

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Immunhistochemische Untersuchung des Einflusses
von lokal applizierten PDGF-BB auf das Remodeling
eines freien Sehnentransplantates nach Ersatz des
vorderen Kreuzbandes**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von
Tobias Maximilian Jung
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Weiler
 2. Prof. Dr. Dr. h.c. N.P. Haas
 3. Prof. Dr. med. R. Becker

Datum der Promotion: 3.6.2012

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD. Dr. med. Andreas Weiler, der mir mit wissenschaftlichem und freundschaftlichem Rat zur Seite stand und mit Geduld und Nachdruck meine Arbeit zu fördern wusste.

Die Durchführung dieses Projektes, wie Operationen an den Versuchstieren, die Tierversorgung, biomechanische Testungen und die histologische Aufarbeitung der Präparate, wurde erst durch die Zusammenarbeit mit meinen Kollegen Herrn Dr.med. Benjamin Faensen, Herrn Roman Falk und Herrn Dr. vet. Patrick Hunt, sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Hardung und Frau Princ möglich. Ihnen möchte ich hiermit nochmals für die jederzeit freundliche und hilfreiche Zusammenarbeit danken.

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Anatomie und Biomechanik des vorderen Kreuzbandes	3
1.2.1	Makroskopische Anatomie	3
1.2.2	Gefäßversorgung	5
1.2.3	Innervation	6
1.2.4	Mikroskopische Anatomie	8
1.2.5	Biomechanik	13
1.3	Die Rekonstruktion des Vorderen Kreuzbandes	15
1.3.1	Historischer Überblick über die Chirurgie des Vorderen Kreuzbandes	16
1.3.2	Aktuelle Methoden der Kreuzbandchirurgie	19
1.4	Transplantateinheilung und Remodeling	23
1.4.1	Degenerations- und Nekrosephase	25
1.4.2	Reparativ-proliferative Phase	26
1.4.3	Remodelingphase	27
1.4.4	Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten	28
1.5	Platelet-Derived Growth Factor	29
1.5.1	Geschichte und Entdeckung von PDGF	29
1.5.2	Aufbau und Struktur	30
1.5.3	Wirkmechanismus	30
1.5.4	Zusammenfassung und der klinische Bezug	32
1.6	Ziele	33
2	Material und Methoden	35
2.1	Material	35
2.1.1	Versuchstiere	35
2.1.2	Transplantatgewebe	35
2.1.3	Wachstumsfaktor	35
2.1.4	Applikationsform des Wachstumsfaktors	36
2.2	Methoden	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1	Studiendesign	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.2	Vorversuch	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.3	Auswahl des Tiermodells	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.4	Tierhaltung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

2.2.5	Gruppeneinteilung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.6	Operatives Vorgehen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.7	Explantation	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.8	Histologische Aufarbeitung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.9	Konventionelle Färbungen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.10	Immunhistologie	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.11	Auswertung und Datenanalyse	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3	Ergebnisse	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.1	Allgemeines	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.1.1	Komplikationen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.1.2	Postoperativer Verlauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.1.3	Explantation	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.2	Makroskopische Auswertung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.2.1	Natives vorderes Kreuzband und Flexorsehne	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.2.2	Nekrosephase und reparativ-proliferative Phase (3 und 6 Wochen Standzeit)	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.2.3	Intermediäre Remodelingphase (12 und 24 Wochen Standzeit)	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3	Mikroskopische Auswertung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3.1	Konventionelle Lichtmikroskopie	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3.2	Crimp	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3.3	Immunhistologie	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4	Diskussion	Fehler! Textmarke nicht definiert.
5	Zusammenfassung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
6	Literatur	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7	Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Motivation

Verletzungen des Kniegelenkes, insbesondere des vorderen (VKB) und hinteren Kreuzbandes (HKB), deren medizinische Versorgung und die ablaufenden Heilungsprozesse, sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Große Aufmerksamkeit erhält dabei das VKB, dessen Ruptur zu den häufigsten Bandverletzungen zu zählen ist ^[90]. Zudem gibt es wohl kaum ein Ligament des menschlichen Körpers, über das mehr publiziert wird und so viele Kongresse abgehalten werden.

Verfahren, einst als zu unerforscht und radikal bezeichnet, sind mittlerweile Goldstandard und medizinische Routine. Die Kniegelenksarthroskopie und der autologe Sehnenersatz bei der Rekonstruktion einer VKB-Ruptur, früher reserviert für Athleten des Leistungssports, sind nun klinischer Alltag bei der Versorgung von Weekendsportlern aller Altersschichten, die wieder ihr vorheriges Aktivitätsniveau erlangen möchten^{[34],[37],[38]}. Die Indikation und der Nutzen einer Kreuzbandrekonstruktion sind allgemein anerkannt. Jedoch sind Transplantatwahl und Rekonstruktionstechnik Gegenstand intensiver Diskussionen.

Die Ursache dafür ist der diffizile Einheilungsprozess, den ein jedes Sehnentransplantat durchläuft, und welcher maßgeblich durch die Operationstechnik beeinflusst wird^[119]. Der langfristige Erfolg einer Kreuzbandplastik wird durch den biologischen Umbau (Remodeling) des Transplantates bestimmt. Das gefäßlose Sehnentransplantat durchläuft nach partieller Nekrotisierung einen den Stadien der Wundheilung ähnelnden Prozess: die Ligamentisierung^[7]. In dieser Phase der Revaskularisierung, Veränderung der Zellgestalt und Zelldichte, Kollagenproduktion und Kollagenfaserausrichtung, zeigt das Transplantatgewebe einen Verlust der mechanischen Belastbarkeit und Eigenschaften ^{[17],[119]}. Diese Tatsache macht es empfindlich für Über- und Fehlbelastung, denen eine frühe Reruptur oder anhaltende Transplantatelongation folgen kann. Diese resultiert in einem Funktionsverlust der Kreuzbandrekonstruktion ^[29].

Um den Patienten vor diesem Schicksal zu bewahren, beziehen die heutigen Behandlungsstrategien neben der Operation eine genau abgestimmte Physiotherapie mit ein. Die Rehabilitation ist langwierig und wird entscheidend durch die Motivation des Patienten beeinflusst. Nicht selten können die Patienten auch noch ein Jahr postoperativ nicht in gleichem Maße sportlich aktiv sein wie vor der Verletzung.

Ein Schwerpunkt der Kreuzbandforschung betrifft daher das bessere Verständnis des Remodeling und den Versuch diesen Prozess zu beschleunigen, um insbesondere die vulnerable Phase der frühen Einheilung zu verkürzen.

Als Folge dieser Bemühungen wird seit den letzten Jahren auf den Gebieten der Weichteilgewebeheilung zunehmend die Verwendung von Wachstumsfaktoren (WF) erforscht. Die ersten tierexperimentellen Ergebnisse zeigen, dass WF die Band- und Sehnenheilung beschleunigen können ^{[32],[70],[94]}. In der lokalen Umgebung von Bandverletzungen sind WF ubiquitär vorhanden. Sie sind essentiell für den geordneten Ablauf von Inflammation, Proliferation und Remodeling bei der Bandheilung. Bekannte WF wie zum Beispiel Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) besitzen eine positive Auswirkung auf Fibroblastenproliferation, Angiogenese und die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen ^{[71],[112],[115]}. Bei Verletzungen des medialen Kollateralbandes (MCL) konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass die lokale Gabe von PDGF zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften führt ^{[58],[74]}. PDGF hat bereits die Zulassung für die klinische Therapie von ausgedehnten Hautulzera erhalten.

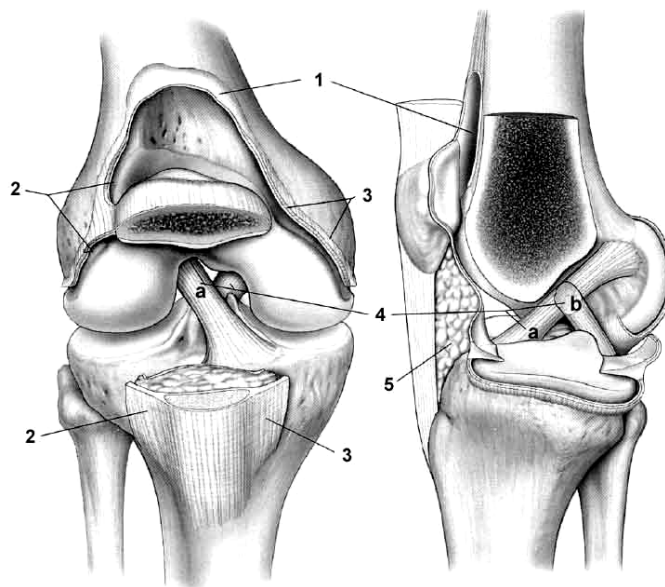
Auch wenn bei der in vitro-Stimulierung von Fibroblasten des VKB mit PDGF eine vermehrte Migration und Proliferation beobachtet werden kann ^{[50],[51],[68]}, gibt es bislang in der Literatur keinen Nachweis über den Einfluss auf die Transplantateinheilung nach VKB Rekonstruktion zu finden.

Ziel dieser Arbeit ist es folgende Forschungsschwerpunkte miteinander zu verbinden: das Einheilungsverhalten eines freien Sehnentransplantates nach VKB - Rekonstruktion und die Wirksamkeit von PDGF-BB bei der Band- und Sehnenheilung.

1.2 Anatomie und Biomechanik des vorderen Kreuzbandes

1.2.1 Makroskopische Anatomie

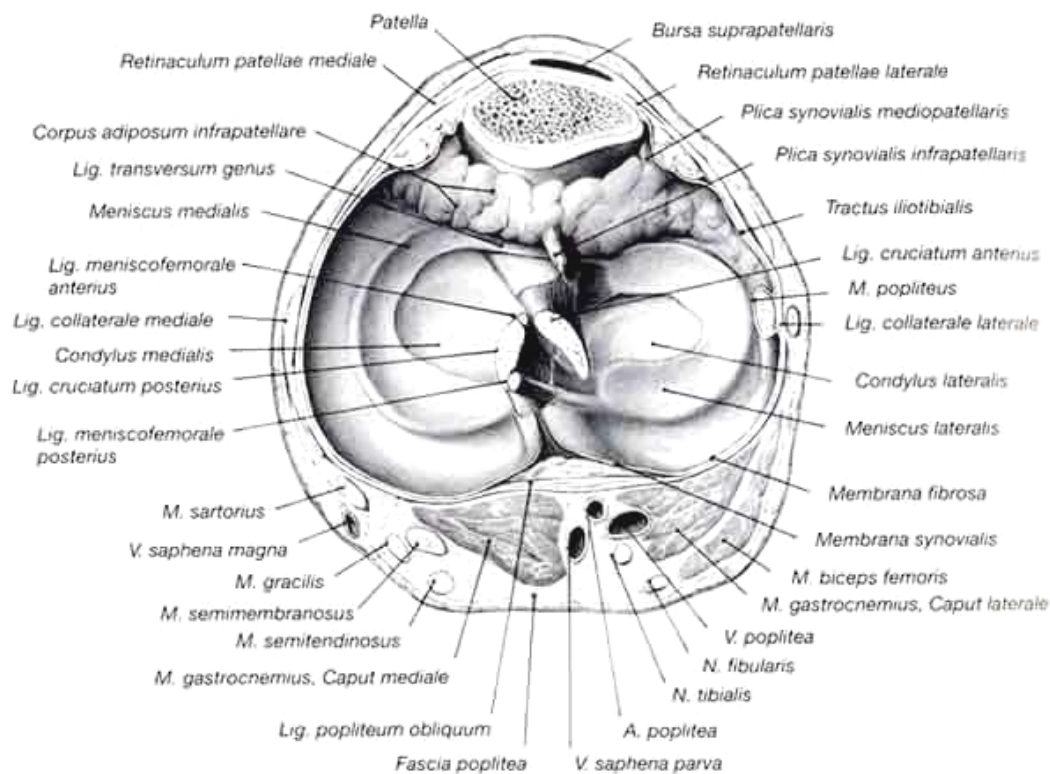
Das VKB ist eine intraartikuläre Bandstruktur des Kniegelenkes, die Femur und Tibia miteinander verbindet. Vom femoralen Ursprung am dorsokranialen Aspekt der medialen Wange des lateralen Femurkondylus zieht es zur tibialen Insertion in der Area intercondylaris anterior tibiae (Abbildung 1-1). Der femorale Ursprung ist oval mit einem Längsdurchmesser von 18 mm und einem Querdurchmesser von 11 mm. Die Längsachse dieses Ovals ist etwas nach vorne gekippt und das Zentrum befindet sich in „over-the-top“ Position (Schnittpunkt der Hinterkante des Femurschaftes mit der proximalen Gelenkfläche des lateralen Femurkondylus) [10,[33]. Die tibiale



1-1 : 1) Bursa suprapatellaris; 2) lat. Retinaculum; 3) med. Retinaculum;
4a) VKB; 4b) HKB 5) Hoffa´sche Fettkörper: Millett,PJ. AJSM 29(6):822-828

Insertionsfläche ist ebenfalls oval und deutlich breiter und kräftiger als die femorale Insertionsstelle. Die Längsachse dieses Ovals verläuft von anterior nach posterior. Das Zentrum der tibialen Insertionsfläche befindet sich vor dem medialen Dorn der Protuberantia intercondylaris und strahlt nach vorne unter das Ligamentum transversum aus. Von Lateral strahlen einige Fasern in den vorderen Ansatz des

lateralen Meniskus ein (Abbildung 1-2). Die dorsalen Anteile des VKB strahlen in den posterioren Ansatz des lateralen Meniskus ein ^{[10],[33]}. Das VKB ist etwa 31-38 mm lang und in seinem mittleren Drittel 10 x 5 mm (sagitaler x koronarer Durchmesser) stark. In seinem gesamten Verlauf wird das VKB vollständig von einer Synovialfalte überzogen ^{[10],[33],[48]}. Ihren Ursprung nimmt diese Synovialfalte in der Area intercondylaris posterior. Sie umhüllt außerdem das hintere Kreuzband und hat nach anterior eine Verbindung zum Hoffa'schen Fettkörper. Das VKB hat insofern keinen direkten Kontakt zur Gelenkflüssigkeit und liegt demnach extrasynovial ^[33].

