

## 5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer interdisziplinären Studie durchgeführt, deren Anliegen es war, den Einfluss des lokal applizierten Wachstumsfaktors PDGF-BB auf das Bandremodeling und die Knochen-Band-Heilung nach der Rekonstruktion des VKB durch ein freies Sehnen-Transplantat in einem Schafsmodell zu untersuchen. Hierbei waren die Entwicklung der mechanischen Eigenschaften, die histologischen und elektronenmikroskopischen Veränderungen des Transplantates in Bezug auf das intakte VKB im Zeitverlauf bis zu 24 Wochen post op. von zentraler Bedeutung. Voraussetzend wurde angenommen, dass die Applikation von PDGF-BB die frühe Heilungsphase eines freien Sehnen-Transplantates in positiver Weise beeinflusst, was zuvor schon in Zellstudien (Scherping *et al.*, 1997) und am mittleren Kollateralband (Letson und Dahners, 1994; Hildebrand *et al.*, 1998), jedoch noch nie in einem in vivo Versuch am VKB bestätigt worden war.

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, die elektronenmikroskopischen Veränderungen der Struktur des Sehnen-Transplantates nach VKB-Rekonstruktion unter dem Einfluss von PDGF post op. zu untersuchen. Hierbei standen die Erfassung der Fibrillenanzahl, der Fibrillendurchmesser, die Fibrillenfläche und die Verteilung der Fibrillendurchmesser in Bezug auf das intakte VKB im Vordergrund.

In der Literatur konnten keine Arbeiten gefunden werden, bei denen ultrastrukturell der Heilungsverlauf der Rekonstruktion des VKB unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren untersucht worden war. Infolgedessen waren Vergleiche diesbezüglich nicht möglich, sondern sie waren auf ultrastrukturelle Angaben ohne den Einsatz von Wachstumsfaktoren oder auch auf andere Bänder beschränkt.

Bei der ultrastrukturellen Untersuchung von Gewebe sind jedoch generell einige methodische Aspekte kritisch zu berücksichtigen: Die untersuchte Proben- dimension ist immer sehr klein. Auf Grund der geringen Proben- dimension stellen die ermittelten Werte nur punktuelle Ergebnisse dar, wodurch allgemeingültigen Aussagen gewisse Grenzen gesetzt sind.

Die Anzahl von sechs elektronenmikroskopischen Fotografien je Probe entsprach der Anzahl, die auch in früheren Untersuchungen verwendet worden war (Frank *et al.*, 1989). Eine Erhöhung der Menge an Fotografien hätte keine positive Auswirkung auf die Aussagekraft der Ergebnisse gehabt, da immer die Probenmenge der

limitierende Faktor ist. Durch Abfotografieren der Negative mit einer hochauflösenden Digitalkamera war es möglich, diese ohne Datenverlust so zu vergrössern, dass die Endvergrößerung 80.000 betrug. Diese Vergrößerung ermöglichte es, den Fehler bei der Unterscheidung von Fibrillen  $< 20$  nm, die aus der Wertung genommen wurden, und denen  $\geq 20$  nm, die gewertet wurden, möglichst klein zu halten. Auf Grund der digitalen Analysemethoden, die den in der Literatur beschriebenen ähnlich waren, und der hohen Zahl an ausgewerteten Fibrillen kann man trotz eventueller geringer Abweichungen durch unterschiedliche Fixations-, Schneide- und Untersuchungsmethoden die Verlässlichkeit und Vergleichbarkeit der eigenen Angaben annehmen.

### **5.1 Vergleich der Ultrastruktur von VKB und Flexorsehne**

Zunächst wurden das native VKB und die zur Transplantation vorgesehene Flexorsehne untersucht. Dabei unterschieden sich die beiden Gewebe ultrastrukturell vor allem in der Fibrillenanzahl, im prozentualen Anteil der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm und in der Fibrillenfläche, die bei der Flexorsehne fast doppelt so hoch wie beim VKB war. Die Fibrillenanzahl war in der Flexorsehne um 28,94 % höher als im VKB, bei einem lediglich um 12,69 % geringeren mittleren Durchmesser. Dies bedeutete eine höhere Fibrillenfläche der Flexorsehne. Die Fibrillenfläche lag beim VKB mit 32,83 % deutlich unter dem Wert und bei der Flexorsehne mit 63,76 % deutlich über dem Wert, der in der Literatur für den Menschen (45%) (Baek *et al.*, 1998) und für das HKB beim Schaf (58%) (Bosch *et al.*, 1995; Moeller *et al.*, 1995) angegebenen wird. Die Verteilung der Fibrillendurchmesser des VKB und der Flexorsehne in der eigenen Untersuchung waren ähnlich. Die einzige Ausnahme war die um ca. 83 % höhere Zahl der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm bei der Flexorsehne. Die Verteilung der Fibrillendurchmesser des intakten VKB war grundsätzlich vergleichbar mit den aus der Literatur angegebenen Daten für Schaf und Mensch (Abe *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 1995; Shino *et al.*, 1995; Baek *et al.*, 1998).

Es gibt bisher keine ultrastrukturellen Untersuchungen bezüglich des VKB-Ersatzes beim Schaf. Die in der Literatur gefundenen ultrastrukturellen Daten beziehen sich ausschliesslich auf das HKB und die Patellarsehne als HKB-Ersatz. Vergleichende Untersuchungen von HKB und Patellarsehne haben gezeigt, dass die Verhältnisse derselben ultrastrukturellen Messparameter vergleichbar mit den eigenen Beobachtungen bei Flexorsehne und VKB waren (Bosch *et al.*, 1995). Bezüglich des

geringeren Durchmessers der Fibrillen der Patellarsehne im Vergleich zum HKB wurde von Bosch angenommen, dass dies auf die unterschiedliche mechanische Belastung zurückzuführen sei, die im HKB neben Zugkräften auch aus Torsionskräften besteht, während sie bei der Patellarsehne überwiegend aus Zugbelastung resultiert.

