

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ausschlusskriterien**

Um die angestrebte Anzahl von 54 Tieren zu erreichen mussten 59 Schafe operiert werden. Ein Tier verstarb postoperativ aufgrund eines Lungenödems und Kreislaufversagens, ein weiteres durch eine Leberegel- und Salmonellen-Infektion in der 8. Woche nach der Operation. Ein Schaf aus der Gruppe mit autologem Bandersatz wurde wegen einer äußerlichen Wundinfektion, ein anderes wegen zunehmend schlechter Belastung ohne eindeutiges pathologisches Korrelat frühzeitig aus der Studie ausgeschlossen. Bei den Schafen mit allogenen Transplantat musste lediglich ein Schaf wegen einer ausgeprägten Arthrofibrose aus der Studie ausgeschlossen werden. In der Obduktion zeigte sich das Transplantat als nicht mehr existent. Sieben Schafe aus beiden Gruppen erlitten oberflächliche Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen. Um eine eventuelle Beeinflussung auf unsere untersuchten Parameter zu verhindern wurden sie nachträglich aus der Wertung genommen, sodass schließlich 47 Tiere in den Hauptversuch aufgenommen werden konnten.

Die Ganganalyse ergab im Durchschnitt eine uneingeschränkte Belastung der operierten Gelenke nach 2 Wochen.

### **3.2 Makroskopische Auswertung**

Im zeitlichen Verlauf zeigten sich in beiden Gruppen nach 6 Wochen Standzeit starke Gefäßinjektionen und Fibrosierungen der Synovialmembran und des VKB. Diese waren nach 12 Wochen stark verringert und nach 52 Wochen nicht mehr zu erkennen. Im Gegensatz zu den autologen Transplantaten erschienen die allogenen Transplantate nach 12 Wochen makroskopisch aufgefasert. Ferner zeigte sich bei den allogenen Transplantaten zu diesem Zeitpunkt eine deutlichere Verschwärzung der extraartikulären Gewebeschichten. In der 52 Wochen Gruppe fiel bei den allogenen Transplantaten ein deutlich geringerer Durchmesser auf.

### 3.3 Mikroskopische Auswertung

#### 3.3.1 konventionelle Histologie und Gesamtzellzahl

Bei den nativen Kreuzbändern und Flexorsehnen durchzogen Gefäße gleichmäßig das Gewebe in den bindegewebigen Septen. Auch die Zellen waren regelmäßig über das ganze Präparat verteilt und longitudinal zwischen den Kollagenfasern ausgerichtet. Dabei hatten die Zellen der Flexorsehnen ein lang gezogenes, spindelförmiges Erscheinungsbild, während die Zellkerne des nativen Kreuzbandes stabförmig bis ovoid imponierten. Die Zellzahl des nativen Kreuzbandes war mit 569,3 /mm<sup>2</sup> signifikant höher als die Zellzahl der nativen Flexorsehne (266,7 /mm<sup>2</sup>). Die Synovialmembran der nativen Kreuzbänder und Flexorsehnen umfasste 1-3 Zellschichten.

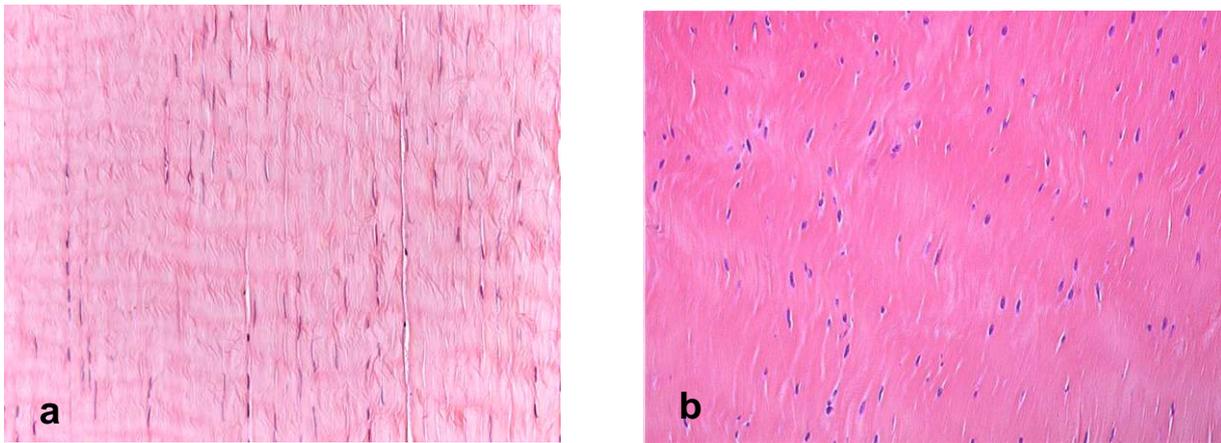
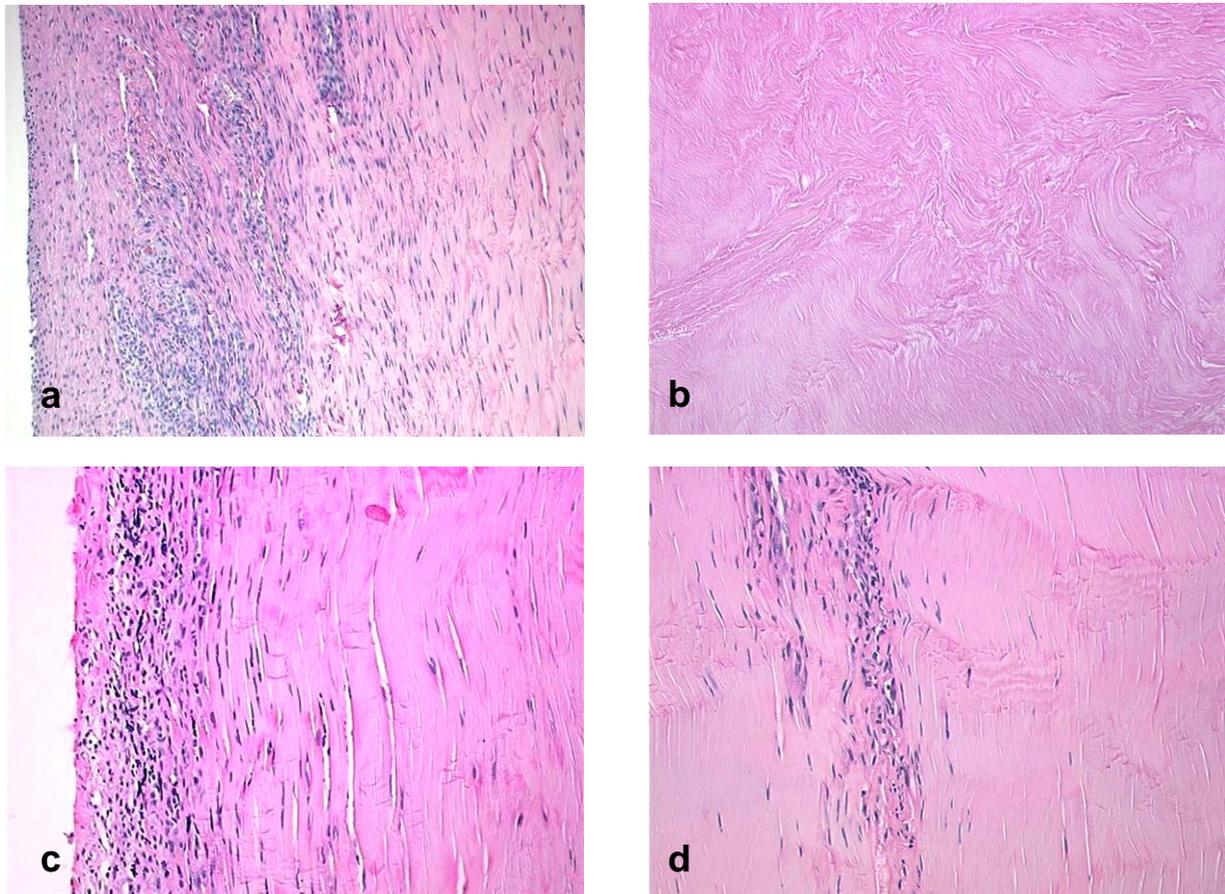