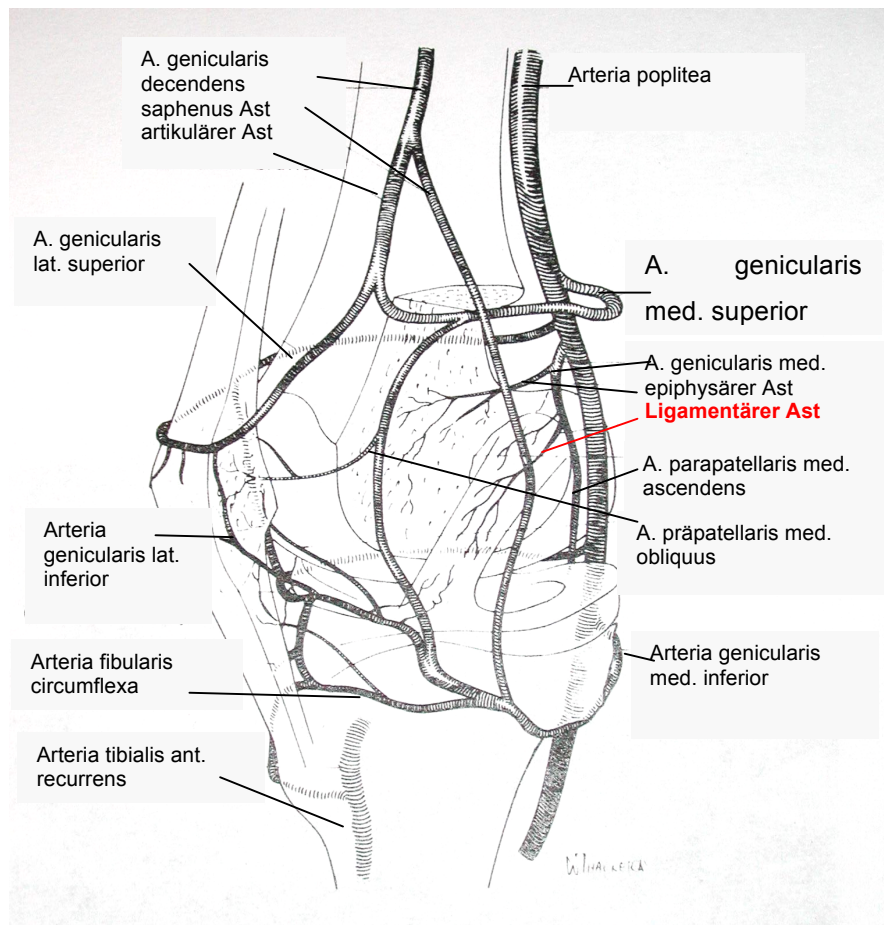


1-2: Horizontaler Querschnitt durch ein rechtes Kniegelenk. Es zeigt den synovialen Überzug des VKB und die Beziehung zum Hoffa'schen Fettkörper : Putz,R. Radiologe 35:77-86.

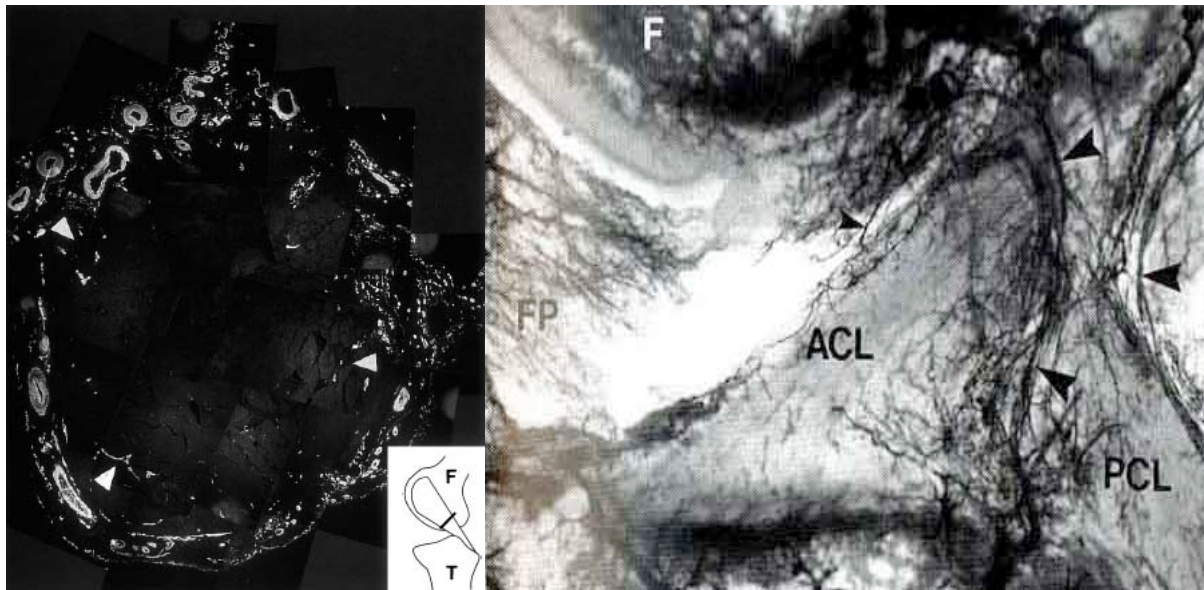
In seinem Verlauf vom femoralen Ursprung bis zur tibialen Insertion, ist das VKB in sich nach außen rotiert. Im Bereich des Überganges vom femoralen- zum mittleren Drittel, beginnt sich das VKB aufzufächern, um schließlich in einer großflächigen Insertion auf der Tibia zu enden. Das VKB kann zum besseren Verständnis seiner biomechanischen Aufgaben, in ein anteromediales und ein posterolaterales Leitbündel unterteilt werden (Abbildung 1-11, S.14) ^{[100],[105],[111]}.

1.2.2 Gefäßversorgung

Ernährt wird das VKB zum größten Teil aus Ästen der A. geniculare media und zu kleineren Anteil aus Endästen der Aa. geniculare inferior mediales et lateralis ^{[33,[102]} (Abbildung 1-3). Diese Gefäße bilden in der das VKB umhüllenden Synovialfalte einen Gefäßplexus. Der Zustrom aus den Aa. geniculare inferior medialis et lateralis erfolgt dabei über den Hoffa'schen Fettkörper. Aus dem synovialen Gefäßplexus dringen kleinere Gefäße horizontal in das VKB ein und bilden hier mit den longitudinal (parallel zum Faserverlauf) verlaufenden Gefäßen endoligamentäre Anastomosen (Abbildung 1-4 + 1-5, S.6).



1-3: Schematische Zeichnung von Lage und Verlauf der das Knie versorgenden Arterien: Netter Atlas



1-4: Querschnitt durch VKB mit Gefäßdarstellung in Fluoreszenz-Mikroskopie: Petersen, W.: Anat Embryol (Berl) 200(3): 325-34.

1-5: Sagitalschnitt durch VKB mit Gefäßdarstellung durch Tuscheinjektion: Dodds J.A et al. Arthroscopy 10(2): 132-9

Die longitudinalen Gefäße durchbrechen die knorpeligen Insertionsstellen des VKB nicht. Aus diesem Grund ist auch die Blutversorgung des VKB über Gefäße aus dem angrenzenden Knochen vernachlässigend gering ^{[10],[102]}.

1.2.3 Innervation

Lange Zeit sahen orthopädische Chirurgen die Ligamente lediglich als mechanische und strukturelle Stabilisierer eines Gelenkkomplexes an mögliche sensorische Aufgaben wurden dabei übersehen.

Dieser Trugschluss hatte auch Auswirkung auf die Therapie von Verletzungen, denn jegliche Therapie von VKB-Rupturen gründeten auf der Annahme, dass das Kreuzband nur eine passive Haltefunktion übernimmt. Erst Ende der sechziger Jahre stellten Freeman und Wykedi die Hypothese auf, dass Signale der Mechanorezeptoren von Gelenken einen beträchtlichen Teil zur Reflex-Koordination via γ -Motorneuron in Form von Muskeltonus, Haltung und Bewegung beitragen^[38]. Die meisten Erforschungen über die Innervation des Kniegelenkes wurden an Katzen oder dem Menschen selbst unternommen ^[118].

Die erste systematische Untersuchung über die Nervenverteilung im Kniegelenk wurde bereits 1944 von Gardner durchgeführt ^[45].

Das VKB wird von einem ausgedehnten Nervengeflecht durchsetzt, welches seinen Ursprung in einem Ast des N. tibialis nimmt und dessen Anteil 1 - 2,5% des Volumens des Bandes ausmacht ^{[39],[63]}. Die Nervenfasern treten über umgebendes Bindegewebe und Gefäße in das VKB ein. Ein Großteil dieser Nervenfasern begleitet die endoligamentären Gefäße. Dies führte zu der falschen Annahme, dass diese Nervenfasern bevorzugt vasomotorische Funktionen hätten ^[63]. Ein kleinerer Anteil endet zwischen den Kollagenfaszikeln in freien Nervenendigungen, weiterhin bestehen drei morphologisch distinkte Mechanorezeptoren, das Ruffini-Endorgan, das Pancini-Körperchen und das Golgi-Sehnen-Organ. Nach der Einteilung von Freeman und Wyke handelt es sich hierbei um Fasertypen I – IV ^[38].

Die freien Nervenendigungen, die für die Vermittlung von Schmerzreizen zuständig sind, verbleiben ohne Reiz inaktiv und machen nur einen kleinen Anteil des intraligamentären Nervengeflechtes aus. Hierdurch erklärt sich die Tatsache, dass vielen Patienten, die sich eine Ruptur des vorderen Kreuzbandes zuziehen, nur selten ein initialer Schmerzreiz Erinnerungswürdig ist und die Schmerzen erst durch Ergussbildung oder vermittelt durch Mediatoren wie Prostaglandine, Bradykinin und Histamine einsetzen ^{[63],[118]}.

Die Mechanorezeptoren vermitteln Informationen über Geschwindigkeit, Beschleunigung und Bewegungsrichtung von Kniegelenksbewegungen sowie Informationen über die Positionierung des Kniegelenkes im Raum an das ZNS^{38,150}. Hierbei reagiert das langsam adaptierende Ruffini-Endorgan auf intraartikulären Druck, die Weite und Geschwindigkeit von Bewegungen und vermittelt eine Information über die statische Position des Kniegelenkes ^[63]. Das Pancini-Körperchen ist schnell adaptierend. Es ist inaktiv bei immobilisiertem Gelenk und bei Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit. Es reagiert lediglich auf Beschleunigung und Verlangsamung und kann somit als dynamischer Mechanorezeptor bezeichnet werden ^{[38],[63]}. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass das langsam adaptierende Golgi-Sehnen-Organ eine sehr hohe Reizschwelle besitzt und in Ruhe komplett inaktiv ist. Es wird vermutet, dass diese Rezeptoren die Spannung im VKB messen und dies insbesondere auf Grund ihrer hohen Reizschwelle nur bei extremen Belastungssituationen ^{[38],[63]}. Die vorliegenden Studien rechtfertigen die Bezeichnung des VKB, als propriozeptiven Zentralpfeiler, dessen Fehlen eine funktionelle Instabilität begünstigt ^[28].