Die überwiegend geringen ultrastrukturellen Unterschiede zwischen VKB und Flexorsehne und die Tatsache, dass sich die strukturell ähnliche Patellarsehne als Bandersatz beim Schaf bewährt hat (Bosch und Kasperczyk, 1992; Schiavone Panni *et al.*, 1993), bestätigt aus ultrastruktureller Sicht die Eignung der Flexorsehne als VKB-Ersatz.

## **5.2 Transplantatveränderungen ohne Einfluss von PDGF**

Die Flexorsehne erfuhr nach der Transplantation in VKB-Position eine deutliche strukturelle Veränderung. Diese spielte sich, wie an den untersuchten Parametern gezeigt wurde, überwiegend in den ersten 12 postoperativen Wochen ab. Sechs Wochen post op. hatte das Transplantat seine ursprüngliche Struktur weitgehend verloren. Zwölf Wochen post op. hatte es eine neue, veränderte Struktur erlangt. Obwohl zwischen der 12. und 24. postoperativen Woche keine signifikanten ultrastrukturellen Veränderungen mehr festzustellen waren, unterschied sich die Struktur des Transplantates selbst nach 24 Wochen noch fundamental von der des intakten VKB. Im Gegensatz zum nativen VKB war das Gesamtbild der Transplantate dominiert von dünnen Fibrillen.

In der Literatur wurde bisher schon häufig an unterschiedlichen Spezies und Bändern das Bandremodeling nach einem Kreuzbandersatz untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das Gewebe nach seiner Transplantation immer einen entscheidenden Umbauprozess durchmachte, der durch mehrere Phasen gekennzeichnet war: Die initiale Entzündungsreaktion, Nekrose und Degeneration, mit einhergehender mechanischer Schwächung des Bandes, gefolgt von der proliferativen Phase, zellulärer Repopulation und dem Remodelingprozess (Woo *et al.*, 1998b). Diese Phasen waren biomechanisch, histologisch, elektronenmikroskopisch und biochemisch festzustellen (Bosch *et al.*, 1989; Decker *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 1993; Weiler *et al.*, 2001b; Weiler *et al.*, 2002b).

Die Phase der Degeneration, Nekrose und Entzündung wird in der Literatur im frühen postoperativen Verlauf bis zu einem Zeitraum von sechs bis acht Wochen

beschrieben. Sie geht sowohl histologisch als auch elektronenmikroskopisch primär mit dem Verlust der geregelten Anordnung der Fibrillen einher. Verschiedene Studien zeigten, dass hierbei im selben Transplantat azelluläre Regionen in direkter Nachbarschaft mit hyperzellulären Regionen zu finden sind (Abe *et al.*, 1993; Bosch und Kasperczyk, 1993; Moeller *et al.*, 1995).

Bei den eigenen Untersuchungen konnten degenerative Veränderungen im Transplantat ab der dritten Woche post op. festgestellt werden und fanden sechs Wochen post op. ihren Höhepunkt. Als degenerative Phänomene stellten sich vor allem der Strukturverlust der Fasern und der Fibroblasten, eine deutliche Schwellung der Fibrillen mit unscharfen Fibrillenbegrenzungen, das Verschwinden von dünnen Fibrillen und elastischen Fasern sowie das verstärkte Auftreten von vakuolären und polymorphen Zellstrukturen dar. Drei Wochen post op. war der Verlust der gleichmässigen Fibrillenstruktur und der typischen Flügelzellmorphologie der Fibroblasten sowie eine deutliche Verringerung der Fibrillenzahl zu beobachten. Ferner stiegen der Fibrillendurchmesser und die Fibrillenfläche stark an. Die Fibrillenfläche des Transplantatgewebes, die annähernd doppelt so hoch war wie die des nativen VKB, hatte sich zwischen drei und sechs Wochen post op. deutlich verringert und der Fibrillenfläche des intakten VKB angepasst. Gleichzeitig zeigte sich eine starke Veränderung der Verteilung der Fibrillendurchmesser und eine Verschiebung der unterschiedlichen Fibrillendurchmesser in Richtung der dicken Fibrillen mit einem Durchmesser von  $> 140$  nm bei gleichzeitiger Abnahme der dünnen Fibrillen  $< 140$  nm. Ob es sich bei der Abnahme der Fibrillenzahl um das tatsächliche Verschwinden von Fibrillen handelte, ob es zu einer Verschmelzung vieler dünner Fibrillen gekommen war oder ob lediglich eine starke Fibrillenschwellung durch degenerative Prozesse stattgefunden hatte, konnte ultrastrukturell nicht ermittelt werden. Die eigenen Beobachtungen unterschieden sich von denen anderer Autoren nach HKB-Ersatz beim Schaf, die schon zwei Wochen post op. von einer starken Zunahme der Fibrillenzahl und der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm sowie einer Verringerung des mittleren Fibrillendurchmessers und der Fibrillenfläche berichteten, die sich bis zur 16. Woche post op. erstreckten (Bosch *et al.*, 1995; Moeller *et al.*, 1995).

Bei der Betrachtung der einzelnen Transplantate innerhalb der Kontrollgruppen zeigte sich, dass die Verteilung der verschiedenen Kollagenfibrillendurchmesser nach sechs Wochen sehr unterschiedlich war. Doch obwohl diese gravierenden

Veränderungen festzustellen waren, gab es bei den Kontrollgruppen sechs Wochen post op. gleichzeitig eine starke Zunahme an Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm, die einen fließenden Übergang zwischen Degeneration und beginnender Regeneration annehmen liess. Die Unterschiede bei der Verteilung der Fibrillendurchmesser sechs Wochen post op. legten den Schluss nahe, dass die Bandheilung zu einem frühen postoperativen Zeitpunkt allgemein noch sehr unkoordiniert stattfindet.