Abb. 18: Native Flexorsehne (a) und natives VKB (b) in HE-Färbung (20x): Die Zellen liegen gleichmäßig verteilt zwischen den kollagenen Fasern. In der Flexorsehne sind die Zellkerne spindelförmig und flach. Das native VKB zeigt signifikant mehr Zellen, die eine stabförmige bis ovoid Morphologie aufweisen.

Nach 6 Wochen Standzeit war die geordnete Struktur in vielen Bereichen weitgehend aufgehoben. Zentral fanden sich avaskuläre und azelluläre Bereiche (Abb. 19, b), während von peripher ein gefäß- und zellreiches Granulationsgewebe fingerförmig einwuchs (Abb. 19, d). Dabei zeigten die allogenen Transplantate eine geringere Vaskularisierung als die autologen. Auch die Zellzahl war im allogenen Transplantat mit 134,1 /mm<sup>2</sup> signifikant geringer als im autologen Gewebe mit 225,8 Zellen /mm<sup>2</sup> (Abb. 19, a, c). Dabei zeigte sich in der allogenen Gruppe eine größere Varianz zwischen den einzelnen Tieren. Die Zellkerne hatten in beiden Gruppen im freien Gewebe eine spindelförmige Gestalt, wobei sie im einwachsenden Granulationsgewebe größer und aufgedunsen erschienen. Zum Teil konnte

sogar eine Kernzeichnung beobachtet werden. Auch die Kernmorphologie der allogenen Transplantate erschien inhomogener als die der autologen Transplantate. Die Synovialmembran war bei den autologen Transplantaten 3-5lagig und bei den allogenen 4-8lagig, in einzelnen Zotten kamen bis zu 20 Zellagen vor.



*Abb. 19: Autologe (a,b) und allogene Transplantate (c,d) nach 6 Wochen Standzeit in HE-Färbung (20x). Während von der synovialen Hülle ausgehend, ein zellreiches Granulationsgewebe einwächst (a, c), finden sich zentral azelluläre und avaskuläre Bereiche (b). Bei genauer Betrachtung erkennt man, dass die Kollagenstruktur hier ungeordnet anmutet (b). Von proximal und distal bevölkern Zellen entlang der fingerförmig einwachsenden Gefäße das nekrotische Gewebe (d).*

In der 12-Wochen-Gruppe waren die Gefäße und Zellen geordneter verteilt und ausgerichtet als in der 6-Wochen-Gruppe. Die Gefäße verliefen dabei schon vereinzelt in bindegewebigen Septen. Die Gewebeordnung war im allogenen Transplantat jedoch unregelmäßiger. Zentral fanden sich hier noch nekrotische Bereiche während im autologen Gewebe Gefäße und Zellen über das ganze Transplantat verteilt waren (Abb. 20). Insgesamt war die Gesamtzellzahl im Vergleich zu den 6-Wochen-Tieren in beiden Gruppen signifikant angewachsen. Auch hier zeigten sich im allogenen Transplantat mehr Zellen (681,9 /mm<sup>2</sup>) als im autologen (571,5 /mm<sup>2</sup>), wobei dieser Unterschied nicht mehr signifikant war. Auch hier erschien die Varianz zwischen den Tieren größer in der Gruppe mit den allogenen Transplantaten. Die Zellkerne

erschieden spindelförmig bis ovoid. Bei den autologen Transplantaten erschien die Synovialmembran in 4-8 Zellagen und im autologen Gewebe mit 5-10 Zellagen.

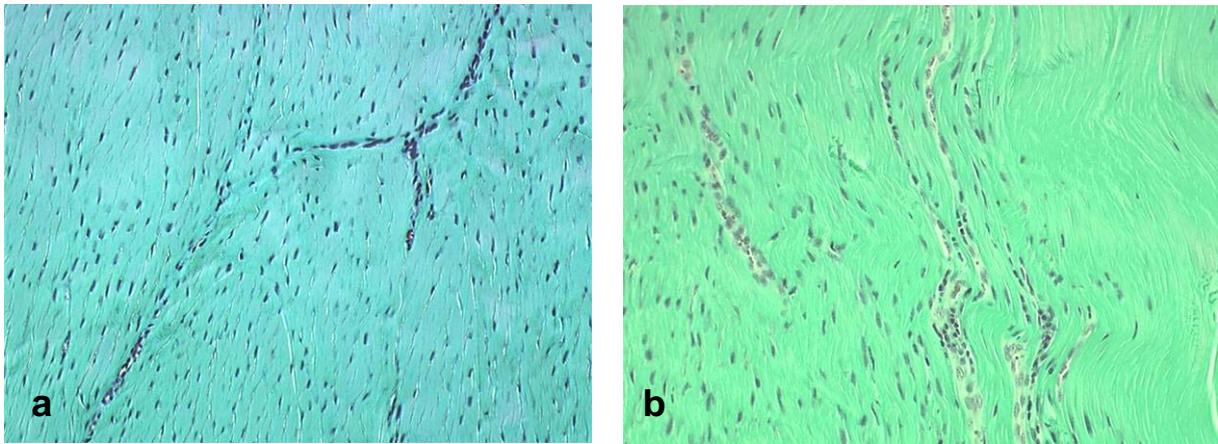


Abb. 20: Die Zellen und Gefäße sind im autologen (a) und im allogenen Transplantat (b) nach 12 Wochen wieder regelmäßiger verteilt. Es findet sich auch z.T. wieder eine Gliederung in bindegewebige Septen. Im allogenen Gewebe werden allerdings noch v.a. zentral nekrotische Areale deutlich (b). (Masson-Goldner-Färbung, 20x)

In der 52. Woche des Remodelings war eine geordnete Struktur fast vollständig wiederhergestellt. Deskriptiv fanden sich bezüglich der Gefäßverteilung keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen. Die Gefäße verliefen jedoch nicht so deutlich in bindegewebigen Septen, wie es im nativen Gewebe der Fall war. Die Gefäßdichte hat sich im Vergleich zu den 12-Wochen-Tieren wieder reduziert. Auch die Zellen verteilen sich in beiden Gruppen wieder regelmäßig über das ganze Transplantat (Abb. 21). Vereinzelt findet man noch eine Zellanreicherung um die Gefäße. In den allogenen Transplantaten konnte bei zwei Tieren jedoch noch eine zentrale Hypozellularität festgestellt werden. Quantitativ ergaben sich sowohl zwischen den beiden Gruppen als auch im Vergleich zu den 12-Wochen-Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Zellzahl war allerdings im autologen Gewebe noch etwas angestiegen ( $749,2 /\text{mm}^2$ ) während sie im allogenen Gewebe erstmalig auch unter das Niveau des autologen Transplantates abgefallen war ( $603,1 /\text{mm}^2$ ). Die Kernmorphologie hatte wieder eine stabförmige bis ovoide Gestalt angenommen. Die Synovialmembran zeigte sich in beiden Gruppen mit 1-3 Zellagen als gleich stark.