1.2.4 Mikroskopische Anatomie

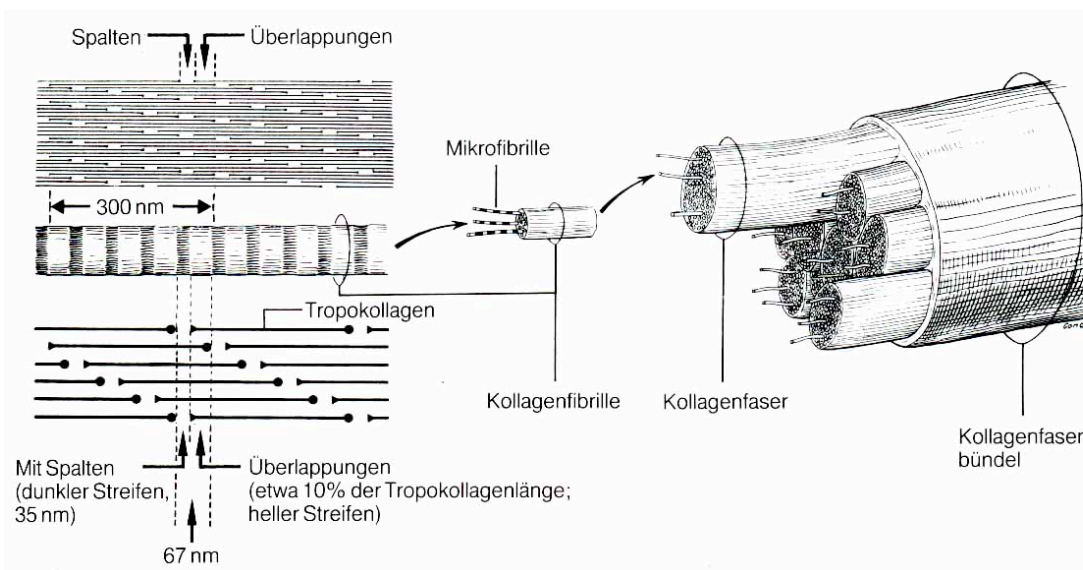
Extrazellulärmatrix

Fast die gesamte Oberfläche des VKB wird von einer dünnen, synovialen Schicht bedeckt. Diese Synovia besteht aus lockerem Bindegewebe und wird von einem verzweigten Netz aus Blutgefäßen durchzogen ^[102].

Die Extrazellulärmatrix des VKB besteht aus biochemischer Sicht hauptsächlich aus Strukturproteinen (Kollagen, Elastin), Adhäsionsproteinen (Fibronektin, Laminin) ^[62], Proteoglykanen und zu 60% aus Wasser ^[87]. Die Kollagene, die 75% des Trockengewichtes ausmachen, setzen sich zu ungefähr 90% aus Kollagen Typ-I und zu lediglich ca. 10% aus Kollagen Typ-III zusammen ^[6]. Das Kollagen, gruppiert zu parallelen Kollagen-Faserbündeln, bildet faszikuläre Strukturen aus, deren Mikroarchitektur mit der von Sehnen zu vergleichen ist ^{[36],[143]}.

Diese Kollagenfaserbündel, 250 – 400 µm im Durchmesser stark, kristallisieren sich aus immer weiter differenzierenden Untereinheiten aus, die von Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 20 µm gebildet werden (Abbildung 1-6).

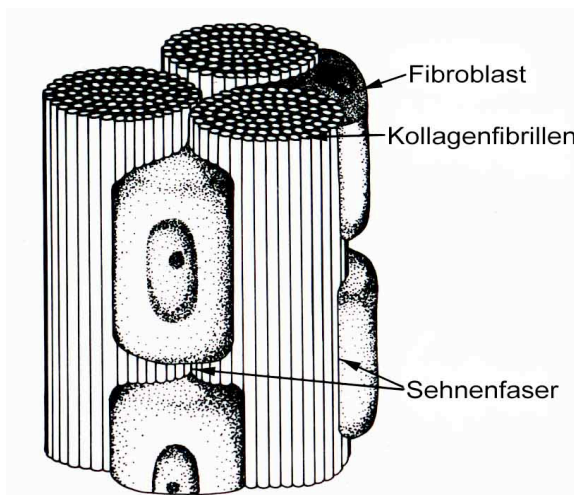
Die Bildung von den Untereinheiten aus Mikrofibrillen geschieht bei Kollagen Typ-I und Typ-III spontan ^[67]. Die Untereinheiten werden von einer dünnen Bindegewebsschicht umhüllt, die in Anlehnung an die Sehnenstruktur in endo-, epi- und periligamentum unterteilt werden kann ^[143].



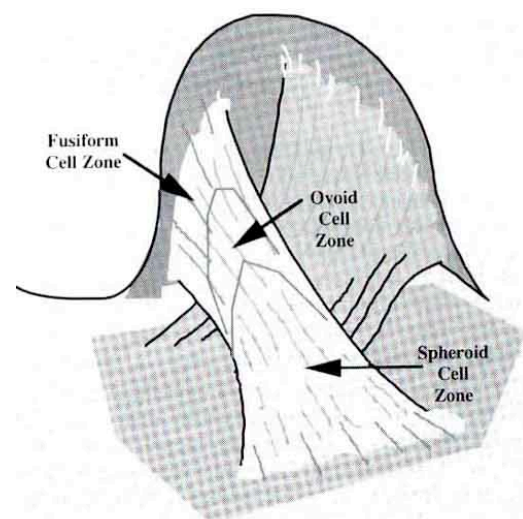
1-6: Schema der Bildung von Mikrofibrillen, Kollagenfibrillen, Kollagenfasern und Kollagenfaserbündeln. Die Mikrofibrillengröße und Anordnung ist spezifisch für die unterschiedlichen Kollagenarten.

Der Fibroblast

In unmittelbarem Kontakt mit den Faserbündeln befinden sich die Fibroblasten (Abbildung 1-7). Diese enge Verbindung von Fibroblasten zu extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin und Fibronectin ermöglicht eine sowohl biomechanische als auch biochemische Signalübertragung in das Zellinnere ^[66] ^[134]. Dadurch hervorgerufene Veränderungen am Zytoskelett beeinflussen die Zellgestalt, Migrationsrate und Adhäsionsstärke des Fibroblasten zur Umgebung ^[130]. Daher sind im Verlauf des VKB morphologisch distinkte Fibroblasten vorzufinden. Es lassen sich an Hand der Form des Zellkerns drei Haupttypen abgrenzen: den spindelförmigen-, den ovoiden und den runden Zellkern ^[92], wobei die Grenzen oft fließend sind (Abbildung 1-8).



1-7:Junqueira L. C., (1996): Lehrbuch für Histologie



1-8: Schematische Darstellung der Verteilung von spindelförmigen-, ovoiden- und runden Fibroblasten im VKB Grafik von: Murray M.M. et al. JOR 17:18-27

Diese Formen einem Abschnitt des VKB zu zuordnen ist jedoch nur eingeschränkt möglich, dennoch beobachtet man im Verlauf des VKB von proximal nach distal, eine Abnahme der Zellzahl und Gefäße, eine Zunahme der Zellen mit rundem Zellkern und eine Zunahme der α -smooth-muscle Aktin positiven Zellen, den Myofibroblasten ^[91].

Der Myofibroblast

Unter bestimmten Umständen können Bindegewebszellen wie zum Beispiel Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten ein Filament des Zytoskeletts exprimieren (welches α -smooth-muscle Aktin genannt wird), das ihnen ein kontraktiles Verhalten ermöglicht ^[125].

Dieses α -smooth-muscle Aktin wurde 1971 zum ersten Mal von dem Schweizer Gabbiani in Fibroblasten des Granulationsgewebes beschrieben ^{[43,[82]}. Diese Entdeckung führte zu der Namensgebung des Myofibroblasten. In den folgenden Jahren konnten durch das Studium diverser pathologischer Bedingungen drei Grundarten von Prozessen entdeckt werden, bei denen es zum Auftreten von Myofibroblasten kommt ^{[117,[120]}:

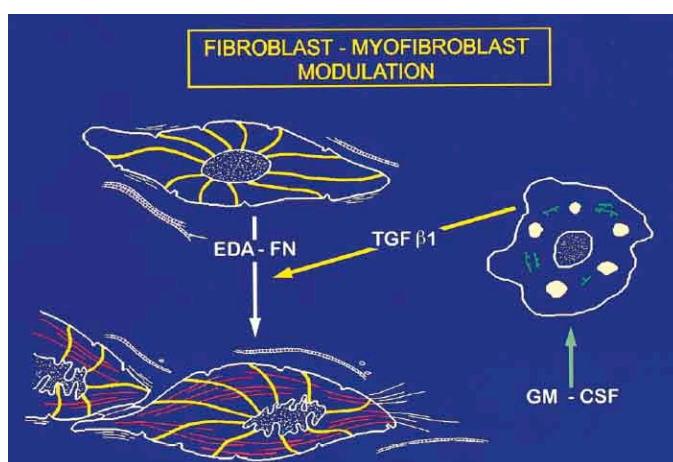
Erstens: Als Antwort auf Verletzungs- und Reparaturphänomene

Zweitens: einer Neoplasie ähnliche Bedingung

Drittens: Als Antwort des Bindegewebes auf eine Neoplasie

Seit dem konnten Myofibroblasten in den unterschiedlichsten Geweben entdeckt werden unter anderem auch im VKB ^[92].

Die Prozesse der Stimulierung von Myofibroblasten zum Beispiel bei der Wundheilung oder bei der Dupuytren-Kontraktur und in wie weit WF die Fibroblasten-Myofibroblasten-Transformation beeinflussen, werden nach wie vor diskutiert



1-9: Von TGF- β 1 ist bekannt, dass es die Bildung von Myofibroblasten induziert.

Es stimuliert den Fibroblasten zu der vermehrten Synthese von α -smooth-muscle Aktin und Kollagen.

Serine G.: Exp Cell Res 250, 273-283

(Abbildung 1-9) ^{[31[44],[121]}.

Im Gegensatz dazu ist die Struktur der Myofibroblasten besser bekannt. Sie werden charakterisiert durch ein gut ausgebildetes, zytoplasmatisches Aktin-Mikrofilament, das α -smooth muscle Aktin (ASMA), das in Fibroblasten des normalen Bindegewebes nicht vorhanden ist ^[116].

Aktin ist ein weitverbreitetes Zytoskelett-Protein, das bei Vorgängen wie Phagozytose, Zellmigration und Kontraktion eine wichtige Rolle spielt. Es treten sechs Isoformen auf, die von verschiedenen Genen kodiert werden und sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden: Die sogenannten „non-muscle-Aktin-Isoformen, β - und γ -cytoplasmatic-actin, treten im Zytoplasma nahezu aller Zellen auf. Weiterhin existieren vier muscle-Aktin-Isoformen, die je nach Zelltyp spezifisch sind und so eine Differenzierung verschiedener Muskelzellen ermöglichen. Diese sind α -skeletal Aktin, α -cardiac Aktin sowie die charakteristischerweise in glatten Muskelzellen auftretenden Isoformen α -smooth muscle Aktin (ASMA) und γ -smooth muscle Aktin ^[132]. Die Aktinfilamente der Myofibroblasten sind in sogenannten „stress fibers“ gebündelt, die parallel zur Zellängsachse verlaufen und hauptsächlich entlang der Zellmembran zu finden sind. Die ASMA-Isoform wurde neben glatten Muskelzellen auch in Perizyten und im kontraktilem Apparat fibroblastenähnlicher Myofibroblasten entdeckt und gilt als Marker dieser Zellen ^[124].

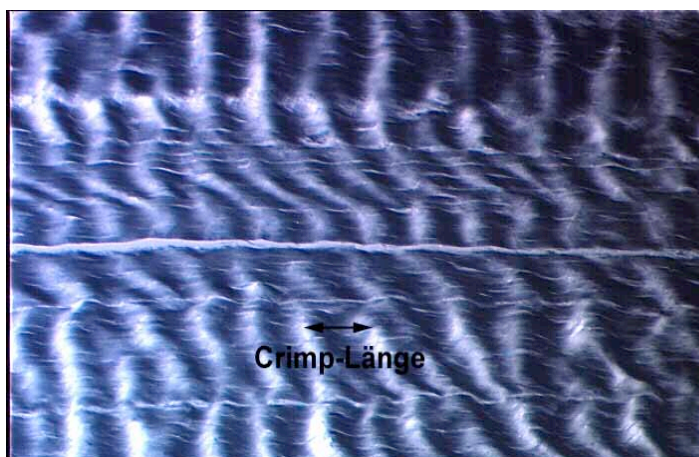
Myofibroblasten zeichnen sich durch ausgeprägte interzelluläre Verbindungen und hoch entwickelte Zell-zu-Stroma Verbindungen (Fibronexus) aus, die es diesem Zelltyp ermöglichen, Zugkräfte auf die ihn umgebende Extrazellulärmatrix auszuüben. *In vitro* Studien zeigten, dass Myofibroblasten vornehmlich isometrische Zugkräfte ausüben. Es ist anzunehmen, dass *in vivo* bei der Kontraktion von granulierendem oder fibrosierendem Gewebe ähnliche Prozesse stattfinden ^[53]. Bei der Suche nach der Vorläuferzelle des Myofibroblasten kommen dabei mehrere Zelltypen in Betracht: der Fibroblast, der Perizyt und die glatte Gefäßmuskelzelle. Man mutmaßt, dass alle drei Zellformen aus einer Vorläuferzelle entspringen, die sich je nach Bedarf in eine der Formen ausdifferenziert ^[117].