Der weitere Heilungsverlauf, der auch als Revitalisierungsphase bezeichnet wird (Bosch und Kasperczyk, 1993), war in den eigenen Untersuchungen bei den Kontrollgruppen durch eine starke und kontinuierliche Zunahme der Fibrillenzahl, Abnahme des mittleren Fibrillendurchmessers und Verschiebung der Verteilung der Fibrillendurchmesser in Richtung der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm gekennzeichnet. Diese Verschiebung zeigte sich bei den Kontrollgruppen nach 12 Wochen in einer signifikanten Steigerung des Anteils der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm. Ferner waren die strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Transplantaten nach dieser Zeit deutlich geringer als nach sechs Wochen.

Bei der Heilung von Hautschnittwunden im Kaninchenmodell wurden in der Phase des frühen posttraumatischen Wundverschlusses ähnliche elektronenmikroskopische Beobachtungen gemacht (Pierce *et al.*, 1991). Auch deckten sich die eigenen ultrastrukturellen Beobachtungen in der frühen postoperativen Phase grundsätzlich mit denen, die nach Ersatz des HKB beim Schaf (Bosch *et al.*, 1995; Moeller *et al.*, 1995) und des VKB beim Mensch (Abe *et al.*, 1993; Shino *et al.*, 1995) gemacht worden waren.

Nach der 12. postoperativen Woche traten keine signifikanten elektronenmikroskopischen Veränderungen mehr auf. 24 Wochen post op. gab es bei keinem Kontrolltransplantat Übereinstimmungen mit dem nativen VKB in Struktur, einem gemessenen oder berechneten Parameter, sondern alle unterschieden sich von diesem noch sehr deutlich, mit Ausnahme der Fibrillenfläche. Aus diesem Grund wird angenommen, dass das Bandremodeling nach 24 Wochen entweder noch nicht abgeschlossen ist, oder dass das Transplantat strukturell nie den Zustand eines intakten VKB erreichen wird.

So war neben den Veränderungen, die an den Fibrillen stattfanden, auch deutliche Unterschiede zwischen den Fibroblasten des intakten VKB und den Fibroblasten der

Transplantate festzustellen. Die grosse Menge an rauhem endoplasmatischem Retikulum bei den Fibroblasten der Kontrolltransplantate nach 12 und 24 Wochen zeigte, dass diese immer noch vermehrt Proteine synthetisierten. Diese Syntheseleistung war weder bei den Fibroblasten der Flexorsehne noch bei denen des intakten VKB zu finden. Beim HKB-Ersatz des Schafes wurde eine starke Syntheseleistung der Fibroblasten schon sechs Wochen post op. beobachtet, die bis zu 26 Wochen post op. festzustellen war. Die Fibroblasten in dieser Studie hatten nach 26 Wochen überwiegend eine ovoide Struktur, die den Fibroblasten des HKB ähnlich war (Decker *et al.*, 1994), während bei den eigenen Untersuchungen überwiegend polymorphe Fibroblasten vorkamen. Andere Autoren stellten beim Mensch fest, dass selbst nach 15 Monaten noch erhebliche Mengen an rauhem endoplasmatischem Retikulum in den Fibroblasten zu finden waren und gingen auf Grund der Aktivität der Fibroblasten ebenfalls davon aus, dass das Bandremodeling zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war (Abe *et al.*, 1993).

Bei den Kontrollgruppen kam es zwischen der dritten und sechsten postoperativen Woche zur Verringerung der Fibrillenfläche während zwischen der sechsten und der 24. postoperativen Woche keine weitere Veränderung mehr diesbezüglich festzustellen waren. In früheren Untersuchungen am HKB-Ersatz des Schafes (Moeller *et al.*, 1995) und am VKB-Ersatz des Menschen (Shino *et al.*, 1995) wurde ebenfalls eine deutliche Verringerung der Fibrillenfläche festgestellt. Allerdings vertraten diese Autoren die Meinung, dass diese anschliessend deutlich unter der des intakten VKB liege, da sie wie oben beschrieben von einer höheren Fibrillenfläche des VKB ausgegangen waren, während sie bei den eigenen Untersuchungen ungefähr im Bereich des VKB lag. Sie nahmen an, dass die mechanische Qualität von Geweben wesentlich von der Fibrillenfläche abhängig sei und dass einer der Gründe, weshalb die mechanischen Eigenschaften des Transplantates hinter denen des intakten Gewebes liegen, die Verringerung der Fibrillenfläche post op. ist. Andere Autoren nahmen an, dass sie von der Verteilung der verschiedenen Kollagenfibrillendurchmesser abhinge (Parry *et al.*, 1978; Parry, 1988).

Die Veränderung der Verteilung der Fibrillendurchmesser war ein wesentliches Merkmal der postoperativen Veränderungen der Transplantate bei den eigenen Untersuchungen. Es war zu sehen, dass es ab der sechsten postoperativen Woche einen steilen Anstieg an dünnen Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm gab.

Die Verteilung der Fibrillendurchmesser erlangte in den eigenen Untersuchungen bei keiner Kontrollgruppe einen Zustand, wie er im intakten VKB vorzufinden war, sondern es bestand ab der sechsten Woche post op. eine zunehmende Dominanz an den o.g. dünnen Fibrillen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass das Transplantatgewebe dem intakten VKB 24 Wochen post op. strukturell unterlegen ist. Die Verteilung der Fibrillendurchmesser nach HKB-Ersatz bei Schafen ergab, dass diese auch 2 Jahre post op. noch weit entfernt von der des intakten HKB war. Dabei betrug der Anteil der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm immer noch über 60 % (Bosch *et al.*, 1989; Bosch *et al.*, 1992; Bosch *et al.*, 1995).