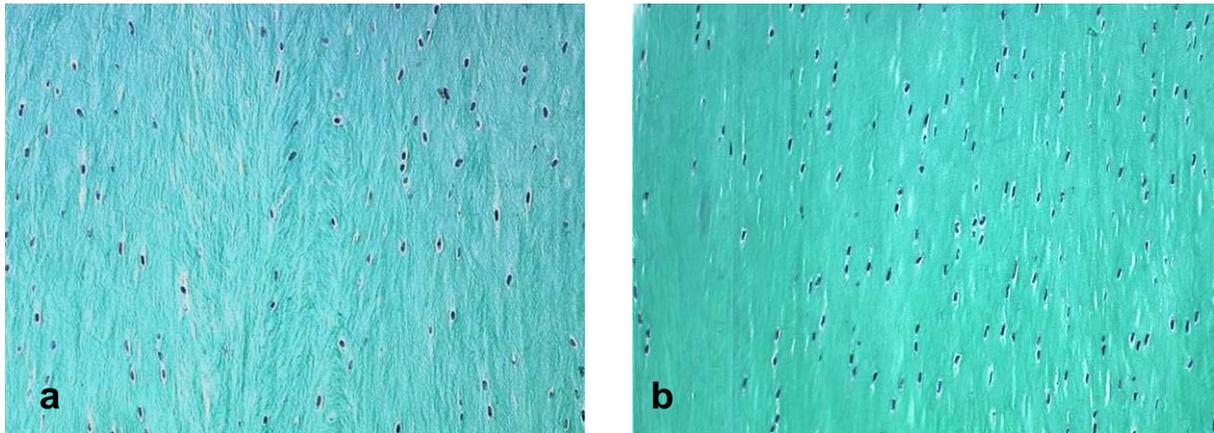
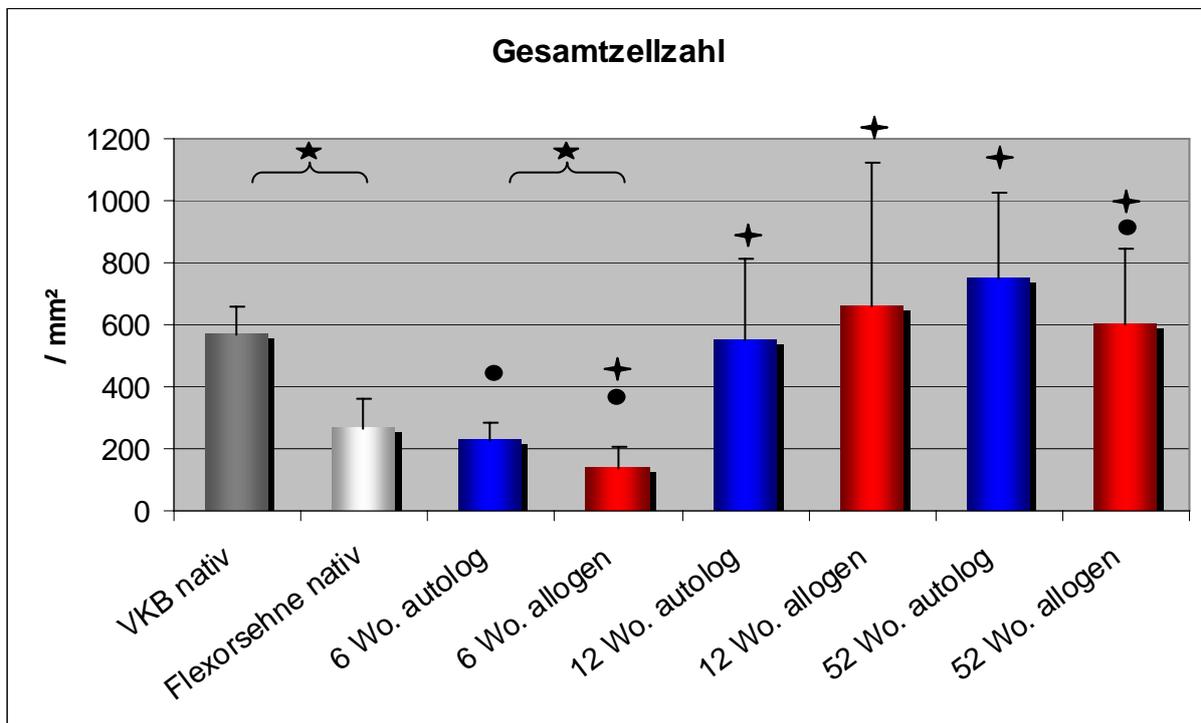


Abb. 21: Im autologen (a) und allogenen (b) Transplantat sind die Zellen nach 1 Jahr noch regelmäßiger im Gewebe angeordnet als nach 12 Wochen und haben wieder eine ovoide-stabförmige Gestalt angenommen. Die Gefäßdichte hat sich weiter reduziert. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den Gruppen nicht mehr gezeigt werden. (Masson-Goldner-Färbung, 20x)

Die Zellkerne hatten also innerhalb eines Jahres wieder die Gestalt der Kerne eines nativen VKBs angenommen. Die Zellen besiedelten das Transplantat zusammen mit den Gefäßen von peripher nach zentral und hatten sich nach einem Jahr weitgehend gleichmäßig verteilt.



Graphik 1: Die Gesamtzellzahl der Transplantate unterscheidet sich lediglich in der 6 Wochen Gruppe signifikant voneinander. In dieser frühen Phase des Remodelings ergibt sich auch noch ein signifikanter Unterschied gegenüber den nativen Kreuzbändern. Zu späteren Zeitpunkten dagegen weicht die Zellzahl von der der nativen Sehne ab. (Mittelwerte, • : signifikant gegenüber VKB nativ, †:signifikant gegenüber Flexorsehne nativ, ★: signifikante Unterschiede in den Gruppen, Signifikanz-Niveau  $p \leq 0,05$ )

Im Verlauf eines Jahres war die Zellzahl von 6 auf 12 Wochen in beiden Gruppen signifikant angestiegen und blieb danach statistisch auf diesem Niveau. Der Verlauf über ein Jahr war jedoch in beiden Gruppen voneinander abweichend: Während die Zellzahl in der Gruppe mit den autologen Transplantaten kontinuierlich über ein Jahr anstieg, fiel sie bei den allogenen Transplantaten von 12 auf 52 Wochen wieder ab, wenngleich dies jedoch nicht statistisch deutlich wurde.

Unterschiede ergaben sich auch im Vergleich mit den nativen Bändern und Sehnen: Beide Transplantate unterschieden sich schon nach 6 Wochen signifikant von den nativen Kreuzbändern, wobei die Zellzahl der allogenen Transplantate auch schon signifikant von der der nativen Flexorsehnen abwich. Nach 12 und 52 Wochen ergab sich in allen Gruppen ein signifikanter Unterschied gegenüber den nativen Flexorsehnen. Bei den allogenen Transplantaten zeigte sich aber nach 52 Wochen wieder ein Unterschied gegenüber den nativen Kreuzbändern. Insofern hatte sich die Gesamtzellzahl nach 52 Wochen in der autologen Gruppe deutlicher den nativen Kreuzbändern genähert als in der allogenen Gruppe.