Bisher wurden Myofibroblasten als pathognomonisches Korrelat der Dupuytren'schen Kontraktur entdeckt ¹, sowie bei der Leberzirrhose, Nieren- und Lungenfibrose und in metaplastischen Stromaveränderungen als Reaktion auf Neoplasien nachgewiesen ^[44].

Faryniarz et al. wiesen Myofibroblasten 1996 erstmals im nativen und heilenden Gewebe des medialen Kollateralbandes am Knie des Kaninchen nach. In dieser Studie wurde vermutet, dass die vorübergehend erscheinenden Myofibroblasten eine Rolle bei der Gewebekontraktion spielen und so zur Wiedererlangung der in-situ Spannung des heilenden Bandes führt. Wenig später wurde dieser Zelltyp im intakten und rupturierten humanen vorderen Kreuzband nachgewiesen.^{[91],[92]} Murray und Spector vermuteten das die kontraktile Eigenschaft dieser Zellen für das Zusammenziehen der Extrazellulärmatrix und die Ausbildung der Kollagentertärstruktur, dem sogenannten Kollagen-Crimp, verantwortlich ist. Somit stellen kontraktile Myofibroblasten einen festen Bestandteil des intakten vorderen Kreuzbandes dar^[92].

Der Crimp

In den Fibroblasten wird der größte Teil der extrazellulären Matrix produziert. So wird zum Beispiel in einer Kaskade von intrazellulären Prozessen das Vorläuferprotein des Kollagens (Prokollagen) als Tripelhelix gebildet. Aus Prokollagen entsteht extrazellulär, nach enzymatischer Veränderung der Tripelhelix, das Tropokollagen aus dem durch parallele Aggregation und kovalente Bindung (cross-link) die Mikrofibrille hervorgeht^{[9],[67],[76]}. Diese Quervernetzung, bestehend aus cross-links, ist für die Reißfestigkeit der Fibrille entscheidend und resultiert in einer höheren Zugfestigkeit als Stahl^[67]. Die komplizierte helikale Form und die dichte Quervernetzung innerhalb des Kollagengerüsts sind Grundlage für die im Polarisationsmikroskop sichtbare, sinuswellenartige Darstellung (Crimp) von Bändern und Sehnen (Abbildung 1-10).



1-10:VKB-Längsschnitt (Schaf-Gewebe)
Polarisationslicht; x200
Deutliche, sinuswellenartige Darstellung (Crimp) der Kollagenstruktur des Bandes.

Dieser Crimp ist einzigartig für jedes Band, jede Sehne im Körper und ist Ausdruck einer funktionellen Adaptation an die Umgebung ^[17].

Die Wirkungen einer langen Immobilisierung des Kniegelenkes auf das Kollagenverhältnis Typ-I / Typ-III und den Gehalt an cross-links im VKB lässt sich an einer Veränderung des „Crimps“ nachvollziehen ^[95]. Ebenso ist bei dem in Stufen ablaufenden Prozess des Remodelings in einem Kreuzbandtransplantat, ein dem Remodeling folgendes „Crimpverhalten“ zu beobachten ^[7].

Der „Crimp“ dient jedoch nicht nur morphologischen Studien, sondern er hat entscheidenden Anteil an den elastischen Rückstellkräften und dem nichtlinearen Spannungsverhalten des VKB^[139]. Während einer Bewegung im Kniegelenk werden alle Bereiche des VKB einer unterschiedlichen Spannung ausgesetzt ^[140]. Die Kollagenfasern reagieren darauf mit einer Abflachung des Crimp, sie werden elastisch gedehnt, so dass benachbarte Fasern einen Teil der Spannung aufnehmen können ^[140]. In Abhängigkeit von der Belastung wird die notwendige Anzahl an Kollagenfasern rekrutiert.

Dieser Mechanismus hat Anteil an den viskoelastischen Eigenschaften des Bandes und beeinflusst den Verletzungsmodus eines VKB. Da die Faserbündel in verschiedenen Mustern belastet werden, ist Versagensart (Elongation, Ruptur) und Lokalisation sehr variabel, abhängig von der Art der Belastung und Position, in der sich das Gelenk in diesem Moment befindet ^[37].

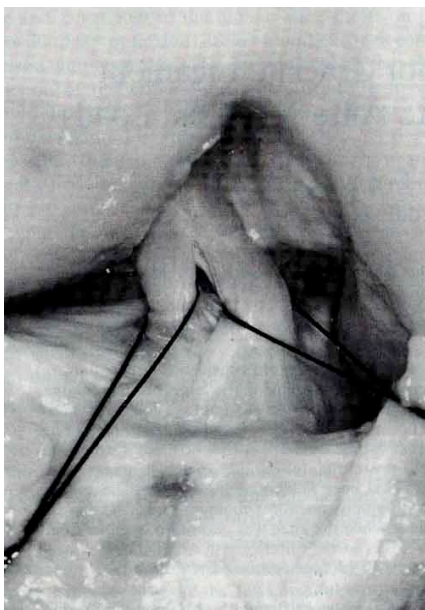
1.2.5 Biomechanik

Diese nichtlineare Spannungseigenschaft des VKB ermöglicht es, den reibungslosen Bewegungsablauf des Kniegelenkes aufrechtzuerhalten und gleichzeitig einer größeren Gelenkfehlstellung unter exzessiver Belastung zu widerstehen ^[139]. Die Insertionsstellen, sowohl des vorderen als auch des hinteren Kreuzbandes, sind so gelegen, dass zu jedem Zeitpunkt einer Bewegung des Kniegelenkes die Distanz zwischen femoraler und tibialer Insertionsstelle identisch, d.h. isometrisch bleibt ^{[89],[100]}. Die Isometrie ist die Determinante für die Kniestabilität und Intaktheit, und gerade weil das unverletzte VKB stets isometrisch bleibt, verändert sich sein Spannungszustand im Laufe einer Bewegung des Gelenkes ^{[10],[140]}.

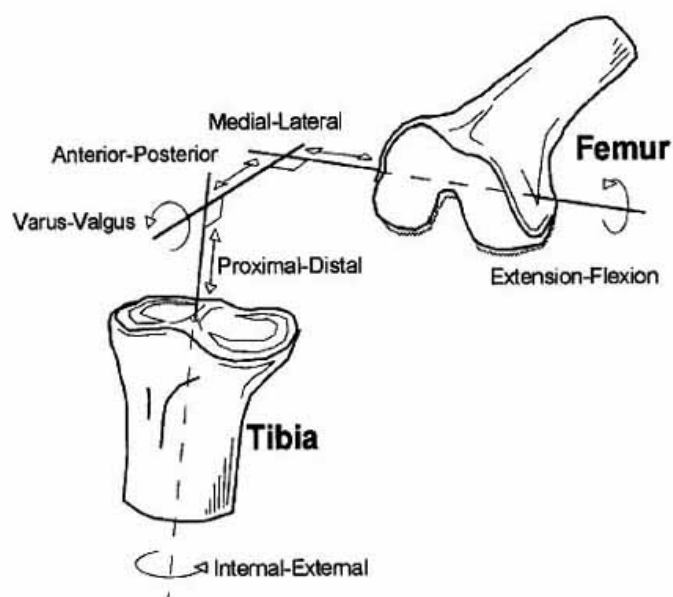
Die Spannungszustände der einzelnen Faserbündel des VKB verändern sich dabei allerdings nicht gleichsam, sondern für jedes Bündel ganz individuell ^[140]. Um die Spannungszustände des VKB während einer Kniegelenksbewegung zu studieren, lassen sich aus funktioneller Sicht ein anteromediales und ein posterolaterales Bündel voneinander trennen ^[111] (Abbildung 1-11). In Streckung und Überstreckung sind alle Fasern (insbesondere die des posterolateralen Bündels) des VKB gespannt. Wird das Knie gebeugt, entspannen sich vor allem die Fasern des posterolateralen Bündels zunehmend, bei etwa 60° wird das Spannungsmaximum des anteromedialen Bündels durchlaufen bis das Spannungsminimum des Gesamtbandes bei einer Beugung von etwa 90° erreicht wird ^[111].

Das Kniegelenk arbeitet in einem komplexen und interaktiven, neuromuskulären System ^[63]. Dabei ermöglicht das Gelenk Bewegungen in sechs Freiheitsgrade, unterteilt in drei Translations- und drei Rotationsrichtungen (Abbildung 1-12).

Als Bezugsachsen dienen dabei die Achsen durch den Tibiaschaft, durch die Kondylen und in Richtung anterior / posterior die senkrecht auf den vorherigen steht ^[140]. In und um diese Achsen sind Bewegungen in Form von Translation und Rotation möglich. Geführt werden diese Vielzahl von Bewegungen durch die geometrische Form der Gelenkflächen, Bänder und anderen Strukturen des Stützgewebes ^[140].



1-11: Photographie zeigt das VKB, mit anteromedialen- und posterolateralen Bündel. Sakane M. et al.: JOR 15: 285-293



1-12: Schema beschreibt die sechs Freiheitsgrade des menschlichen Kniegelenkes. Woo et al.: AJSM 27/4: 533-543

Dabei erfüllt das VKB zwei sich ergänzende Aufgaben: die eine ist propriozeptiv die andere biomechanisch. Das VKB und HKB stellen in dem Bewegungsablauf des Kniegelenkes „Gelenkstangen“ dar, die den ungehinderten Ablauf der physiologischen „Roll-Gleit-Bewegung“ gewährleisten ^[89]. Das VKB verhindert als primärer Stabilisator eine vordere Translation der Tibia gegenüber dem Femur. Fällt das VKB als eine der Determinanten dieses mechanischen Prinzips aus, resultiert daraus eine veränderte Gelenkmechanik, welche als vermehrte anteriore Laxität messbar wird ^{[39],[77]}. Durch ein Überwiegen des M. quadrizeps kommt es bei jedem aktiven Streckvorgang zu einer pathologischen anterioren Translation der Tibia. Diese pathologische Bewegungsfreiheit des Tibiakopfes gegenüber dem Femur nach anterior kann beim Patienten das subjektive Gefühl der Instabilität im Kniegelenk erzeugen ^[77]. Des weiteren widersteht das VKB Kräften, die eine vermehrte Innenrotation oder Abduktion in Flexionsstellung des Kniegelenkes bewirken würden³⁷.

1.3 Die Rekonstruktion des Vorderen Kreuzbandes

Das VKB ist eines der am häufigsten verletzten Bänder des Menschen. In den USA beläuft sich die Häufigkeit von Rupturen des VKB derzeit auf einen Fall pro 3000 Einwohner / Jahr, das heißt allein für Amerika 95.000 frische VKB-Rupturen pro Jahr ^[90]. Diese hohe Inzidenz hängt mit dem gewachsenen Gesundheitsbewusstsein, der zunehmenden Anzahl von Freizeitsportlern und der Verbreitung kniebelastender Sportarten zusammen. So ist die Inzidenz in Risikopopulationen wie zum Beispiel Skifahrern oder Fußballspielern fast doppelt so hoch wie in der Durchschnittsbevölkerung ^{[64],[77]}. Neben der akuten Instabilität hat die VKB-Verletzung das Potential, eine chronische Instabilität zu entwickeln, die in einer vorzeitigen, oder zumindest in einer langsam voranschreitenden degenerativen Veränderung des Knies münden kann.

Daher verwundert es nicht, dass schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts von innovativen Chirurgen neue Techniken entwickelt wurden, um eine VKB-Verletzung operativ zu stabilisieren.

1.3.1 Historischer Überblick über die Chirurgie des Vorderen Kreuzbandes

Die Auswirkung rupturierter Kreuzbänder auf die Kniegelenksmechanik wurde erstmals 1845, von **Amédée Bonnet** in Lyon beschrieben. Er postulierte: „Bei Patienten ohne Fraktur sind die Symptome: schnappendes Geräusch, Hämarthros und Verlust der Gelenksfunktion, typisch für ligamentäre Verletzungen im Knie ^[15].“ Er stützte seine These sowohl auf klinische Beobachtungen als auch auf Kadaverstudien, bei denen er Knie traumen setzte. Diese Knie wurden daraufhin seziiert um das Verletzungsmuster beschreiben zu können.

Im Jahre 1875, verfasste der Grieche **Georges K. Noulis** ^[96] (1849-1919) eine Arbeit mit dem Titel „Knee Sprains“. Darin beschrieb er sehr dezidiert die Funktion des VKB, zu dem beschrieb er die Vorgehensweise, mit der das Band untersucht werden sollte.



Georges K. Noulis

Interessanter Weise ist dieser von **Noulis** beschriebene Test, identisch mit dem heute bekannten Lachman-Test.