Die in Bändern und Sehnen überwiegend gefundenen Kollagentypen sind Kollagen I, III und zu einem sehr geringen Teil Kollagen V. Der Kollagen I-Anteil am Gesamtkollagen beträgt ca. 90 % (Amiel *et al.*, 1986b). Fibrillen vom Kollagentyp III werden nicht dicker als ca. 60 nm. In Narben- und Reparationsgewebe ist Kollagen III der überwiegend nachzuweisende Typ, während die im nativen VKB überwiegend vorkommenden Fibrillen aus Kollagen I bestehen, die einen Durchmesser von bis zu 500 nm haben können (Lapiere *et al.*, 1977). Man vermutet, dass die mechanische Belastbarkeit mit dem Durchmesser korreliert und dass deshalb Kollagen III Kollagen I mechanisch unterlegen ist (Parry *et al.*, 1978). Immunhistologische Untersuchungen am HKB-Ersatz von Schafen ergaben, dass die Fibrillen von 20-60 nm eine positive Reaktion auf Kollagen III-Antikörper zeigten (Bosch *et al.*, 1992). Das bedeutet jedoch nicht, dass sie nur aus Kollagen III bestehen, denn bei der Synthese von Kollagenfibrillen können Kollagen I und III gleichzeitig in dünnen Fibrillen vorkommen (Keene *et al.*, 1987; Fleischmajer *et al.*, 1990).

Viele komplexe Faktoren, wie die biochemische Zusammensetzung der Bänder, das Alter, die Belastung, das pH und die Interaktion von Kollagen I und III haben einen Einfluss auf das Dickenwachstum von Fibrillen. Biochemische Untersuchungen bei der Heilung des HKB-Ersatzes beim Schaf bis zu zwei Jahren post op. haben ergeben, dass es nach der Transplantation zu einer ausserordentlich starken Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Transplantate kommt. Diese stellte sich in erster Linie in der unterschiedlichen Menge der Glykosaminoglykane, speziell von Chondroitin, Chondroitinsulfat, Dermatan, Dermatansulfat, Keratan, Glukuronsäure und Hyaluronat dar. Doch nicht nur die absolute Menge an Glykosaminoglykanen, sondern auch ihre prozentuale Verteilung innerhalb der Transplantate unterschied sich vom intakten HKB (Gässler *et al.*,

1994). Diese gravierenden biochemischen Unterschiede zwischen HKB und Transplantat bestanden auch noch zwei Jahre post op. Hieraus wurde geschlossen, dass das Bandremodeling selbst nach dieser Zeit noch nicht abgeschlossen ist (Decker *et al.*, 1991; Bosch *et al.*, 1992; Decker *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 1995; Moeller *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass sich mit den biochemischen Veränderungen die Verteilung der Fibrillendurchmesser in Richtung der dünnen Fibrillen verändert, legte die Vermutung nahe, dass sich diese Veränderungen negativ auf das Dickenwachstum der Fibrillen auswirken (Gässler *et al.*, 1994; Moeller *et al.*, 1995). Des Weiteren wird angenommen, dass bei Fibrillen, die gleichzeitig Kollagen I und III exprimieren, die Kollagen-III-Moleküle das Dickenwachstum der Kollagen-I-Fibrillen behindern (Fleischmajer *et al.*, 1990) und dass durch den vermehrten Anteil an Kollagen V im Transplantat das Dickenwachstum von dünnen Kollagenfibrillen zusätzlich begrenzt wird (Adachi und Hayashi, 1986). Ausgehend von den morphologischen Gegebenheiten der Kollagenfibrillen bei der eigenen Untersuchung konnte angenommen werden, dass es sich bei den dünnen Fibrillen weitgehend um Kollagen III handelte, was allerdings der biochemischen Bestätigung bedarf.

Man geht davon aus, dass das Dickenwachstum von Fibrillen nicht nur von biochemischen Faktoren sondern auch zeitabhängig ist. So wurde in Untersuchungen am HKB-Ersatz des Schafes festgestellt, dass es in direkter Umgebung der Fibroblasten nach sechs Wochen zur Häufung von Fibrillen bis zu einem Durchmesser von 50 nm gekommen war. Die Fibrillen wurden mit grösserem Abstand zu den Fibroblasten dicker (Decker *et al.*, 1994). Zusätzlich hatte nach 104 Wochen die Zahl der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm zu Gunsten der Fibrillen mit einem Durchmesser von 60-100 nm abgenommen, was in einer Zunahme des mittleren Kollagenfibrillendurchmessers resultierte (Bosch *et al.*, 1995). Bei heilenden Hautschnittwunden wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Parry, 1988; Pierce *et al.*, 1991; Bosch *et al.*, 1995). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde angenommen, dass von den Fibroblasten Mikrofibrillen synthetisiert werden, die ausserhalb der Zellmembran, mit wachsender Entfernung und zunehmender Entwicklung des Gewebes zu dickeren Fibrillen aggregieren. Eine ähnliche Entwicklung des Dickenwachstums konnte bei den eigenen Untersuchungen gemacht werden, allerdings setzte diese Umverteilung der Fibrillendurchmesser zu Gunsten der Fibrillen mit einem Durchmesser von 60-100 nm schon nach 24



Wochen ein und resultierte nicht in einer Zunahme des mittleren Fibrillendurchmessers.

Lichtmikroskopische Beobachtungen führten zu der These, dass Sehnentransplantate intra-artikulär eine Metamorphose zu Bandgewebe durchmachen (Amiel *et al.*, 1986a; Amiel *et al.*, 1986b; Abe *et al.*, 1993; Weiler *et al.*, 2001b), weshalb dieser Prozess auch als "Ligamentisierung" bezeichnet wird (Amiel *et al.*, 1986b). Die eigenen ultrastrukturellen Beobachtungen widersprechen jedoch dieser These, wobei sie sich mit denen anderer Autoren decken, die ultrastrukturell bisher zu keinem Zeitpunkt und in keinem Bandersatzgewebe nachweisen konnten, dass aus Sehngewebe Bandgewebe wurde (Decker *et al.*, 1991; Bosch und Kasperczyk, 1992; Abe *et al.*, 1993). Auf Grund der eigenen Ergebnisse und der oben erläuterten biochemischen Beobachtungen ist der Begriff der "Ligamentisierung" aus elektronenmikroskopischer Sicht nicht anwendungsfähig.