Vor allem in der 12-Wochen-Gruppe und speziell bei den allogenen Transplantaten ergaben sich deutliche Standardabweichungen, die eine Varianz des remodellierenden Gewebes unterstreichen.

Zu keinem Zeitpunkt konnten wir in den Transplantaten Zeichen einer Entzündungsreaktion feststellen. So fanden wir weder in den autologen noch in den allogenen Transplantaten ein entzündungstypisches Granulationsgewebe mit Ansammlungen von Granulozyten oder Fremdkörperriesenzellen.

### **3.3.2 Immunhistologie der Myofibroblasten**

In der immunhistologischen Färbung mit ASMA zeigten die Myofibroblasten analog zu den Fibroblasten in der nativen Flexorsehne schmale, spindelförmige Kerne, die relativ regelmäßig über die Schnittfläche verteilt waren. Im intakten vorderen Kreuzband stellten sich dagegen diese Kerne stab- bis ovoidförmig dar. Es gab hier jedoch ausgedehnte Areale ohne Myofibroblasten sowie starke Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren. Dies kam auch in einer hohen Standardabweichung zum Ausdruck. Das native VKB wies dabei mit

118,1 /mm<sup>2</sup> eine höhere Anzahl dieser Zellen auf als die native Flexorsehne 101,4 /mm<sup>2</sup>, wenn auch dieser Unterschied nicht signifikant war.

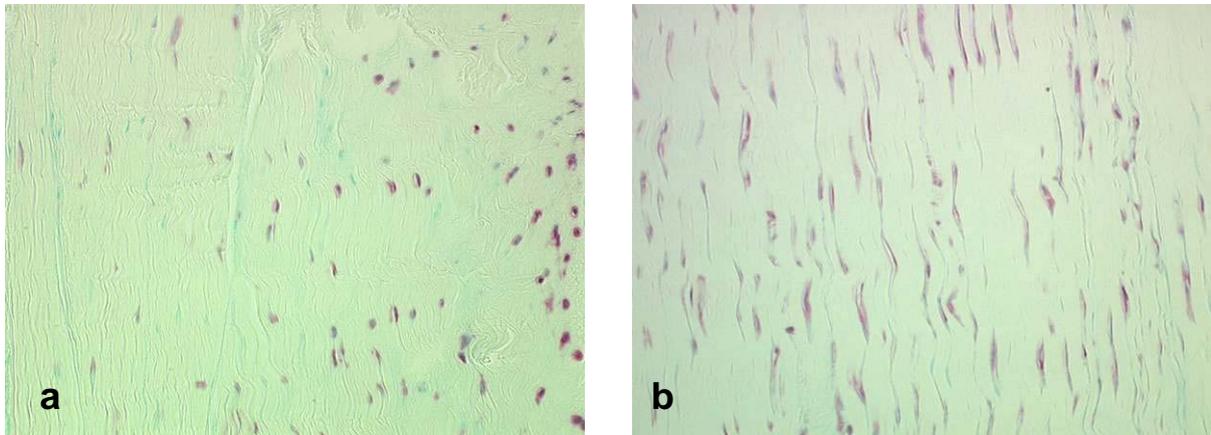


Abb. 22: VKB nativ (a), Flexorsehne nativ (b). Das intakte Vordere Kreuzband zeigt stab- bis ovoidförmige Myofibroblasten, während sie in der nativen Sehne deutlich schmäler und spindelförmig anmuten. (ASMA-Färbung, 20x)

In der 6. Woche des Einheilungsvorganges zeigten sich im Transplantat beider Gruppen spindelförmige Zellen wie sie auch in der nativen Flexorsehne zu finden waren. Sie wachsen ausgehend von Gefäßstrassen und der Synovia in das azelluläre Gewebe ein. Die Anzahl der ASMA positiven Zellen war bei den 6-Wochen Tieren geringer als in den nativen Bändern und Sehnen. Für die allogenen Transplantate (28,6 /mm<sup>2</sup>) war der Unterschied sogar gegenüber den nativen Flexorsehnen signifikant geringer. Im autologen Transplantat fanden sich mehr Zellen (60,8 /mm<sup>2</sup>).

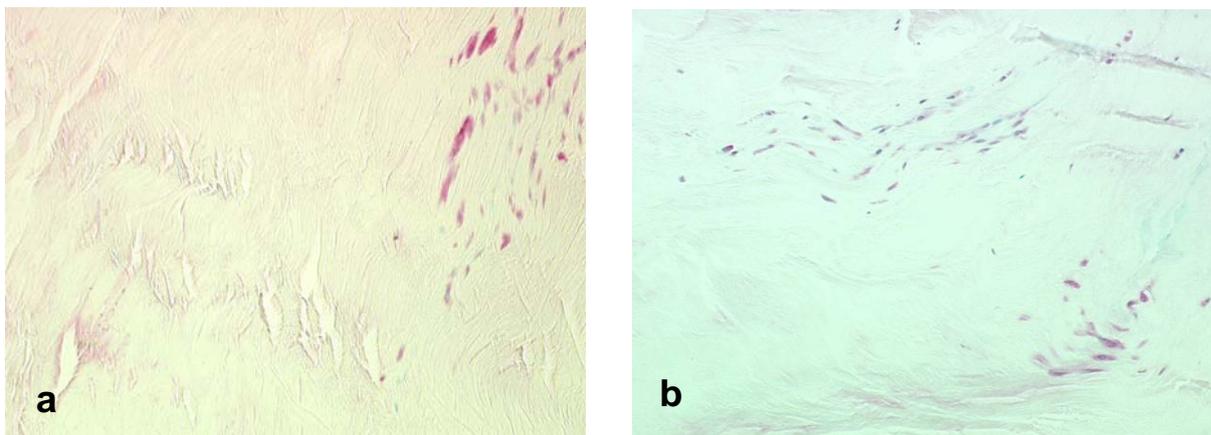


Abb. 23: Myofibroblasten der 6-Wochen Tiere. Autologes Transplantat (a), allogenes Transplantat (b): Die Myofibroblasten wachsen fingerförmig von peripher in das azelluläre Gewebe ein. (ASMA-Färbung, 20x)

In den 12-Wochen Gruppen hatten die Zellen einen spindelförmig bis ovoiden Charakter. Obwohl es innerhalb eines Schnittes noch große Unterschiede gab, waren sie schon regelmäßiger verteilt als nach 6 Wochen. Die Myofibroblastendichte war in beiden Gruppen signifikant angestiegen, wobei die Anzahl in den autologen Transplantaten ( $170,6 /\text{mm}^2$ ) die der allogenen Transplantate ( $93,9 /\text{mm}^2$ ) signifikant übertraf.