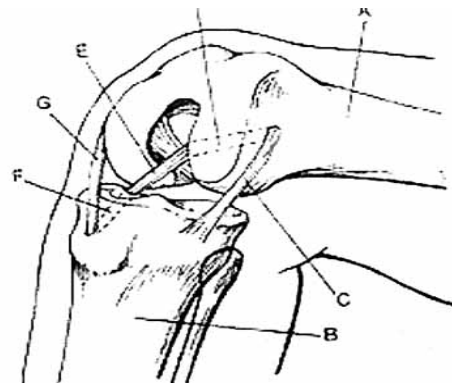
Mit der Fähigkeit, die Ruptur eines VKB zu diagnostizieren und aufgrund der schlechten Verläufe verletzter VKB wurden bald erste Versuche unternommen, rupturierte vordere Kreuzbänder operativ zu therapieren. Die erste operative Versorgung einer VKB-Ruptur wurde 1895 von **Mayo Robson** (Leeds, UK) durchgeführt ^[86]. Der Patient, ein 41-jähriger Grubenarbeiter, litt an einer Schwäche und Instabilität seines Knies in Folge eines Sturzes. Die Enden des rupturierten VKB wurden im Bereich der femoralen Insertion miteinander vernäht.

Der Arbeiter beschrieb sein Knie sechs Jahre später als: „*perfectly strong*“. Dieser Fall wurde erst 1903 bekannt, nachdem der Brite **W.H. Battle** den Ruhm, die erste operative Versorgung durchgeführt zu haben, für sich in Anspruch nehmen wollte.

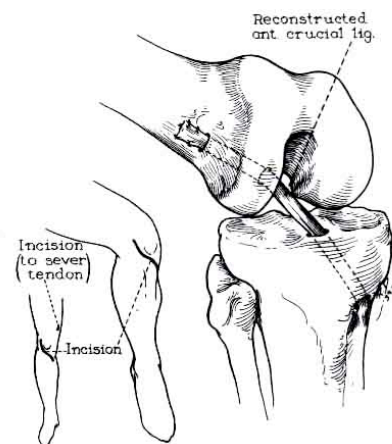
Im Jahr 1917 führte **Ernest W. Hey Groves** [56],[57] (Bristol), die erste VKB-Rekonstruktion mit einem Transplantat aus Anteilen des Tractus ilio-tibialis durch. In der modifizierten Version führte er ein 20 cm langes Transplantat, das immer noch an der Tibia inserierte, durch einen Tunnel in der lateralen Condyle (Abbildung 1-13). Das Transplantat verlief nun durch das Gelenk bis zum tibialen Tunnel, der sich in vorderen Anteilen der Protuberantia intercondylaris befand. Vom Ausgang, im antero/medialen Bereich der Tibia, führte das Transplantat bis zum medialen Condylus, an dem es mit einem Eisennagel befestigt war.

In den folgenden Jahrzehnten wurden die bestehenden Techniken weiter modifiziert. Aber auch neue Versuche wurden unternommen, speziell die Transplantatwahl war schon damals eine Quelle der Innovation. So ersetzte bereits 1935, **Campbell**, aus Memphis (Tennessee) ein defektes VKB mit dem tibial gestielten, medialen Drittel der Patellar-Sehne^[24]. Schon vier Jahre später 1939, folgte durch **Macey** aus Rochester, die Rekonstruktion mit der Sehne des M. semitendinosus (Abbildung 1-14)^[80].

Nach Jahren des Stillstandes, bedingt durch den Zweiten Weltkrieg, wurde in den Jahren 1963 durch **Jones** aus Little Rock (Arkansas) und 1966 durch den deutschen Chirurgen **Brückner**, die Idee des gestielten Patella-Transplantates wieder belebt (Abbildung 1-15 + 1-16, S. 18)^{[22] [65]}.



1-13: Schema beschreibt die Technik nach Hey Groves. Das Tractus-Transplantat ist durch C gekennzeichnet.



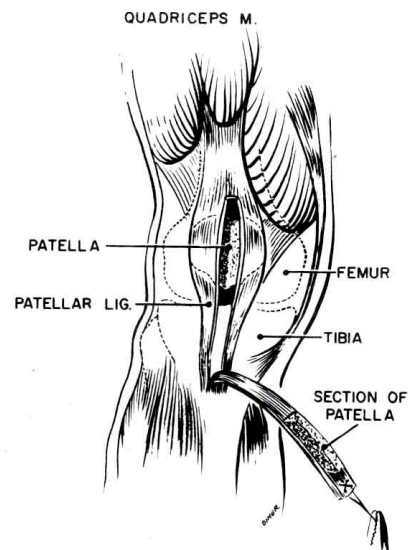
1-14: Schema beschreibt die Technik nach Macey. Die Sehne des Semitendinosus dient als gestieltes Transplantat. Macey H. B.: 1939 Surg.Gynecol.Obstet. 69: 108-109

Aber erst der Berliner **Kurt Franke** gilt als Schöpfer des freien Patella-Sehnen-Transplantates 1969, bestehend aus einem „Knochen-Patellasehne-Knochen-Stück“ (BPTB). Seine Technik baute auf denen von **Jones** und **Brückner** auf, im Gegensatz zu ihnen verwendete er jedoch ein freies Transplantat.

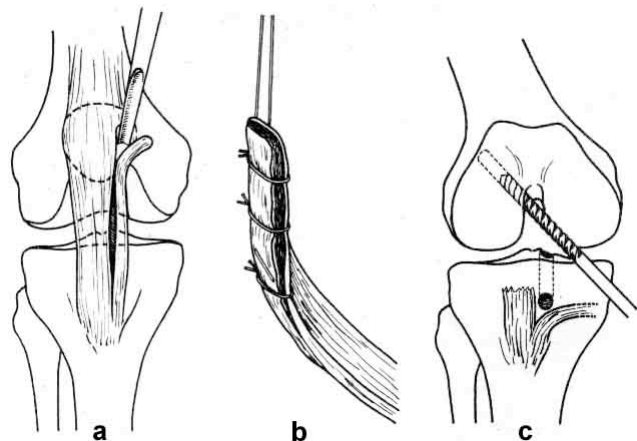
Die achtziger Jahre sind im Zeichen, der Arthroskopie und des synthetischen Kreuzband-Ersatzes zu sehen. Die Vorteile der synthetischen Materialien (Karbon-Fasern , Dacron, Gore-Tex) bestehend aus kurzen Operationszeiten und dem geringeren Operationstrauma, wurden aber durch das endemische Auftreten von chronischen Synovitiden und Re-Rupturen aufgewogen, so dass dieser Weg wieder schnell verlassen wurde^[30].

Während all dieser Jahre verwendeten viele Operateure weiterhin Autografts (Transplantate aus körpereigenem Gewebe) mit dem Unterschied das nun vermehrt die Arthroskopie zum Einsatz kam.

In den neunziger Jahren hatte sich die VKB-Rekonstruktion mit dem BPTB-Transplantat als „golden standard“ durchgesetzt.



1-15: Schema zeigt Technik nach Jones. Gestieltes, mediales Drittel der Patella-Sehne mit Knochenblock.
Jones KG. : 1963 JBJS 45A: 925-932



1-16: Schema zeigt Technik nach H. Brückner:
a) zeigt die Präparierung des gestielten, medialen Drittels der Patella-Sehne mit Knochenblock
b) zeigt das proximale Ende des Transplantates mit Zugdraht
c) zeigt Bohrung des femoralen Tunnels
Brückner H.: 1966 Chirg. 37: 413-414

Zu Beginn des neuen Jahrtausends konnte in der Literatur ein zunehmender Trend zu der Semitendinosussehne beschrieben werden. Dies wurde maßgeblich durch die verbesserten Transplantat-Fixationsmöglichkeiten wie z.B. der Interferenzschraube beeinflusst.

Als Erkenntnis der letzten Jahre lässt sich zusammenfassend festhalten, dass jeder / jede PatientIn ein individuelles Anforderungsprofil an die VKB-Rekonstruktion stellt. Aus diesem Grund sollte aus dem großen Angebot der Rekonstruktionsmöglichkeiten (BPTB-, Semitendinosussehnen-Transplantat, Einzelbündel- / Doppelbündel-Rekonstruktion, Fixationstechniken, etc.) die zutreffende Lösung gewählt werden.

1.3.2 Aktuelle Methoden der Kreuzbandchirurgie

Die Wahl des Transplantates

Zu Beginn der neunziger Jahre setzte sich das Patellasehnen-Transplantat, bestehend aus dem mittleren Drittel der Patellasehne mit anhängenden Knochenblöcken, als der „Goldstandard“ durch ^{[12],[27]}. Das Patella-Sehnen-Transplantat wird heutzutage üblicherweise in endoskopischer Technik mit metallenen oder resorbierbaren Interferenzschrauben auf Höhe des Gelenkspaltes anatomisch fixiert ^{[75],[88],[137]}. Diese Methode gewährleistet eine hohe, initiale Fixationsfestigkeit und große Steifigkeit des Transplantates. Die zahlreichen experimentellen Arbeiten wurden durch die guten klinische Ergebnisse bestätigt ^{[23],[83],[122]}. Die hohe initiale Fixationsfestigkeit ist eine Grundvoraussetzung für eine frühzeitige „aggressive“ Rehabilitation, welche für den Langzeiterfolg nach vorderer Kreuzbandersatzplastik entscheidend ist ^[95]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine annähernd isometrische Platzierung des Transplantates erzielt werden kann. Die isometrische Transplantatplatzierung ist ausschlaggebend für die postoperative Kniestabilität und sichert das Langzeitüberleben des Transplantates ^[41].

Aber auch dieses Transplantat weist einige Schwächen auf. In Folge des operativen Eingriffes treten häufiger Beschwerden im patello-femorale Gleitlager auf, deren Ursache in der Transplantatentnahme zu finden ist ^{[3],[110]}. Zu Patellafrakturen oder Rupturen der Patellasehne kommt es nur in seltenen Fällen ^[85]. Die mit der Entnahmemorbidität verbundenen Komplikationen, insbesondere die Schmerzen im

patellaren Gleitlager, erschweren die Rehabilitation und gefährden dadurch den Langzeiterfolg der Operation ^{[2],[4]}.

Bei der Suche nach Ausweichtransplantaten erinnerte man sich der „Hamstringsehnen“ (Semitendinosus- & Gracilissehne). Diese Sehnen werden als „Vierfachtransplantat“ (beide Sehnen werden gefaltet und zusammengelegt oder Semitendinosussehne alleine), verwendet ^[3]. In dieser Form gleicht die Dimension dem des nativen VKB. Zudem geht man davon aus, dass durch die Bündel-Struktur des Transplantates die des VKB am besten imitiert werden kann ^[111]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass patello-femorale Probleme wesentlich seltener auftreten ^{[3],[108],[129]}.

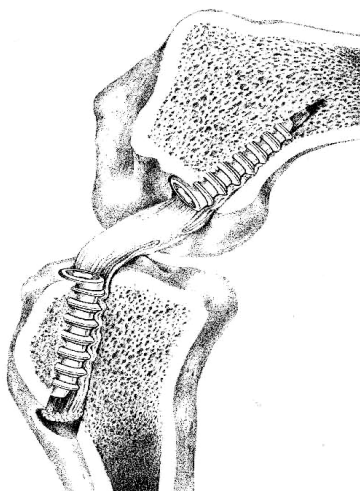
Die für die frühe Rehabilitation notwendige Fixationsfestigkeiten lassen sich mit den gängigen Methoden, z.B. dem „EndoButton“ (extraartikulär) oder durch Schraubenfixation (anatomisch) mit großer Sicherheit gewährleisten ^[61].

Andere Weichteiltransplantate wie z.B. Anteile der Quadrizepssehne oder des Tractus ilio-tibialis, finden insbesondere in der Revisionschirurgie eine Verwendung. Dagegen erlangen in letzter Zeit die Allotransplantate eine zunehmende Bedeutung. Die Spendersehnen vereinigen dabei die Vorteile der synthetischen Materialien in Form reduzierter Operationszeit und geringerem Trauma, ohne durch deren Nachteile beeinträchtigt zu werden ^{[37],[42]}. Die Verbesserung der Verarbeitungsmethoden und die Minimierung des Infektionsrisikos tragen zu der wachsenden Beliebtheit der Spendertransplantate, gerade bei Revisionseingriffen oder komplexen Knieverletzungen, bei.

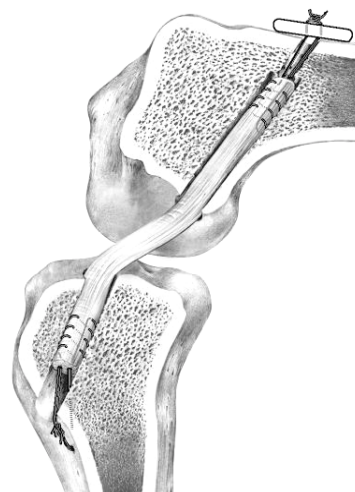
Die Diskussion über das Transplantat darf aber nicht über die Tatsache hinweg täuschen, dass während den ersten vier bis sechs Wochen nach Rekonstruktion die Fixation der schwächste Punkt ist ^[107].