### **5.3 Transplantatveränderungen unter dem Einfluss von PDGF**

Es ist bekannt, dass PDGF positive Rückkopplungsmechanismen bei der Wundheilung verstärkt, die wiederum den Heilungsprozess beschleunigen. Der positive Einfluss von PDGF auf die Proliferation und Migration von Fibroblasten des VKB wurde in verschiedenen Zellstudien nachgewiesen (Schmidt *et al.*, 1995; Scherping *et al.*, 1997). An Hautschnittwunden von Kaninchenohren wurde herausgefunden, dass unter dem Einfluss von PDGF-BB schon nach 10 Tagen die Anzahl von Entzündungszellen erheblich höher war als bei den Kontrolltieren. Gleichzeitig war die Fibroblastenproliferation und die Fibrillogenese stärker als bei den unbehandelten Kontrolltieren (Pierce *et al.*, 1991). Auch bei der Heilung des MKB bei Ratten wurden die Fibroblastenproliferation, Revaskularisation und Produktion extrazellulärer Matrix unter Einfluss von PDGF am MKB von Ratten verbessert und beschleunigt (Batten *et al.*, 1996; Hildebrand *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998).

Trotz vielversprechender *in vitro*-Ergebnisse und klinischer Beobachtungen beim Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Wundheilung und Heilung des MKB, gab es bisher keine *in vivo* Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf die Heilung eines freien Sehnentransplantates. Entgegen den in der Literatur geschilderten deutlichen Unterschieden zwischen den Ergebnissen von wachstumsfaktorbehandelten Proben und Kontrollen an Zellen,

Hautwunden und dem MKB, zeigten die eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Bandremodeling unter dem Einfluss von PDGF bei den Kontroll- und Versuchsgruppen im Grundsatz einen durchaus ähnlichen Heilungsverlauf.

Der deutlichste Unterschied in der Ultrastruktur der Kontroll- und Versuchsgruppen war beim Parameter Fibrillenanzahl/ $\mu\text{m}^2$  festzustellen, der bei den Versuchsgruppen durchweg höher als bei den Kontrollgruppen war. Bei der Versuchsgruppe wurden schon nach drei Wochen mehr Fibrillen gefunden als bei der Kontrollgruppe. Nach 12 Wochen war der Unterschied bei der Fibrillenanzahl zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe sogar signifikant. Dieser Unterschied war insbesondere deswegen bedeutend, weil er die einzige Signifikanz aller Messparameter zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum darstellte. Bei den Versuchsgruppen kam es zwischen der dritten und sechsten Woche post op. zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm, bei gleichzeitig signifikanter Verringerung des Anteils an Fibrillen mit einem Durchmesser von 100-140 nm, während es bei den Kontrollgruppen erst zwischen der sechsten und 12. Woche post op. zu einem signifikanten Anstieg der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm kam.

Frühere Untersuchungen an Hautwunden zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bei der Untersuchung elektronenmikroskopischer Parameter, ausser der Anzahl und Aktivität der proteinsynthetisierenden Fibroblasten (Pierce *et al.*, 1991).

Die höhere Fibrillenanzahl bei der Versuchsgruppe schon nach drei Wochen und die signifikante Steigerung des Anteils an Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm zwischen drei und sechs Wochen gibt Grund zu der Annahme, dass PDGF schon sehr früh auf die Proliferation der Fibroblasten wirkt. Für eine frühe proliferative Wirkung von PDGF auf die posttraumatische Fibrillogenese sprachen Untersuchungen der Heilung des VKB-Ersatzes bei Hunden. Hier wurde festgestellt, dass die endogene PDGF-Expression schon eine Woche post op. stattfand (Kuroda *et al.*, 2000). Bei den Versuchsgruppen war im Gegensatz zu den Kontrollgruppen die Fibrillenanzahl nach der 12. postoperativen Woche rückläufig, so dass auf eine abgeschlossene Fibrillogenese nach diesem Zeitpunkt geschlossen wird.

Der Fibrillendurchmesser war bei den Versuchsgruppen zwar konstant geringer als bei den Kontrollgruppen, allerdings war dieser Unterschied immer nur geringfügig. Ferner war der Unterschied primär darauf zurückzuführen, dass bei den

Transplantaten der Versuchsgruppen allgemein mehr Fibrillen und besonders mehr dünne Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm synthetisiert wurden als bei den Kontrollgruppen. Obwohl PDGF positiv auf die Heilung von Wunden und Bändern wirkt, konnte in der eigenen Untersuchung nicht gezeigt werden, dass es innerhalb von 24 Wochen post op. einen positiven Effekt auf das Dickenwachstum von Fibrillen hatte, im Gegenteil: Die Zahl der Fibrillen mit einem Durchmesser von 60-100 nm war ab der sechsten postoperativen Woche bei den Versuchsgruppen immer geringer als bei den Kontrollgruppen. Die Zahl der Fibrillen mit einem Durchmesser > 100 nm nahm nach drei Wochen bei den Versuchsgruppen beständig ab und war immer geringer als bei den Kontrollgruppen.

Bei Untersuchungen an Mäusen wurde beobachtet, dass es mit steigender mechanischer Belastung von Sehnen teilweise zur enzymatischen Längsteilung von dicken Kollagenfibrillen kam (Michna, 1984), wodurch angenommen wurde, dass anhaltende mechanische Überbelastung von Gewebe in vermehrtem Auftreten von dünnen Fibrillen resultieren würde. Diese Längsteilung von dicken Kollagenfibrillen wurde teilweise auch beim Schaf nach Ersatz des HKB festgestellt (Bosch *et al.*, 1989; Decker *et al.*, 1991). Bezüglich der Fibrillenzahl und des Fibrillendurchmessers könnten solche Prozesse zu einer Verfälschung der eigenen elektronenmikroskopischen Ergebnisse geführt haben. Es handelte sich jedoch in den oben genannten Untersuchungen um Einzelvorkommnisse, die stellenweise auftraten. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die eigenen Beobachtungen bei den o.g. erwähnten Messparametern auf den Einfluss des eingesetzten Wachstumsfaktors zurückzuführen waren und nicht auf eine, durch mechanische Überbelastung des Transplantatgewebes massenhafte, enzymatische Längsteilung dicker Fibrillen.

Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen verringerte sich die Fibrillenfläche nach der dritten postoperativen Woche über den gesamten Untersuchungszeitraum. Dabei war sie ab der 12. Woche post op. geringer als bei den Kontrollgruppen. Grund dafür war die deutlich höhere Anzahl an dünnen Kollagenfibrillen, die jedoch keine höhere Packungsdichte aufwiesen.

Wie Moeller *et al* und Shino *et al.* (1995) postuliert hatten, scheint die Fibrillenfläche eine grosse Bedeutung für die mechanischen Eigenschaften eines Bandes zu haben. Ob dies aus ultrastruktureller Sicht tatsächlich zutrifft, wird im nächsten Kapitel im Kontext mit den biomechanischen Ergebnissen der Arbeitsgruppe diskutiert.

Eine Wirkung von PDGF in der frühen postoperativen Phase der vorliegenden Studie ist wahrscheinlich in der Beschleunigung und Verkürzung der entzündlichen Reaktionen zu sehen, wie es bei den o.g. Hautschnittwunden der Fall war. Somit werden bessere Grundvoraussetzungen für die Heilung des Transplantates geschaffen.

Trotz der messbaren ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen, v.a. in den ersten 12 Wochen post op. konnten zwei wichtige Fragen beim Einsatz von PDGF von uns nicht beantwortet werden und bedürfen noch der Klärung: 1. Wie hoch muss die Dosis sein um einen optimalen Effekt zu erzielen und 2. Wann und wie lange muss PDGF eingesetzt werden?

Untersuchungen der Freisetzung von PDGF aus PDGF-beschichtetem Fadenmaterial, welches anschliessend in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde ergaben, dass nach 48 Stunden mehr als die Hälfte der Wachstumsfaktoren ins Gewebe abgegeben worden war. Über 42 Tage wurde eine weitere gleichmässige Abgabe der Wachstumsfaktoren gemessen. Danach waren ca. 2/3 der ursprünglichen Gesamtmenge an PDGF ins Gewebe abgegeben (Schmidmaier *et al.*, 2001). Kuroda *et al.* hatten beim oben erwähnten Hundemodell festgestellt, dass drei Wochen nach VKB-Ersatz die endogene PDGF-Expression am höchsten war. Daraus schlossen sie, dass der Idealzeitpunkt der höchsten Wachstumsfaktorkonzentration innerhalb dieser Zeitspanne liegen müsse. Um zu erreichen, dass ein Maximum an PDGF-BB nach drei Wochen in das Transplantat abgegeben wird ist es wichtig ein Applikationsmedium oder eine Applikationsform zu finden, welche diese Voraussetzung erfüllt. Bezüglich des Applikationsmediums wurde bei der Heilung eines VKB-Defekts in einem anderen Hundemodell festgestellt, dass bei Verwendung von Polymerpellets, die mit bFGF beschichtet waren, die Defektfüllung zwischen 1-24 Wochen besser war und die Kollagenfibrillenausrichtung ab der sechsten Woche post op. homogener war als bei der Kontrollgruppe (Kobayashi *et al.*, 1997). Allerdings wurde die nutritive Versorgung des VKB in dieser Studie im Gegensatz zu der eigenen nie unterbrochen. Wegen der begrenzten Möglichkeiten durch konventionelle Applikationsformen wird inzwischen auch vermehrt der Einsatz von Gentransfermethoden diskutiert (Woo *et al.*, 1998b).

Bei der Suche nach dem optimalen Zeitpunkt der Applikation wurde festgestellt, dass die Wirksamkeit von exogen zugeführtem PDGF-BB auf die Steifigkeit von heilenden MKB bei Ratten nachliess, wenn es erst 48 Stunden nach der Verletzung appliziert

wurde. Daher wurde angenommen, dass die positive Wirkung von PDGF nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig sei und möglichst früh nach der Verletzung des Bandes appliziert werden müsse (Batten *et al.*, 1996).

Die Tatsache, dass zwischen der 12. und der 24. postoperativen Woche nur noch geringe Unterschiede innerhalb der Gruppen festzustellen waren, legt den Schluss nahe, dass die ultrastrukturelle Bandheilung nach 12 Wochen im wesentlichen abgeschlossen war und sich weitere Veränderungen in Bereichen abspielten, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen alleine nicht festzustellen sind. Folglich müssen weitere Aspekte der postoperativen Bandheilung näher betrachtet werden wie etwa die biochemischen Veränderungen, speziell der Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix und die eigenen Ergebnisse im Kontext mit den weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe.

Neben den rein morphologischen Aspekten sind die biochemischen Veränderungen innerhalb des Transplantates nicht zu vernachlässigen, da sie sehr bedeutend für die Struktur und die Stabilität des Gewebes sind. Glykosaminoglykane haben einen grossen Einfluss auf den mittleren Kollagenfibrillendurchmesser und die Verteilung der verschiedenen Durchmesser innerhalb der Transplantate.

Studien an Sehnen haben ergeben, dass ihr Gehalt an Glykosaminoglykanen deutlich unter dem der Kreuzbänder liegt und auch ihre Zusammensetzung von diesen verschieden ist (Amiel *et al.*, 1984; Decker *et al.*, 1994; Gässler *et al.*, 1994). Untersuchungen der Wundheilung unter dem Einfluss von PDGF zeigten einen signifikant stärkeren Anstieg der Glykosaminoglykane und damit einhergehende bessere mechanische Eigenschaften des Gewebes bei Versuchsgruppen verglichen mit Kontrollgruppen (Pierce *et al.*, 1991). Diese Beobachtungen sprechen für den positiven Einfluss von PDGF auf die biochemischen Eigenschaften des PDGF-behandelten Transplantates.