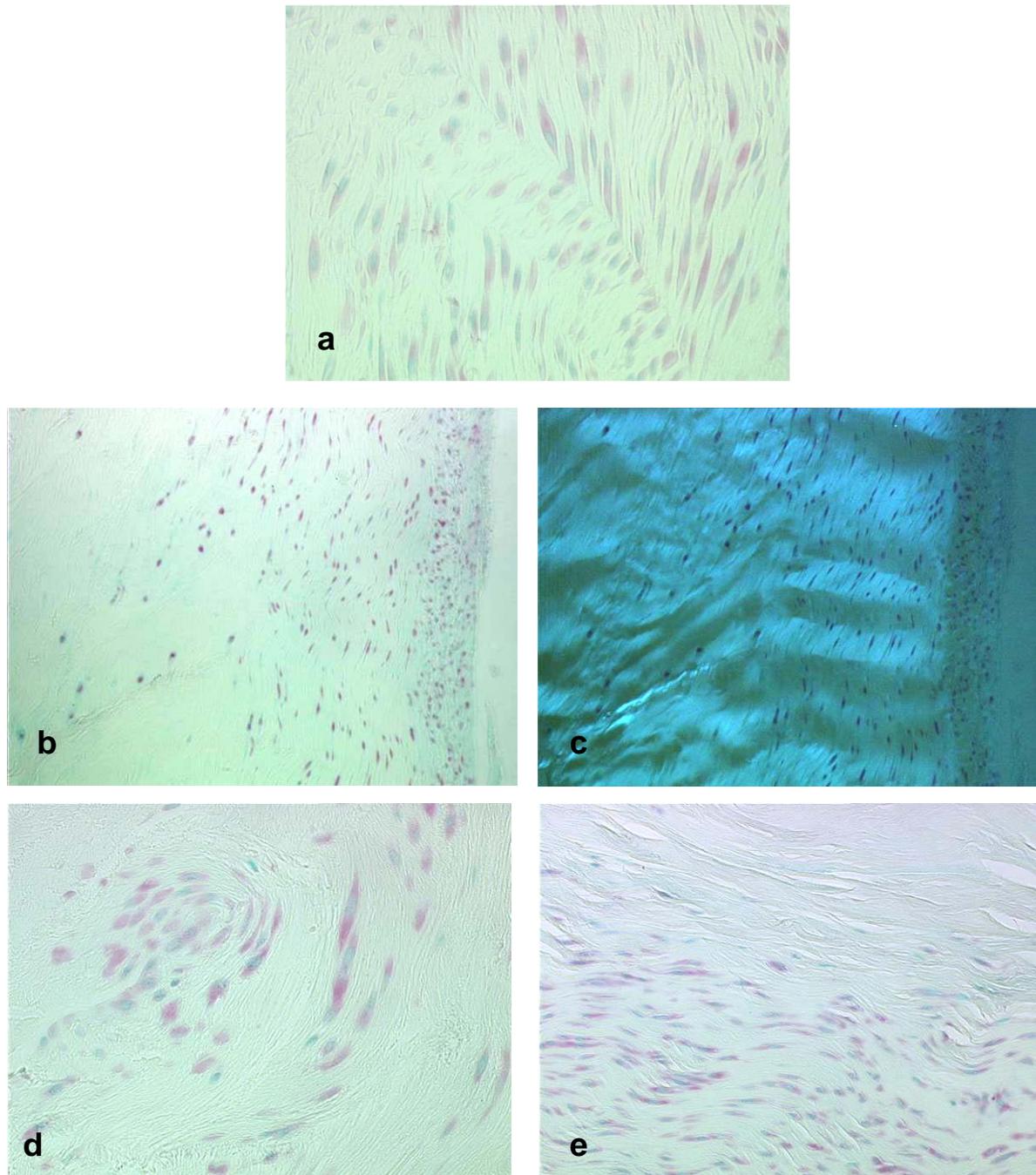


Abb. 24: autologe Transplantate (a,b,c) und allogene Transplantate (d ,e) nach 12 Wochen. Die Zellen richten sich entlang der Kollagentertiärstruktur aus (a, 40x). Es wird deutlich, dass die Zellen u.a. von der Synovialmembran ausgehend das Gewebe besiedeln (b, 10x). Das gleiche Gesichtsfeld unter polarisiertem Licht zeigt einen potentiellen Zusammenhang der MFB mit der Crimp-Formierung (c, 10x). Myofibroblasten erreichen das Gewebe auch von Gefäßen ausgehend. In Bild d (40x) ordnen sie sich um ein solches Gefäß an. Neben zellreichen Bereichen gibt es noch einige azelluläre Areale (e, 20x). (ASMA-Färbung)

Nach 52 Wochen haben die Myofibroblasten wieder eine ovoide Gestalt angenommen und gleichen damit den Myofibroblasten des intakten vorderen Kreuzbandes.