Möglichkeiten in der Transplantatfixierung

Bei der Diskussion der Transplantatfixierung spielen nicht nur die Arten (Schraube, EndoButton, Crosspinn, Staple) und deren Materialien (Titan, Biomaterialien) eine Rolle sondern, auch der Ort der Fixation. Grundsätzlich kann zwischen der gelenkfernen- (extraartikulären-) und der gelenknahen- (anatomischen) Fixierung unterschieden werden (Abbildungen 1-17 + 1-18).



1-17: Schema zeigt die anatomische Fixierung mit Interferenzschraube.



1-18: Schema zeigt die extraartikuläre Fixierung mit EndoButton und Knochenbrücke

Bei der Verwendung von Hamstringsehnen wurde gerade in den Anfangsjahren auf extraartikuläre Verankerungen zurückgegriffen ^[75]. Hierdurch konnten zufrieden stellende initiale Fixationsfestigkeiten erzielt werden, welche teilweise über denen von Patellasehnenrekonstruktionen lagen ^[101]. Die initialen Fixationssteifigkeiten und klinischen Ergebnisse hinsichtlich der Kniestabilität blieben jedoch hinter denen, bei Verwendung von Patellasehnen und anatomischer Fixierung mittels Interferenzschrauben erzielten Werten zurück ^{[60],[101]}.

Erklärt wird dieses Phänomen damit, dass bei einer anatomischen Verankerung neben der Verankerung selber nur der intraartikuläre Anteil des Transplantates für die Steifigkeit verantwortlich ist, bei einer extraartikulären Verankerung jedoch zusätzlich noch die Anteile des Transplantates im Bohrtunnel zur Steifigkeit der Rekonstruktion beitragen ^{[59],[135]}.

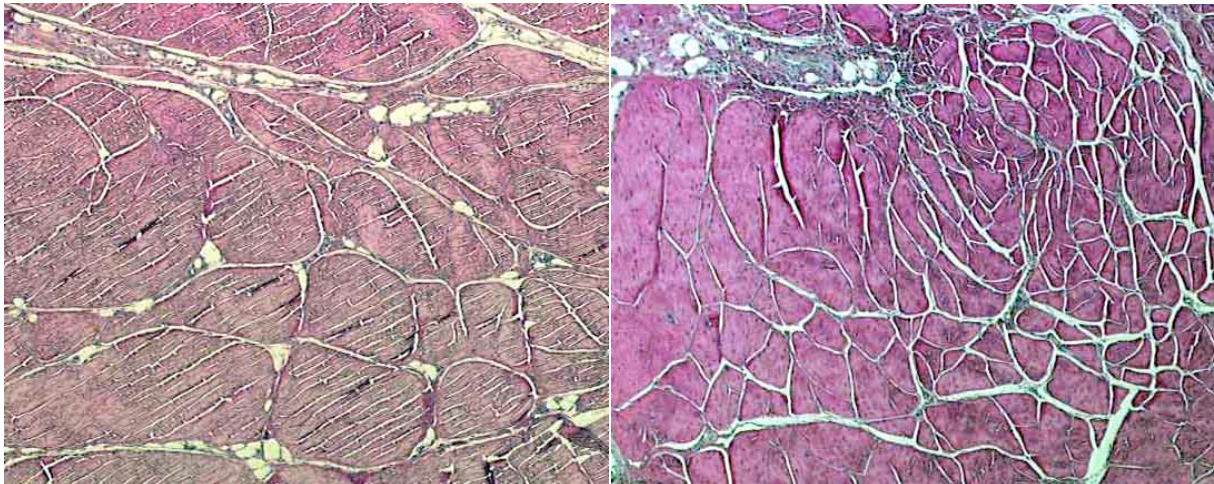
Interessanter Weise muss in Folge der zahlreichen klinischen Studien, die über eine Vielzahl von Fixationstechniken berichten festgehalten werden, dass die Fixation nur ein kleines Problem darstellt ^{[20],[21]}.

Die Prävalenz und funktionelle Bedeutung von Transplantatgleiten assoziiert mit einer bestimmten Fixationsmethode ist immer noch unbekannt ^[37].

1.4 Transplantateinheilung und Remodeling

Nach erfolgter Rekonstruktion wird das VKB-Transplantat von denselben biologischen und biomechanischen Prozessen bei der Einheilung beeinflusst, die vorher auf das VKB einwirkten⁸⁹. Diese biologischen Prozesse interagieren mit den biomechanischen Kräften im Kniegelenk und verwandeln das Transplantat in das Gewebe, das die Funktionen des VKB übernehmen soll.

Die dabei verwendeten Transplantate wie zum Beispiel Anteile der Patellasehne, Semitendinosusehne oder Allografts sind alle Sehngewebe, die die Funktion eines Bandes ersetzen sollen. Bei allen Ähnlichkeiten zwischen Sehnen und Bändern bestehen doch große Unterschiede in biochemischer Zusammensetzung und Morphologie^{[6],[16]}. In beiden Geweben findet man in der Histologie straffe Kollagenfaserverbände, die durch dünne Septen voneinander getrennt werden^{[6],[143]} (Abbildungen 1-19 + 1-20). Jedoch ist das Sehngewebe durch parallele Ausrichtung dieser Faszikel charakterisiert, wogegen im VKB eher eine multiaxiale Struktur überwiegt^[17].



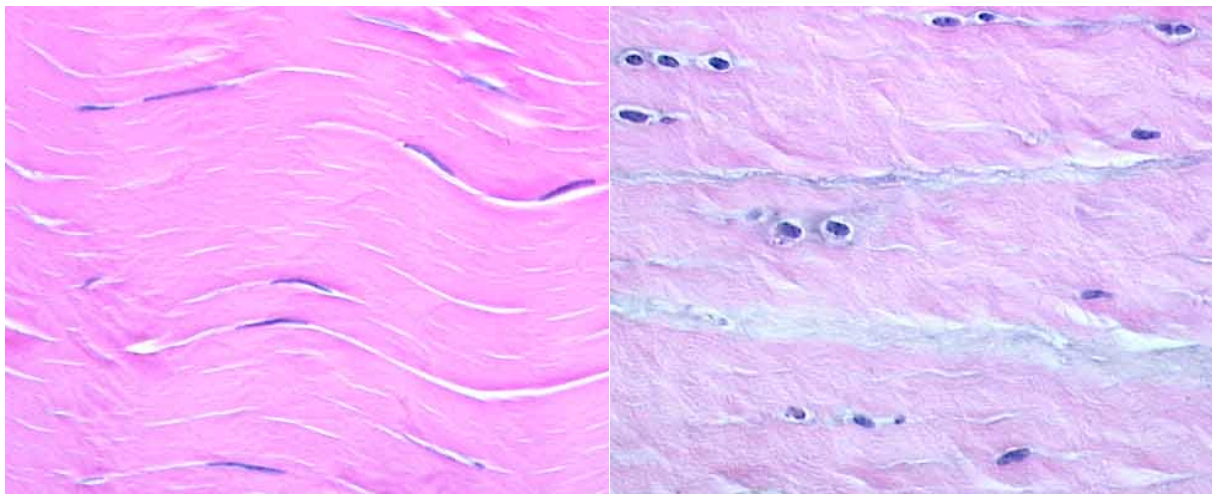
1-19: Querschnitt einer Achilles-Sehne vom Schaf. Deutlich sind relativ große Faserverbände zu erkennen. HE Färbung, x50

1-20: Querschnitt des VKB vom Schaf. Es ist eine deutlich feinere Septierung und kleinere Faserverbände als in der Achilles-Sehne erkennbar. HE Färbung, x50

Das VKB ist durch diese Septen in feinere Kollagenfaserverbände unterteilt als das Sehngewebe ^[143]. Daneben erkennt man bei Längsschnitten in der Polarisationsmikroskopie eine deutlich längere Kollagenwellenlänge (Crimp) im Sehngewebe als bei den Bändern. Das Sehngewebe enthält im Vergleich zum Bandgewebe eine kleinere Fibroblastenzahl, verbunden mit geringen morphologischen Unterschieden innerhalb der Fibroblastenpopulation ^[6].

Während die Zellkerne der Fibroblasten im Sehngewebe fast ausnahmslos lang gestreckt und spindelförmig, parallel zur Belastungsachse, erscheinen, findet man im Bandgewebe eine Vielfalt von Zelltypen ^{[6],[17]}.

Man kann spindelförmige, ovoide und runde- (chondroide) Zelltypen mit einer perizellulären Hofbildung, die ultrastrukturell Glykosaminoglykane (GAG) enthält, unterscheiden (Abbildungen 1-21 + 1-22) ^{[6],[17]}.



1-21: Längsschnitt einer Flexor-Sehne (Schaf) mit spindelförmigen Fibroblasten ohne Zytoplasma-Saum. HE Färbung, x400

1-22: Längsschnitt eines VKB (Schaf) mit ovoiden- und runden Fibroblasten mit breitem Zytoplasma-Saum. HE Färbung, x400

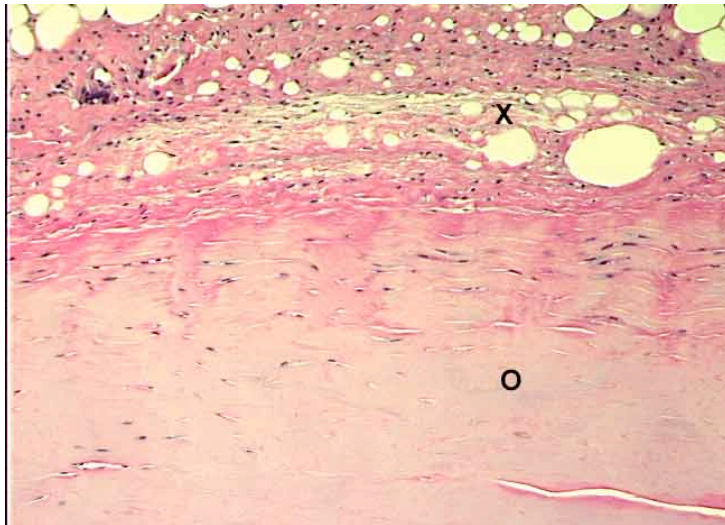
Der in der Morphologie der Gewebe ersichtliche Unterschied wird durch die biochemische Zusammensetzung derselben untermauert. Der Gesamtgehalt an DNA ist im metabolisch aktiveren VKB nahezu doppelt so hoch wie der im Sehngewebe. Beim Vergleich der Menge an GAG, erreicht das VKB sogar den 2.5-fachen Wert des Sehngewebes ^[6]. Im Gegensatz dazu besitzen Sehngewebe einen größeren Kollagenanteil bezogen auf das Trockengewicht der Gesamtmasse als es beim VKB der Fall ist ^[6].

Auch die Zusammensetzung des Kollagens differiert, ist der Anteil an Kollagen Typ-III im Sehngewebe verschwindend gering, beträgt er im VKB immerhin ca. 10% ^[6]. Noch deutlicher ist der Unterschied bei den cross-links. Das VKB enthält eine hohe Konzentration an DHLNL (Di-Hydroxy-Lysino-Nor-Leucine) und relativ wenig HHMD (Histidino-Hydroxy-Mero-Desmosine) und HLNL (Hydroxy-Lysino-Nor-Leucin). Beim Sehngewebe verhält es sich genau die gegensätzlich. Es enthält sehr viel HHMD und HLNL und nur Spuren von DHLNL. Die cross-links werden somit zu einem hervorragenden Marker für Umbauprozesse an einem Kreuzbandersatz.

Das Transplantat durchläuft nach einer VKB-Rekonstruktion eine Anpassungsreaktion. Wie bereits erwähnt wird das Transplantat durch die veränderte biochemische- und biomechanische Umgebung innerhalb des Kniegelenks umgebaut. In einem phasenhaften Verlauf ähnlich der Wundheilung ^[17]. Die Arbeitsgruppe um Arnoczky et al. schlussfolgerten, dass ein erfolgreiches Transplantat eine ähnliche histologische Erscheinung aufweist wie das normale Band ^[11]. Diese Umwandlung von der Sehne zum Band, in Form einer „Ligamentisierung“, verläuft in drei Phasen ^{[7],[17]}.

1.4.1 Degenerations- und Nekrosephase

Unmittelbar postoperativ wird die Festigkeit einer VKB-Rekonstruktion von der chirurgischen Fixation bestimmt ^{[17],[76]}. In den folgenden Wochen durchläuft das freie avaskuläre Sehnen transplantat eine partielle, ischämische Nekrose und Degeneration. In dem aufgequollenen Transplantat dominieren ein Zell- und Strukturverlust des Gewebes ^{[7],[17]}. In den Zellen kommt es zur mitochondrialen Schwellung und Degranulation des Endoplasmatischen Retikulums. Zusammen mit der Desintegration der Kollagenfibrillen sind dies die bestimmenden Zeichen der Degeneration des Transplantates. In der Peripherie deuten vitales Gewebe und stattfindende reparative Prozesse auf eine Versorgung durch die synoviale Flüssigkeit hin. Das sich bildende Granulationsgewebe wird bis zu einer kritischen Tiefe durch Diffusion versorgt ^[5] (Abbildung 1-23, Seite 26).