#### **5.4 Eigene Ergebnisse im Kontext mit weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe**

Die eigenen Messungen waren nur ein Teil der Gesamtstudie. Die ultrastrukturellen Ergebnisse können jedoch nicht isoliert betrachtet werden, da sie nur punktuelle Ergebnisse darstellen. Für ein umfassenderes Verständnis des Einsatzes von PDGF in der Studie müssen sie deshalb mit den anderen Ergebnissen in Zusammenhang gebracht werden. Im Rahmen der Gesamtstudie wurden weitere Untersuchungen

von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe vorgenommen. Hierbei handelte es sich um biomechanische und histologische Analysen (Weiler *et al.*, 2003).

Da für die Klinik die biomechanischen Ergebnisse von herausragender Bedeutung sind, werden diese zuerst in Verbindung mit den ultrastrukturellen Messparametern beleuchtet, gefolgt von einigen histologischen Ergebnissen.

Generell wird davon ausgegangen, dass die Versagenskraft eines Bandes (Kraft bei der ein Band seine mikroskopische und makroskopische Kontinuität verliert) direkt mit dem Durchmesser der einzelnen Kollagenfibrillen korreliert (Parry *et al.*, 1978). Die eigenen Studien innerhalb der Arbeitsgruppe, die die Versagenskraft der Flexorsehne mit der des VKB verglichen, konnten dies nicht bestätigen. Obwohl die Querschnittsfläche der Sehne nur 35,1 % grösser war als die des intakten VKB und obwohl die Fibrillen der Sehne dünner waren als die des intakten VKB, war die Versagenskraft der Flexorsehne (1530,6 N) um 72,3 % höher als die des intakten VKB (888,2 N). Auch andere Autoren stellten einen verminderten mittleren Fibrillendurchmesser der Fibrillen der Patellarsehne bei höherer Versagenskraft verglichen mit dem HKB und dem VKB fest, was der Theorie von Parry *et al.* widerspricht (Butler *et al.*, 1986; Moeller *et al.*, 1995). Hiermit bestätigen nicht nur die ultrastrukturellen sondern auch die mechanischen Ergebnisse die Eignung der Flexorsehne als VKB-Ersatz im Schafsmodell.

Verschiedene Studien, die die biomechanischen Eigenschaften eines rekonstruierten VKB und HKB an Schaf und Ziege untersuchten konnten zeigen, dass diese selbst noch nach Jahren den Eigenschaften des nativen Bandes unterlegen waren (Bosch *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1995; Weiler *et al.*, 2002b). Die biomechanischen Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigten, dass die absolute Versagenskraft zu allen Zeitpunkten signifikant geringer war als die eines intakten VKB.

Die Spannung der Flexorsehne (Kraft/Flächeneinheit, der das Transplantat beim Zerreissungstest widerstehen kann), war um ca. 28 % höher als die des VKB und um ca. 8 % geringer als der Wert, der für die Patellarsehne angegeben wird (Bosch *et al.*, 1992). Bei den Versuchsgruppen war die Spannung durchweg höher als bei den Kontrollgruppen, trotz geringerem mittleren Fibrillendurchmesser. Besonders auffallend dabei war, dass die Spannung der Transplantate aus den Versuchsgruppen genau zu den Zeitpunkten signifikant höher war wo diese eine signifikant geringe Transplantat-Querschnittsfläche als die Transplantate der Kontrollgruppen aufwiesen. Dies legt mehrere Schlüsse nahe: 1. Die Versagenskraft

ist nicht nur abhängig vom mittleren Durchmesser der Fibrillen, sondern die Fibrillenzahl, die Fibrillenfläche und vor allem die Verteilung der Fibrillendurchmesser spielen ebenfalls eine grosse Rolle, wie schon zuvor vermutet worden war (Parry, 1988; Bosch *et al.*, 1989). 2. Strukturelle Faktoren, wie die interfibrilläre Quervernetzung haben Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften eines Bandes und PDGF wirkt genau auf diese Faktoren.

Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass viele dünne Kollagenfibrillen eine stärkere Quervernetzung mit der extrazellulären Matrix aufwiesen als wenige dicke (Parry, 1988), was in einer gesteigerten Versagenskraft der Gewebe resultierte, die eine höhere Fibrillenzahl bei geringerem mittleren Durchmesser hatten (Bosch und Kasperczyk, 1993). Nach 12 Wochen waren bei der Versuchsgruppe signifikant mehr Fibrillen/ $\mu\text{m}^2$  zu finden, was in Verbindung mit der signifikant höheren Transplantatspannung den ersten Schluss der Wirkung von PDGF in Bezug auf die Fibrillenzahl unterstützt.

In früheren Studien wurde davon ausgegangen, dass eine grosse Fibrillenfläche entscheidend für die mechanische Stabilität von Bändern sei (Parry, 1988). Trotz der geringeren Fibrillenfläche war die mechanische Spannung der Versuchsgruppen verglichen mit den Kontrollgruppen höher, was der Theorie von Parry (1988) widerspricht. Die ultrastrukturellen Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen führten bei der Beantwortung dieser Frage jedoch zu keiner Lösung, da diese allgemein zu gering waren.

Die eigenen Untersuchungen der Verteilung der Fibrillendurchmesser nach sechs Wochen ergaben, dass bei annähernd gleicher Verteilung der Fibrillendurchmesser mit einem Durchmesser  $> 100$  nm, die Zahl der Fibrillen mit einem Durchmesser von 20-60 nm bei der Versuchsgruppe um 75 % über der Kontrollgruppe lag. Die biomechanischen Testungen der Arbeitsgruppe zeigten eine signifikante Verringerung der Versagenskraft der Kontrolltransplantate zwischen drei und sechs Wochen, während diese bei der Versuchsgruppe nicht signifikant war, was den zweiten Schluss der Wirkung von PDGF in Bezug auf die interfibrilläre Quervernetzungen unterstützt.

