crimpdistanz) bzw. Crimpfrequenz der Kollagentertiärstruktur betrachtet. Für die statistische Berechnung wurde Pearson's Korrelationsanalyse mit einer Stärke von 80% benutzt.

Es ließ sich bei allen untersuchten Sehnen sowie beim vorderen Kreuzband eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Myofibroblasten und der Crimpdistanz nachweisen. Am ausgeprägtesten zeigte sich die Korrelation bei der Patellarsehne. Die Semitendinosussehne, das vordere Kreuzband, die Quadricepssehne und die Tibialis anterior Sehne hatten ähnliche Werte, am wenigsten ausgeprägt zeigte sich die Korrelation bei der Gracilissehne. Die Patellarsehne und die Quadricepssehne scheinen aufgrund ihrer histomorphologischen Beschaffenheit dem VKB am ähnlichsten und somit vom Aspekt des

Transplantatremodelings als Transplantat am besten geeignet. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass beim vorderen Kreuzband, bei der Patellarsehne und auch bei der Quadricepssehne in bestimmten anatomischen Regionen verschiedene Myofibroblastenformen (rund, ovoid, spindelförmig) vorherrschen, bei den anderen Transplantaten finden sich hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten. Einen signifikanten Unterschied bezüglich Myofibroblastenhäufigkeit innerhalb der Segmente gab es nicht. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Myofibroblastenform auch Einfluss auf das Crimpverhalten haben könnte.

In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Myofibroblasten einen regulären Bestandteil nicht nur des humanen VKB, sondern auch seiner autologen Sehnen-Transplantate darstellen.

Es besteht nun die Hypothese, dass Myofibroblasten eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Kollagentertiärstruktur spielen, basierend auf der Erkenntnis, dass die Gewebereiche mit der höchsten Crimpfrequenz auch die höchste Anzahl von Myofibroblasten aufweisen. Es ist wahrscheinlich, dass Myofibroblasten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Kollagentertiärstruktur eine wichtige Rolle spielen und sie als ein integraler Bestandteil des normalen Bindegewebes betrachtet werden sollten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. AAOS press release: 6 Million A Year Seek Medical Care For Knees. *Arthroscopy* 1997
2. Adler K, Craighead J, Vallyathan N, Evans J: Actin-containing cell in human pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 102:427-437, 1981
3. Aglietti P., Buzzi R, Zaccherotti G, De Biase P : Patellar tendon versus doubled Semitendinosus and Gracilis tendons for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 22:211;217, 1994
4. Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W: Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* 1:257-265, 1984
5. Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH: The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res* 4:162-172, 1986
6. Andersson C, Odensten M, Gillquist J: Knee function after surgical or nonsurgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period. *Clin Orthop* 255-263, 1991
7. Arnoczky SP: Blood supply to the anterior cruciate ligament and supporting structures. *Orthop Clin North Am* 16:15-28, 1985
8. Arnoczky, SP., Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop*:172 19-25, 1983
9. Arnoczky SP, Warren RF, Ashlock MA: Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft: An experimental study. *J Bone Joint Surg* 68A:376-385,
10. Arnold JA, Coker TP, Heaton LM, et al: Natural history of anterior cruciate tears. *Am J Sports Med* 7:305-313, 1979
11. Arora PD, McCulloch CA: Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 159:161-175, 1994
12. Augustine RW: The unstable knee. *Am J Surg* 92:380-388, 1956
13. Bach, B.R., Jr., Levy, M.E., Bojchuk, J., Tradonsky, S., Bush-Joseph, C.A.and Khan, N.H.,Single-incision endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Minimum two-year follow-up evaluation. *Am J Sports Med* 26: 30-40, 1998
14. Bach, B.R., Jr., Tradonsky, S., Bojchuk, J., Levy, M.E., Bush-Joseph, C.A.and Khan, N.H.,Arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Five- to nine-year follow-up evaluation. *Am J Sports Med* 26: 20-9, 1998
15. Baur P, Parks D: The myofibroblast anchoring strand: The fibronectin connection in wound healing and the possible loci of collagen fibril assembly. *J Trauma* 23:853-862, 1983



16. Becker, B., Elektronenmikroskopische Untersuchung der Insertion von Sehnen am Knochen. *Arch. orthop. Unfall-Chir.* 69: 315-29, 1971
17. Becker, W. and Krahl, H., *Die Tendopathien.* 1978, Stuttgart: Thieme.
18. Benjamin, M., Evans, E.J. and Copp, L., The histology of tendon attachments to bone in man. *J Anat* 149:89-100, 1986
19. Bhathal PS: Presence of modified fibroblasts in cirrhotic livers in man. *Pathology* 4:139-144, 1972
20. Bircher E: Die Arthroendoskopie. *Zentralbl Chir* 1460-1461, 1921
21. Bircher E: Beitrag zur Pathologie und Diagnose der Meniscus-Verletzung. *Bruns Beitr Klin Chir* 127:239-250, 1922
22. Blauth W : Die zweizügelige Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes aus der Quadricepssehne. *Unfallheilkunde* 87:45, 1984
23. Boenisch T: Antikörper. *Handbuch immunchemischer Färbemethoden II* 3:9-15, 2002
24. Bonnet A: Traité de thérapeutique des maladies articulaires. pp 354-357. Paris, Baillière, 1853
25. Bosch U, Kasperczyk W, Oestern H, Tscherne H: Die Einheilungsphasen beim autogenen hinteren Kreuzbandersatz. *Unfallchirurg* 93:187-196, 1990
26. Bosch U, Kasperczyk WJ: The healing process after cruciate ligament repair in the sheep model. *Orthopade* 22:366-371, 1993
27. Boszotta H :Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using a patellar tendon graft in press-fit technique: surgical technique and follow-up. *Arthroscopy* 13: 332, 1997
28. Brand J., Weiler A., Cabron D., Johnson D., Brown C.,: Graft fixation in cruciate ligament surgery.: Current concepts *Am J Sports Med* 28:761-774, 2000
29. Brown Jr CH, Steiner ME, Carson EW: The use of hamstring tendons for anterior cruciate ligament reconstruction. Technique and results. *Clin Sports Med* 12:723, 1993
30. Burman MS, Finkelstein H, Mayer L: Arthroscopy of the knee-joint. *J Bone Joint Surg* 16:255-268, 1934
31. Butler DL, Noyes FR, Grood ES: Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. A biomechanical study. *J Bone Joint Surg [Am]* 62:259-70, 1980
32. Campbell W. Reconstruction of the ligaments of the knee *Am J Surg* 43: 473-480, 1930
33. Claes L, Neugebauer R: In vivo and in vitro investigation of the longterm behaviour and fatigue strength of carbon fibre ligament replacement. *Clin Orthop* 196:99, 1985