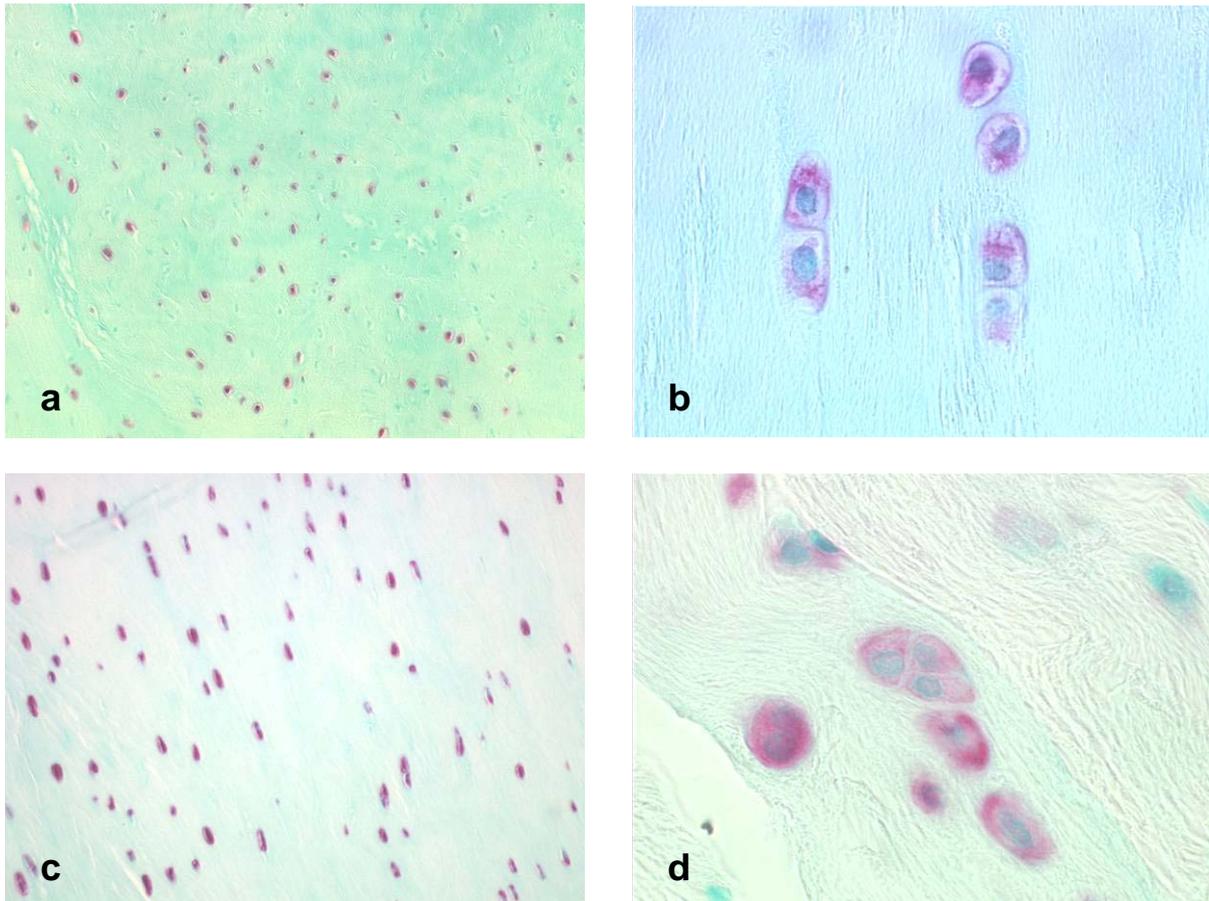
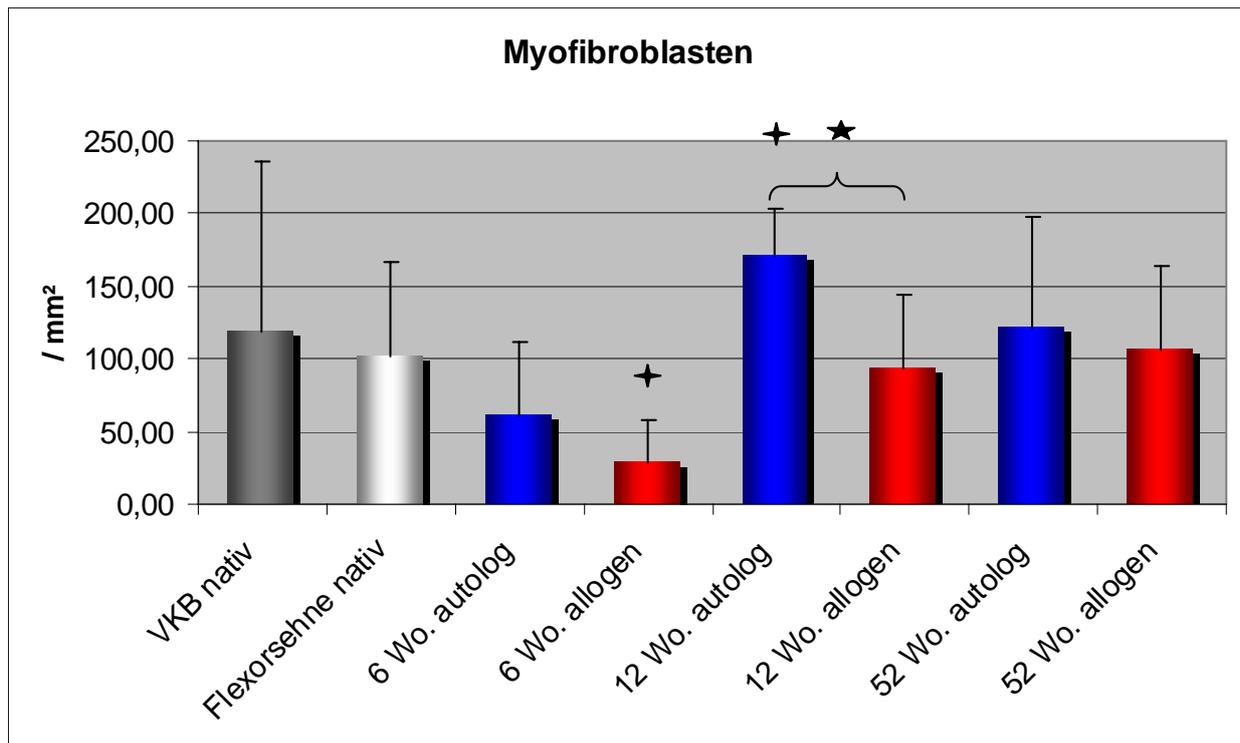


Abb. 25: Transplantateinheilung nach 52 Wochen, autologes Transplantat (a,b), allogenes Transplantat (c,d). Die Myofibroblasten zeigen wieder eine ovoide Gestalt und verteilen sich gleichmäßiger über das Gewebe. (ASMA-Färbung, a und c 20x; b und d 100x)

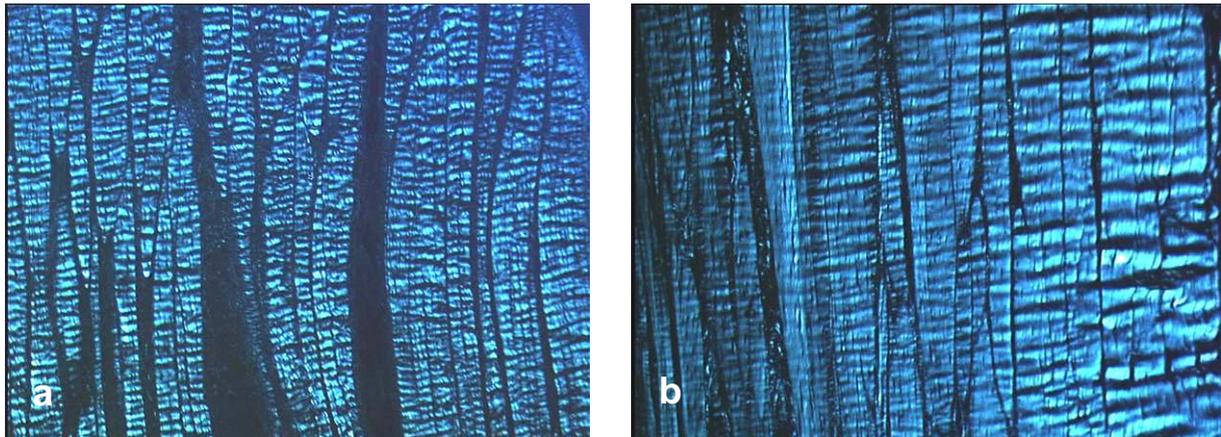
Im Jahresverlauf fällt auf, dass die Zahl der Myofibroblasten im autologen Gewebe zu jedem Zeitpunkt der Transplantateinheilung die Zahl der Zellen des allogenen Transplantates übertrifft. Die Myofibroblasten erreichen nach einem Jahr wieder die ovoide Gestalt der Zellen des nativen VKBs. In den autologen Transplantaten erreichen sie sogar annähernd dessen Anzahl (121,6 /mm<sup>2</sup>). Ferner ergibt sich ein unterschiedlicher Verlauf: Während die MFB-Zahl im allogenen Transplantat kontinuierlich ansteigt, hat sie im autologen Transplantat nach 12 Wochen ihren Höhepunkt erreicht und fällt danach wieder ab. In den Gruppen zeigte sich eine z.T. erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren.