Obwohl die Steifigkeit der Transplantate (Kraft, die nötig ist um das Band 1 mm zu dehnen), die mit PDGF behandelt worden waren nach 24 Wochen signifikant höher war als die der Kontrollgruppe, konnte dies durch die ultrastrukturellen Ergebnisse nicht erklärt werden, da speziell zwischen 12 und 24 Wochen so gut wie keine

elektronenmikroskopischen Veränderungen mehr festzustellen waren. Die Erklärung für diese Veränderungen sind vermutlich im Bereich der biochemischen Eigenschaften der Transplantate, wie der Glykosaminoglykanmenge und -zusammensetzung sowie der Proteoglykane zu suchen. Die eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die in einigen Parametern verbesserten biomechanischen Eigenschaften der Transplantate nicht ausreichend erklären.

Wie aus der Arbeit von Weiler et al. (2003) ersichtlich ist, zeigt die histologisch feststellbare wellenartige Struktur, der sogenannte Crimp, im intakten VKB signifikant kürzere Wellenlängen als in der intakten Flexorsehne. Die sichtbar höhere Anzahl an elastischen Fibrillen legt den Schluss nahe, dass diese direkt mit der Crimplänge korreliert.

Speziell in der frühen Phase bis zu sechs Wochen post op. wurden signifikante Unterschiede in der Crimplänge zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen gefunden. Die ultrastrukturelle Untersuchung der Verteilung der Fibrillendurchmesser war jedoch bei beiden 6-Wo-Gruppen, bis auf die Fibrillen mit einem Durchmesser von 60-100 nm nahezu identisch. Die Untersuchung der traumatischen Ruptur der Achillessehne beim Mensch ergab, dass es keinen Zusammenhang zwischen Crimpwinkel und dem mittleren Durchmesser oder der Verteilung der Fibrillendurchmesser gab. Die rupturierten Sehnen hatten lediglich eine signifikant geringere Anzahl an Fibrillen mit einem Durchmesser zwischen 60 und 150 nm (Magnusson *et al.*, 2002). Da in der eigenen Studie jedoch keine signifikanten Unterschiede der Ultrastruktur zwischen den Gruppen nach drei und sechs Wochen festzustellen waren, ist die Veränderung der Crimplänge zu diesen Zeitpunkten durch die gemessenen Parameter nicht zu erklären.

## **5.5 Schlussfolgerungen**

Bänder und Sehnen unterscheiden sich strukturell und mechanisch voneinander. Ultrastrukturell unterschieden sich die beiden Gewebe signifikant nur in der Fibrillenfläche bei ansonsten ähnlichen Messparametern. Die in der Studie als VKB-Ersatz eingesetzte Sehne des *M. flexor digitalis superficialis* zeigte biomechanisch eine deutlich höhere Versagenskraft als das native VKB. Deshalb wird die Flexorsehne auch aus ultrastruktureller Sicht als geeignetes VKB-Ersatzgewebe erachtet.



Die strukturelle Transformation der Flexorsehne vollzog sich nach ihrer Transplantation in VKB-Position ultrastrukturell überwiegend in den ersten 12 Wochen post op. In den ersten sechs Wochen post op. war sie durch eine weitgehende Strukturschädigung des Transplantates gekennzeichnet, sichtbar vor allem in Fibrillendeformationen. Es folgte eine Restrukturierungsphase, die sich durch eine vermehrte Bildung von dünnen mit einem Durchmesser von 20-60 nm auszeichnete.

Unter dem Einfluss von PDGF war der postoperative Heilungsverlauf grundsätzlich ähnlich dem Heilungsverlauf ohne PDGF-Applikation. Der wesentliche Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen lag in der um drei Wochen früheren Restrukturierung der Transplantate in den Versuchsgruppen und einer nach 12 Wochen signifikant höheren Fibrillenanzahl/ $\mu\text{m}^2$ , was darauf schließen lässt, dass dies als Resultat der lokalen PDGF-Applikation anzusehen ist. Die übrigen Messparameter, zeigten einen tendenziellen Einfluss von PDGF, gemessen an einer Verringerung der Fibrillendurchmesser, kompensiert durch eine hohe Fibrillenanzahl/ $\mu\text{m}^2$ , einer Verringerung der Fibrillenfläche/ $\mu\text{m}^2$  und Verteilung der verschiedenen Fibrillendurchmesser, waren aber nicht signifikant. Diese Ergebnisse könnten dennoch positiv im Sinne der strukturellen Transplantatheilung gewertet werden.

Flankierende Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben teilweise verbesserte biomechanische Eigenschaften der Transplantate unter dem Einfluss von PDGF und bestätigten somit die eigenen ultrastrukturellen Beobachtungen in den Grundaussagen.

Insgesamt weisen die eigenen Untersuchungen aus, dass die lokale Applikation von PDGF einen durchaus positiven, wenn auch nicht stark ausgeprägten Einfluss auf die strukturelle Transformation und Reorganisation des Transplantates hatte. Die Veränderungen, die durch den Einsatz von PDGF hervorgerufen wurden, zeigten, dass der Einsatz dieses Wachstumsfaktors Möglichkeiten eröffnet, speziell in der frühen postoperativen Phase die strukturellen und mechanischen Eigenschaften eines Kreuzbandersatzes zu verbessern.

Um die Wirksamkeit, Konzentration und Kinetik von PDGF bei der Bandheilung in vivo noch genauer zu verfolgen, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden. Ebenso muss geklärt werden, ob PDGF alleine die Heilung eines VKB-Ersatzes

verbessert, oder ob die Applikation in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren noch erfolgversprechender ist.