34. Clark, J. and Stechsulte, D.J., Jr., The interface between bone and tendon at an insertion site: a study of the quadriceps tendon insertion. *J Anat.* 192 :605-16, 1998
35. Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 200-202, 1941
36. Cooper, R.R. and Misol, S., Tendon and ligament insertion. A light and electronmicroscopic study. *J Bone Joint Surg [Am]* 52 1-20, 1970
37. Cotton FJ, Morris GM: Artificial ligaments at the knee: Technique. *New Engl J Med* 210:1331, 1934
38. Dandy D., Gray A.: Anterior cruciate ligament reconstruction with the Leeds-Keio prosthesis plus extra articular tendonesis: Results after six years. *J Bone Joint Surg* 76B: 193-197, 1994
39. Denk H: Immunhistochemische Färbemethoden. In: *Mikroskopische Technik* pp 251-261. Ed by P Böck. München, Wien, Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1989
40. Desmoulière A., Gabbiani G.: Tissue repair, contraction, and the Myofibroblast *Wound Rep Reg* 2005;13:7-12
41. Dodds JA, Arnoczky SP: Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction. *Arthroscopy* 10:132-9, 1994
42. Dolgo-Saburoff, B., Über Ursprung und Insertion der Skelettmuskeln. *Anat. Anz.* 68: 80-87, 1929.
43. Dupont JY, Scellier C: Intra-articular lesions and their development in old ruptures of the anterior cruciate ligament. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 72 Suppl 2:112-114, 1986
44. Dustmann M, Schmidt T, Gangey I, Unterhauser FN, Weiler A, Scheffler SU: The extracellular remodeling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*; [Epub ahead of print] 2008 Jan 9
45. Faryniarz DA, Chaponnier C, Gabbiani G, Yannas IV, Spector M: Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction. *J Orthop Res* 14:228-237, 1996
46. Feagin JA, Curl WW: Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5 year follow-up study. *Am J Sports Med* 4:95-100, 1976
47. Fetto, J. and Marshall, J., The natural history and diagnosis of anterior cruciate ligament insufficiency. *Clin Othop Rel Res.* 147: 29-38 , 1980
48. Friederich, N.F., Kniegelenkfunktion und Kreuzbänder. Biomechanische Grundlagen für Rekonstruktion und Rehabilitation. *Orthopäde.* 22: 334-42, 1993

49. Friedrich, N., O'Brien, W. and Müller, W. How important is isometric placement of anterior cruciate substitutes? *in AAOS 57th Annual meeting. Scientific exhibition, 1990*
50. Fukubayashi T, Torzilli PA, Sherman MF, Warren RF: An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation, and torque. *J Bone Joint Surg Am* 64:258-264, 1982
51. Fulkerson JP, Langeland R: An alternative cruciate reconstruction graft: the central quadriceps tendon. *Arthroscopy* 11:252, 1995
52. Gabbiani G: Some historical and philosophical reflections on the Myofibroblast concept. *Curr Top Pathol* 93:1-5, 1999
53. Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G: Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 135:719-734, 1972
54. Gabbiani G, Majno G: Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66:131-146, 1972
55. Gillquist J., Odenstein M.: Reconstruction of old anterior cruciate ligament tears with a Dacron prosthesis: A prospective study *Am J Sports Med* 21:358-366, 1993
56. Glousman R., Shields C., Kerlan R., Jobe F., Lombardo S., Yocum L., Tibone J., Gambardella R. : Gore-Tex prosthetic ligament in anterior cruciate deficient knees. *Am J Sports Med* 16: 321-326, 1988
57. Grood ES, Noyes FR: Cruciate ligament prosthesis: Strength, creep, fatigue properties. *J Bone Joint Surg (A)* 58:1083-1088, 1976
58. Hadjicostas P.T., Soucacos P.N., Berger I, Koleganova N ,Paessler H.H.: Comparative analysis of the morphologic structure of quadriceps and patellar tendon: a descriptive laboratory study. *Arthroscopy* 23: 744-750, 2007
59. Hadjicostas P.T., Soucacos P.N., Paessler H.H., Koleganova N., Berger I.: Morphologic and histological comparison between the patella and hamstring tendon grafts: a descriptive and anatomic study *Arthroscopy* 23: 751-756, 2007
60. Halata Z, Wagner C, Baumann KI: Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (Lig. cruciatum anterius) of sheep. *Anat Rec* 254:13-21, 1999
61. Harner CD, Olsen E, Irrgang JJ, Silverstein S, et al: Allograft versus Autograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop* 324:134, 1996
62. Harris AK, Stopak D, Wild P: Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290:249-251, 1981

63. Harris A, Wild P, Stopak D: Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 208:177-179, 1980
64. Herman IM: Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5:48-55, 1993
65. Hertel P: Frische und alte Kreuzbandverletzungen. *Unfallchirurg* 99:686, 1996
66. Hey Groves E: Operation for repair of the crucial ligaments. *Lancet* 674-675, 1917
67. Höher J. und Tiling T.:Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie, *Chirurg (2000)* 71: 1045-1054
68. Holmes, P., James, S.and Larson, R., Retrospective direct comparison of three intraarticular anterior cruciate ligament reconstructions. *Am J Sports Med.* 19: 596-600 , 1991
69. Hurov, J.R., Soft-tissue bone interface: how do attachments of muscles, tendons, and ligaments change during growth? A light microscopic study. *J Morphol* 189: 313-25, 1986
70. Jackson DW, Frank CB: the science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 79:1556, 1997
71. Jackson DW, Grood ES, Goldstein JD, Rosen MA,et al: A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med* 21:176, 1993
- 72.Järvinen T.A.H., Järvinen T. L. N., Kannus P. Laszlo J. Järvinen M. Collagen fibres of spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle *J Orthop Res* 22: 1303-1309, 2000
73. Jenkins DHR, McKibbin B: The role of flexible carbon fibre implants as tendon and ligament substitute in clinical practice. *J Bone Joint Surg (B)* 62:497-499, 1980
74. Johansson H, Sjörlander P, Sojka P: A sensory role for the cruciate ligaments. *Clin Orthop* 268:161-178, 1991
75. Johnson, R. and al., e., Five-to ten-year follow-up evaluation after reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Clin orthop Rel Res.* 226: 122-140, 1984
76. Jones R, Smith A: On rupture of the crucial ligaments of the knee and on fractures of the spine of the tibia. *Br J Surg* 1:70-89, 1913
77. Kannus P: Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10: 312-320, 2000
78. Kapanci Y, Ribaux C, Chaponnier C, Gabbiani G. Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung .*J Histochem Cytochem.*;40(12):1955-63. 1992
79. Kennedy JC: Application of prosthetics to anterior cruciate reconstruction and report. *Clin Orthop* 172:125-128, 1983

80. King G, Edwards P, Brant R: Freeze- thawing impairs long term healing of a rabbit medial collateral ligament autograft model. *Trans Orthop Res Soc* 17:660, 1992
81. Kneese, K. and Biermann, H., Die Knochenbildung an Sehnen und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. *Zeitschrift für Zellforschung* 49:142-187, 1958
82. Kreuzschner PH: Semilunar cartilage disease. A plea for early recognition by means of the arthroscope and early treatment of this condition. *Int Med J* 47:290-292, 1925
83. Kurosaka M, Yoshiya S, Andrish JT: A biomechanical comparison of different surgical techniques of graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 15:225, 1987
84. Küsswetter, W. and Refior, H.J., Vergleichende licht- und rasterelektronmikroskopische Untersuchungen zum morphologischen Aufbau der knöchernen Bandinsertion. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 123: 876-9, 1985
85. Lobenhoffer H: Kniebandverletzungen. I. Anatomie, Biomechanik, Diagnostik, Indikationsstellung. *Chirurg* 70:219-230, 1999
86. Maeda A, Shino K, Horibe S, Nakata K, Buccafusca G: Anterior cruciate ligament reconstruction with multistranded autogenous Semitendinosus tendon. *Am J Sports Med* 24:504, 1996
87. Macey HB: A new operative procedure for repair of ruptured cruciate ligaments of the knee joint. *Surg Gynecol Obstet* 69:108-109, 1939
88. Markolf, K.L., Burchfield, D.M., Shapiro, M.M., Cha, C.W., Finerman, G.A. and Slauterbeck, J.L., Biomechanical consequences of replacement of the anterior cruciate ligament with a patellar ligament allograft. Part II: forces in the graft compared with forces in the intact ligament. *J Bone Joint Surg Am.* 78: 1728-34, 1996
89. Markolf, K.L., Burchfield, D.M., Shapiro, M.M., Davis, B.R., Finerman, G.A. and Slauterbeck, J.L., Biomechanical consequences of replacement of the anterior cruciate ligament with a patellar ligament allograft. Part I: insertion of the graft and anterior posterior testing. *J Bone Joint Surg Am* 78:1720-7, 1996
90. Marshall, J. and Warren, R., Primary surgical treatment of anterior cruciate ligament lesions. *Am J Sports Med* 10:103-6, 1982
91. Mayo Robson AW : Ruptured cruciate ligaments and their repair by operation. *Ann Surg* 716-718, 1903
92. McDaniel, W. and Jr, D.T., Untreated rupture of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg (A)* 62: 696-705, 1980
93. McGuire, D.A., Barber, F.A., Elrod, B.F. and Paulos, L.E., Bioabsorbable interference screws for graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 15:463-73, 1999

94. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S: Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4219-4223, 1996
95. Murray MM, Martin SD, Martin TL, Spector M: Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Joint Surg Am* 82-A:1387-1397, 2000
96. Murray MM, Spector M: Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin positive cells. *J Orthop Res* 17:18-27, 1999
97. Murray, M.M., Weiler A., Spindler K.P.: Interspecies Variation in the Fibroblast Distribution of the Anterior Cruciate Ligament. *Am J Sports Med* 32: 1484-1491, 2004
98. Nagano M, Yoshiya S, Kuroda R, Kurosaka M, Mizuno K: Remodeling and healing process of bone-patellar tendon bone graft in a bone tunnel. *Trans Orthop Res Soc*:78, 1997
99. Nagle RB, Kneiser MR, Bulger RE, Benditt EP: Induction of smooth muscle characteristics in renal interstitial fibroblasts during obstructive nephropathy. *Lab Invest* 29:422-427, 1973
100. Newton, P.O., Woo, S.L., MacKenna, D.A. and Akeson, W.H., Immobilization of the knee joint alters the mechanical and ultrastructural properties of the rabbit anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 13: 191-200, 1995
101. Noyes FR, Barber SD: Allograft reconstruction of the anterior and posterior cruciate ligaments: report of ten-year experience and results. *Instruct Course Lect* 42:381, 1993
102. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL: Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg Am* 62:687-95, 757, 1980
103. Noyes FR, Barber –Westin SD: Reconstruction of the anterior cruciate ligament with human allograft. Comparison of early and later results. *J Bone Joint Surg Am* 78:524, 1998
104. Noyes, F.R., Butler, D.L., Grood, E.S., Zernicke, R.F. and Hefzy, M.S., Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *J Bone Joint Surg [Am]* 66:344-52, 1984
105. Noyes, F.R., Torvik, P.J., Hyde, W.B. and DeLucas, J.L., Biomechanics of ligament failure. II. An analysis of immobilization, exercise, and reconditioning effects in primates. *J Bone Joint Surg [Am]* 56:1406-18, 1974
106. Ochi M, Iwasa J, Uchio Y, Adachi N, Sumen Y The regeneration of sensory neurones in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Br.*;81(5):902-6. 1999 Sep

107. Odensten, M. and Gillquist, J., Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction. *J Bone Joint Surg [Am]* 67:257-62, 1985
108. Odensten, M., Hamberg, P., Nordin, M., Lysholm, J. and Gillquist, J., Surgical or conservative treatment of the acutely torn anterior cruciate ligament. A randomized study with short-term follow-up observations. *Clin Orthop* 198: 87-93, 1985
109. O'Donoghue DH: Surgical treatment of the major injuries to ligaments of the knee. *J Bone Joint Surg* 721-738, 1950
110. Pässler H, Stadler J, Berger R: Erste Ergebnisse der operativen Behandlung von 200 veralteten Kreuzbandrupturen mit einem Kunststoffband. *Hefte Unfallheilk* 189:963, 1987
111. Patzelt W.J.: Polarisationsmikroskopie, *E. Leitz, Firmenschrift* 550-51, 1974
112. Palmer I: On the injuries of the ligaments of the knee joint. *Acta Chir Scand* 2- 282, 1938
113. Petersen W, Tillmann B: Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol* 200:325-334, 1999
114. Radomsky M, Merck A, Gonsalves M, Anudokem G, Poser J. Basic fibroblast growth factor in a hyaluronic acid gel stimulates intramembranous bone formation. 22, 510. 1997. San Francisco CA. Ref Type: Conference Proceeding
115. Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen Bd 1 Bewegungsapparat 20-25 (Kollagen)1998 Thieme Verlag Stuttgart
116. Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen Bd 1 Bewegungsapparat 562-566 (Knie) 1998 Thieme Verlag Stuttgart
117. Richmond J., Manseau C., Patz R., McConville O.: Anterior cruciate ligament reconstruction using a Dacron prosthesis: A long term study *Am J Sports Med* 20:24-28, 1992
118. Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF: Tendon healing in a bone tunnel. *J Bone Joint Surg Am* 75:1795, 1993
119. Rostrup O: Reconstruction of the anterior cruciate ligament. *West J Surg Obstet Gynecol* 72:199-202, 1964
120. Rubin RM, Marshall JL, Wang J: Prevention of knee instability. Experimental model for prosthetic anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 113:212-236, 1975
121. Rushton N, D'Andy DJ, Naylor CPE: Clinical, arthroscopic and histological findings after replacement of the anterior cruciate ligament with carbon-fibre. *J Bone Joint Surg (B)* 65:308-309, 1983
122. Sachs RA, Daniel DM, Stone ML, Garfein RF: Patellofemoral problems after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 17:760, 1989

123. Schneider, H., Zur Struktur der Sehnenansatzzonen. *Z. Anatomie.* 119: 431-56 , 1956
124. Schürch W, Seemeyer T, Gabbiani G: The myofibroblast: A quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 22:141-147, 1998
125. Scranton P, Pinczewski L, Auld M, Khalfayan E: Outpatient endoscopic quadruple hamstring anterior cruciate ligament reconstruction. *Oper Tech Orthop* 6:177, 1996
126. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G: Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 3:525-533, 1979
127. Segawa, H., Omori, G., Tomita, S. and Koga, Y., Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction using hamstring tendons. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 9: 206-10, 2001
128. Serini G, Gabbiani G: Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Exp Cell Res* 250:273-283, 1999
129. Senst, W., Beitrag zur feingeweblichen Struktur der Band-Knochenverbindung. *Zentralblatt für Chirurgie* 9: 275-279 , 1974
130. Skalli O, Pelte MF, Pecllet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L: Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 37:315-321, 1989
131. Skalli O, Ropaz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G: A monoclonal antibody against alpha smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biology* 103:2787-2796, 1986
132. Shelbourne K., Gray T: Anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon graft followed by accelerated rehabilitation. *Am J Sports Med* 25: 786-795, 1997
133. Shelbourne K., Trumper R: Preventing anterior knee pain after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 25:41-47, 1997
134. Stäubli HU, Schatzmann L, Brunner P, Rincon L, Nolte LP: Quadriceps tendon and patellar ligament: cryosectional anatomy and structural properties in young adults. *J Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 4:100, 1996
135. Stecker S., Parker R.: Graft selection in knee cruciate ligament surgery: autograft, allograft and synthetic *Operative Tech Orthop* 9: 248-255, 1999
136. Stopak D, Harris A: Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. *Dev Biol* 90:383-398, 1982



137. Strobel M, Weiler A : Pitfalls and pearls for the management of the posterior cruciate ligament deficient knee. *Tech Orthop* 16:167-94, 2001
138. Südkamp N.P., Haas N.P.: Neue Wege in der Kreuzbandchirurgie : *Chirurg* 71: 1024-1033, 2000
139. Tackmann W: Das Bindegewebe und Stützgewebe. In: *Auxilium-Repetitorien der Histologie I* pp 58-89. Berlin, 1994
140. Ulmer M.G., Imhoff A. B.: Bandverletzungen am Kniegelenk I, *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 2006, 303-328
141. Unterhauser F, Bail H, Höher J, Haas N, Weiler A: Endoligamentous revascularisation of an anterior cruciate ligament graft. *Clin Orthop* 415, 2003
142. Vandekerckhove J, Weber K: At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126:783-802, 1978
143. Vandekerckhove J, Weber K: Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1106-1110, 1978
144. Weiler A., Förster C., Hunt P., Falk R., Jung T., Unterhauser F.N., Bergmann V., Schmidmeier G., Haas N.P.: The Influence of locally applied Platelet-Derived Growth Factor-BB on free tendon Graft remodelling after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction *Am J Sports Med* 32: 881-891, 2004
145. Weiler A, Hoffmann RFG, Bail H, Rehm O, Südkamp N: Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18:124-135, 2002
146. Weiler, A., Peters G., Mäurer, J. Unterhauser F.N., Südkamp N.P.: Biomechanical Properties and Vascularity of an Anterior Cruciate Ligament Graft can be predicted by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Am J Sports Med* 29:751-761, 2001
147. Weiler A, Scheffler S, Südkamp NP: Aktuelle Aspekte in der Verankerung von Hamstringsehnen-Transplantaten in der Kreuzbandchirurgie. *Chirurg* 71: 1034-1044, 2000
148. Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ, Huning M, Haas NP: Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J Orthop Res* 20:310-317, 2002
149. Wolter D: Die Biokompatibilität von Kohlefasern und Kohlenstoffmikropartikeln. In: *Alloplastischer Bandersatz* Ed by C Burri and Claes L. Bern, Huber, 1983