Graphik 2: Bei der Myofibroblastenzahl ergab sich nur nach 12 Wochen Standzeit ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Im Verlauf fällt auf, dass die Anzahl bei den allogenen Transplantaten kontinuierlich ansteigt, während sie bei den autologen nach 52 Wochen wieder abfällt. (Mittelwerte, • : signifikant gegenüber VKB nativ, + : signifikant gegenüber Flexorsehne nativ, ★ : signifikante Unterschiede in den Gruppen, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ )

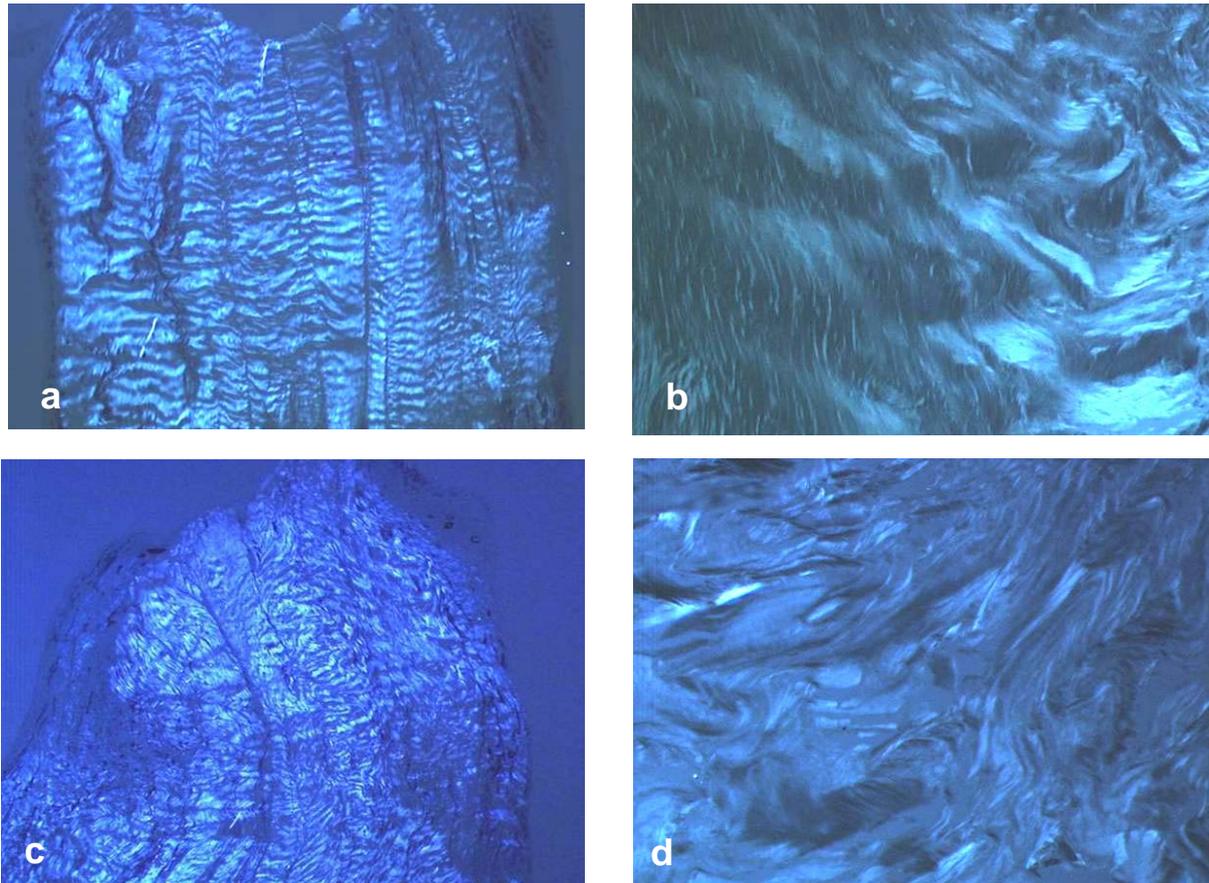
### 3.3.3 Kollagenanordnung und Crimp

Im nativen Gewebe des Kreuzbandes und der Flexorsehnen ist das Kollagen streng longitudinal angeordnet. Die Kollagenfaserbündel sind durch parallel verlaufende bindegewebige Septen gegliedert, die den ganzen Schnitt durchziehen. Dabei erscheint die Septierung im VKB ausgeprägter als in der Flexorsehne. Ebenso stellt sich der Kollagen-Crimp regelmäßig longitudinal orientiert und von den Septen unterbrochen dar. Die Wellenlänge ist im intakten VKB mit  $59,9 \mu\text{m}$  signifikant kürzer als in der nativen Flexorsehne ( $163,4 \mu\text{m}$ ). Die Crimp-Struktur erscheint dadurch im VKB ausgeprägter.



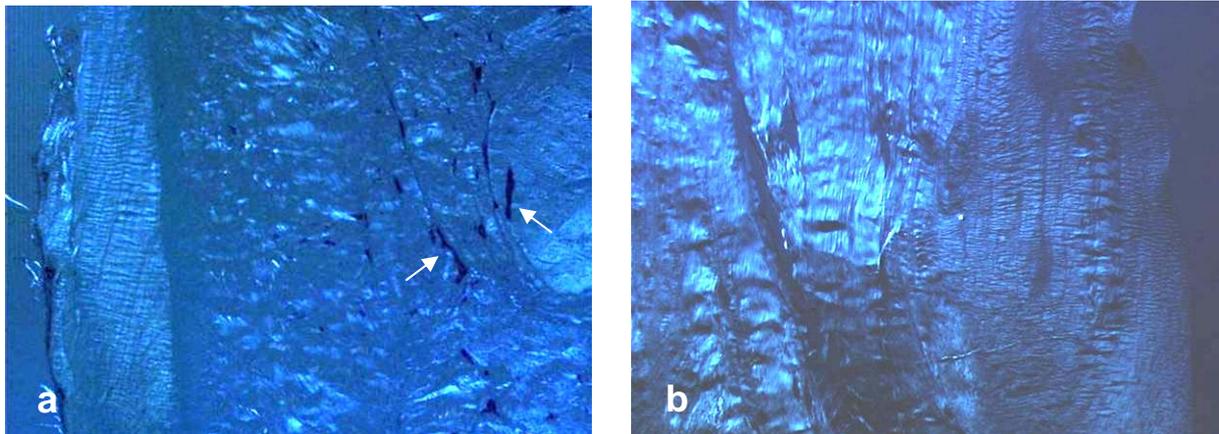
*Abb. 26: Darstellung des Kollagen-Crimps im polarisierten Licht (5x): Natives VKB (a), native Flexorsehne (b). Das Kollagen ist regelmäßig und longitudinal ausgerichtet und von bindegewebigen Septen unterbrochen. Die Wellenlänge ist im nativen VKB kürzer, die Septierung deutlicher als in der Flexorsehne.*

In der frühen Remodeling-Phase von 6 Wochen fällt eine deutlich inhomogenere Struktur der EZM auf. Die Septierung ist nicht mehr so regelmäßig, die Ausrichtung des Gewebes weicht zum Teil voneinander ab. Zentral findet sich meist noch eine geordnete Struktur. Ebenso ist die Crimp-Anordnung unregelmäßiger geworden. Die Wellenlänge variiert stark innerhalb eines Schnittes. Im Vergleich zum Crimp der nativen Bänder und Sehnen wirkt die Wellenstruktur jedoch bei höherer Vergrößerung markanter. Im allogenen Transplantat stellt sich das Kollagen inhomogener dar als im autologen Gewebe.