1-23: Längsschnitt eines VKB-Transplantates im Schaf (Studientier) 3. Wochen post OP. HE x 100

O: zeigt nekrotischen und azellulären Bereich aus der zentralen Zone des Transplantates.

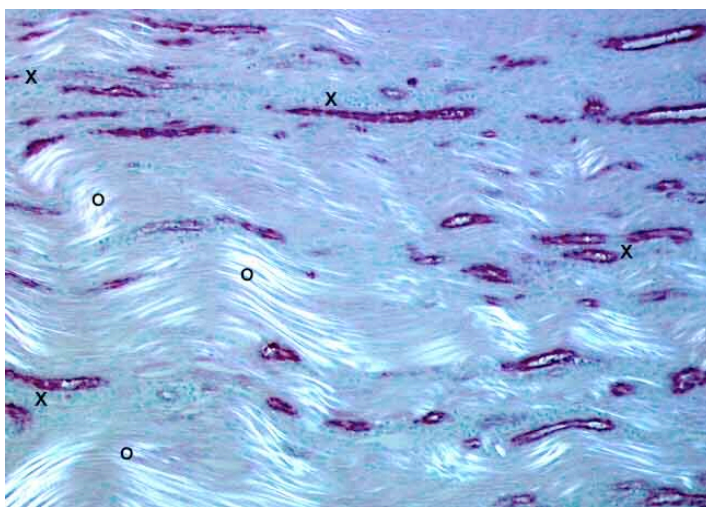
X: zeigt neu gebildetes Granulationsgewebe aus der peripheren Zone des Transplantates.

Diese Veränderungen führen zu einer sukzessiven Verminderung der biomechanischen Eigenschaften des Transplantates [7],[17]. Am Ende der Nekrosephase, zwischen der vierten und sechsten Woche, ist schließlich der intraartikuläre Abschnitt des Transplantates der Faktor der die Stabilität bestimmt.

1.4.2 Reparativ-proliferative Phase

Die Revitalisierung des Gewebes wird von einer aus der Peripherie nach zentral voranschreitenden Revaskularisierung und Zelleinwanderung bestimmt

(Abbildung 1-24) [17]. Diese einwandernden Zellen sind metabolisch hoch aktiv.



1-24: Längsschnitt eines VKB-Transplantates im Schaf (Studientier) 6. Wochen postoperativ. Immunhistochemie mittels Faktor VIII. Darstellung im angedeuteten Polarisationslicht. x100

O: altes Transplantatgewebe, der großwellige Crimp der Sehne ist noch deutlich zu erkennen.

X: fingerförmiges Einstrahlen von

Als Bildungsort dieser Zellen dient vermutlich die Synovialis [76]. Die Synovialis besitzt eine Kombination aus makrophagen- und fibroblastenähnlichen Zellen. Der vermehrte Nachweis von Kollagen Typ-III und Fibronectin, die Zunahme des GAG-

Gehalts und der dünnen Kollagenfibrillen sind dabei Ausdruck von reparativ-proliferativen Prozessen, die zum Teil auch im Rahmen der Ligamentheilung auftreten ^[76]. Der Gehalt an „cross-links“ vollzieht in dieser Zeit einen eindrucksvollen Wechsel. Bereits in der zweiten Woche postoperativ verändert sich das Verhältnis in Richtung des für Ligamente typischen Gehalts, und diese Transformation ist erst in der 30. Woche nahezu abgeschlossen ^[7].

Während der Proliferationsphase, in der die fibroblastenähnlichen Zellen schrittweise das Transplantat bevölkern und Kollagen produzieren, kommt es zu einer massiven Desorganisation des Gewebes und damit zu einer signifikanten Abnahme der mechanischen Eigenschaften ^[119].

1.4.3 Remodelingphase

Der Proliferationsphase in der überschießend Extrazellulärmatrix produziert wird, folgt die Remodellingphase, die in etwa um die 16. postoperative Woche beginnt ^{[17],[76],[91]}. Dies äußert sich in einer zunehmenden Längsorientierung der Kollagenfaserbündel mit erneuter Ausbildung der Septierung, einer Normalisierung des Zellgehaltes und Vaskularisierung sowie in einem gegenüber der reparativ-proliferativen Phase verminderten Gehalt an Kollagen Typ-III und Fibronectin. Während des Zeitraumes zwischen der 26. und 52. Woche kommt es zu einer stetigen Verbesserung der morphologischen Struktur und der biomechanischen Belastbarkeit ^{[17],[76],[91],[107]}.

Der langsame Prozess der Einheilung und des Remodelings wird durch viele Faktoren beeinflusst: die Transplantatwahl, der intraartikulären Transplantatposition, der Fixationstechnik und nicht zuletzt die mechanische Umgebung der VKB-Rekonstruktion ^{[20] [54] [81] [97],[98]}.

1.4.4 1.4.4 Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten

Die endoligamentäre Revaskularisierung eines freien Sehnentransplantates nach vorderem Kreuzbandersatz ist eine notwendige biologische Voraussetzung der Ligamentisierung und Gewährleistung der Langzeitüberlebensdauer des Transplantates ^[11]. Im Gegensatz zum nativen vorderen Kreuzband wird das Transplantat von keiner gut vaskularisierte synovialen Oberfläche umhüllt und besitzt keinerlei Blutversorgung. Wie oben beschrieben durchläuft der Bandersatz während des Einheilungsprozesses drei verschiedene Phasen, wobei es über eine Phase der initialen Degeneration zum Einwachsen von hyperzellulärem und hypervaskulärem Granulationsgewebe kommt bis das Transplantat nach bis zu zwei Jahren annähernd seine originäre Festigkeit wiedererlangt ^[17]. Durch die einwachsenden Kapillaren wird die notwendige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet und damit der Heilungsprozeß entscheidend bestimmt.

Die Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten wurde in der Vergangenheit intensiv in verschiedenen Studien untersucht ^[7,11].

Arnoczky und Coautoren berichten in einer Untersuchung am Hund von einem nach 20 Wochen mit reichlichen Kapillaren durchsetzten Patellarsehnentransplantat nach vorderem Kreuzbandersatz ^[11]. In dieser Studie wurde eine dem nativen vorderen Kreuzband vergleichbarer Gefäßstatus nach 12 Monaten erreicht. Laser Dopplerflowmetrie gestützte Untersuchungen ^[123] von humanen autologen Kreuzbandtransplantaten zeigten ebenfalls die späte Wiedererlangung der Gefäßdichte entsprechend dem nativen VKB nach 12 Monaten.

Im Gegensatz dazu wird in anderen Studien von einer unveränderten Hypovaskularität des Transplantats noch acht Wochen postoperativ berichtet, und eine wesentliche Änderung der Gefäßverteilung nach sechs und zwölf Monaten postoperativ konnten nicht festgestellt werden ^[26].

Diese kontroversen Aussagen lassen sich durch zum Teil unterschiedliche Studiendesigns und unterschiedliche Techniken der Gefäßdarstellung erklären.

Bislang wurden die Spalteholztechnik und die Tuscheinjektion verwendet, aber auch mikroangiographische Verfahren und die Laser-Dopplerflowmetrie kamen zum Einsatz. ^[123].

Diese Techniken ermöglichen jedoch nur Aussagen über direkt unter der Oberfläche liegende Gefäße (Laser-Dopplerflowmetrie) oder vermögen, nur Gefäße bis zur Größe einer Venole oder Arteriole sicher nachzuweisen. Das endoligamentäre Kapillarnetz konnte bis vor kurzem nicht präzise dargestellt werden ^[123].

Unterhauser et. al zeigte kürzlich durch immunhistochemische Färbungen ein kontinuierliches Einwachsen von Kapillaren in das avaskuläre Transplantatgewebe. Der verwendete Antikörper dabei ist gegen den auf der Zelloberfläche von Endothelzellen lokalisierten v. Willebrandt Faktor (F. VIII) gerichtet und erlaubt es selbst kleinste Kapillaren, im Endstromgebiet bereits ohne glatte Gefäßmuskelzellen, klar zu identifizieren.

1.5 Platelet-Derived Growth Factor

1.5.1 Geschichte und Entdeckung von PDGF

Der Wachstumsfaktor (WF) Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ist ein weit verbreitetes Mitogen. Ursprünglich wurde es aufgrund der Tatsache entdeckt, dass bei Zellkulturen aus Mesenchymal-Zellen eine Aktivität von WF nachgewiesen werden konnte während sie in einem Medium aus Serum gezüchtet wurden diese Aktivität fehlte jedoch in zellfreiem Plasmamedium ^{[69],[109]}. Der Verdacht, dass die Plättchen als Quelle der WF dienen, wurde bereits 1971 von Balk et al. geäußert. Aber erst durch den Nachweis, dass die Plättchen, die gesamte im Plasma fehlende WF-Aktivität ersetzen können, war es offensichtlich, dass diese Zellen nicht nur die Quelle für PDGF darstellen, sondern auch für andere WF wie zum Beispiel den Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ^[25].

PDGF ist der hauptsächliche Faktor für den größten Teil der Zellteilungsaktivitäten in Plättchen. Die potenteste Wirkung entfaltet es bei Bindegewebszellen wie zum Beispiel Fibroblasten der Haut, Gliazellen und an der glatten Gefäßmuskulatur ^[109]. Es hat einen Einfluss auf die unterschiedlichen Phasen der Embryogenese und Entwicklung, die Wundheilung, die Entstehung von Neoplasien und der fibrotischen Antwort auf chronisch entzündliche Erkrankungen (Myelofibrose, Rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose). Krankheiten, die ungefähr 50% aller Todesursachen der westlichen Welt zu Grunde liegen ^[106]. Die Tatsache, dass PDGF vor allem in den α -Granulae der Plättchen gespeichert wird, führte zu der Namensgebung des WF, er

gilt mittlerweile aber als zu ungenau, da PDGF auch von einer Vielzahl anderer Zellen produziert werden kann ^[106].

1.5.2 Aufbau und Struktur

Von humanen Thrombozyten und thrombozytenreichen Plasma isoliertes PDGF, kann durch die Gelelektrophorese in zahlreiche molekulare Gewichtsformen von 28 bis 35 kDA, separiert werden. Jedes PDGF-Molekül und die größten, durch Reduktion inaktivierten, Peptide enthalten zwei grundlegende Peptidsequenzen. Das bedeutet, dass das aktive PDGF aus zwei unterschiedlichen aber homologen Polypeptidketten besteht, benannt **A** und **B**, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind ^[106]. Analysen zweier Hauptformen von aktivem humanem PDGF zeigten eine fast gleichmäßige Verteilung der PDGF **A**- und **B**-Kette, wobei Hammacher et al. nachweisen konnten, dass etwa 70% des aus lysierten humanen Thrombozyten gewonnene PDGF als das Heterodimer PDGF-**AB** vorliegt. Der überwiegende Rest wird von dem Homodimer PDGF-**BB** gebildet.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass bei der **A**-Kette von PDGF große Ähnlichkeiten mit PDGF-ähnlichen Molekülen zu erkennen ist, die aus humanen Tumor-Zell-Linien gewonnen wurden ^[49].

Es besteht eine relativ große Übereinstimmung zwischen beiden Ketten. Sie bestehen aus ca. 100 Aminosäuren (AS), die eine Tertiärstruktur bilden. Diese ist entscheidend für die biologische Aktivität ^{[55],[106]}. Innerhalb der AS-Sequenz bestehen acht Cystein-Sequenzen, die bei beiden Ketten in einem gleichen Abstand von einander vorliegen. Dieselbe Cystein-Abfolge existiert auch bei der Familie des Vascular Endothelial cell Growth Factor (VEGF). Zudem haben die Cystein-Sequenzen durch Brückenbildung innerhalb einer Kette und zwischen zwei Ketten bei der Bildung des PDGF-Moleküls eine entscheidende Bedeutung für die Struktur und biologische Aktivität dieses WF ^{[55],[106]}.

1.5.3 Wirkmechanismus

Die verschiedenen Isoformen des PDGF vermitteln die Wirkung auf ihre Zielzellen über die Aktivierung von zwei spezifischen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren ^{[55],[106]}. Der α - und der β -Rezeptor besitzen beide ein Molekulargewicht von ~170 und ~180 kDA

und induzieren über komplizierte intrazelluläre Abläufe, wie zum Beispiel der Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes oder Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen ebenso komplexe Abläufe wie die direkte Zellbewegung, Kontraktion der glatten Muskulatur und insbesondere die Zellteilung. Es ist aber nach wie vor unklar, auf welchem intrazellulären Weg bestimmte Mechanismen ausgelöst werden können.

Die Fähigkeit von PDGF, die Zellteilung zu beeinflussen, wird von anderen biologischen Komponenten im Extrazellularraum beeinflusst. Speziell Plasmafaktoren scheinen in einer koordinierenden Art zu wirken um ein Optimum an mitogener Antwort auszulösen ^[133]. Die Arbeitsgruppe um Stiles entwickelte ein Konzept der Zellteilung in zwei Stufen:

- Das Eintreten der Zellen in den Teilungskreislauf wird durch PDGF vermittelt;
- Darauf folgt der Zellkreislauf, der abhängig von den anderen Plasmakomponenten ist ^[128].

Aufgrund der Tatsache, dass die Wirkung von PDGF so weit reichende Konsequenzen vermittelt, bestehen Schutzmechanismen, die benachbarte Zellen vor einer ungewollten Aktivierung beschützen sollen:

Zum einen wird über spezielle Bindungsproteine im Plasma (α_2 Makroglobulin) ein zu langes ungebundenes Verweilen von PDGF nach Freigabe aus den Thrombozyten verhindert ^[106]. Zum anderen vermutet man, dass über eine Formationsveränderung des PDGF-Moleküls die biologische Wirksamkeit abgeschwächt oder zerstört werden kann ^[106].

Auch wenn die Freigabe, Wirkung und Protektion von und vor PDGF durch sehr komplexe Kontrollmechanismen reguliert wird, ist das humane PDGF nicht artspezifisch. Die Konservierung des PDGF-Moleküls zeigt sich in der großen Ähnlichkeit in Struktur und Aminosäuresequenz zwischen humanen PDGF und dem anderer Tierarten. Das humane PDGF bindet an Rezeptoren der Zellen von anderen Säugetieren, Hühnern und sogar Fischen. Es bestehen sogar funktionelle Homologien von PDGF und seinem Rezeptor in primitiven Tierarten:

PDGF stimuliert Chemotaxis und die Synthese von Nukleinsäure in der Protozoe Tetrahymena ^[106].

Weiterhin zeigte sich, dass PDGF-**BB** die dominierende Isoform in allen getesteten Tierarten, (Maus, Ratte, Schwein, Rind, Schaf, Hund, Huhn) darstellt ^{[18],[19]}.

1.5.4 Zusammenfassung und der klinische Bezug

Bislang gibt es wenig Literatur über die eigentliche Rolle von PDGF im lebenden Organismus. Erst seit den letzten Jahren gewinnt man vermehrt Einblicke in den Wirkmechanismus, den PDGF bei zahlreichen Krankheiten wie zum Beispiel der Arteriosklerose, Systemische Sklerose, Neoplasien aber auch der natürlichen Wundheilung triggert ^{[104],[106]}. Wie schon beschrieben vermag eine Vielzahl von Zellen wie auch neoplastisch transformierte Zellen, die Gene für beide Ketten von PDGF zu exprimieren und eine oder alle Isoformen des Polypeptids PDGF zu synthetisieren. PDGF induziert dabei die gezielte Zellmigration und Chemotaxis sowie die direkte und indirekte Zellproliferation, die häufig mit dem Remodeling von Bindegewebe verbunden ist ^{[104],[106]}.

Die wichtige Funktion von PDGF bei einer Vielzahl von Gewebeantworten insbesondere der Wundheilung konnte durch zahlreiche Modelle belegt werden ^{[72],[79],[106]}.

PDGF in der Bandheilung

Zellwanderung, Zellproliferation sowie Aktivierung der Synthese von Proteinen und Kollagen sind wesentliche Bestandteile des Heilungsprozesses nach einer Bandverletzung. Auf zellulärer Ebene kann die biologische Antwort nach einer Bandläsion in mehrere Phasen eingeteilt werden: haemorrhagische- / inflammatorische-, proliferative Phase und das Remodeling ^[104].

Insbesondere während der ersten beiden Phasen regulieren Wachstumsfaktoren (WF) Chemotaxis, Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese. In vivo konnte bei Hunden nach VKB-Rekonstruktion, insbesondere während der frühen post operativen Phase (1-9 Wochen), ein deutlicher Anstieg an bFGF, TGF- β und PDGF-**BB** nachgewiesen werden ^[70]. Aus Thrombozyten sezerniertes PDGF wirkt dabei chemotaktisch auf Entzündungszellen, mitogen auf Fibroblasten und stimuliert mit anderen WF die Synthese von Kollagen, und Glykosaminoglykanen ^{[58],[73]}. Anhand von in vitro Versuchen an Fibroblastenkulturen von ausgewachsenen Kaninchen wurde belegt das PDGF-**BB**, EGF und bFGF großen Einfluss auf die Zellproliferation haben. DesRosiers et al. konnten in einem in vivo Experiment an Kaninchen zeigen,

dass PDGF-**AB** und EGF vergleichbare, stimulierende Einflüsse auf ACL Fibroblasten besitzen.

Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung von Spindler et al.: VKB-Gewebe von Schafen zeigen keine gesteigerte Proliferation nach PDGF-**AB** Gaben, wohingegen Patellasehnen-Transplantate signifikante, dosisabhängige Fibroblastenproliferation nach 72h und 96h zeigten ^[126].

Im Gegensatz dazu zeigten die Arbeitsgruppen um Letson et al. und Hildebrand et al., dass bei MCL-Rupturen im Kaninchenmodell die Gabe von PDGF-**BB** zu den besten Ergebnissen führte, was auch mit Kombinationen von mehreren WF keine weitere Verbesserung zu erzielen ist.

Auf Grund der unterschiedlichen Angaben in der Literatur muss davon ausgegangen werden, dass das Ansprechen auf PDGF einzelner Gewebe, wie beispielsweise VKB, Achillessehne oder Patellasehne sich innerhalb eines Tieres unterscheidet. Darüber hinaus scheint nur eingeschränkte Übertragbarkeit zwischen den einzelnen Spezies zu bestehen. Zu dem sind bei den Isoformen des PDGF (PDGF-**AB**, -**AA**, -**BB**) große Unterschiede in der Wirksamkeit auf die Bandheilung zu erkennen.

Die Isoform PDGF-**BB** zeigte dabei die vielversprechendsten Ergebnisse.

1.6 Ziele

Mit dieser Studie sollten verschiedene Parameter der Einheilung einer VKB-Rekonstruktion unter Einfluß von lokal applizierten PDGF-BB im Schafmodell untersucht werden. Diese Arbeit ist ein Ausschnitt von vier Teilaspekten: Elektronenmikroskopische Untersuchung, biomechanische Testung, Knochen-Sehnen-Heilung und Remodeling des freien Sehnen-Transplantates.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluß von lokal applizierten PDGF-BB auf zwei Teilaspekte des Remodelingprozesses, die Revaskularisierung und Ligamentisierung eines freien Sehnen-Transplantates nach VKB-Ersatz darzustellen:

In der Literatur wird eine beginnende Revaskularisierung eines freien Sehnen-Transplantates einer VKB Rekonstruktion nach 2. – 4. Wochen beschrieben. Ein Gefäßstatus entsprechend dem nativen vorderen Kreuzbandes wird nach ca. 12

Monaten erreicht. Bisherige Studien sind aufgrund verschiedener Studienmodelle und verschiedener Nachweismethoden schwer vergleichbar. Erst eine Vorläuferstudie dieses Projektes konnte erstmalig mittels immunhistochemischer Untersuchung die Dynamik der Revaskularisierung eines VKB-Transplantates beschreiben ^[131].

Wir vermuten ein wesentlich früheres Erreichen des Gefäßstatus des nativen VKB unter Einfluß des lokal applizierten Wachstumsfaktors im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Rahmen der Wundheilung sowie bei fibrotischen oder metaplastischen Gewebeeränderungen können hochdifferenzierte Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, nachgewiesen werden. Hauptmerkmal dieser Zellen ist es, Zugkräfte auf die sie umgebende Extrazellulärmatrix auszuüben.

Seit kurzem ist bekannt, dass diese Myofibroblasten eine Rolle bei der Gewebekontraktion spielen und so zur Wiedererlangung der in-situ Spannung des heilenden Bandes führen. Weiterhin wird vermutet, dass die kontraktile Eigenschaften dieser Zellen für das Zusammenziehen der Extrazellulärmatrix und die Ausbildung der Kollagentertärstruktur, dem sogenannten „Kollagen-Crimp“, verantwortlich sind. Bei den reparativen Ab- und Aufbauvorgängen der Kollagenmatrix eines VKB-Transplantates läßt sich ebenfalls eine entscheidende Rolle der Myofibroblasten vermuten. Dies konnte bereits in der Arbeit von Unterhauser et. al dargestellt werden ^[131].

Damit können diese Zellen als Marker des Remodelings eines VKB Transplantates angesehen werden. In der vorliegenden Studie soll mittels immunhistologischer Färbemethode untersucht werden, ob durch die Gabe von PDGF-BB das Auftreten von Myofibroblasten im „remodelierenden“ VKB beeinflusst werden kann und darüber hinaus weitere Funktionen der Myofibroblasten aufgeklärt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 48 weibliche ausgewachsene, reinrassige Heidschnucken (Abbildung 2-1) im Alter von 2 Jahren und mit einem mittleren Gewicht von 34,1kg ($\pm 3,5$ kg).

Abbildung 2-1



2.1.2 Transplantatgewebe

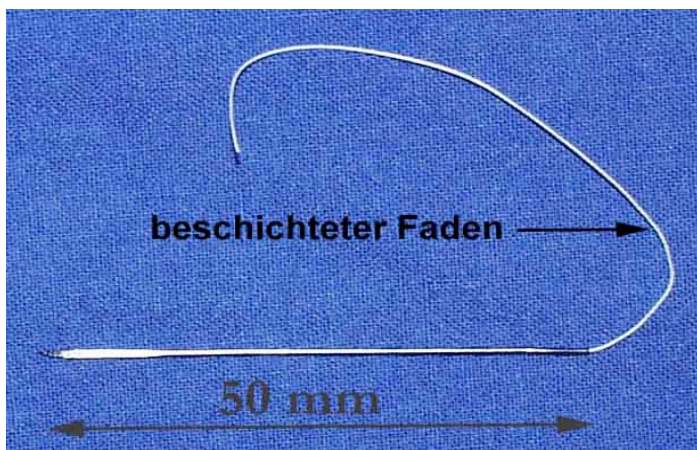
Als Transplantat diente autologes Sehngewebe. Dieses wurde aus der Endsehne des linken M. flexor digitalis superficialis eines jeden Versuchstieres entnommen. Das Transplantat hatte eine durchschnittliche Länge von 67,1 mm ($\pm 4,5$ mm) und einen mittleren Durchmesser von 6 mm ($\pm 0,3$ mm).

2.1.3 Wachstumsfaktor

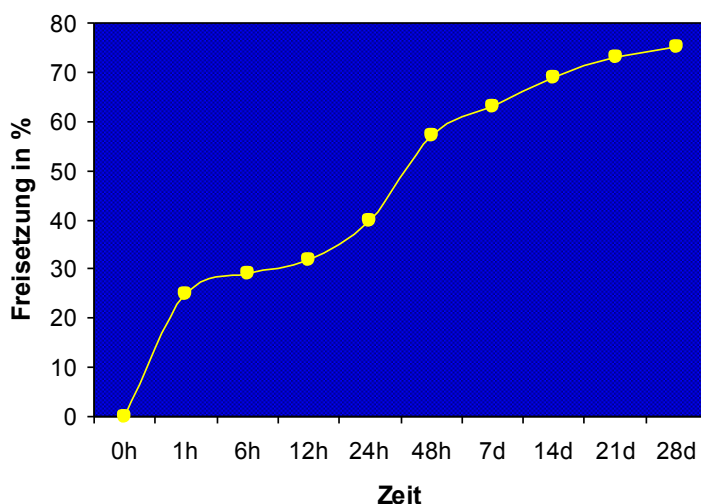
Bei dem eingesetzten Wachstumsfaktor handelte es sich um „recombinant human Platelet-Derived Growth Factor-BB“ (PDGF-BB). Dieser Wachstumsfaktor wurde nach intensivem Studium der Literatur gewählt, da die Arbeitsgruppe um Letson et al. bei isolierter Gabe von PDGF-BB eine höhere Wirkung als in Kombination von PDGF mit IGF1, oder bFGF erzielte. Auch die Kombination von bFGF und IGF1 war der alleinigen PDGF-Gabe unterlegen ^[74].

2.1.4 Applikationsform des Wachstumsfaktors

Das PDGF-BB wurde auf schnell resorbierbare Polyglactin-Fäden aufgebracht, von denen je vier in Längsrichtung in das Zentrum des Transplantates eingebracht wurden. Die Beschichtung erfolgte nach einer Technik von Schmidmaier et al. [1]. Als Trägersubstanz diente Poly (D,L)-Laktid. Auf jedem der Fäden befanden sich 300 µg dieser Trägersubstanz, in der wiederum 15 µg humanes PDGF-BB gelöst war (Abbildung 2-2). Die Gesamtdosis des applizierten Wachstumsfaktors pro verwendetes Transplantat war somit 60 µg PDGF-BB.



2-2: Photo zeigt den beschichteten Polyglactin-Faden mit Nadel. Der Faden diente als Trägersubstanz, um das PDGF-BB in das Transplantat einzubringen.



2-2: Schaubild beschreibt Freisetzung des PDGF-BB aus der Trägersubstanz über mehrere Wochen. Eluierungsversuch mittels ELISA.