150. Yashuda K, Tsujino J, Ohsoshi Y, Tanabe Y, Kanedak: Graft site morbidity with autogenous Semitendinosus and Gracilis tendon. *Am J Sports Med* 23:706, 1995
151. Yashuda K, Hayashi K: Remodeling of Tendon Autograft in Ligament Reconstruction. In: *Biomechanics: Functional Adaptation and Remodeling* pp 214-250. Ed by K Hayashi, A Kamiya, and K Ono. Heidelberg, New York, Springer, 1997
152. Youmans WT: The so-called "isolated" anterior cruciate ligament tear or anterior cruciate ligament syndrome: A report of 32 cases with some observation on treatment, its effect on results. *Am J Sports Med* 6:26-30, 1978

## 7. Anhang

### Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Grafiken

- Tabelle 1: Bewegungsmechanismus und die dabei betroffenen Strukturen bei Verletzungen des Kapsel-Band-Apparates am Kniegelenk VKB= Vorderes Kreuzband, HKB= Hinteres Kreuzband, POL= Posterior Oblique Ligament ; aus M.G. Ulmer, A. B. Imhoff: Bandverletzungen am Kniegelenk I, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2006, 303-328 Seite 12
- Tabelle 2: Derzeit empfohlene Transplantate zum Ersatz der Kreuzbänder; aus J.Höher und T.Tiling: Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie, Chirurg (2000) 71: 1045-1054 Seite 15
- Tabelle 3: Entscheidungskriterien zur Transplantatauswahl aus J. Höher und T.Tiling: Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie , Chirurg (2000) 71: 1045-1054 Seite 17
- Tabelle 4: Eigenschaften des „idealen“ Transplantats zum Kreuzbandersatz ;aus J. Höher und T.Tiling :Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie, Chirurg (2000) 71: 1045-1054 Seite 19
- Tabelle 5: Vorteile bei der Verwendung von Allografts als Transplantat aus P.H. Marks , M. Cameron und F.H. Fu :Die Rekonstruktion der Kreuzbänder mit allogenen Transplantaten- Techniken, Ergebnisse, Perspektiven ; Orthopäde (1993) 22: 386-391 Seite 20
- Tabelle 6: Nachteile bei der Verwendung von Allografts als Transplantat aus P.H. Marks , M. Cameron und F.H. Fu :Die Rekonstruktion der Kreuzbänder mit allogenen Transplantaten- Techniken, Ergebnisse, Perspektiven ; Orthopäde (1993) 22: 386-391 Seite 20
- Tabelle 7: Nachweis von Myofibroblasten in verschiedenen pathologischen und gesunden Geweben Seite 25
- Tabelle 8: Histomorphologisches Erscheinungsbild der Myofibroblasten in den kurzen Transplantaten und dem vorderen Kreuzband in den verschiedenen anatomischen Regionen Seite 65

- Tabelle 9 Darstellung der mittleren zellulären Verhältnisse und mittleren Crimpdistanz der untersuchten Sehnen-Transplantate, es fällt auf, dass die langen Transplantate ähnliche Werte aufweisen, ebenso die kurzen Transplantate und das vordere Kreuzband. Die ASMA+ Zellen machen nahezu die Hälfte der Gesamtzellzahl aus Seite 67
- Tabelle 10: Es zeigt sich, dass bei allen untersuchten Präparaten eine eindeutige Korrelation zwischen ASMA+/Fläche und Wavedistance/ $\mu\text{m}$  vorhanden ist, am ausgeprägtesten bei der Patellarsehne. Die Gracilissehne hat die geringste Ausprägung einer Korrelation Seite 68
- Tabelle 11: Anleitung zur Verwendung der (1.) absteigenden und (2.) aufsteigenden Alkoholreihe Seite 98
- Tabelle 12: Mischungsverhältnis der Grundsubstanzen zur Herstellung des TBS-Spülpuffers pH 8,2 Seite 98
- Abbildung 1: Knochen-Knochen-Fixation (BPTB-Technik) mit Interferenzschrauben aus Ulmer M.G., Imhoff A. B.: Bandverletzungen am Kniegelenk I, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2006, 303-328 Seite 16
- Abbildung 2: indirekte extrakortikale Fixation mittels Endobutton und Suture plate aus Ulmer M.G., Imhoff A. B.: Bandverletzungen am Kniegelenk I, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2006, 303-328 Seite 18
- Abbildung 3: Humanes Kniegelenk mit Blick auf Kreuzbänder und Femurkondylen Seite 22
- Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ursprungs und Ansatzes der Kreuzbänder im Kniegelenk (aus F.H.Netter Interactive Atlas of human anatomy): Links: Ansicht der Femurkondylen von inferior. Rechts: Ansicht des Tibiaplateaus mit Menisken von superior. (VKB = vorderes Kreuzband, HKB = hinteres Kreuzband, MCL = mediales Kollateralband, AM = Aussenmeniskus, IM = Innenmeniskus) Seite 23
- Abbildung 5: Vorderes Kreuzband links: immunhistochemische Darstellung der Myofibroblasten mittels ASMA-Antikörper ( grüner Zellkern und rote Anfärbung des alpha smooth muscle actin, schmale Pfeile) und der Fibroblasten (grüner Zellkern, dicke Pfeile) rechts: das gleiche Präparat unter polarisiertem Licht, es ist deutlich die wellenförmige Struktur der Kollagentertiärstruktur erkennbar (Kollagencrimp) Seite 24
- Abbildung 6: Morbus Dupuytren der linken Hand Seite 26
- Abbildung 7: Ultrastrukturelle Eigenschaften der Myofibroblasten.(a) Ein typischer Myofibroblast im menschlichen Granulationsgewebe mit einer irregulären Form, einem gut ausgebildetem rauem endoplasmatischem Retikulum und einem Bündel zytoplasmatischer Mikrofilamente im Zytoplasma

(„stress fibers“) (b, c, d und e) Interzellulärjunctions zwischen Myofibroblasten. (b) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) gefolgt von einer Gapjunction (langer Pfeil) im humanen Granulationsgewebe. (c) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) in einer tiefen muskuloaponeurotischen Fibromatose (d) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) gefolgt von einer Gapjunction (langer Pfeil) bei Morbus Dupuytren (e) Intermediärjunction (kurzer Pfeil) gefolgt von einer Gapjunction (langer Pfeil) im Stroma eines invasiven duktales Mammakarzinoms (f) Gut entwickelte Fibronexus im humanen Granulationsgewebe (g) Basallamina im menschlichen Granulationsgewebe. Vergrößerungen: (a) 1:10000; (b) 1:32000; (c) 1:39000; (d) 1:78000; (e) 1:58000; (f) 1:17500; (g) 1:18900 Aus: Schürch, W.: The Myofibroblast: A quarter century after its discovery, *Am J Surg Pathol*, Volume 22(2) Februar 1998. 141-147 Seite 27

Abbildung 8: Model der Fibroblasten-Myofibroblasten Modulation: TGF $\beta$  1 wird von Thrombozyten (nicht abgebildet) und Makrophagen freigesetzt, wahrscheinlich als eine Konsequenz von GM-CSF Stimulation. Das freigesetzte TGF $\beta$  1 aktiviert stromaständige Fibroblasten zur Synthese und Organisation eines dreidimensionalen ECM Gerüstes, das Fibronectin enthält. Gemeinsam mit TGF $\beta$  1 induziert es den myofibroblastischen Phänotypen. (TGF  $\beta$ 1 = transformed growth factor  $\beta$ 1; GM-CSF=germcell-colonie stimulating factor; ECM= extracellular matrix; ED-A FN = fibronectin) Aus: Guido Serini „Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation“, *Experimental Cell Research* 250, 273-283 (1999) Seite 28

Abbildung 9: Schematische Zeichnung von Lage und Verlauf der knieversorgenden Arterien Seite 29

Abbildung 10: Hierarchischer Aufbau des Fibrinkollagens. Drei Polypeptidketten (Sekundärstruktur) bilden eine Tripelhelix, woraus Protofibrillen entstehen (Tertiärstruktur). Aus fünf Protofibrillen entsteht eine Mikrofibrille, die durch Vernetzung und Aneinanderlagerung eine Subfibrille formen. Diese wiederum lagern sich zu unterschiedlich dicken Fibrillen zusammen woraus letztendlich die Fasern (Faszikel) der Sehne gebildet werden. Modifiziert nach J. Kastelic, A. Galeski and E. Baer: “The multicomposite structure of tendon“ *Connective Tissue Research* Vol. 6, pp 11-23, 1978 Seite 33

Abbildung 11: Interferenz Farbbilddarstellung von Kollagen crimp mit Polychromatischem Licht: Kollagenfibrillen sind optisch anisotrop und zeigen bei longitudinaler Ausrichtung eine positive Doppelbrechung. Mit Hilfe polarisationsoptischer Untersuchungen kann ihre Verlaufsrichtung ermittelt werden. Aus: B. de Campos Vidal „Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy“ / *Micron* 34 (2003) 423-432 Seite 34

- Abbildung 12: Beispiel Semitendinosussehne: nach der Unterteilung in 1cm große Segmente und vor der Formalinfixierung, Entwässerung, Einbettung in Paraffin und Mikrotomieung Seite 37
- Abbildung 13: Darstellung des Kollagencrimp (200x) mittels polarisiertem Licht und Auswertung der Crimpdistanz bzw. der Kollagenfibrillenfrequenz (= Anzahl der Crimpformationen oder „Wellenberge“ pro definierter Strecke; in diesem Beispiel 7) im humanen vorderen Kreuzband Seite 44
- Abbildung 14: Schematische Darstellung der Kollagenfibrillen (Seitansicht): Je geringer die Crimpdistanz ist (= Abstand zwischen zwei Wellenbergen), desto höher ist auch die Kollagencrimpfrequenz, sie verhalten sich antiproportional zueinander Seite 45
- Abbildung 15: Humanes Vorderes Kreuzband: A) Immunhistochemische Darstellung der spindelförmigen (fusiformen) Myofibroblasten (Pfeile) mit dem typischen Anfärbeverhalten für die  $\alpha$ -smooth muscle actin Isoform im proximalen Anteil des Vorderen Kreuzbandes B) das gleiche Präparat unter polarisiertem Licht (200x) zur Darstellung der Kollagentertiärstruktur (Crimp) Seite 46
- Abbildung 16: A) Humanes Vorderes Kreuzband mit der immunhistochemischen Darstellung von ovoiden (ovalen) Myofibroblasten mit kolumnenförmigen Auftreten (Pfeile) im proximalen Anteil des Vorderen Kreuzbandes B) Darstellung des gleichen Präparates unter polarisiertem Licht (200x) : es imponiert eine intakte hochfrequente Kollagentertiärstruktur Seite 47
- Abbildung 17: A) Immunhistochemische Darstellung des humanen Vorderen Kreuzbandes mit dem Nachweis von runden (spheroiden) Myofibroblasten mit positiven roten Anfärben von  $\alpha$ -smooth muscle Aktin im distalen Anteil des VKB B) Darstellung der hochfrequenten Kollagentertiärstruktur unter polarisiertem Licht (200x) des gleichen Präparates Seite 47
- Abbildung 18: Semitendinosussehne: vor der Formalinfixierung, Dehydratation und Einbettung in Paraffin wird das Transplantat in 1 cm große Segmente unterteilt Seite 50
- Abbildung 19: A) Semitendinosussehne: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten) , die hier spindelförmig imponieren und sich in der Sehne als der dominierende Zelltyp zeigen B) Darstellung des selben Präparates unter polarisiertem Licht (200x) Seite 50
- Abbildung 20: Gracilissehne: makroskopisch intaktes Transplantat, bis auf leichte Auffaserungen im mittleren Anteil, vor der Unterteilung in ca. 1cm große Segmente Seite 52
- Abbildung 21: A) Gracilissehne: proximales Segment mit dem immunhistochemischen Nachweis von multiplen spindelförmigen  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten), mit B) Darstellung der Crimpfrequenz (polarisiertes Licht 200x) Seite 53

Abbildung 22: Tibialis anterior Sehne: vor der Unterteilung in 24 1cm gleichgroße Segmente und der entsprechenden immunhistochemischen Behandlung, makroskopische Beschädigungen lassen sich nicht erkennen Seite 55

Abbildung 23: A) Tibialis anterior Sehne, proximales Segment der Sehne mit immunhistochemischen Nachweis von wenigen spindelförmigen Myofibroblasten (Pfeile), die ubiquitär in allen Segmenten nachweisbar sind B) das selbe Präparat unter polarisiertem Licht (200x) mit der Darstellung der eher niedrigfrequenten Kollagentertiärstruktur Seite 56

Abbildung 24: Quadricepssehne mit distalem patellarem Knochenblock und proximalem freien Sehnenende mit muskulären Restanteilen, vor der Einteilung des Präparates in einen medialen und einen lateralen Anteil in ca. 1cm große Segmente und immunhistochemischer Aufbereitung Seite 58

Abbildung 25: A) Quadricepssehne mit dem immunhistochemischen Nachweis von multiplen runden (dicke schwarze Pfeile), ovoiden (dicke helle Pfeile) und spindelförmigen (schmale Pfeile) Myofibroblasten, die in der gesamten Sehne nebeneinander nachweisbar sind, bis auf den letzten distalen Abschnitt, dort sind hauptsächlich spindelförmige Myofibroblasten vorzufinden B) das selbe Präparat unter polarisiertem Licht (200x) mit regelmäßiger hochfrequenter Crimpstruktur Seite 58

Abbildung 26: A) medialer Anteil der Patellarsehne mit patellarem und tibialem Knochenblock und Unterteilung der Sehne in 5 gleiche, ca. 1cm große Segmente B) laterale Patellarsehne mit patellarem und tibialem Knochenblock und Unterteilung der Sehne in 7 gleiche, ca. 1cm große Segmente Seite 61

Abbildung 27: A) Proximaler Anteil der Patellarsehne: Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten) ,es imponieren hauptsächlich spherioide (runde) Zellen in dieser Region (Pfeile) B) Darstellung des selben Präparates unter polarisiertem Licht (200x), es zeigt sich ein sehr inhomogenes Crimpmuster mit teilweise lokal hohen Crimpfrequenzen (weiße Pfeile) Seite 61

Abbildung 28: A) Patellarsehne: distales Segment mit immunhistochemischen Nachweis von multiplen  $\alpha$ -smooth muscle Aktin positiven Zellen (Myofibroblasten) ,die hier hauptsächlich als spherioide (runde) Zellen (dicke Pfeile) imponieren und von fusiformen (spindelförmigen) Myofibroblasten (schmale Pfeile) begleitet werden B) unter polarisiertem Licht zeigt sich das selbe Präparat mit einer hochfrequenten, partiell inhomogenen Kollagentertiärstruktur Seite 62

Abbildung 29: A) Patellarsehne: Nachweis von multiplen ovoiden Myofibroblasten (Pfeile) im Übergang

vom proximalen Viertel der Sehne zu den restlichen drei Vierteln der Sehne B) hochfrequente Crimpformation des gleichen Präparates unter polarisiertem Licht (200x) Seite 62

Abbildung 30: A) Patellarsehne: Immunhistochemische Darstellung von spindelförmigen Myofibroblasten (Pfeile) mit vereinzelt runden und ovoiden Zellen in den mittleren Segmenten der Sehne Spindelförmige Zellen machen höchsten Anteil an Myofibroblasten aus B) niedrigfrequente Kollagentertiärstruktur des selben Präparates unter polarisiertem Licht (200x) Seite 63

## Grafikverzeichnis

Grafik 1: dargestellt ist die Anzahl der gesamten (ovoiden, spindelförmigen und fusiformen) Myofibroblasten/Fläche in den einzelnen Segmenten von proximal nach distal in den 4 verschiedenen vorderen Kreuzbändern. Eine signifikante Häufung von Asma+ Zellen in einer bestimmten anatomischen Region lässt sich, im Gegensatz zur Häufigkeit von morphologisch unterschiedlichen Myofibroblasten (siehe Histologie), nicht feststellen Seite 48

Grafik 2: Korrelation von Asma-positiven Zellen (Myofibroblasten) pro Fläche und Crimp pro  $\mu\text{m}$  im humanen vorderen Kreuzband : mit  $R^2 = 0,6692$  hat das VKB eine deutliche Korrelation zwischen Myofibroblastenhäufigkeit und Crimpdistanz Seite 49

Grafik 3: Dargestellt ist die Myofibroblastenzahl in den Segmenten 1 (proximal) bis 23 (distal) der Semitendinosusehne mit einer erhöhten Myofibroblastenzahl in den beiden proximalen Segmenten 1 und 2 sowie Segment 13 Seite 51

Grafik 4: Korrelation zwischen Myofibroblastenhäufigkeit pro Fläche und Wellenlänge (Crimpfrequenz) der Semitendinosusehne: Es lässt sich eine eindeutige Korrelation ( $R^2 = 0,6927$ ) feststellen, je höher die Myofibroblastenzahl ist, desto kürzer ist die Wellenlänge (Crimp/ $\mu\text{m}$ ) bzw. der Abstand zwischen den einzelnen Crimpformationen Seite 52

Grafik 5: Dargestellt ist die Myofibroblastenzahl pro Fläche in den einzelnen Segmenten der Gracilissehne, wobei hier ein relativ homogenes Verteilungsmuster ohne anatomisch-regionale Häufung auffällt, Ausnahme bilden Segment 1,7 und 14 (hohe Anzahl) und 16 (niedrige Anzahl). Seite 54

Grafik 6: Myofibroblastenzahl pro Fläche und Crimpfrequenz (Crimp/ $\mu\text{m}$ ) in der Gracilissehne: es lässt sich eine eindeutige Korrelation ( $R^2 = 0,4349$ ) feststellen, es findet sich hier allerdings die geringste Korrelation der untersuchten Präparate Seite 54

Grafik 7: Myofibroblastenverteilung in der Tibialis Anterior-Sehne von proximal nach distal. Es fällt



auf, dass in Segment 2 sehr wenige Myofibroblasten, in Segment 3 sehr viele Myofibroblasten vorkommen, eine Häufung in einer bestimmten anatomischen Region lässt sich jedoch nicht feststellen

Seite 57

Grafik 8: Darstellung von Myofibroblastenzahl (Asma+) pro Fläche und Crimp/ $\mu\text{m}$  in der Tibialis anterior-Sehne: es lässt sich eine eindeutige Korrelation mit  $R^2 = 0,6407$  feststellen

Seite 57

Grafik 9: Myofibroblastenzahl pro Fläche in den einzelnen Segmenten des medialen und lateralen Anteils der Quadricepssehne. Jeweils in den proximalen Segmenten( 1 und 6 ) des medialen und lateralen Anteils sowie im distalen Segment des lateralen Anteils (12) der Sehne fällt eine verminderte Myofibroblastenzahl auf

Seite 59

Grafik 10: Korrelation von ASMA+ Zellen pro Fläche und Wavedistance/ $\mu\text{m}$  (Crimp) in der gesamten Quadricepssehne (medialer und lateraler Anteil) : es lässt sich eine eindeutige Korrelation mit  $R^2 = 0,6555$  feststellen.

Seite 60

Grafik 11: Myofibroblastenverteilung innerhalb der gesamten Patellarsehne, es zeigt sich eine relativ homogene Verteilung der Myofibroblasten, lediglich das erste proximale Segment des lateralen Anteils zeigt ein verstärkte Häufung von ASMA+ Zellen pro Fläche

Seite 64

Grafik 12: Signifikante Korrelation zwischen Myofibroblasten pro Fläche und Crimpfrequenz der gesamten Patellarsehne: mit  $R^2 = 0,8078$  hat die Patellarsehne die höchste Korrelation der untersuchten Präparate .

Seite 64

## Untersuchungsmaterialien

### Materialien zur histologischen Aufarbeitung

Zur Entparaffinierung und Hydrierung durchliefen die Präparate die absteigende Alkoholreihe (1.).

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate wieder in der aufsteigenden Alkoholreihe (2.) dehydriert.

1. Absteigende Alkoholreihe	2. Aufsteigende Alkoholreihe	Anzahl der Durchgänge	Dauer der Einwirkung	Lösung
		2x	10 min	Xylol
		2x	2 min	100 % Alkohol
		1x	2 min	96 % Alkohol
		1x	2 min	80 % Alkohol
		1x	2 min	70 % Alkohol
		1x	kurz durchspülen	Aqua dest.

Tabelle 11: Anleitung zur Verwendung der (1.) absteigenden und (2.) aufsteigenden Alkoholreihe.

Die Präparate wurden anschließend in TBS-Spülpuffer gegeben (pH-Wert=8,2)

Substanz	1L TBS-Spülpuffer-pH:8,2	5L TBS-Spülpuffer-pH:8,2
Trisma HCLT 3253 – Sigma <sup>17</sup>	6,60g	33,0g
Trisma t 1503 Base – Sigma <sup>18</sup>	0,90g	4,5g
NaCl <sup>19</sup>	8,78g	43,9g

Tabelle 12: Mischungsverhältnis der Grundsubstanzen zur Herstellung des TBS-Spülpuffers pH 8,2

Nach Vermischen der Grundsubstanzen wurde mit destilliertem Wasser die jeweilige Gesamtmenge aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,2 titriert.

<sup>17</sup> Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508 St. Louis, US

<sup>18</sup> Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

<sup>19</sup> Natriumchlorid p.-a., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## Übersichtsfärbungen

HE - Färbung (Harris Hämalaun + Eosin)

<i>Methode:</i>
▣ 5- 6x in <b>Harris Hämatoxylin</b> tauchen (Kernfärbung)
▣ in Aqua dest. gut spülen
▣ <b>Differenzierung</b> in 0,75% HCL-Alkohol (entfärbt mitgefärbtes BG, aber auch Kerne! Deshalb nur kurz tauchen!!)
▣ <b>Bläuen</b> in reichlich warmen Wasser
▣ (Färbeüberprüfung durch Zwischenmikroskopie: bei schwacher Farbtintensität in Aqua dest. spülen und erneut Kernfärben)
▣ 3- 4x in <b>Eosin</b> ( <i>Eosin Y Solution Aqueous, Sigma Diagnostics St.Louis Missouri 63178 USA</i> ) tauchen (Cytoplasma- / Kollagenfaserfärbung)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

<i>Methode</i>
▣ In <b>Weigerts Eisenhämatoxylin</b> 2-3 min färben (Kernfärbung) ( <i>Eisen-Haematoxylin A (2E032) + Eisen-Haematoxylin B (2E052), Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co 73257 Köngen/ N</i> )
• In fließendem Wasser auswaschen 10 min
▣ In <b>Säurefuchsin-Poncheau</b> 5 min färben. ( <i>Poncheau Fuchsin Masson (2C149), Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co 73257 Köngen/ N</i> )
▣ <b>Spülen</b> in 1% iger Essigsäure
▣ <b>Differenzierung</b> in Phosphormolybdänsäure Orange G bis das Bindegewebe vollständig entfärbt ist (15 - 30 min).
▣ <b>Spülen</b> in 1% iger Essigsäure
▣ Gegenfärben mit <b>Lichtgrün</b> 5 min.
▣ <b>Spülen</b> in 1% iger Essigsäure

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl oder Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistung erhalten.

Weitere Personen waren an der schriftlichen Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leichlingen, den 28.09.2010

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

## Liste der bisherigen Veröffentlichungen

Poster

Unterhauser FN, Weiss M, Bail HJ, Haas NP, Weiler A:  
Crimp frequency is strongly  
correlated to myofibroblast density in human tendon  
tissue;49thAnnual Meeting, Orthopaedic Research  
Society, February 2-5, New Orleans, 2003

Orginalarbeit

Markus Weiss; Frank N. Unterhauser; Andreas Weiler: Crimp Frequency is  
Strongly Correlated to Myofibroblast Density in the Human Anterior  
Cruciate Ligament and its Autologous Tendon Grafts *Knee Surgery, Sports  
Traumatology, Arthroscopy* ( submitted 12/10)