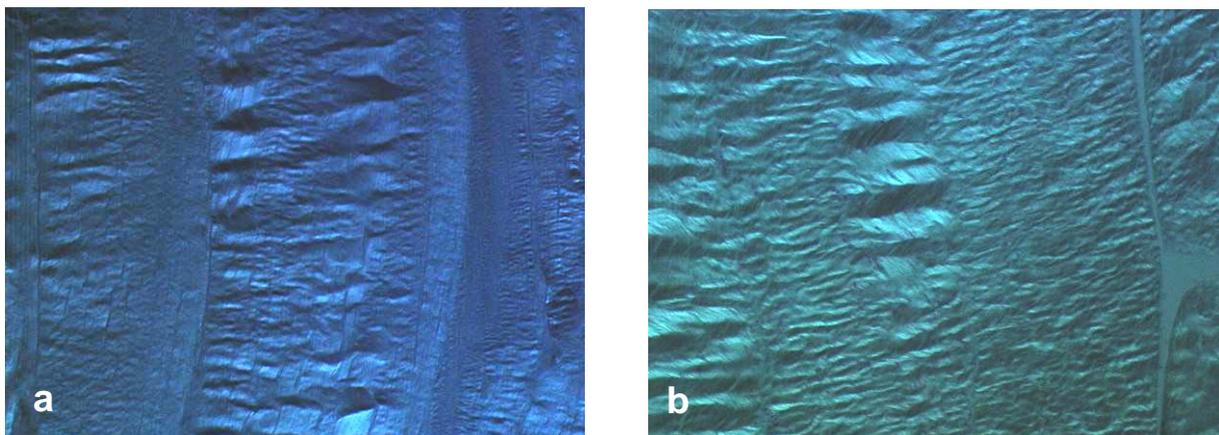
*Abb. 27: Kollagen-Crimp nach 6 Wochen, autologes Transplantat (a, b), allogenes Transplantat (c, d): Die Struktur erscheint ungeordnet. Die Frequenz der Wellen variiert. Im allogenen Transplantat stellt sich im Vergleich zum autologen eine inhomogenere Anordnung der EZM dar. (a und c 1,6x; c und d 20x)*

Nach 12 Wochen Standzeit zeigte sich die Kollagentertiär-Struktur wieder zunehmend longitudinal orientiert und in Septen gegliedert. Die Crimp-Frequenz und das Erscheinungsbild variierten jedoch stark innerhalb eines Schnittes und zwischen den Tieren. Die Ordnung schreitet von peripher nach zentral fort. Das allogene Transplantat zeigt in dieser Phase eine deutlich inhomogenere Struktur als das autologe. Zu diesem Zeitpunkt war die Wellenlänge im autologen Gewebe mit  $198,9 \mu\text{m}$  signifikant höher als im allogenen Transplantat ( $121,8 \mu\text{m}$ ).



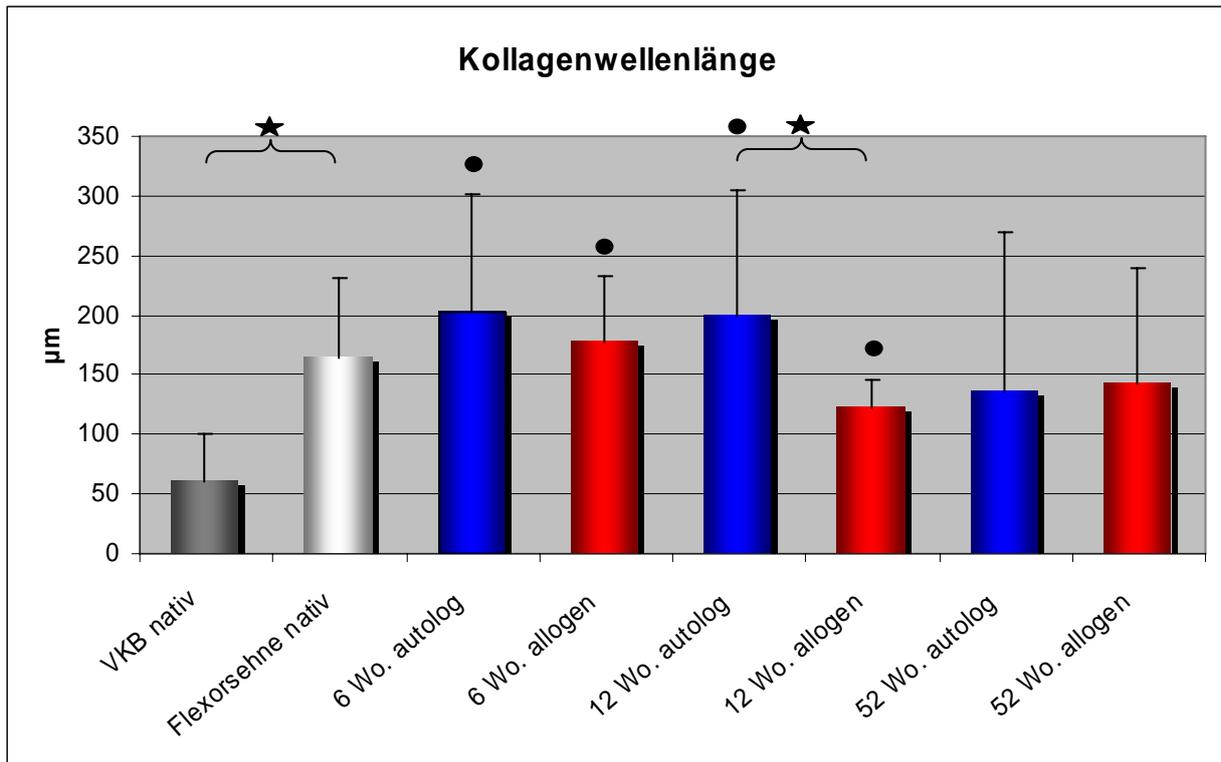
*Abb. 28: Autologes (a) und allogenes (b) Transplantat nach 12 Wochen (5x). Die Kollagenstruktur ordnet sich von peripher nach zentral neu. Gefäße durchziehen das Gewebe in bindegewebigen Septen (a, rechter Bildteil)*

Nach 52 Wochen ist die Kollagenanordnung und Crimp-Struktur wieder regelmäßiger geworden. Es findet sich wieder eine deutliche Septenbildung des Gewebes und die EZM ist longitudinal orientiert. Da die Kollagenwellenlänge aber immer noch stark variiert, wurde der Zustand des nativen VKB diesbezüglich nicht wieder erreicht.



*Abb. 29 : Crimp-Struktur nach 52 Wochen, autologes Transplantat (a), allogenes Transplantat (b), (20x): Das Gewebe ist wieder longitudinal orientiert und regelmäßig von bindegewebigen Septen durchzogen. Die Crimp-Frequenz variiert noch stark.*

Betrachtet man hier den Jahresverlauf zeigt sich bei den autologen Transplantaten eine kontinuierliche Abnahme der Wellenlängen, während sie im autologen Gewebe nach 52 Wochen wieder ansteigt. Im Vergleich zu den nativen Kreuzbändern ergibt sich in den beiden 6- und 12-Wochen Gruppen eine signifikant höhere Wellenlänge. Nach 52 Wochen tritt dieser Unterschied nicht mehr auf.



Graphik 3: Die Wellenlänge unterscheidet sich zum lediglich nach 12 Wochen signifikant voneinander. Ferner fällt auf, dass sich der signifikante Unterschied zum nativen VKB nach 52 Wochen in beiden Gruppen nicht mehr abzeichnet. (Mittelwerte, • : signifikant gegenüber VKB nativ, ★ : signifikant gegenüber Flexorsehne nativ, ★ : signifikante Unterschiede in den Gruppen, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ )