

**Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Putz

**Molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im
Patellar- und Quadrizepssehnenansatz frühkindlicher
Patellae**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Britta Abel

aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. S. Milz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Mutschler
Prof. Dr. Dr. Kunze

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Funktionelle Anpassung	5
1.2	Entwicklung und Funktion der Sehnenansatzzonen	6
1.3	Zur molekularen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Sehnenansatzzonen	9
1.4	Fragestellung	11
2	MATERIAL UND METHODE	12
2.1	Material	12
2.2	Methode	13
2.2.1	Paraffinschnitanfertigung und Färbung	13
2.2.1.1	Paraffinschnitanfertigung	13
2.2.1.2	Färbung der Paraffinschnitte	13
2.2.1.3	Mikroskopische Auswertung	15
2.2.2	Immunhistochemische Untersuchung	15
2.2.2.1	Präparatentnahme und Fixierung	15
2.2.2.2	Anfertigung der Gefrierschnitte	16
2.2.2.3	Immunhistochemische Markierung	16
2.2.2.4	Mikroskopische Auswertung	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	Ergebnisse der Untersuchung der Paraffinschnitte	20
3.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung	21
3.2.1	Kollagene	23
3.2.1.1	Kollagen I	23
3.2.1.2	Kollagen II	24
3.2.1.3	Kollagen III	26
3.2.1.4	Kollagen V	27
3.2.1.5	Kollagen VI	29
3.2.2	Glykosaminoglykane	31
3.2.2.1	Dermatansulfat	31
3.2.2.2	Chondroitin-4-sulfat	32

3.2.2.3	Chondroitin-6-sulfat	34
3.2.2.4	Chondroitin-6-sulfat - native Epitope	35
3.2.2.5	Keratansulfat	37
3.2.3	Proteoglykane	39
3.2.3.1	Versican	39
3.2.3.2	Tenascin	40
3.2.3.3	Aggrecan	42
3.2.3.4	Link Protein	44
4	DISKUSSION	46
4.1	Grundlage des Studienaufbaus	46
4.2	Diskussion der Methoden	46
4.2.1	Paraffinschnitte	46
4.2.2	Immunhistochemie	47
4.2.2.1	Entnahme, Fixierung und Kryomikrotomie	47
4.2.2.2	Immunhistochemische Untersuchung	47
4.3	Interpretation der Ergebnisse	50
4.3.1	Kollagene	50
4.3.2	Glykosaminoglykane	52
4.3.3	Proteoglykane	54
4.3.4	Zusammenfassende Beurteilung	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	59
7	ANHANG	68

1 Einleitung

1.1 Funktionelle Anpassung

Eine der grundlegenden Fragen auf dem Gebiet der muskuloskelettalen Forschung ist, inwieweit die Morphologie und die Struktur der Binde- und Stützgewebe genetisch determiniert sind oder Ausdruck eines postnatalen Anpassungsprozesses an mechanische Stimuli darstellen. Das Problem der Beziehung von Form und Funktion dieser Gewebe wird bereits im 19. Jahrhundert von Lamarck (1809) und Darwin (1872) erörtert. Es etabliert sich die Idee der „funktionellen Anpassung“ des Knochens, als wesentlichen Vertreter der Binde- und Stützgewebe, an den "physiologischen Gebrauch" (Meyer 1867, Roux 1881, Wolff 1884, Pauwels 1980, Huiskes 2000). Seitdem sind verschiedene morphologische Parameter zur Differenzierung der jeweiligen Anpassung herangezogen worden. Als gesichert gilt, dass sowohl die histomorphologische Gewebestruktur als auch die molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, in direkter Beziehung zur lokalen mechanischen Beanspruchung stehen (Benjamin et al. 1986, 1990, Milz et al. 2001). Immunhistochemische Nachweismethoden erlauben heute die Zuordnung von Geweben und den Nachweis von Veränderungen auf molekularer Ebene innerhalb der verschiedenen Gewebetypen. Beim Menschen erfolgte bisher die Abgrenzung von Faserknorpel im Bereich von Sehnenansatzzonen nur am adulten Material. Dementsprechend bezieht sich hier die Interpretation der Reaktion des Gewebes auf mechanische Stimuli auch nur auf erwachsenes Gewebe. Demgegenüber ist der Nachweis der Enthesisregionen an der Patella an Ratten und Kaninchen in sämtlichen Entwicklungsstadien bereits erfolgt (Bland & Ashhurst 1996, Ralphs et al. 1991), während beim Menschen der Nachweis solcher Ansatzzonen bei frühkindlichem Gewebe noch aussteht. Somit ist auch die Frage der Balance zwischen rein genetischer Determinierung und dem Wirken des Prinzips der „funktionellen Anpassung“ noch nicht geklärt. Die Patella bildet mit ihren beiden verschiedenen Sehnen-/Bandanheftungen ideale Voraussetzungen zur Untersuchung der Verankerung von Sehnen / Bändern an unverkalktem Knorpelgewebe (Abb. 1).

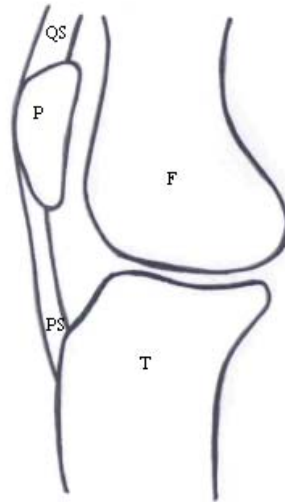


Abbildung 1

Schematische Darstellung des menschlichen Kniegelenks

P=Patella, F=Femur, T=Tibia, QS=Quadricepssehne, PS=Patellarsehne.

1.2 Entwicklung und Funktion der Sehnenansatzzonen

Die Sehnenansatzzonen bilden das verbindende Glied zwischen Sehne und Knochen, bzw. im frühen Kindesalter zwischen Sehne und Knorpel. Sie gewährleisten die Kraftübertragung vom Muskel auf das Skelett. Dabei sind verschiedene Formen zu differenzieren. Bereits Clopton Havers beschreibt 1691 in seiner *Osteologia Nova* zwei unterschiedliche Mechanismen der Sehneninsertionen, zum einen am Periost und zum anderen direkt am Knochen (Havers 1691). In den darauf folgenden Jahrhunderten beschreibt man überwiegend die letztere Form. Laurentius Heister stellt im 18. Jahrhundert in seinem *Compendium anatomicum* fest, dass Sehnenansatzzonen periostfrei sind (Heister 1771). Ebenso weist Joseph Hyrtl hundert Jahre später in gleicher Weise darauf hin (Hyrtl 1870). Diese Ansicht teilt auch Weidenreich (1923). Im Gegensatz dazu meint Petersen in seinem Lehrbuch der Histologie „alle Verbindungen durch fibröse Organe, wie Bänder und Sehnenansätze, befestigen sich zunächst am Periost“ (Petersen 1924). Dolgo-Saburoff setzt jenen Widersprüchen ein Ende und beschreibt die bis heute gültige Differenzierung zwischen periostalen und tendinösen Sehnenansätzen. Großflächige Sehnenansätze an glatten Flächen oder Einbuchtungen, die eine diffuse Kräfteverteilung erfordern, nennt er fleischig, bzw. periostal. Die eher lokalisierte Anheftung an Erhabenheiten,

die keine Periostbeteiligung zulässt, bezeichnet er als sehnig oder tendinös (Dolgo-Saburoff 1929). Diese Art der Befestigung bezieht sich in der Regel auf alle Ansätze von Sehnen an Apo-, Dia- und Metaphysen.

Auch die histomorphologische Zoneneinteilung der Sehnenansätze wird erstmals durch Dolgo-Saburoff anhand des Ligamentum patellae an der Tuberositas tibiae beschrieben. Auf die Sehne folgt eine Zone von Faserknorpel und anschließend eine Zone verkalkten Faserknorpels, in beiden sind typische „Knorpelzellen eingestreut und in Form von Säulen oder Bälkchen angeordnet“. Zuletzt stellt sich eine Zone „grobfaserigen Knochens, der in lamellosen Knochen übergeht“ dar (Dolgo-Saburoff 1929). Obwohl hier bereits eindeutig der Begriff Faserknorpel geprägt wird, schließen sich Diskussionen über die Zuordnung des Gewebes an. Schaffer bezeichnet es 1930 als hyalines, chondroides Gewebe, 1953 tauft es Zawisch auf den Namen „Pseudoknorpel“ und 1968 bezeichnen Haines und Mohiuddin es sogar als metaplastischen Knochen. Cooper und Misol meinen die Struktur sei hyalinen Knorpelzellen ähnlich (Cooper & Misol 1970).

Heute definiert man Faserknorpel vor allem auch anhand der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Faserknorpel stellt hinsichtlich Struktur und Funktion zudem als ein avaskuläres Übergangsgewebe zwischen kompaktem, faserreichem Bindegewebe und hyalinem Knorpel dar. Das Vorkommen beschränkt sich im Wesentlichen auf Menisci, Anulus fibrosus der Disci intervertebrales, sowie auf sesamoide Faserknorpel in Sehnen und Sehnenansatzzonen welche einer lokalen Druckbeanspruchung ausgesetzt sind (Benjamin et al. 1998, Milz 2002). Die Zellen haben ein ähnliches Erscheinungsbild wie Chondrozyten und sind in den Sehnenansatzzonen longitudinal in Reihen angeordnet (Benjamin & Evans 1990). Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Achillessehnenansatzes der Ratte ergibt faserreiches Bindegewebe mit verschiedenen Proteoglykanen. Die Zellen zeigen ovale, elongierte Nuclei, raues endoplasmatisches Retikulum, einen hohen Anteil an Glykogen und Lipiden, sowie einen hohen Anteil an Proteoglykanen und Kollagenfibrillen in der perizellulären Matrix (Rufai et al. 1996).

Als Beispiel für die Entwicklung apophysärer Sehnenansatzzonen beschreibt Schneider 1956 die Anheftung des Musculus iliopsoas an den Trochanter minor. Frühembryonal reicht die Sehne an die knorpelige Anlage heran. Ab dem zweiten Fetalmonat bis zum Auftreten des Knochenkerns erfolgt die Vergrößerung der knorpeligen Matrise, Sehnenfasern werden in das Knorpelgewebe eingebaut. Später erfolgt die Einmauerung in den Knochen (Schneider 1956). Die Untersuchung der

Kalzifizierung des Sehnenansatzes der Patellarsehne an der Tibia ergibt die Differenzierung der Faserknorpelzellschicht in zwei Zonen. Eine oberflächliche Schicht mit kleinen Zellen und wenig Matrix und eine tiefe, knorpelnahe Zellschicht mit hypertrophierten Zellen in vermehrter Interzellulärsubstanz. Die Kalzifizierung erfolgt zunächst entlang der Kollagenbündel in der „small-cell“- Schicht, und schließlich erfolgt die Umwandlung des hyalinen Knorpels und der „large-cell“-Schicht in Lamellenknochen (Badi 1972). Abgesehen von dieser Untersuchung gelingt es an Kaninchen, deren Patella am 17. fetalen Tag in Form einer knorpeligen Scheibe entsteht (Bland & Ashhurst 1996), nachzuweisen, dass Sehnenfasern nach der Ossifikation zwar direkt am Knochen inserieren, sich aber nicht mit dem Kollagensystem einzelner Lamellen vermischen (Clark & Stechschulte 1998).

Diese Struktur aus zwei unterschiedlich mineralisierten Faserknorpelzellschichten ermöglicht eine sehr feste Anheftung. So kommen traumatische Sehnenrisse nur extrem selten in solchen Ansatzzonen vor (Clark & Stechschulte 1998).

Die Funktion des Faserknorpels wird in verschiedenen Hypothesen dargelegt. Die maximale Kraftübertragung erfordert einen bestimmten Sehnen- und Ansatzzonenquerschnitt im Verhältnis zur Muskelkraft (Ertelt 1955). Die Zugfestigkeit von Knochen und Kollagenfasern ist annähernd gleich (Knese et al. 1955, Rollhäuser 1950), wohingegen die Dehnungsfähigkeit stark variiert. Somit muss die Enthese als Dehnungsbremse fungieren. Die Längsdehnung der Sehne führt zur Verringerung des Sehnenquerschnitts, während die Ansatzzone im Querschnitt konstant bleibt (Knese & Biermann 1958).

Während Frost dem Knorpelgewebe die Verhinderung von Knochenresorption zuschreibt (Frost 1983), rechtfertigt Benjamin das Vorkommen eines Enthesis-Faserknorpels mit dem Auftreten von Scherkräften (Benjamin et al 1986). Je größer dabei der Grad der Abknickung ist, desto mehr Faserknorpel ist in der Anheftung nachweisbar (Evans et al. 1991, Benjamin et al. 1995). Seine Untersuchung der Quantität des Faserknorpels in Abhängigkeit von der Winkeländerung der ansetzenden Sehne ergibt eine zusätzliche Abhängigkeit vom absoluten Sehnen Durchmesser. Am Quadricepsansatz an der Patella wird unter einer Winkeländerung von 35° eine Ansatzzone im Schnitt von 0.83mm gemessen, gegenüber dem Ursprung der Patellarsehne von 0.30mm bei keiner messbaren Winkeländerung. Der Ansatz der Patellarsehne an der Tibia, der wiederum einer Winkeländerung von 35° ausgesetzt ist, zeigt eine prominente Faserknorpelregion mit

0.47mm Durchmesser. Die kleinere Zone im Patellarsehnenansatz erklärte Benjamin eben mit der unterschiedlichen Kraftverteilung zwischen Quadriceps- und Patellarsehne im Verhältnis 8:5.

Auch wenn die Morphologie der Sehnenansatzzonen weitgehend geklärt scheint, lassen die erwähnten Untersuchungen viele Fragen bezüglich Entwicklung und Funktion offen. Das schnellere Wachstum der Patella in Ratte und Kaninchen lässt keinen direkten Vergleich bezüglich der Situation beim Menschen zu. Die Funktion der Sehnenansätze lässt sich wohl nicht allein seitens der Histomorphologie klären, vielmehr ist die detaillierte Untersuchung der extrazellulären Matrix auf molekularer Ebene dazu notwendig.

1.3 Zur molekularen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Sehnenansatzzonen

Das Bindegewebe lässt sich hinsichtlich Bindegewebszellen und Interzellulärsubstanz differenzieren. Letztere hat einen ungeformten Anteil, die Grundsubstanz und einen geformten Anteil, der sich aus Fasern verschiedener Typen zusammensetzt. Die Interzellulärsubstanz bestimmt durch die unterschiedliche Zusammensetzung aus Mukopolysacchariden und Kollagenfasern die mechanischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern lassen sich die einzelnen Bestandteile in immunhistochemischen Verfahren identifizieren.

Als eines der biochemischen Schlüsselkriterien für den Nachweis von faserknorpeltypischer Grundsubstanz gilt das Auftreten von Kollagen I mit Kollagen II (Benjamin et al. 1991). In Bezug auf die Mukopolysaccharide lassen sich sulfatierte Glykosaminoglykane in Kombination mit Aggrecan nachweisen (Vogel & Koob 1995). Die bisherigen Untersuchungen der extrazellulären Matrix der Enthesisregionen beschränken sich auf wenige Beispiele, deren Großteil an Ratten oder Kaninchen nachgewiesen wurde. Die Untersuchung der Anheftung der Achillessehne der Ratte ergab den Nachweis von Kollagen II, Chondroitin-6-sulfat und wenig Keratansulfat (Rufai et al. 1992). Keratansulfat lässt sich im Gegensatz dazu im Quadricepsansatz der Ratte nicht nachweisen, während Chondroitinsulfat und Kollagen II positiv markiert sind. Es wird dementsprechend vermutet, dass Keratansulfat in der extrazellulären Matrix der Ratte eher spärlich vorkommt (Benjamin et al. 1991, Ralphs et al. 1991). In der Supraspinatussehne des Kaninchens findet man neben Kollagen II in beiden

Faserknorpelregionen, im nicht kalzifizierten Anteil Kollagen III (Kumagai et al. 1994). Die Untersuchung der Entwicklung der extrazellulären Matrix bezieht sich eher auf den Verknöcherungsvorgang, der Kollagen II aus der Patella verdrängt, während die Enthesis kollagen-II-positiv bleibt. Dabei wird ein präzises Arrangement der Kollagene nachgewiesen, deren endgültige Matrix sich nach der Geburt ausbildet (Ralphs et al. 1991, Bland & Ashhurst 1996). Die detaillierte Aufschlüsselung der Matrix eines Enthesisfaserknorpels erfolgt im Ansatz der Ligamenta transversa acetabuli und atlantis (Milz et al. 2001). Hier werden die Glykosaminoglykane Chondroitin-4- und 6-sulfat, sowie Dermatan- und Keratansulfat nachgewiesen. Die Anheftung der Bänder ist positiv für Kollagen I und II.

Insgesamt fehlt bisher in den Untersuchungen zur Entwicklung der Sehnenansätze des Menschen eine Untersuchung hinsichtlich der Molekülverteilungen im frühkindlichen Entwicklungsstadium. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Enthesis einer am kindlichen, knorpelig angelegten Skelettelement ansetzenden Sehne ist bisher nicht beschrieben worden. Die Kenntnis dieser Matrix im Vergleich zur adulten Enthesis ist die Voraussetzung für eine Interpretation bezüglich der "funktionellen Anpassung" gegenüber der genetischen Determinierung.

1.4 Fragestellung

Aus den vorangegangenen Abschnitten ergeben sich folgende Fragestellungen im Detail, welche im Verlauf der vorliegenden deskriptiven Studie geklärt werden sollen.

1. Welche molekulare Zusammensetzung weist die extrazelluläre Matrix der proximalen und der distalen Enthesisregionen kindlicher Patellae vor Auftreten des Knochenkerns auf?
2. Lässt sich die regionale Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und das histomorphologische Bild mit dem typischen Erscheinungsbild eines adulten Faserknorpels vergleichen?
3. Unterliegt die molekulare Anpassung auf mechanische Beanspruchung beim Kleinkind ähnlichen Mechanismen wie bei adultem Gewebe?

2 Material und Methode

2.1 Material

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten werden exemplarisch drei Patellae aus dem Altbestand der Anatomischen Anstalt der LMU-München entnommen (Identifikation: 18, 23/57, F84/61). Hierbei handelt es sich durchweg um Totgeburten mit Anecephalus (Scheitel-Steiß-Länge zwischen 20 und 30cm, Gewicht ca. 2000g).

Im Institut für Rechtsmedizin der LMU-München werden für die immunhistochemische Untersuchung zehn frühkindliche Patellae in unfixiertem Zustand entnommen und anschließend in Methanol fixiert. Mit einer Ausnahme erfolgt die Entnahme binnen 55 Stunden post mortem. Das Alter zum Zeitpunkt des Todes liegt zwischen 8 Tagen und 2.5 Jahren.

Identifikation	Geschlecht	Alter	Entnahmezeitpunkt	Größe	Gewicht	Todesursache
GS 1155/99	männlich	8 Tage	10h p.m.	53 cm	2.6 kg	SIDS
GS 1184/99	männlich	3 Monate	53h p.m.	62 cm	5.6 kg	SIDS
GS 1961/99	männlich	4 Monate	54h p.m.	65 cm	6.3 kg	SIDS
GS 1080/99	weiblich	6 Monate	10h p.m.	55 cm	4.1 kg	WBS
GS 914/99	männlich	6 Monate	79h p.m.	60 cm	4.7 kg	SIDS
GS 1891/99	weiblich	9 Monate	27h p.m.	71 cm	7.3 kg	SIDS
GS 1276/00	männlich	13 Monate	27h p.m.	77 cm	10.8 kg	Viraler Infekt
GS 1969/00	männlich	12 Monate	29h p.m.	78 cm	7.4 kg	Ersticken
GS 1190/00	männlich	15 Monate	23h p.m.	83cm	11.6 kg	Leukämie
GS 2039/99	männlich	30 Monate	19h p.m.	95 cm	13.1 kg	Verkehrsunfall

Tabelle 1

Liste der entnommenen Patellae mit zugehörigen Spenderdaten

Abkürzungen: SIDS = Sudden Infant Death Syndrome, WBS = Williams-Beuren-Syndrom

2.2 Methode

2.2.1 Paraffinschnittanfertigung und Färbung

2.2.1.1 Paraffinschnittanfertigung

Drei jeweils rechte Patellae werden durch Entfernen der Retinaculae und von Teilen des Hoffaschen Fettkörpers präpariert. Die etwas länger belassene Quadricepssehne und die etwas kürzer zugeschnittene Patellarsehne dienen der Orientierung an den anschließend halbierten Kniescheiben. Die über Jahrzehnte hinweg in Formalin fixierten Patellae werden zunächst in fünfprozentiger EDTA-Lösung eingelegt, um eine bessere Schneidbarkeit zu gewährleisten. Dies geschieht bei 37°C im Wärmeschrank über einen Zeitraum von drei Wochen. Anschließend erfolgt die Einbringung in die aufsteigende Alkoholreihe (50-70-80-90-100-100 Prozent Äthanol und zweimal Xylol 100 Prozent) und in zwei Fraktionen 60 Grad Celsius heißen Paraffins, um die darauf folgende Einbettung zu ermöglichen. Bis zum Anfertigen der Schnitte werden die eingebetteten Präparate im Kühlschrank aufbewahrt. Das Schneiden im Mikrotom (Reichert-Jung 2050 Supercut) erfolgt mit einer Schnittdicke von 8µm. Die Schnitte werden in Bädern mit destilliertem kaltem und warmen (ca. 50°Celsius) Wasser gestreckt, auf Objektträger aufgebracht und schließlich bei 40°C getrocknet und bis zur Färbung im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Färbung der Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte werden vor sämtlichen Färbungen zunächst auf der Wärmebank bei 60°Celsius aufgeschmolzen, anschließend zweimal für fünf Minuten in Xylol entparaffiniert. Es folgt die Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (100%-90%-80%-70% Äthanol) und kurzes Abspülen in destilliertem Wasser. Zur Darstellung der Zonen werden vier unterschiedliche Färbungen angewendet.

Toluidinblau

Die Färbung erfolgt über drei Minuten im 1%-igen Toluidinblau O (1g Toluidin Blue O und 1g Natriumtetraborat in 100ml Aqua dest.). Es folgt die Waschung in Leitungswasser bis zum Ausbleiben von Schlieren. Schließlich werden die Schnitte durch Aufpressen von Filterpapier getrocknet und zügig mit DPX eingedeckt.

Trichromfärbung nach Goldner

Zunächst wird über 15 Minuten eine Kernfärbung in Mayers Hämalaun durchgeführt. Nach Spülung in destilliertem Wasser wird 15 Minuten mit fließendem warmen Leitungswasser gewässert. Der erneuten Spülung in Aqua dest. folgt die 15-minütige Färbung in Säurefuchsin-Ponceau. Die Schnitte werden zweimal kurz in 1%-iger Essigsäure gespült und sechs Minuten lang in Phosphorwolframsäure-Orange G differenziert. Die Spülung mit Essigsäure wird wiederholt, und es erfolgt die Färbung mit 1%-igen Lichtgrün über einen Zeitraum von 15 Minuten. Abermals wird nun in Essigsäure gespült und in Aqua dest. ausgewaschen. Dem kurzen Schwenken in 90%-igen Äthanol folgen zwei Fraktionen über jeweils zwei Minuten in 100%-igen Äthanol und schließlich, nach zwei mal drei Minuten Xylol, das Eindecken der Schnitte mit Eukitt.

Pikrofuchsin nach van Gieson

Nach zehn Minuten in Weigert A und B (Rezept siehe Romeis 1989) im Verhältnis 1:1 wird über einen Zeitraum von zehn Minuten fließend gewässert. Nach der Umsetzung in Aqua dest. wird drei Minuten lang in Pikrofuchsin gefärbt. Dem Abspülen in Aqua dest. folgt dann ein kurzes Schwenken in 90%-igen Äthanol und die Spülung in 100%-igen Äthanol über zweimal zwei Minuten. Dem Einbringen in Xylol über zweimal drei Minuten schließt sich das Eindecken mit DPX an.

Modifizierte Färbung nach Ladewig

Die Kernfärbung erfolgt über zehn Minuten in Weigert A und B im Verhältnis 1:1. Anschließend werden die Schnitte über zehn Minuten fließend gewässert. Nach der

Umsetzung in Aqua dest. wird die Farbe in 5%-iger Phosphorwolframsäure differenziert und wiederum in Aqua dest. abgespült. Es folgt die Färbung über drei Minuten in der Ladewiglösung, die erneute Spülung in Aqua dest, ein kurzes Schwenken in 90%-igen Äthanol, zweimal zwei Minuten in 100%-igen Äthanol, zweimal drei Minuten in Xylol und sofortiges Eindecken mit DPX.

2.2.1.3 Mikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der Zonen und deren Abgrenzung innerhalb der Präparate erfolgt mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops Axiophot der Firma Zeiss. Jeweils am proximalen und distalen Ende der Patella werden Sehne, Faserknorpel und hyaliner Knorpel, sowie anteriorer und posteriorer Rand und Zentrum der Patella untersucht (Abb.2).

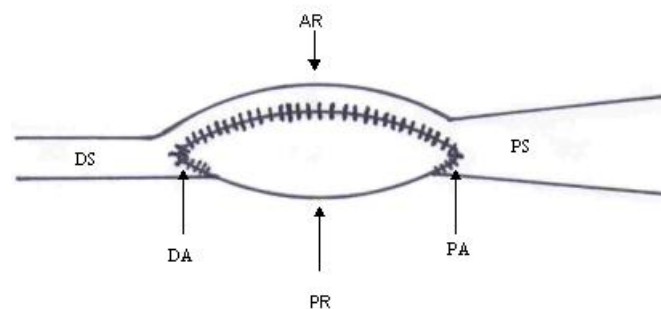


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Zoneneinteilung

DS=distale Sehne, PS=proximale Sehne, DA=distale Anheftungszone, PA=proximale Anheftungszone, AR=anteriorer Rand, PR=posteriorer Rand.

Zoneneinteilung der Präparate: DS=distale Sehne, PS=proximale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand, DA=distale Ansatzzone, PA=proximale Ansatzzone.

2.2.2 Immunhistochemische Untersuchung

2.2.2.1 Präparatentnahme und Fixierung

Die Präparatentnahme erfolgt durch Schnitte auf halber Länge der Quadriceps- und der Patellarsehnen, sowie mediale und laterale patellanahe Entfernung der Retinaculae. Sämtliche Patellae werden zur Vorbereitung für die immunhistochemische Bearbeitung sofort nach der Entnahme in 90%-igem Methanol

fixiert und mindestens 24 Std. bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgt eine längere Lagerung bei –20 °C.

2.2.2.2 Anfertigung der Gefrierschnitte

Vor der Anfertigung der Schnitte werden die Präparate für zwölf Stunden in 5%-iger Saccharose-Lösung inkubiert, um ein möglichst gleichmäßiges Einfrieren des Gewebes gewährleisten zu können. Anschließend erfolgt die sorgfältige Präparation zur Entfernung nicht relevanter Sehnenanteile und zur Reduzierung des Hoffaschen Fettkörpers am distalen Ende der Patellae. Die Präparate werden auf einem Objekthalter mittels eines Gefriermediums (Jung, Kat.-No. 0201 08926) bei ca. –22°C fixiert. Danach erfolgt die Anfertigung der Schnitte im Kryomikrotom (Microm 500 OMV) in sagittaler Ebene zunächst mit einer Schnittdicke von 30-50µm (Trimmschnitt) bis die relevante Schnittebene erreicht ist. Es folgen Serienschnitte mit einer Dicke von 12µm, die Schnitte werden dabei auf Superfrost Plus Objektträger aufgebracht. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgt die Aufbewahrung der fertigen Schnitte bei –20°C im Tiefgefrierschrank.

2.2.2.3 Immunhistochemische Markierung

Zur Vorbereitung für den immunhistochemischen Nachweis werden die Präparate auf den Objektträgern mit Dako-Pen umrandet, um eine hydrophobe Barriere zu schaffen und die Präparate damit gegeneinander abzugrenzen. Es folgt die Rehydrierung in PBS, sowie die Inkubation in Methanol (100ml+1ml 30% Wasserstoffperoxyd) über 30 Minuten. Nach dreimaligem Waschen in PBS (mit Tween 20 (0,1%) als Detergens) werden relevante Epitope durch eine Enzymbehandlung demaskiert. Die Inkubation erfolgt jeweils bei 37°C über 30 Minuten mit den Enzymen Chondroitinase AC (0.25 U/ml) und ABC (0.25 U/ml) sowie Hyaluronidase (1.5 U/ml). Es folgt erneut dreimal die Waschung mit PBS. Mögliche unspezifische Proteinbindungen werden anhand eines Pferdeserums mit einer Konzentration von 1:20 innerhalb von 60 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Die immunhistochemische Markierung erfolgt nach dem Abklopfen des Pferdeserums durch die Aufbringung spezifischer primärer Antikörper (Tabelle 2). Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur und wiederholtem Waschvorgang wird der sekundäre Antikörper (Anti-Maus) in einer

Verdünnung von 1:200 aufgebracht und wie der primäre Antikörper inkubiert und gewaschen. In der Zwischenzeit wird ein Peroxidase-Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-kit Elite) angesetzt und anschließend für 30 Minuten auf die Objektträger aufgetragen. Es folgt erneut ein dreifacher Waschvorgang in PBS. Daraufhin ist die Inkubation über 4 Minuten in absoluter Dunkelheit mit DAB-Lösung nötig. Es erfolgt die rasche Auswaschung in Leitungswasser und die Kernfärbung in Meyers Hämatoxylin für 20 Sekunden. Nach Differenzierung in Leitungswasser erfolgt die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe von 70-100% Äthanol über jeweils 5 Minuten. Es folgen zwei Fraktionen mit 100% Xylol. Schließlich werden die Objektträger mit DPX möglichst unter der Vermeidung von Luftblasen eingedeckt.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Enzymvorbehandlung	Quelle	Referenz
Kollagen I	Col I	1:2000	H1.5U/ml+ChABC 0.25U/ml	Sigma	Mayne 1988
Kollagen II	CIIC1	1:6	H1.5U/ml+ChABC 0.25U/ml	DSHB	Holmdahl et al. 1986
Kollagen III	4H12	1:500	H1.5U/ml+ChABC 0.25U/ml	ICN	Milz et al. 2002
Kollagen V	3C9	1:500	H1.5U/ml+ChABC 0.25U/ml	ICN	Milz et al. 2002
Kollagen VI	5C6	1:10	H1.5U/ml+ChABC 0.25U/ml	DSHB	Hessle&Engvall 1984
Chondroitin-6-sulphat	3B3	1:200	ChABC 0.25U/ml	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Chondroitin-6-sulphat natives Epitop	3B3	1:200	keine	B.Caterson	Caterson et al. 1990
Dermatansulfat	2B6	1:1500	ChABC 0.25U/ml	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Chondroitin-4-sulfat	2B6	1:1500	ChACII 0.25U/ml	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Keratansulfat	5D4	1:1500	keine	B.Caterson	Caterson et al. 1983
Chondroitin-6-sulphat natives Epitop oversulphated	7D4	1:350	keine	B.Caterson	Caterson et al. 1990
Versican	12C5	1:5	ChACII 0.25U/ml	DSHB	Asher et al. 1991
Tenascin	T2H5	1:100	ChACII 0.25U/ml	Serotec	Verstraeten et al. 1992
Aggrecan	1C6	1:5	ChACII 0.25U/ml	B.Caterson	Caterson et al. 1986
Link-Protein	8A4	1:5	ChACII 0.25U/ml	B.Caterson	Caterson et al. 1985
Kontrolle	RT97	1:10	keine	B. Caterson	Caterson et al. 1985

Tabelle 2

Primärantikörper – alle monoklonal, aus der Maus

Abkürzungen: H-Hyaluronidase, ChACII-Chondroitinase ACII, ChABC-Chondroitinase ABC

2.2.2.4 Mikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der Zonen und deren Abgrenzung innerhalb der immunhistochemisch markierten Präparate erfolgt, ebenso wie die Auswertung der Paraffinschnitte, mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops Axiophot der Firma Zeiss. Jeweils am proximalen und distalen Ende der Patella werden Sehne, Faserknorpel und hyaliner Knorpel, sowie anteriorer und posteriorer Rand und Zentrum der Patella mittels der immunhistochemischen Markierung der verschiedenen Kollagene, Glykosaminoglykane und Proteoglykane untersucht (Abb.2).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Untersuchung der Paraffinschnitte

Die Auswertung der Paraffinschnitte erfolgt bei sagittaler Schnittrichtung jeweils am proximalen und am distalen Patellaende. Dazu werden die verschiedenen Bereiche der Anheftungsregionen in Sehne, Enthese und hyalinen Knorpel unterschieden.

In den Sehnen sind Fibrozyten in Reihen, parallel zu den Kollagenfaserbündeln, angeordnet (Abb.8d). Die Enthese stellt sich an beiden Enden der Patella als avaskuläres Gewebe mit rundlichen, chondroiden Zellen dar. Verglichen mit dem benachbarten Gewebe, wirkt diese Region eher zellarm. Die chondrozytären Zellen sind in Reihe oder einzeln angeordnet (Abb.16b). Es zeigt sich somit in der Enthese des Kleinkindes morphologisch das Erscheinungsbild einer nicht kalzifizierten Faserknorpelzone, welches einer vergleichbaren Zone beim Erwachsenen ähnlich ist. Die zonale Gliederung der Enthese als Ganzes, unterscheidet sich jedoch von der Anordnung der adulten Enthese, da beim Kleinkind die Zone aus kalzifiziertem Faserknorpel und der darauffolgende Knochen fehlen.

Im ansatznahen hyalinen Knorpel liegen die rundlichen Zellen einzeln oder in Gruppen, eine ausgeprägte Chondronanordnung wie im Knorpel des Erwachsenen ist jedoch nicht zu erkennen. Vereinzelt sind gefäßführende Knorpelkanäle im hyalinen Knorpel der Patella des Kleinkindes anzutreffen (Abb.14d). Diese halten einen gewissen Mindestabstand von der Enthese ein, dort finden sich nie Blutgefäße. Das kollagene Fasernetzwerk ist im Bereich des Patellaknorpels maskiert, während es in der Sehne gut zu erkennen ist. Histomorphologisch lässt sich kein Unterschied zwischen proximalem und distalem Ende der kindlichen Patellae nachweisen (Abb.10b,6b,16b).

3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung

Zur immunhistochemischen Auswertung werden die Präparate bei sagittaler Schnittrichtung in sieben Abschnitte unterteilt. Diese werden als topographische Einheiten bewertet. Die Abschnitte setzen sich aus proximaler und distaler Sehne, proximaler und distaler Enthese, hyalinem Knorpel im Zentrum der Patella und dem anterioren und posterioren Randbereich der Patella zusammen. Der immunhistochemische Nachweis der verschiedenen Kollagene, Glykosaminoglykane und Proteoglykane wird mit negativ (-), positiv (+) und stark positiv (++) beschrieben. Die folgende Tabelle (Tab.3) fasst die Ergebnisse zusammen, die anschließend detailliert erläutert werden.

Kollagene	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
Kol I	5/5	5/5	0/9	9/9	9/9	6/6	6/6
Kol II	1/5	5/5	9/9	9/9	3/8	4/6	6/6
Kol III	5/5	5/5	6/9	8/9	9/9	6/6	6/6
Kol V	2/5	3/5	1/9	6/9	7/9	4/6	5/6
Kol VI	5/5	4/5	2/9	8/8	8/8	5/6	4/6

Glykosamino- glykane	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
DS	5/5	5/5	8/9	9/9	9/9	7/7	7/7
C4S	5/5	5/5	9/9	8/8	8/8	6/6	6/6
C6S	5/5	5/5	9/9	9/9	9/9	6/6	6/6
C6S nativ 3B3	3/5	3/5	4/9	7/10	6/9	2/6	2/6
C6S nativ 7D4	5/5	5/5	7/9	9/9	9/9	5/6	5/6
KS	5/5	5/5	9/9	9/9	9/9	6/6	4/6

Proteoglykane	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
Versican	5/5	5/5	5/10	9/9	9/9	7/7	7/7
Tenascin	4/5	5/5	5/10	9/9	8/9	6/6	7/7
Aggrecan	0/4	2/4	8/9	6/9	0/9	1/4	4/4
Link Protein	2/4	3/4	6/9	8/9	7/9	2/4	2/4

Kontrolle	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
RT97	0/5	0/5	0/9	0/9	0/9	0/6	0/6

Tabelle 3

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die erste Ziffer gibt die Anzahl der positiven Nachweise an, die zweite Ziffer die Anzahl der untersuchten Präparate. Abkürzungen: Kol=Kollagene, DS=Dermatansulfat, C4S=Chondroitin-4-sulfat, C6S=Chondroitin-6-sulfat, nativ=natives Epitop, die Antikörper 3B3 und 7D4 erkennen verschiedene Epitope des C6S-Moleküls, KS=Keratansulfat, PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella.

3.2.1 Kollagene

3.2.1.1 Kollagen I

Für Kollagen I zeigt sich stets eine gleichmäßige Markierung in allen Sehnen und im Bereich der Anheftungszonen (Abb.3). Darüber hinaus weisen die anterioren Ränder der Patellae und in geringerem Maße auch die posterioren Randzonen positive Nachweise auf. Der hyaline Knorpel des Patellazentrums weist stets keine Markierung auf. In drei Präparaten fällt im Patellazentrum die positive Markierung im Bereich der gefäßführenden Knorpelkanäle besonders auf.

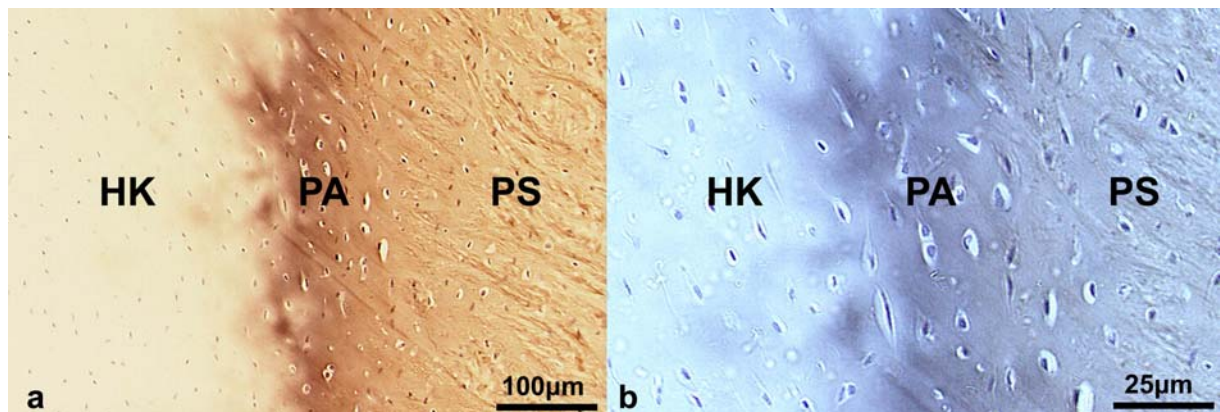


Abbildung 3

Kollagen I

Darstellung der Zonen am proximalen Ende der Patella.

a. Kollagen-I-Färbung, der hyaline Knorpel (HK) stellt sich links im Bild negativ als helle Zone dar; proximaler Ansatz (PA) und die etwas hellere proximale Sehne (PS) sind positiv markiert. **b.** Übergangszone aus (a) bei stärkerer Vergrößerung. Deutlich erkennbar der Wandel der Zellmorphologie von der Sehne (PS) zum nicht markierten, hyalinen Knorpel (HK).

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, HK=hyaliner Knorpel.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			-	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			-	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			-	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	-			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			-	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	-	+	+	+	+

Tabelle 4

Kollagen I

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.1.2 Kollagen II

Eine positive Markierung für Kollagen II findet sich in allen Enthesisregionen und im Patellazentrum (Abb.4a). Die artikulierende Fläche der Patella ist ebenfalls stets positiv markiert. Der anteriore Rand ist in vier von sechs Fällen positiv, wohingegen die abgrenzbaren Sehnenanteile keinen positiven Nachweis von Kollagen II zeigen.

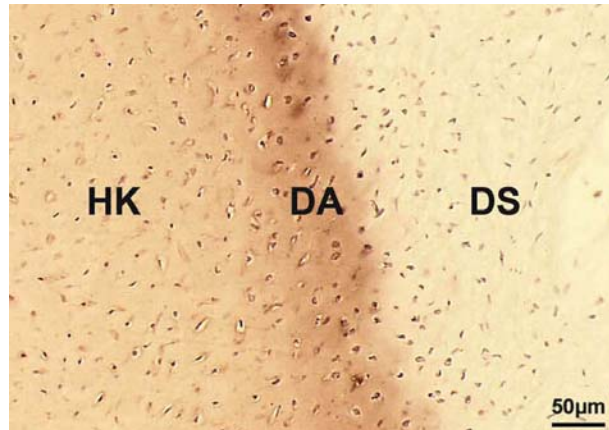


Abbildung 4

Kollagen II

Darstellung der positiven Zonen der Patella (HK) und der distalen Enthese (DA) links im Bild; angrenzend an negative, distale Patellarsehne (DS) der CIICI-Färbung.

Abkürzungen: HK=hyaliner Knorpel, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	-	-	+
GS 1184/99	3m			+	+	-		
GS 1961/99	4m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	-		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	-	+	+			+	+
GS 1276/00	13m	-	+	+	+	-	+	+
GS 1969/00	13m	-	+	+	+	-	-	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	-	+	+	+	-	+	+

Tabelle 5

Kollagen II

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.1.3 Kollagen III

Der Primärantikörper 4H12 ermöglicht in allen Sehnen, Anheftungszonen und Randbereichen der Patellae den positiven Nachweis von Kollagen III (Abb.5). Hierbei bildet lediglich das 3 Monate alte Präparat eine Ausnahme, dessen distale Enthese im Ergebnis negativ ist. Das Patellazentrum zeigt eine unterschiedliche Markierung, hier weisen drei von neun Schnitten ein negatives Ergebnis auf. Die positiven Sagittalschnitte sind teils fleckig oder perizellulär, jedoch durchgehend positiv markiert.

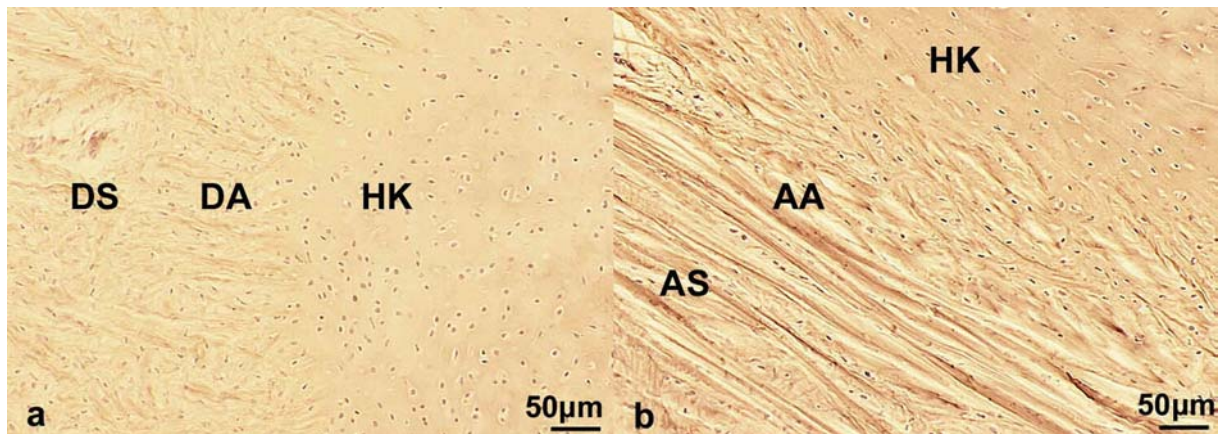


Abbildung 5

Kollagen III

a. Darstellung der durch 4H12 positiv markierten Zonen, distale Sehne (DS), distale Enthese (DA) und hyaliner Knorpel (HK) der Patella, das gesamte Bild zeigt eine einheitliche Markierung. **b.** Mit 4H12 positiv markierter anteriorer Rand der Patella mit Knorpel (HK) rechts oben, Anheftung (AA) diagonal im mittleren Bildbereich und Sehne (AS) links unten. Es zeigt sich eine einheitliche Markierung in allen Zonen.

Abkürzungen: DS=distale Sehne, DA=distaler Ansatz, HK=hyaliner Knorpel, AS=anteriore Sehne, AA=anteriore Anheftung der Sehne.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			-	-	+		
GS 1961/99	4m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	+			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 6

Kollagen III

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, beziehungsweise nicht beurteilbar sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.1.4 Kollagen V

Die Markierung von Kollagen V weist ein sehr diffuses Muster auf. Proximal zeigen die Sehne und ihr Ansatz negative und positive Markierungen zu gleichen Teilen, wohingegen das distale Pendant größtenteils Kollagen V aufweist, das jedoch häufig auf die Region um die Zellkerne begrenzt bleibt (Abb.6a). Der hyaline Knorpel der Patella ist bis auf eine Ausnahme nicht markiert. Die Randregionen zeigen wiederum keine einheitliche Markierung.

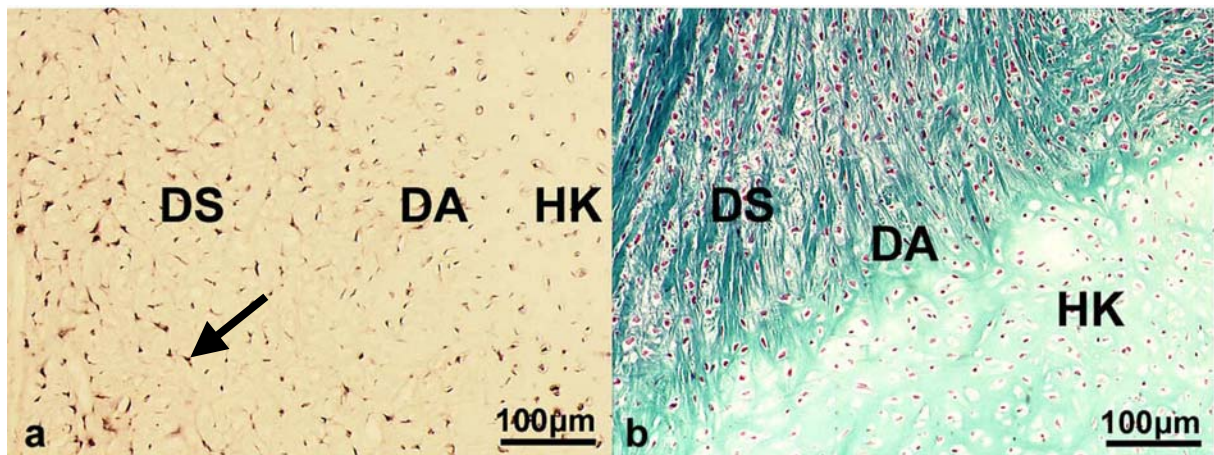


Abbildung 6

Kollagen V

a. Darstellung der intrazellulären Markierung (siehe Pfeil) durch 3C9 in sämtlichen Zonen. Die distale Sehne (DS) zeigt sich mit abgeflachten Zellkernen, sie geht in die Enthese (DA) mit rundlichen Zellkernen, die in Reihe angeordnet sind, über. Es schließt sich hyaliner Knorpel der Patella (HK) mit vereinzelt, rundlichen Zellkernen an. **b.** Darstellung der entsprechenden Zonen in der Trichromfärbung nach Goldner. Die Zellkerne sind im gesamten Präparat rotviolett markiert. In der oberen Bildhälfte sind die kollagenen Fasern der Sehne (DS) dunkelgrün angefärbt, die distale Anheftungszone (DA) ist mit ihren chondroiden Zellen etwas heller angefärbt, die extrazelluläre Matrix der Chondrone des hyalinen Knorpels (HK) rechts unten im Bild stellen sich am hellsten dar.

Abkürzungen: DS=distale Sehne, DA=distale Anheftungszone, HK=hyaliner Knorpel.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			-	ZK	ZK	-	-
GS 1184/99	3m			-	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	+	ZK	ZK	+	+
GS 1080/99	6m				ZK	ZK		
GS 914/99	6m			-	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	-			+	+
GS 1276/00	13m	-	-	-	-	-	-	+
GS 1969/00	13m	-	ZK	-	ZK	ZK	ZK	ZK
GS 1190/99	15m			-	ZK	+		
GS 2039/99	30m	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	+	+

Tabelle 7

Kollagen V

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: ZK=nur die Zellkerne weisen eine positive Markierung auf, PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.1.5 Kollagen VI

Der Antikörper 5C6 ergibt folgendes Bild. Sehne und Enthese sind mit einer Ausnahme stets positiv markiert (Abb.7). Die anteriore Patellafläche ist wiederum bis auf eine Ausnahme kollagen-VI-positiv. Die gelenkzugewandte Seite ist teils negativ, teils positiv markiert. Das Patellazentrum ist bis auf ein 13 Monate altes Präparat stets negativ.

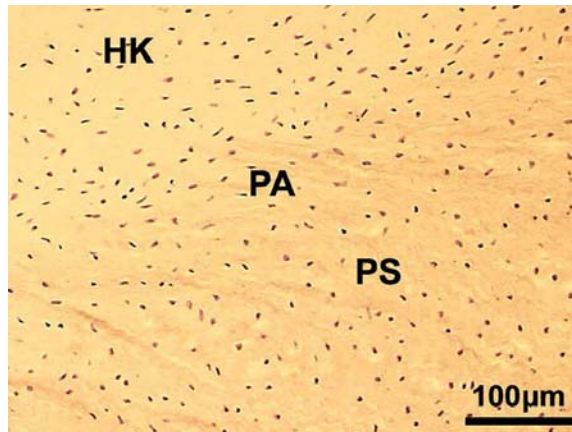


Abbildung 7

Kollagen VI

Durch 5C6 positiv markierte Zonen: hyaliner Knorpel (HK), proximaler Ansatz (PA) und proximale Sehne (PS) zeigen eine relativ einheitliche Markierung. In Ansatz und proximaler Sehne ist das kollagene Fasernetzwerk zu erkennen.

Abkürzungen: HK=hyaliner Knorpel, PA=proximale Anheftungszone, PS=proximale Sehne.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			-	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			-	+	+		
GS 1961/99	4m	+	-	-	+	+	-	-
GS 1080/99	6m							
GS 914/99	6m			-	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	-			+	-
GS 1276/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			-	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 8

Kollagen VI

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, beziehungsweise nicht beurteilbar sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.2 Glykosaminoglykane

3.2.2.1 Dermatansulfat

In sämtlichen Zonen der untersuchten Präparate lässt sich Dermatansulfat nachweisen (Abb.8a,b,c). Das Präparat des jüngsten Spenders weist eine diffuse positive Markierung auf. Lediglich das 15 Monate alte Präparat zeigt im Patellazentrum keine Markierung.

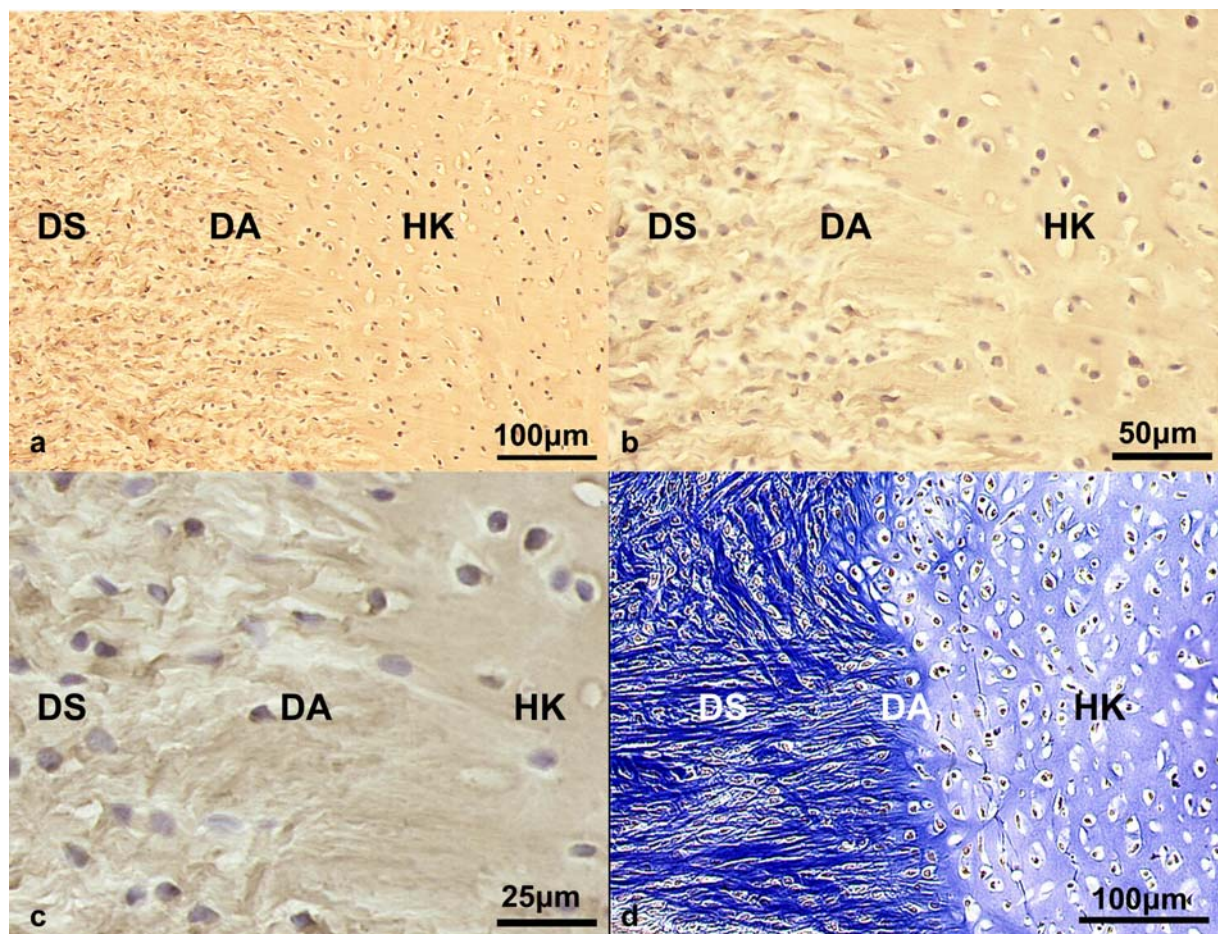


Abbildung 8

Dermatansulfat

Einheitlich markierte Zonen, distale Sehne (DS) jeweils links im Bild, distale Enthese (DA) in der Bildmitte und hyaliner Knorpel (HK) rechts im Bild.

a. b. c. Verschiedene Vergrößerungen der immunhistochemischen Präparate. **d.** Darstellung der entsprechenden Zonen in modifizierter Färbung nach Ladewig.

Abkürzungen: DS=distale Sehne, DA=distaler Ansatz, HK=hyaliner Knorpel.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			+	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	+			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			-	+	+	+	+
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 9

Dermatansulfat

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.2.2 Chondroitin-4-sulfat

Das Glykosaminoglykan Chondroitin-4-sulfat ist ausnahmslos in allen untersuchten Zonen der Präparate nachweisbar (Abb.9). Die Intensität der Markierungen weist nahezu keine Unterschiede auf.

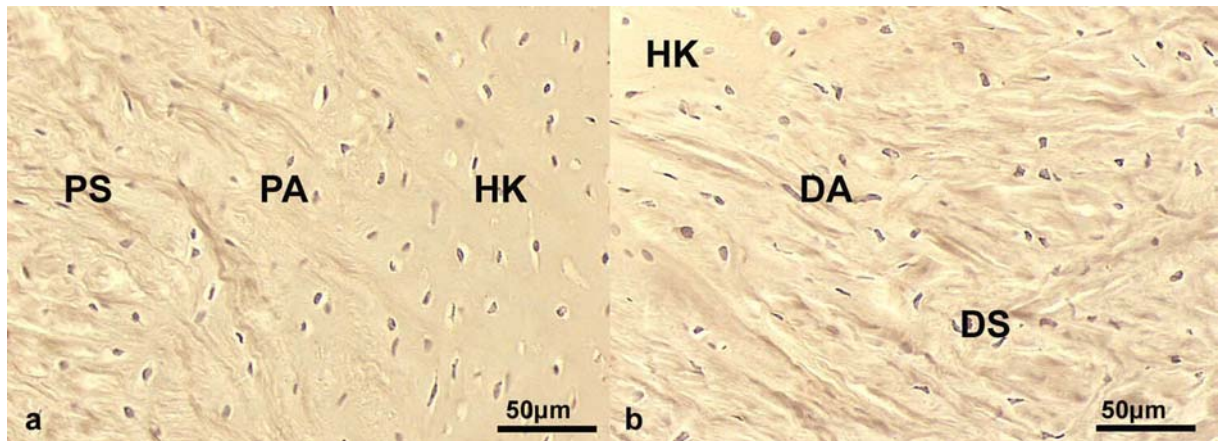


Abbildung 9

Chondroitin-4-sulfat

Darstellung Chondroitin-4-sulfat positiven Zonen, es zeigt sich an beiden Enden eine einheitliche Markierung.

a. Proximale Sehne (PS), Enthese (PA) und hyaliner Knorpel (HK). b. Distale Zonen.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximaler Ansatz, HK=hyaliner Knorpel, DS=distale Sehne, DA=distaler Ansatz.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			++	++	++		
GS 1961/99	4m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	+			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	+			+	+

Tabelle 10

Chondroitin-4-sulfat

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, --negativ, +=positiv, ++=stark positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.2.3 Chondroitin-6-sulfat

Die Markierung von Chondroitin-6-sulfat ist sehr einheitlich in sämtlichen Zonen positiv, d.h. es werden auch die Sehnenareale markiert, die nicht unmittelbar der Anheftungszone angehören (Abb.10a).

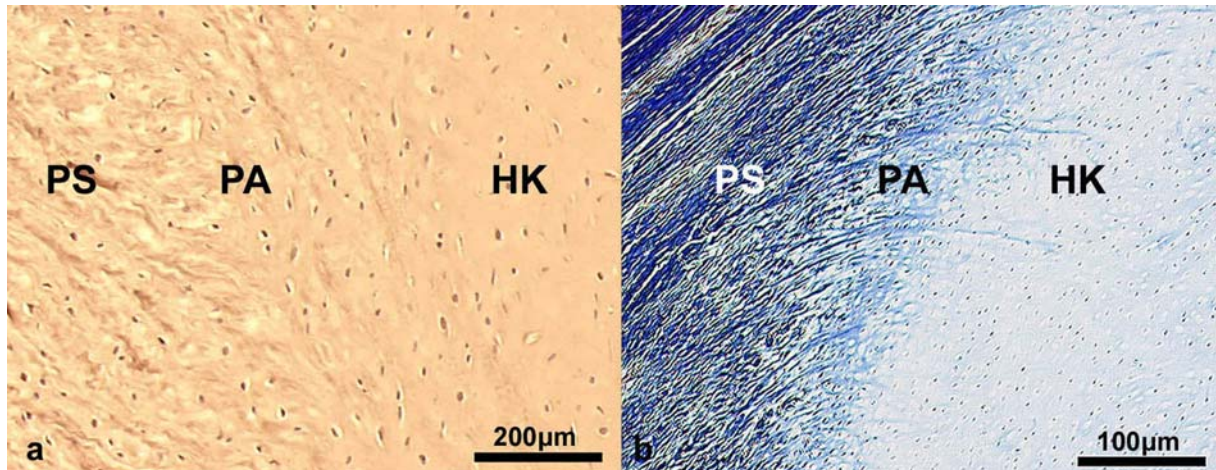


Abbildung 10

Chondroitin-6-sulfat

a. Chondroitin-6-sulfat positive Zonen proximal; es zeigt sich eine einheitliche Markierung in Sehne (PS), Enthese (PA) und hyalinem Knorpel (HK). **b.** Darstellung der proximalen Zonen in modifizierter Färbung nach Ladewig. Links im Bild stellt sich die dunkelblau gefärbte Sehne dar (PS). Im proximalen Ansatz (PA) ist die extrazelluläre Matrix dunkler gefärbt als im hyalinen Knorpel (HK) rechts im Bild. Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximaler Ansatz, HK=hyaliner Knorpel.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			+	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	+			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 11

Chondroitin-6-sulfat

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, beziehungsweise nicht beurteilbar sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.2.4 Chondroitin-6-sulfat - native Epitope

In der vorliegenden Untersuchung werden zwei verschiedene native Epitope des Chondroitin-6-sulfats mit Hilfe der Antikörper 3B3 und 7D4 (jeweils ohne Enzymvorbehandlung) nachgewiesen. Selbst ohne die Vorbehandlung mit Chondroitinase ABC stellt sich 3B3- zu einem relativ hohen Anteil in den Sehnen und Anheftungszone dar (Abb.11a), das Patellazentrum ist jedoch überwiegend negativ markiert. Die Randbereiche sind zu gleichen Teilen negativ und positiv markiert (Abb.11b). Ebenfalls ohne Enzymvorbehandlung liefert 7D4 in allen Zonen mit wenigen Ausnahmen einen positiven Nachweis des entsprechenden Epitops.

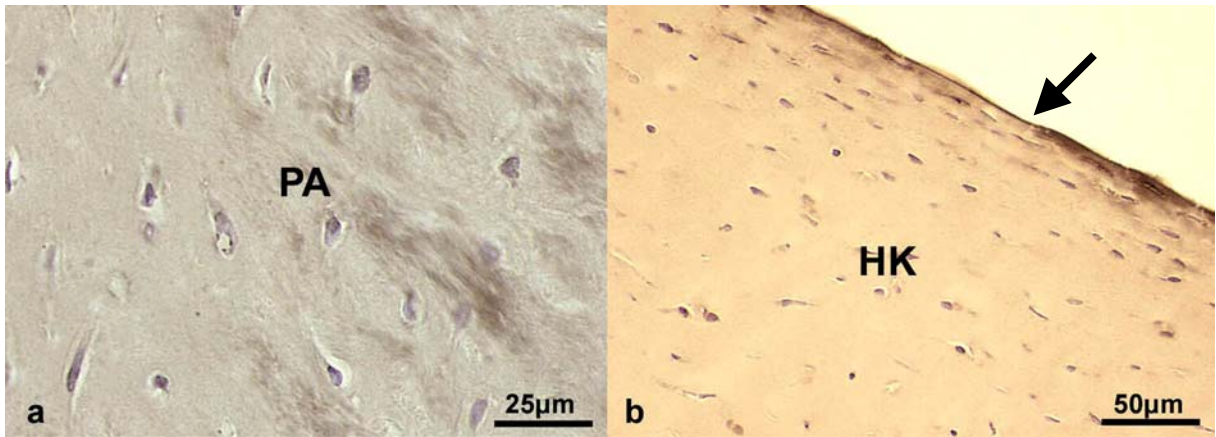


Abbildung 11

Chondroitin-6-sulfat - native Epitope

a. Darstellung der durch 3B3- positiv markierten proximalen Enthese (PA), das gesamte Bild weist eine positive Markierung auf. **b.** Gelenkflächennaher Teil (siehe Pfeil), die oberste ein bis zwei Zelllagen dicke Schicht des hyalinen Knorpelgewebes ist mit 3B3- positiv markiert. In größerem Abstand von dieser gelenkflächennahen Zone ist der hyaline Knorpel (HK) schwächer markiert.

Abkürzungen: PA=proximaler Ansatz, HK=hyaliner Knorpel.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			-	+	+	-	-
GS 1184/99	3m			-	-	-		
GS 1961/99	4m	+	+	-	+	+	ZK	ZK
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	-	+		+	+
GS 1276/00	13m	-	-	-	-	-	-	-
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	-	-	ZK	-	-	-	-

Tabelle 12

Chondroitin-6-sulfat - natives Epitop 3B3-

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			+	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	-			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	+	+	+	-	+
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	+	+	ZK

Tabelle 13

Chondroitin-6-sulfat - natives Epitop 7D4

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, beziehungsweise nicht beurteilbar sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: ZK=nur die Zellkerne weisen eine positive Markierung auf, PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.2.5 Keratansulfat

Die Untersuchung auf Keratansulfat anhand des Antikörpers 5D4 erbringt einen positiven Nachweis in sämtlichen Zonen und Präparaten (Abb.12), außer in zwei Fällen, in denen die posterioren Patellaränder im sagittalen Schnitt keine Markierung aufweisen.

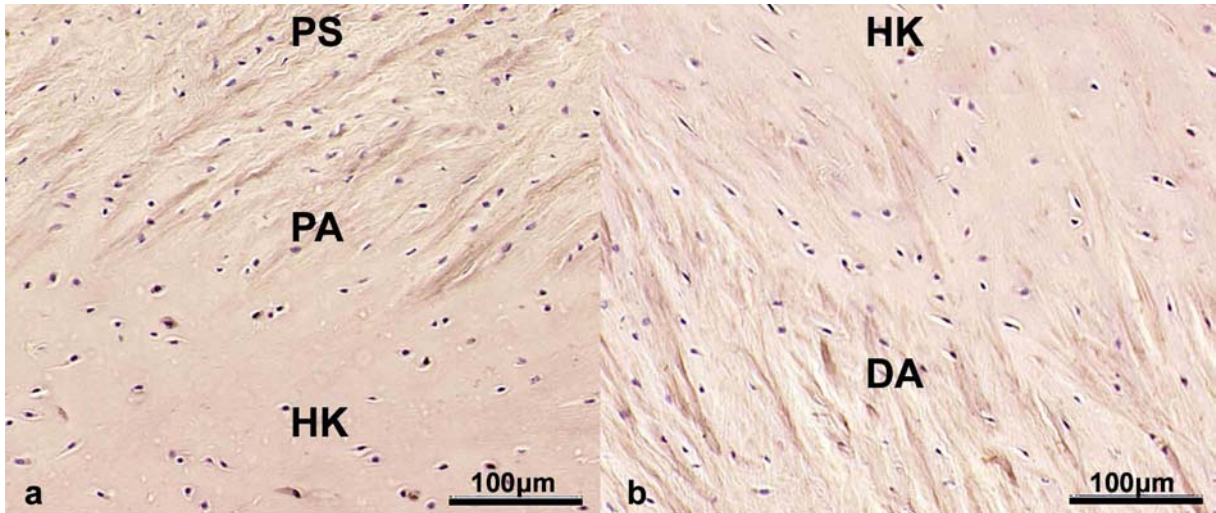


Abbildung 12

Keratansulfat

Nachweis von Keratansulfat.

a. Gleichmäßige positive Markierung in sämtlichen Zonen, proximale Sehne (PS), Enthese (PA) und hyaliner Knorpel (HK). **b.** Positive Markierung in den distalen Zonen, hyaliner Knorpel (HK) und Enthese (DA).

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			++	++	++		
GS 1961/99	4m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1080/99	6m				+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+		
GS 1891/99	10m	+	+	+			+	-
GS 1276/00	13m	+	+	+	+	+	+	-
GS 1969/00	13m	+	+	+	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 14

Keratansulfat

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, --negativ, +=positiv, ++=stark positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.3 Proteoglykane

3.2.3.1 Versican

Versican lässt sich sehr gleichmäßig in allen Sehnen und Ansatzzonen nachweisen (Abb.13). Das Zentrum der Patella ist bei sagittaler Schnittführung in jedem zweiten Präparat positiv. Drei der nicht markierten Zentren weisen deutlich positive Knorpelkanäle auf. Die Vorder- und Rückseiten der Patellae sind im Randbereich bis auf eine Ausnahme immer positiv markiert.

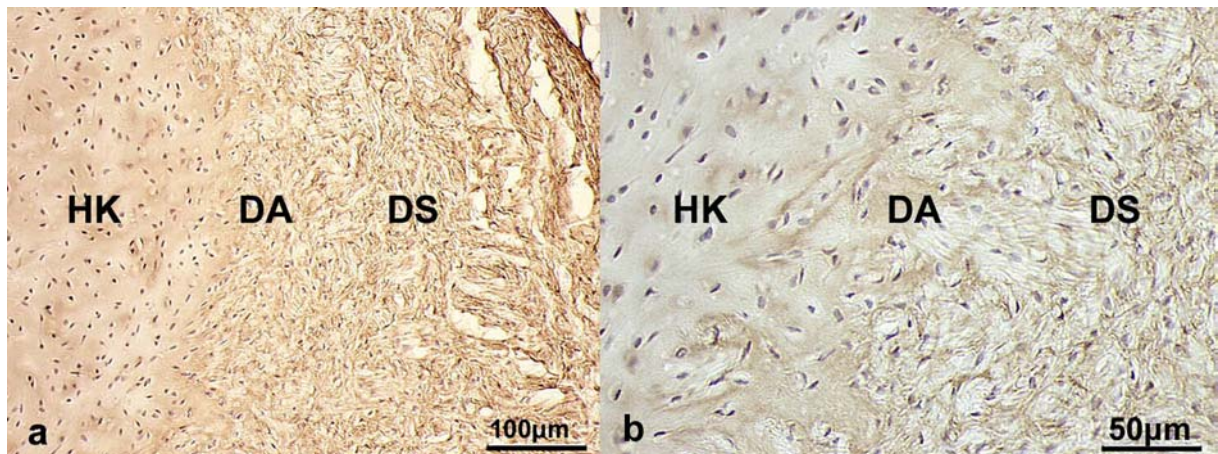


Abbildung 13

Versican

Gleichmäßig positiver Nachweis von Versican bei unterschiedlichen Vergrößerungen: hyaliner Knorpel (HK) jeweils links im Bild, distale Anheftungszone (DA) in der Bildmitte und distale Sehne (DS) rechts im Bild.

Abkürzungen: HK=hyaliner Knorpel, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			+	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1080/99	6m			+	+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+	+	+
GS 1891/99	10m	+	+	-			+	+
GS 1276/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1969/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	-	+	+	+	+

Tabelle 15

Versican

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.3.2 Tenascin

Die Enthese zeigt proximal und distal immer eine positive Markierung, die Sehne ebenfalls bis auf jeweils eine Ausnahme. Das Zentrum der Präparate, der hyaline Knorpel, ist in der Hälfte der Fälle negativ, bei einer durchweg positiven Darstellung der Knorpelkanäle und der diese unmittelbar umgebenden Zellen und deren extrazellulärer Matrix (Abb.14c). Anteriore und posteriore Randbereiche stellen sich komplett positiv dar (Abb.14a,b).

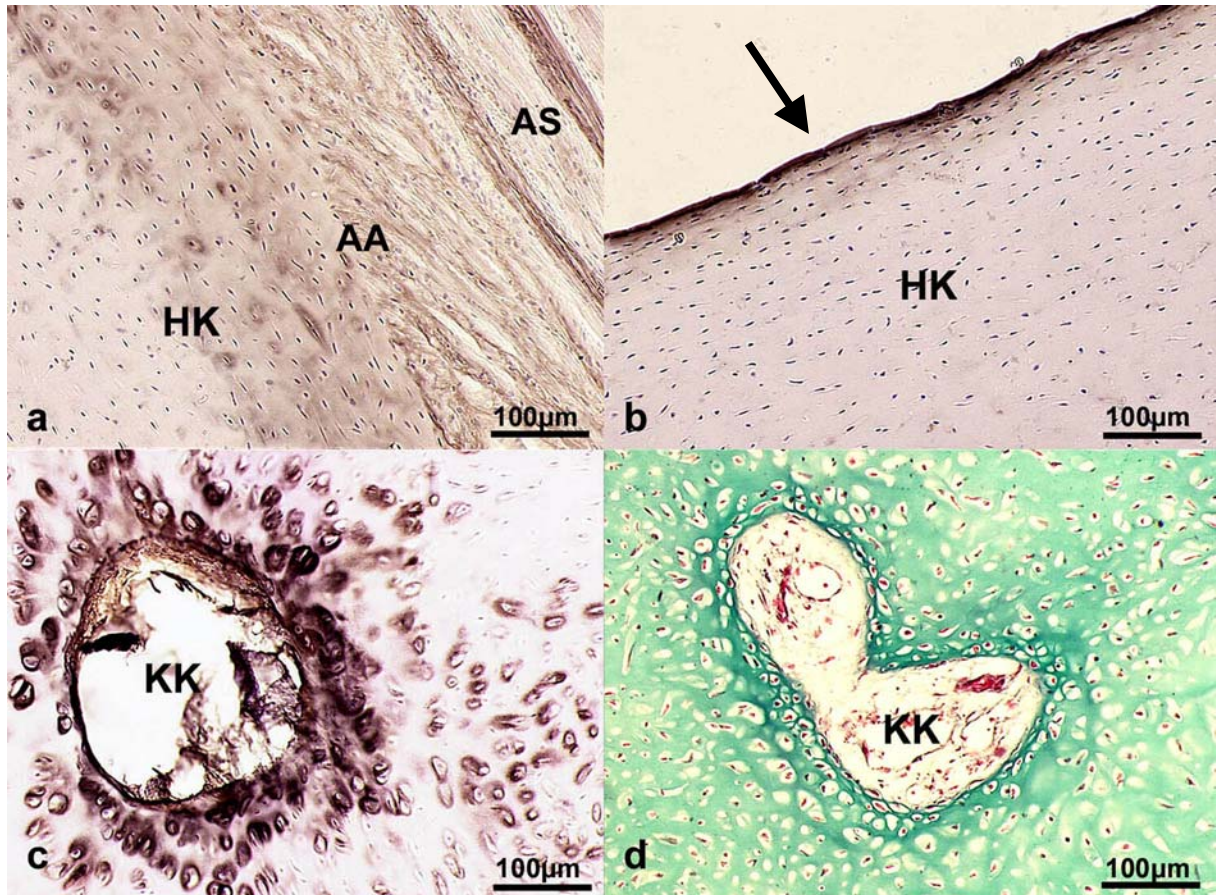


Abbildung 14

Tenascin

a. Positiver Nachweis von Tenascin im anterioren Rand der Patella. Der hyaline Knorpel (HK) ist im Patellazentrum negativ, geht dann in eine schmale, positiv markierte Zone über, der sich Enthese (AA) und die anterior gelegene Patellarsehne (AS), ebenfalls positiv markiert, anschließen. **b.** Am posterioren Rand (siehe Pfeil) geht die positiv markierte Gelenkfläche in den nicht markierten, hyalinen Knorpel (HK) über. **c.** Darstellung der zellulären Markierung durch Tenascin am Knorpelkanal (KK). **d.** Knorpelkanal (KK), Trichromfärbung nach Goldner.

Abkürzungen: HK=hyaliner Knorpel, AA=anteriore Anheftungszone, AS=anteriore Sehne, KK=Knorpelkanal.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	+	+	+
GS 1184/99	3m			+	+	+		
GS 1961/99	4m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1080/99	6m			+	+	+		
GS 914/99	6m			+	+	+	+	+
GS 1891/99	10m	+	+	-			+	+
GS 1276/00	13m	-	+	-	+	-		+
GS 1969/00	13m	+	+	-	+	+	+	+
GS 1190/99	15m			+	+	+		
GS 2039/99	30m	+	+	-	+	+	+	+

Tabelle 16

Tenascin

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, beziehungsweise nicht beurteilbar sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ,+=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.3.3 Aggrecan

Im proximalen Anteil von Sehne und Enthesis lässt sich größtenteils kein Aggrecan nachweisen (Abb.15a). Der hyaline Knorpel ist in acht Präparaten größtenteils diffus markiert (Abb.15), in einem Fall lässt sich keine Markierung nachweisen. Die distale Enthesis ist in sechs von zehn Präparaten positiv markiert (Abb.15b). Die distale Sehne weist kein Aggrecan auf, während der posteriore Rand (Abb.15a) häufiger als der sehnenbehaftete, anteriore Rand positiv markiert ist.

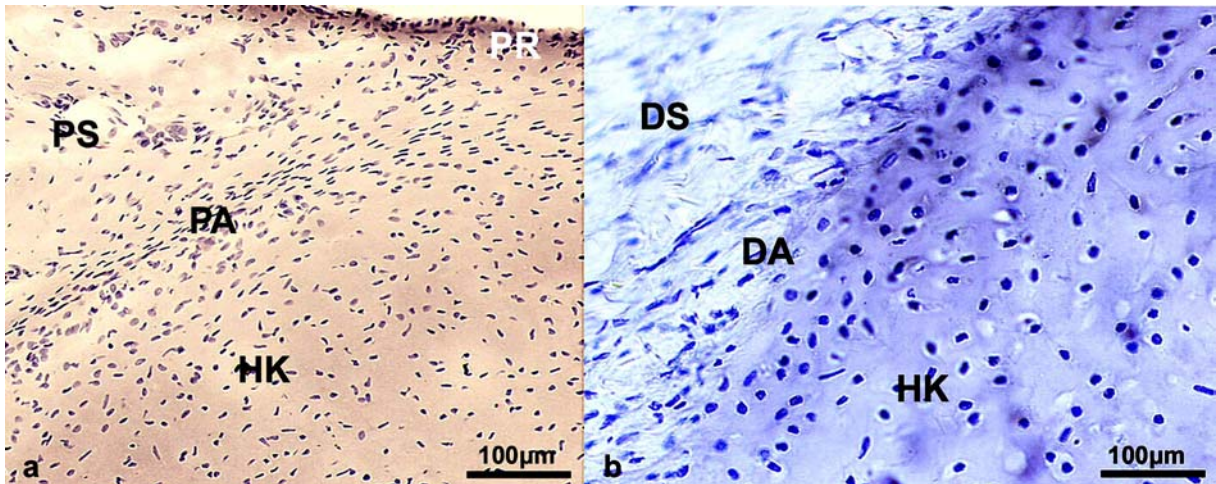


Abbildung 15

Aggrecan

Darstellung proximale und distale Enthese. **a.** Negative proximale Sehne (PS) links oben im Bild und negative proximale Anheftungszone (PA), hyaliner Knorpel (HK) rechts unten im Bild und posteriorer Randzone (PR) am oberen Bildrand positiv. **b.** Negative distale Sehne (DS) links oben im Bild, positiver Nachweis in distaler Enthese (DA) und hyalinem Knorpel (HK) rechts unten.

Abkürzungen: HK=hyaliner Knorpel, PA=proximale Anheftungszone, PS=proximale Sehne, PR=posteriorer Rand, DS=distale Sehne, DA=distale Anheftung.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			+	+	-		
GS 1184/99	3m			+	+	-		
GS 1961/99	4m	-	-	+	-	-	-	+
GS 1080/99	6m			+	+	-		
GS 914/99	6m			+	+	-		
GS 1891/99	10m	-	-	+	-	-	+	+
GS 1276/00	13m							
GS 1969/00	13m	-	+	-	-	-	-	+
GS 1190/99	15m			+	+	-		
GS 2039/99	30m	-	+	+	+	-	-	+

Tabelle 17

Aggrecan

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

3.2.3.4 Link Protein

Das Antigen, das durch den Antikörper 8A4 nachgewiesen wird, ist in den proximalen Zonen eher in der Enthese nachweisbar. Der hyaline Knorpel ist überwiegend positiv markiert, während die distale Ansatzzone mit einer Ausnahme den Nachweis von Link Protein erbringt (Abb.16a). Die Patellarsehne ist im Gegensatz dazu bis auf ein Präparat durchweg negativ markiert. Anteriore und posteriore Randbereiche zeigen keine einheitliche Tendenz.

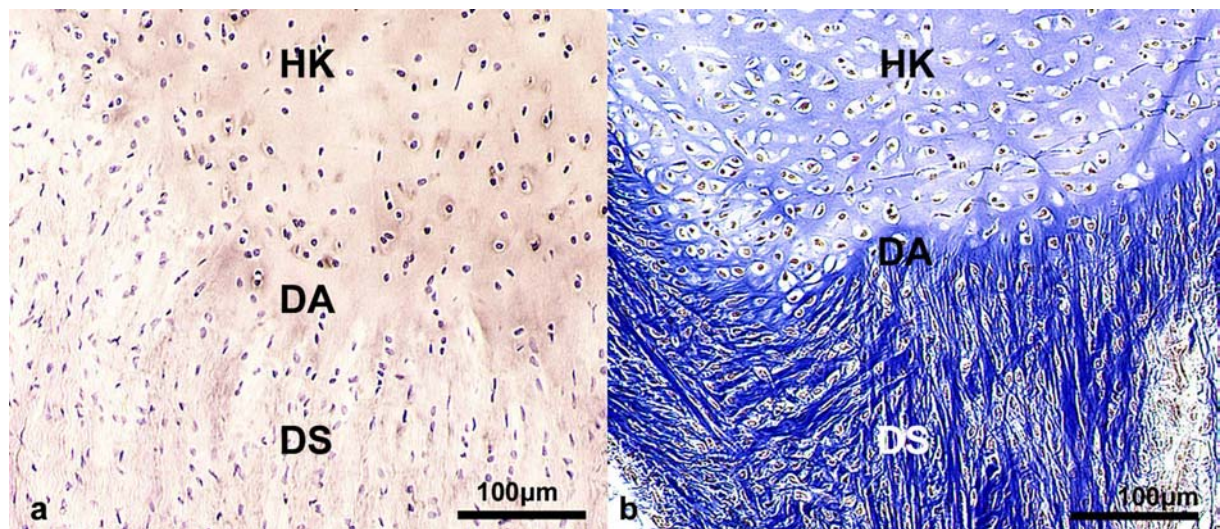


Abbildung 16

Link Protein

Distales Patellaende.

a. Nachweis von Link Protein in hyalinem Knorpel (HK) oben im Bild und distaler Enthese (DA), angrenzend die negative distale Sehne (DS) im unteren Bildbereich. **b.** Hyaliner Knorpel (HK) in der oberen Bildhälfte, distale Enthese (DA) und distale Sehne (DS) in der unteren Bildhälfte; modifizierte Färbung nach Ladewig.

Abkürzungen: HK=hyaliner Knorpel, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne.

Präparate	Alter	PS	PA	PZ	DA	DS	AR	PR
GS 1155/99	8d			++	+	-		
GS 1184/99	3m			+	+	-	+	+
GS 1961/99	4m	-	+	-	+	-	+	+
GS 1080/99	6m			+	+	-		
GS 914/99	6m			+	+	-		
GS 1891/99	10m	-	-	-	-	-	-	-
GS 1276/00	13m							
GS 1969/00	13m	+	+	-	+	+	+	-
GS 1190/99	15m			+	+	-		
GS 2039/99	30m	+	+	+	+	-	-	+

Tabelle 18

Link Protein

Zonen, die im Präparat nicht vorhanden sind, beziehungsweise nicht beurteilbar sind, repräsentieren leere Zellen der Tabelle, -=negativ, +=positiv, +=stark positiv.

Abkürzungen: PS=proximale Sehne, PA=proximale Anheftungszone, PZ=Patellazentrum, DA=distale Anheftungszone, DS=distale Sehne, AR=anteriorer Rand der Patella, PR=posteriorer Rand der Patella, d=Tage, m=Monate.

4 Diskussion

4.1 Grundlage des Studienaufbaus

Die vorliegende deskriptive Studie will klären, inwieweit die Morphologie und die Struktur der kindlichen Enthese (vor Bildung des Knochenkernes) mit der bekannten Struktur der Enthese eines Erwachsenen übereinstimmt. Insbesondere interessiert, ob sich bereits im frühkindlichen Alter Merkmale finden lassen, welche als Ausdruck eines Anpassungsprozesses an die mechanische Beanspruchung gewertet werden können. Zu diesem Zweck wählten wir zunächst die klassische histomorphologische Untersuchung von paraffineingebettetem Gewebe, sowie danach die immunhistochemische Untersuchung anhand von Gefrierschnitten. Die hier angewandten histologischen Färbungen (Toluidinblau, Trichrom nach Goldner, Pikrofuchsin nach van Gieson und Ladewig) erlauben eine klare Zoneneinteilung der zu untersuchenden Enthese anhand histomorphologischer Kriterien.

In diesen Zonen erfolgt sodann die detaillierte Bestimmung der verschiedenen Bestandteile der extrazellulären Matrix. Diese Vorgehensweise erlaubt einen präzisen Vergleich mit den Daten, welche für adultes Enthesisgewebe bereits mit den gleichen Methoden erarbeitet wurden.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Paraffinschnitte

Die Vorbehandlung der über lange Zeit fixierten und damit gehärteten Proben in 5%iger EDTA-Lösung bei 37°Celsius über einen Zeitraum von drei Wochen ermöglicht eine Schnittdicke von 8µm und gewährleistet somit eine optimale histomorphologische Beurteilbarkeit. Mit Toluidinblau O lassen sich Bereiche, in denen viele Glykosaminoglykane (diese entsprechen den sauren Valenzen im Gewebe) enthalten sind, metachromatisch (d.h. rotviolett) anfärben. Somit lässt sich die Knorpelgrundsubstanz gut darstellen. Die Trichromfärbung nach Goldner färbt Muskelgewebe rot, Kollagen leuchtend grün und Zellkerne blauschwarz. Sie ist damit zur Darstellung der Kollagenfaserverläufe im Bereich der Anheftungszonen gut

geeignet. Ähnliches gilt auch für die beiden anderen Färbungen. Bei der modifizierten Ladewig-Färbung stellen sich Kerne braun, Bindegewebe blau, Muskulatur rot und Epithel orange-rot dar, während Pikrofuchsin van Gieson sämtliche Gewebe (mit Ausnahme der elastischen Fasern) rot färbt. Durch den Vergleich der vier verschiedenen Färbungen wird eine umfassende Beurteilung der Histomorphologie der relevanten Zonen der kindlichen Patella sicher ermöglicht.

4.2.2 Immunhistochemie

4.2.2.1 Entnahme, Fixierung und Kryomikrotomie

Zur einwandfreien Durchführung der hier angewandten immunhistochemischen Markierungsmethode ist eine Methanolfixierung nötig, welche längstens 2 bis maximal 3 Tage post mortem erfolgen muss. Innerhalb dieser Zeitspanne führt die nach dem Tod einsetzende Autolyse noch nicht zu einer so weit reichenden Zerstörung der relevanten Antigene, dass eine Immunmarkierung unmöglich wird.

Methanol als Fixierungsmittel unterbindet nicht nur das Fortschreiten der Autolyse, sondern blockiert gleichzeitig eine eventuell vorhandene endogene Peroxidaseaktivität, welche ansonsten unspezifische Farbreaktionen bedingen könnte. Die Beurteilbarkeit der Präparate ist darüber hinaus stark von der Schnittdicke abhängig. Diese beträgt bei der vorgelegten Untersuchung 12µm, was einerseits eine hinreichende mechanische Stabilität beim Schneidevorgang gewährleistet, andererseits aber noch eine gute histologische Beurteilbarkeit zulässt. Um Schnittartefakte, insbesondere Überlappungen der Präparate zu vermeiden, müssen die Kryoschnitte faltenfrei und möglichst ohne Zerreißung angefertigt und auf die Objekträger aufgebracht werden. Dieser Arbeitsschritt wird mit zunehmender Probengröße immer schwieriger.

4.2.2.2 Immunhistochemische Untersuchung

Immunhistochemische Nachweismethoden beruhen auf der besonderen Affinität von Antikörper und Antigen. Unter Affinität ist dabei die Anziehungskraft zwischen den beiden Makromolekülen, Antikörper und Antigen zu verstehen, welche für die Bindung und die Aufrechterhaltung derselben verantwortlich ist. Ihrer Natur nach sind diese Bindungen weder kovalent noch rein elektrostatisch (Kiernan 1999), sondern beruhen

auf einem komplexen, dreidimensionalen Schlüssel-Schloss-Prinzip. Insgesamt beruht die Antigen-Antikörper-Bindung auf einer Mischung aus Anziehungskräften auf Ionenbasis, Wasserstoffbrückenbildung und hydrophoben Wechselwirkungen (Kiernan 1999). Aufgrund der sehr hohen Spezifität, mit der das Antigen durch einen entsprechenden Antikörper erkannt wird (Kiernan 1999, Lehninger et al. 1994), eignen sich immunhistochemische Nachweismethoden hervorragend zur Markierung von Makromolekülen, und hier insbesondere von Proteinen sowie zur Untersuchung von deren Verteilung im Gewebe.

Entsprechend ihrer Herkunft, bzw. der Art ihrer Gewinnung unterscheidet man als die zwei wesentlichen Gruppen monoklonale und polyklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum einer immunisierten Tierart gewonnen und sind typischerweise gegen verschiedene Epitope desselben Makromoleküls gerichtet. Im Gegensatz dazu binden monoklonale Antikörper nur an eine bestimmte antigene Determinante (Epitop), da sie alle von demselben, hybridisierten B-Zellklon abstammen. Die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers übertrifft daher in der Regel die eines polyklonalen Antikörpers. Im vorliegenden Fall wurde ausschließlich mit monoklonalen Antikörpern aus der Maus gearbeitet.

Antikörpermoleküle bestehen aus verschiedenen, funktionell sehr unterschiedlichen Untereinheiten. Man unterscheidet je Immunglobulin-G-Molekül zwei kurze und zwei lange Molekülketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Dadurch entsteht ein Y-förmiges Molekül, welches an seinen Enden eine variable Region aufweist, die für die Antigen-Antikörper-Reaktion verantwortlich ist. Demzufolge handelt es sich um ein bivalentes Molekül. Der Rest des Moleküls ist weitgehend konstant aufgebaut und erlaubt in der Praxis eine Unterscheidung von IgG-Molekülen, welche von verschiedenen Spezies stammen. Durch enzymatische Spaltung lassen sich weitere Untereinheiten erzeugen. Ist ein Antikörper gegen ein relativ kleines Molekül gerichtet, so besteht die Möglichkeit, dass die variablen Regionen auch andere ähnliche Moleküle erkennen. Man spricht in diesem Fall von Kreuzreaktivität. Ein Auftreten dieses Phänomens beeinträchtigt die Spezifität erheblich. Die genaue biochemische Charakterisierung eines Antikörpers ist daher unerlässlich, bevor dieser zur immunhistochemischen Markierung verwendet wird. Bei den im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Antikörpern wurde besonderer Wert auf das Vorliegen von solchen Charakterisierungen gelegt. Dies gilt vor allem für die Antikörper gegen die verschiedenen Glykosaminoglykane und Proteoglykane, welche von einer sehr angesehenen und zuverlässigen, biochemischen Abteilung der School of Biosciences

der University of Wales (Connective Tissue Lab. Prof. Dr. B. Caterson) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Detektion der gebundenen Primärantikörper sind verschiedene Verfahren möglich, deren gemeinsames Ziel die Erzeugung einer lichtmikroskopisch erkennbaren Markierung ist. Im vorliegenden Fall wurde die ABC-Peroxidase-Methode gewählt, da diese bei den Geweben des Bewegungsapparates die besten Ergebnisse liefert und demzufolge auch weltweit für diese Fragestellungen sehr häufig eingesetzt wird. Nach Ansicht verschiedener Autoren (Kiernan 1999) erzielt man mit dieser Methode die saubersten Präparationen, d.h. es ergeben sich die geringsten unspezifischen Hintergrundmarkierungen. Durch die Verwendung spezieller, optimierter Detektionssysteme (Vector Elite ABC-Peroxidase Kit) wird eine zuverlässige, spezifische und sensitive Detektion des jeweiligen Primärantikörpers gewährleistet.

Das im Rahmen dieser Untersuchung verwendete Nachweissystem arbeitet nach folgendem Prinzip. Ein biotinierter Sekundärantikörper – im vorliegenden Fall aus dem Pferd gewonnen – bindet an den Primärantikörper und reagiert in einem zweiten Schritt mit einem zuvor angesetzten Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex. Nach Zugabe eines geeigneten Chromogens (hier DAB) kommt es zu einem lösungsmittelresistenten Farbstoffniederschlag. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Detektions-Kits kommt eine bestimmte Avidinpopulation (Avidin-D) zum Einsatz, welche nach Firmenangaben (Vector Labs. Burlingame, Ca., USA) etwa 10-100-mal sensitiver mit Biotin reagiert, als das gewöhnlich verwendete Avidingemisch. Durch die Bildung von Komplexen, welche mehrere Peroxidasemoleküle enthalten, kommt es außerdem am Bindungsort zu einer Amplifizierung des Farbsignals. Die Peroxidasenachweisreaktion erlaubt keine quantitative Abschätzung, da die Menge an gebildetem Chromogenniederschlag nicht stöchiometrisch mit der Menge von nachgewiesenem Antigen korreliert.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

4.3.1 Kollagene

Kollagen I macht 90% des Gesamtkollagens im menschlichen Körper aus. Es kommt typischerweise in Sehnen, Faszien und Knochen, jedoch nicht im hyalinen Knorpel vor. Die Fibrillen gewährleisten die Widerstandsfähigkeit gegen hohe Zugkräfte (Kielty & Shuttleworth 1993). Die eigenen Ergebnisse zeigen in Quadriceps- und Patellarsehne auch beim Kleinkind ein Verteilungsmuster für Kollagen I, welches dem beim Erwachsenen beschriebenen Muster entspricht. Im hyalinen Knorpel im Zentrum der kindlichen Patella findet sich kein Kollagen I. Im Bereich der proximalen und distalen Sehnen-, beziehungsweise Bandanheftung (Enthesis) findet sich regelmäßig eine Überlappungszone mit Bereichen, welche positiv für Kollagen I und II reagieren. Diese Zone weist zudem eine Zellmorphologie auf, welche sich deutlich von den zentralen Patellaanteilen unterscheidet. Insgesamt entsteht das Bild eines Enthesisfaserknorpels, welcher in seiner Ausdehnung vor allem durch das gleichzeitige Vorkommen von Kollagen I und II charakterisiert ist. Dieser Faserknorpel trennt die Zugsehnenanteile der Quadriceps- und Patellarsehne vom hyalinknorpeligen Bereich im Zentrum der frühkindlichen Patella.

Typisch für Knorpelgewebe ist das Vorkommen von Kollagen II in Verbindung mit Aggrecan und Link Protein. Unter Druckbeanspruchung kann es auch in Sehnen ausgebildet werden, wo es häufig als so genannter sesamoider oder Enthesisfaserknorpel (Benjamin et al. 1995, Milz et al. 1998, 1999, 2001) vorkommt. Dabei kann in Geweben mit besonders knorpeligem Phänotyp die Markierung für Kollagen I völlig verschwinden und durch Kollagen II ersetzt werden (Milz et al. 2002).

Im vorliegenden Fall sind sowohl der hyaline Knorpel der Patella wie auch die Enthesisregion kollagen-II-haltig. Die Übergangszone stimmt morphologisch mit der Faserknorpelzone überein, die als Enthesis-Faserknorpel unter anderem bereits bei der Patella der Ratte beschrieben wurde (Benjamin et al. 1995, 1997, 1998). Die Zellen erscheinen morphologisch als große, rundlich bis ovale Zellen, die im

Gegensatz zu den, beim Kleinkind ungeordnet wirkenden, hyalinen Knorpelzellen des Patellazentrums einzeln oder in Reihe angeordnet sind.

Kollagen III, das zusammen mit Kollagen I typisch für alle faserreichen Bindegewebe ist (Gelbermann et al. 1988), hat einen geringeren Faserdurchmesser im Vergleich zu Typ I (Silver 1983) und kommt vermehrt in Geweben mit höheren Elastizitätsanforderungen, wie der Aorta oder der Haut vor. In dieser Untersuchung ist es regelmäßig in den Sehnen- und Anheftungszone anzutreffen. Das Zentrum der Patellae ist zwar zumeist ebenfalls positiv markiert, die Färbungen sind aber weniger gleichmäßig.

Kollagen V wird zusammen mit Typ I-III zur Gruppe der fibrillären Kollagene gezählt und ist ebenfalls in Bindegeweben, unter anderem in Sehnen vertreten (Kreis & Vale 1993). In den untersuchten Präparaten lässt sich eindeutig eine negative Zone im Zentrum der Patellae nachweisen. Sehnen und Enthesis sind im distalen Bereich größtenteils positiv markiert, die proximalen Zonen sind jedoch ziemlich uneinheitlich markiert. Auffallend ist, dass in den beschriebenen Zonen ab dem 13. Monat so gut wie keine positiven Nachweise mehr auftreten, bzw. die Markierungen dann auf die Region um die Zellkerne beschränkt bleiben.

Kollagen VI scheint für die Bindung von Zellen an das kollagene Netzwerk der extrazellulären Matrix verantwortlich zu sein (Burgeson & Nimni 1992). Als Verankerungsstruktur zwischen Komplexen aus Hyaluronsäure, Chondroitinsulfaten und Kollagen-I-Fibrillen, bildet es einen stark hydratisierten Saum, der den Flüssigkeitstransport zwischen den Fibrillen erleichtert (Bray et al. 1993). Dementsprechend wäre eine Verteilung ähnlich des Kollagen I anzunehmen, die sich auch weitestgehend so nachweisen lässt. Sehne und Ansatz zeigen einen positiven Nachweis, während sich der hyaline Knorpel weitgehend negativ darstellt.

Insgesamt ermöglichen die klaren Grenzen der Markierungen mit Kollagen I in Sehne und Enthesis und Kollagen II in Enthesis und hyalinem Knorpel eine immunhistochemische Abgrenzung der Faserknorpelzone, die der histomorphologischen Zuordnung gut entspricht. Die Enthesis weist chondroide, rundliche Zellen auf, die einzeln oder in Reihe angeordnet sind und entspricht somit dem Bild eines Faserknorpels. Bei beiden Methoden ist kein Unterschied zwischen

proximalem und distalem Sehnenansatz festzustellen. Demnach entspricht die Kollagenverteilung in den kindlichen Zonen (Sehne, Enthese und hyaliner Knorpel) prinzipiell dem Bild beim Erwachsenen. Hier ergibt sich durch die Kalzifizierung lediglich eine andere zonale Gliederung (Sehne, unverkalkter Enthesefaserknorpel, verkalkter Faserknorpel und Knochen).

4.3.2 Glykosaminoglykane

Die Polysaccharidketten der Glykosaminoglykane bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die ein Derivat eines Aminozuckers, Glukosamin oder Galaktosamin, enthalten. Mindestens einer der Zucker der Disaccharide besitzt eine negativ geladene Carboxylat- oder Sulfatgruppe. Die dadurch erzeugte hohe negative Ladungsdichte führt dazu, dass Kationen wie Kalium, Natrium, Kalzium und große Mengen Wasser gebunden werden (Stryer et al. 1994). Somit entsteht ein Zusammenhalt in der Grundsubstanz der gemeinsam mit den Kollagenfibrillen eine Permeabilitätsbarriere bildet und für die Druckresistenz des Gewebes mit verantwortlich ist. Je nach mechanischer und chemischer Beanspruchung variiert die jeweilige Zusammensetzung in den verschiedenen Geweben (Gillard et al. 1977b, Gelbermann et al. 1988, Flint et al. 1994, Watanabe et al. 1994, Vogel & Koob 1995). Unter lokaler Druckbeanspruchung in Sehnen ergibt sich eine bestimmte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Dermatan- und Keratansulfat bilden sich bereits unter Zugbeanspruchung aus, während Chondroitin-4-sulfat erst mit zusätzlicher geringfügiger Druckbeanspruchung folgt. Bei deutlicher Kompression bildet sich schließlich Chondroitin-6-sulfat aus (Milz et al. 2002).

Dermatansulfat, dessen Disaccharideinheit aus Iduronsäure und N-Acetyl-Galaktosamin-4-sulfat besteht, weist eine sehr einheitliche Markierung in allen untersuchten Bereichen auf. Gemeinsam mit Keratansulfat ist das Vorkommen typisch für faserreiches Gewebe (Gelbermann et al. 1988). Dermatansulfat kommt vermehrt in Haut, Lungen und Sehnen vor (Leonhard et al. 1990). Darüber hinaus ist es ein Bestandteil von Decorin, das assoziiert mit Kollagenfibrillen in nahezu allen Geweben nachweisbar ist (Kreis & Vale 1993) und für die Regulation des Kollagendurchmessers verantwortlich ist (Roughley & White 1994). Hohe Konzentrationen von Dermatansulfat werden als ein Zeichen für ausgereiftes Gewebe

beschrieben (Flint et al. 1984), die Quantifizierung unserer Befunde ist bei der hier angewandten Methode jedoch nicht möglich.

Eine sehr gleichmäßige Markierung in allen untersuchten Regionen ist auch für Chondroitin-4-sulfat nachweisbar. Es kommt in kleineren und größeren Proteoglykanen, wie Aggrecan, Versican, Biglycan und Decorin gehäuft vor (Vogel & Koob 1995).

Chondroitin-6-sulfat kommt vermehrt im Knorpel vor (Leonhardt et al. 1990) und ist in Verbindung mit Kollagen II ein charakteristischer Marker für Faserknorpel (Benjamin et al. 1995). Ein positiver Nachweis gelingt sowohl in den kollagen-II-positiven Regionen, wie auch in allen anderen untersuchten Zonen. Etwas differenzierter verteilt sich die Markierung des nativen Epitops 3B3-, welches nur in den Sehnen und Anheftungszone positiv dargestellt werden kann. Im hyalinen Patellazentrum findet sich meist keine Markierung. Das zweite native Epitop (Antikörper 7D4, stellt das so genannte Chondroitin-6-sulfat „oversulphated“ dar) ist mit wenigen Ausnahmen in allen untersuchten Bereichen positiv markiert. Beide Epitope gelten im adulten Gewebe als selten, bzw. als Indiz für degenerative Veränderungen an Bandscheibe und Gelenkknorpel (Caterston et al. 1990, Carney et al. 1992, Roberts et al. 1994, Slater et al. 1995). Ihr gehäuftes Vorkommen in juvenilem Gewebe deutet auf eine Funktion bei der gesteigerten Gewebevermehrung im frühen Kindesalter hin (Archer et al. 1996).

Keratansulfat ist in der Regel in Kornea, Nucleus pulposus und Knorpel nachweisbar (Leonhardt et al. 1990). In den untersuchten kindlichen Patellae und Sehnenansätzen ist es regelmäßig in allen Zonen nachweisbar, d.h. auch in den Sehnen. Funktionell wird diesem Glykosaminoglykan eine Bedeutung bei der Befähigung der Gewebe zum Widerstand gegen Zugbelastung zugeschrieben (Flint et al. 1994). Ein vermehrtes Vorkommen wurde im Alter und bei degenerativen Veränderungen in den knorpeligen Endplatten der Wirbelkörper beschrieben (Bishop & Pearce 1993).

Die vier nachgewiesenen Glykosaminoglykane sind mit Ausnahme eines nativen Epitops des Chondroitin-6-sulfats relativ gleichmäßig in sämtlichen Zonen nachgewiesen. Immunhistochemisch lässt sich bezüglich der Glykosaminoglykane

wiederum kein Unterschied zwischen proximaler und distaler Enthese feststellen. Das weit in die Sehnen hineinreichende Vorkommen von Chondroitin-6-sulfat, welches Teil verschiedener Proteoglykane ist (darunter Aggrecan und Versican), deutet auf eine faserknorpelige Enthese hin. Somit ist zu vermuten, dass selbst die geringe Beanspruchung der Übergangszone zwischen Sehne und hyalinem Knorpel beim Kind genügt, um die Expression sämtlicher Glykosaminoglykane, wie sie im adulten Entheseorgan vorkommen, anzuregen.

4.3.3 Proteoglykane

Proteoglykane bestehen zu 95% aus Polysacchariden und zu 5% aus Proteinen. Es handelt sich um große Polyanionen, die Wasser und Kationen binden und somit die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes bei mechanischer Deformation gewährleisten. Die Verteilung und die Häufigkeit der Proteoglykane sind wiederum abhängig von der mechanischen Beanspruchung (Milz 2002). Versican und Tenascin sind charakteristische Marker des kollagenfaserreichen, straffen Bindegewebes. In Sehnen nehmen sie unter Druckbeanspruchung mit zunehmendem faserknorpeligen Umbau ab, während die Expression von Aggrecan und Link Protein verstärkt wird (Milz 2002).

Versican und Tenascin sind regelmäßig in Sehnen und deren Ansatzzonen nachweisbar. Im hyalinen Knorpel ist nur die Hälfte der Präparate nahe der Enthese positiv. Es lässt sich jedoch keine typische Altersverteilung nachweisen. Versican, ein großes Chondroitin-sulfat-Proteoglykan, das von Fibroblasten gebildet wird, ist für die Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix und den Zelloberflächen-Glykoproteinen verantwortlich (Zimmermann 1993). Es stellt das typische, große Proteoglykan der Sehnen und des faserreichen Bindegewebes dar (Heinegard & Oldberg 1993).

Aggrecan ist wiederum, in Verbindung mit Link Protein, ein typischer Bestandteil von hyalinem Knorpel (Heinegard & Oldberg 1993). Es ist ein Strukturmolekül, das durch hohe Konzentrationen von fixierten Ladungen hyperosmotische Bedingungen im extrazellulären Raum schafft und somit ein festes, reversibel verformbares Gel bildet, welches Druckkräften widerstehen kann (Doerge et al. 1993). Jackson beschreibt die Widerstandsfähigkeit gegen Druckbeanspruchung in Verbindung mit Kollagen II (Jackson et al. 1991). Im sesamoiden Faserknorpel wird unter Druckbeanspruchung

die Zunahme von Aggrecan und von Kollagen II beobachtet (Benjamin et al. 1991, Robbins et al. 1997, Evanko & Vogel 1993). Im sesamoiden Faserknorpel der Achillessehne (Wagget et al. 1998) und der Rotatorenmanschette (Berenson et al. 1996) wird Aggrecan assoziiert mit Chondroitin-6-sulfat beschrieben.

Link Protein ist ein extrazelluläres Glykoprotein das zur Stabilisierung der Interaktion zwischen Aggrecan und Hyaluronsäure benötigt wird. Die beiden Epitope, die von 8A4 erkannt werden, liegen im Bereich der zweimal wiederholten, funktionell aktiven Domäne („tandem-repeat-domain“) des Link Proteins und gehören zu dem Teil, der an der Interaktion mit Hyaluronsäure beteiligt ist (Doege et al 1986, Goetnik 1993). Link Protein ist notwendig zum Wachstum embryonaler Knorpelanlagen (Goetnik 1993) und zur Bildung und Erhaltung der juvenilen und adulten Knorpelmatrix (Watanabe et al. 1999). Es ist eines der bedeutendsten Autoantigene bei Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises (Guerassimov et al. 1997,1998, Zhang et al. 1998). Es ist in diesem Zusammenhang bereits in Faserknorpeln nachgewiesen, welche besonders häufig im Rahmen der rheumatoiden Arthritis zerstört werden (Milz 2002).

Der adulte Sehnenansatz zeigt eine typische Überlappungszone zwischen Kollagen I und Versican der Sehne mit Kollagen II, Aggrecan und Link Protein im Faserknorpel der Enthesisregion. Die vorliegenden Ergebnisse lassen eine ähnliche Verteilung im kindlichen Knorpel vor Auftreten des Knochenkerns erkennen. Teilweise reichen die knorpeltypischen Markierungen bis weit in die Sehnen hinein.

4.3.4 Zusammenfassende Beurteilung

Die kindliche Enthesis zeigt eine Faserknorpelzone, welche alle charakteristischen Moleküle in einer Anordnung aufweist, die im Prinzip der Verteilung beim Erwachsenen entspricht (Benjamin et al. 1986). In der adulten Enthesis lässt sich die zonale Gliederung und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Kollagen II, Aggrecan, Link Protein, Chondroitin-6-sulfat) mit den spezifischen lokalen mechanischen Anforderungen erklären, welche offensichtlich auch an den Sehnenanheftungen der frühkindlichen Patella bereits vorliegen. Die Scherkraft am Übergang zwischen Knorpel und Sehne erzeugt auch bei der weicheren, hyalinen kindlichen Kniescheibe eine lokale Druckbeanspruchung im Bereich der Anheftungsstelle, die bereits den Schwellenwert, welcher zur Ausbildung von

Faserknorpel notwendig ist, übersteigt (Milz 2002). Selbst diese relativ geringe Beanspruchung der Übergangszone genügt offensichtlich, um ein faserknorpeliges Enthesisorgan, ähnlich des Erwachsenen, hervorzurufen. Grundsätzlich scheinen die Zugkräfte die der M. quadriceps femoris bei Streckung des gebeugten Kniegelenkes beim Kleinkind ausübt, bereits hinreichend groß zu sein, um die Notwendigkeit für die Existenz dieser Enthesis an der Patella (an beiden Polen!) zu schaffen. Einschränkend muss allerdings auch festgestellt werden, dass ein möglicher zusätzlicher Einfluss einer genetischen Disposition anhand unserer Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann (Schneider 1956). Dennoch deuten unsere Ergebnisse eher darauf hin, dass beim Kleinkind aufgrund der dem adulten Gelenk vergleichbaren anatomischen und mechanischen Situation auch ein vergleichbarer Reiz zur Ausbildung der faserknorpeligen Enthesis führt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht mit histologischen und immunhistochemischen Methoden den Aufbau und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im proximalen und im distalen Sehnenanheftungsbereich frühkindlicher Patellae. Ziel ist es die regional unterschiedliche molekulare Zusammensetzung zu beschreiben und mit den Befunden an der adulten Enthese zu vergleichen. Ausgehend vom Wissensstand zur molekularen Anpassung der adulten Enthese an mechanische Beanspruchung sollte geklärt werden, ob ähnliche Mechanismen auch mit den Befunden bei frühkindlichen Patellae vereinbar sind. Die zu Beginn der Untersuchung gestellten Fragen lassen sich dabei im Detail wie folgt beantworten.

Die extrazelluläre Matrix der kindlichen Sehnenansatzzonen weist folgende Bestandteile auf: Es besteht eine Zone, in der eine Überlappung von Kollagen I und II positiven Regionen besteht, während Kollagen III praktisch überall vorkommt. Kollagen V lässt sich bis zum 13. Monat nachweisen. Kollagen VI ist in den Ansatzregionen ebenfalls nachweisbar, die Anordnung der Markierungen variiert aber je nach Region.

Alle untersuchten Glykosaminoglykane (Dermatansulfat, Keratansulfat, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat) kommen regelmäßig in den Anheftungszonen vor. Auch Versican und Tenascin sind stets in den Ansätzen zu finden. Link Protein lässt sich häufig in den Anheftungszonen nachweisen, während Aggrecan in rund zwei Drittel der Fälle in der kindlichen Enthese auftritt. Insgesamt lassen sich zwischen proximaler und distaler Enthese keine großen Unterschiede hinsichtlich der Materialzusammensetzung feststellen.

Histomorphologisch stellt sich die Enthese an beiden Enden der Patella als Faserknorpel mit chondroiden (im Habitus den adulten Knorpelzellen ähnlich), rundlichen Zellen dar, die in Reihe oder einzeln angeordnet sind. Lediglich die zonale Gliederung aus hyalinem Knorpel, nicht kalzifiziertem Faserknorpel und Sehne unterscheidet sich von der Anordnung beim Erwachsenen (hier gilt: Knochen, kalzifizierter und nicht kalzifizierter Faserknorpel und Sehne). Die Zusammensetzung

der extrazellulären Matrix entspricht prinzipiell dem adulten Faserknorpel mit Kollagen II, Aggrecan, Link Protein und Chondroitin-6-sulfat.

Obwohl noch kein Knochenkern und somit kein subchondraler Knochen vorliegt, ergibt sich, trotz der zuvor erwähnten, morphologischen Unterschiede, prinzipiell ein ähnliches Gliederungsprinzip der Enthese wie beim Erwachsenen. D.h. schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung sind zwei getrennte Bereiche (Faserknorpel der Enthese und frühkindlicher hyaliner Knorpel) klar voneinander abgrenzbar. Die Verteilung der geformten Anteile der extrazellulären Matrix beim Kleinkind entspricht im nicht mineralisierten Bereich prinzipiell der beim Erwachsenen. Es ergibt sich lediglich eine unterschiedliche zonale Gliederung durch die noch nicht erfolgte Mineralsalzdeposition. Obwohl der Einfluss der genetischen Determinierung anhand unserer Studie nicht ausgeschlossen werden kann, kommen wir zu dem Ergebnis, dass bereits kurz nach der Geburt die gleichen biomechanischen Mechanismen bestehen, die auch beim Erwachsenen zur Ausprägung des Sehnenansatzorgans führen. Wir ziehen daraus den Schluss, dass die, im Vergleich zum Erwachsenen, geringe Beanspruchung der Übergangszone zwischen Sehne und kindlichem hyalinem Knorpel bereits ausreicht, um ein, dem adulten Ansatz entsprechendes, Enthesisorgan auszubilden.

6 Literaturverzeichnis

Archer CW, Morrison EH, Bayliss MT, Ferguson MW. The development of articular cartilage: II. The spatial and temporal patterns of glycosaminoglycans and small I leucine-rich proteoglycans.

J. Anat. 189:23-35, 1996

Asher RA, Scheibe RJ, Keiser HD, Bignami A. On the existence of a cartilage-like proteoglycan and link proteins in the central nervous system.

Glia 13:294-308, 1995

Badi MH. Calcification and ossification of fibrocartilage in the attachment of the patellar ligament in the rat.

J. Anat. 112: 415-421, 1972

Benjamin M, Evans EJ, Copp L. The histology of tendon attachments in man.

J. Anat. 149:89-100, 1986

Benjamin M, Qin S, Ralphs JR. Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys.

J. Anat. 187:625-33, 1995

Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments – an adaptation to compressive load.

J. Anat. 193:481-94, 1998

Benjamin M, Ralphs JR. Tendons and ligaments – an overview.

Histol. Histopathol. 12:1135-44, 1997

Benjamin M, Tyers RNS, Ralphs JR. Age-related changes in tendon fibrocartilage.

J. Anat. 179:127-136, 1991

Benjamin M., Evans EJ. Fibrocartilage.

J.Anat.171:1-15,1990

Bishop PB, Pearce RH; The proteoglycans of the cartilaginous end-plate of the human intervertebral disc change after maturity.

J. Orthop Res 11: 324-331, 1993

Bland YS, Ashhurst DE: Fetal and postnatal development of the patella, patellar tendon and suprapatella in the rabbit; changes in the distribution of the fibrillar collagens.

J. Anat. 190:327-342, 1997

Bray DF, Bray RC, Frank CB; Ultrastructural immunolocalization of type-VI collagen and chondroitin sulphate in ligament.

J Orthop. Res. 11:677-85, 1993

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin Orthop 282 : 250-272, 1992

Carney SL, Billingham ME, Caterson B, Ratcliffe A, Bayliss MT, Hardingham TE, Muir H. Changes in Proteoglycan turnover in experimental canine osteoarthritic cartilage.

Matrix 12: 137-147, 1992

Caterson B, Mahmoodian F, Sorrell JM, Hardingham TE, Bayliss MT, Carney SL, Ratcliffe A, Muir H. Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease.

J. Cell Sci. 97:407-411, 1990

Clark J, Stechschulte jr DJ, The interface between bone and tendon at an insertion site: a study of the quadriceps tendon insertion.

J Anat. 193:605-616, 1998

Cooper RR, Misol MD. Tendon and Ligament Insertion.

J. of Bone and Joint Surgery V. 52-A, No. 1:1-20, 1970

Darwin C. The origin of species. Sixth Edition. New American Library, New York, 1872

Doege K, Hassell JR, Caterson B, Yamada Y. Link protein cDNA sequence reveals a tandemly repeated protein structure.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3761-5, 1986

Dolgo-Saburoff B. Über Ursprung und Insertion der Skelettmuskeln.
Anatomischer Anzeiger 68:80-87, 1929

Ertelt W. Untersuchung über Körpergröße und Knochenstruktur bei Säugetieren.
Zool. Jb. Abt. Anat. und Ontog. 74:588-638, 1955

Evanko SP, Vogel KG. Proteoglycan synthesis in fetal tendon is differentially regulated by cyclic compression in vitro.
Arch. Biochem. Biophys. 307:153-164, 1993

Evans EJ, Benjamin M, Pemberton DJ. Fibrocartilage in the attachment zones of the quadriceps tendon and patellar ligament of man.
J. Anat. 171:155-162, 1990

Flint MT, Craig AS, Reilly HC, Gillard GC, Parry DA. Collagen fibril diameters and glycosaminoglycan content of skins – indices of tissue maturity and function.
Connect. Tissue Res. 13:69-81, 1984

Frost H. Intermediary organization of the human skeleton. Vol II, CRC, Boca Raton, 1983

Gelberman R, Goldberg V, An K-N, Banes A. Tendon.
In: Woo SL-Y, ed. Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues
Park Ridge: American Academy of Orthopaedic Surgeons: 5-40, 1988

Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH; A comparison of the glycosaminoglycans of weight-bearing and non-weight-bearing human dermis.
J. Invest. Dermatol. 69:257-261, 1977 a

Goetnik PF. Link Protein.
In: Kreis T, Vale R. Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins.
Oxford University Press 1993: 68-72

Guerassimov A, Duffy C, Zhang Y, Banerjee S, Leroux JY, Reimann A, Webber C, Delaunay N, Vipparti V, Ronbeck L, Cartman A, Arenault L, Rosenberg LC, Poole AR. Immunity to cartilage link protein in patients with juvenile rheumatoid arthritis.

J. Rheumatol. 24:959-64, 1997

Guerassimov A, Zhang Y, Banerjee S, Cartman A, Webber C, Esdaile J, Fitzcharles MA, Pole AR. Autoimmunity to cartilage link protein in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis.

J. Rheumatol. 25:1480-4, 1998

Haines RW, Mohuiddin A. Metaplastic bone.

J. Anat. 103(3):527-38, 1968

Havers C. Osteologia Nova. London, Smith, 1691

Heinegard D, Oldberg O. Glycosylated matrix proteins.

In: Royce PM, Steinmann B, eds. Connective Tissue and its Heritable Disorders. New York: Wiley & Liss: 189-209, 1993

Heister L. Compendium anatomicum. Nürnberg: Johann Paul Krauss, 1771

Hessle H, Engvall E. Type VI collagen. Studies on its localization, structure and biosynthetic form with monoclonal antibodies.

J. Biol. Chem. 259:3955-61, 1984

Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E, Wigzell H. Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis using monoclonal anti-type II collagen antibodies.

Arth. Rheum. 29:400-10, 1986

Huiskes R. If bone ist he answer, then what is the question?

Nature 197:145-156, 2000

Hyrtil J. Lehrbuch der Anatomie des Menschen. 11. Auflage Wien Wilhelm Braumüller 1870

Jackson RL, Bush SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and role in physiological processes.

Physiol. Rev. 71:481-539, 1991

Kiely CM, Shuttleworth CA. Synthesis and assembly of fibrillin by fibroblasts and smooth muscle cells.

J. Cell Sci.106:167-73, 1993

Kiernan JA. Histological und histochemical methods: theory and practice.

Butterworth-Heinemann, Oxford, Auckland, Boston; pp.390-418, 1999

Knese K-H, Hahne OH, Biermann H. Festigkeitsuntersuchungen an menschlichen Extremitätenknochen.

Morph. Jb. 96: 141-209, 1955

Knese K-H, Biermann H. Die Knochenbildung an Sehnen- und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen.

Z. Zellforschung 49:142-187, 1958

Kreis T, Vale R. Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins.

Oxford University Press, Oxford, 1993

Kumagai J, Kiriti S, Uthoff HK, Okawara Y, Ooshima A. Immunohistochemical distribution of type I, II and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion.

J. Anat. 185:279-284, 1994

Lamarck JB. Philosophie Zoologique. Bailliere, Paris, 1809

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Kohlenhydrate.

In Tschesche H (Hrsg.). Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford: 345-363, 1994

Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.

Thieme, Stuttgart, 8. Auflage, 1990

Mayne R. Preparation and application of monoclonal antibodies to different collagen

types.

Clin. Biochem. 21(2):111-115, 1988

Meyer H. Die Architektur der Spongiosa.

Archiv für Anatomie und Physiologie. pp.615-628, 1867

Milz S, McNeilly C, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M. Fibrocartilages in the extensor tendons of the Interphalangeal Joints of Human Toes.

Anat. Rec. 252:264-70,1998

Milz S, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M. Fibrocartilage in the extensor tendons of the human metacarpophalangeal joints.

Anat. Rec. 256:139-145, 1999

Milz S, Schlüter T, Putz R, Morigl B, Ralphs JR, Benjamin M. Fibrocartilage in the transverse ligament of the human atlas.

Spine 26:1765-1771, 2001

Milz S. Molekulare Parameter der mechanischen Beanspruchung des faserreichen Bindegewebes.

Habilitationsschrift. München 2002

Pauwels F. Biomechanics of the locomotor apparatus. Springer, Berlin, 1980

Petersen H. Histologie und mikroskopische Anatomie. J.F. Bergmann, München 1924

Ralphs JR, Benjamin M, Thornett A: Cell and Matrix Biology of the Suprapatella in the Rat: A Structural and Immunocytochemical Study of Fibrocartilage in a Tendon Subject to compression.

The Anatomical Record 231:167-177, 1991

Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG. Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendons.

Arch. Biochem. Biophys. 342:203-211, 1997

Roberts S, Caterson B, Evans H, Eisenstein SM. Proteoglycan components of the intervertebral disc and cartilage endplate: an immunolocalization study of animal and human tissues.

Histochem. J. 26:402-411, 1994

Rollhäuser H. Konstitutions- und Altersunterschiede in Festigkeit kollagener Fibrillen.

Morph. Jb. 90:157-179, 1950

Romeis B. Mikroskopische Technik.

Urban und Schwarzenberg München, 17.Auflage, 1989

Roughley PJ, White RJ. The dermatan sulphate proteoglycans of the adult human meniscus.

J. Orthop. Res. 10:631-7, 1992

Roux W. Der Kampf der Teile im Organismus. Engelmann Leipzig, 1881

Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR. Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon.

Anat. Embryol. 186:611-618, 1992

Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M.

Ultrastructure of fibrocartilage at the insertion of the rat Achilles tendon.

J. Anat. 189:185-191, 1996

Schaffer J. Die Stützgewebe. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.

von Möllendorff, Band 2, Teil 2, pp.1-390. Berlin: Springer, 1930

Schneider H. Zur Struktur der Sehnenansatzzonen.

Zeitschr. Für Anat. Und Entwickl., Bd.119:431-456, 1956

Silver FH. A two step model for lateral growth of collagen fibrils.

Coll. Rel. Res. 3:167-79, 1983

Slater RR jr., Bayliss MT, Lachiewicz PF, Visco DM, Caterson B. Monoclonal

antibodies that detect biochemical markers of arthritis in humans.

Arthritis Rheum. 38:655-659, 1995

Stryer L. Biochemie.

Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akad. Verlag, 1994

Verstraeten AA, Mackie EJ, Hagemann PC, Hilgers J, Schol DJ, De Jongh GJ, Schalkwijk J.

Tenascin expression in basal cell carcinoma.

Br. J. Dermatol. 127:571-4, 1992

Vogel KG, Koob TJ. Structural specialisation in tendons under compression.

International Review of Cytology 115:267-293, 1989

Waggett A, Kwan A, Woodnutt D, Ralphs J, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon.

Matrix Biol. 16: 457-70, 1998

Watanabe M, Nojima M, Shibata T, Hamada M. Maturation-related biochemical changes in swine anterior cruciate ligament and tibialis posterior tendon.

J. Orthop. Res. 12:672-82, 1994

Weidenreich F. Über den Begriff Knochen und die Beziehungen des Knochengewebes zu Bindegewebe und Knorpel. Anat. Anz. 57: 138, 1923

Wolff J. Das Gesetz der Transformation der inneren Architektur der Knochen bei pathologischen Veränderungen der äußeren Knochenform.

Sitzungsber. Preuss. Akad. Wiss. 22: 179, 1884

Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg LC, Poole AR.

Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes.

Am. J. Pathol. 153: 1283-91, 1998

Zimmermann D.R.: Versican. In: Kreis T, Vale R, Hrsg. Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins.

Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1993:100-101, 1993

7 Anhang

Protokoll: Immunofärbeverfahren mit Vectastain DAB-Kit

1. Präparatschnitte mit Dako-Pen umranden
2. 5 Minuten Rehydrierung in PBS und Tween
3. 30 Minuten Methanol (100ml+1ml 30% Wasserstoffperoxyd)
4. Waschen (3x5 Minuten PBS und Tween)
5. Enzym-Behandlung (30 Minuten bei 37°Celsius)

3B3 ohne Enzym (+PBS)	(Verdünnung 1:150 bis 1:300)
3B3 mit Chondroitinase ABC	(0.25 U/ml)
2B6 mit Chondroitinase ABC	(Verdünnung 1 :1500)
2B6 mit Chondroitinase AC	(Verdünnung 1 :350)
5D4 ohne Enzym (+PBS)	(Verdünnung 1:1500)
7D4 ohne Enzym (+PBS)	(Verdünnung 1:350)
ClICI mit HC	(Verdünnung 1:6)
Col I mit HC	(Verdünnung 1:2000)
4H12 mit HC	(Verdünnung 1:500)
3C9 mit HC	(Verdünnung 1:500)
5C6 mit HC	(Verdünnung 1:10)
T2H5 mit ACII	(Verdünnung 1:100)
12C5 mit AC	(Verdünnung 1:5)
1C6 mit AC	(Verdünnung 1:5)
8A4 mit AC	(Verdünnung 1:5)

6. Waschen (3x5 Minuten PBS und Tween)
7. Blockierung mit 1:20 Pferdeserum (60 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS)
8. Vorbereitung des ABC-Komplexes der bei 4°C für 30 Minuten aufbewahrt wird:
1ml PBS ohne Tween
20µl ABC-A
20µl ABC-B
9. Auftragen des Primärantikörpers (30 Minuten bei Raumtemperatur)
10. Waschen (3x5 Minuten PBS und Tween)
11. Aufbringen der Sekundärantikörper Antimaus (30 Minuten bei Raumtemperatur)
Vectastain ABC-kit Elite (Verdünnung: 1:200)
12. Waschen (3x5 Minuten mit PBS und Tween)

13. Zugabe des vorbereiteten ABC-Komplexes (30 Minuten bei Raumtemperatur)
14. Waschen (3x5 Minuten mit PBS und Tween)
15. DAB Inkubation 4 Minuten im Dunkeln
16. Waschen in Leitungswasser
17. Meyers Hämatoxylin 30 Sekunden
18. Waschen in Leitungswasser
19. Alkoholreihe
20. Eindecken der Präparate mit DPX

Lebenslauf:

Name: Britta Abel
Geburtsdatum: 21. April 1976
Geburtsort: München

Akademische Ausbildung:

1996-2003 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität
1996 Abitur in München, Leistungskurse: Englisch und Geschichte

Praktische und Internationale Erfahrungen:

Seit 04/04 Ärztin im Praktikum, Unfallchirurgie, Zentralklinikum Augsburg
10/03-03/04 Ärztin im Praktikum in der Anatomischen Anstalt der LMU München
Studium:
2002-2003 Praktisches Jahr im Zentralklinikum Augsburg, Wahlfach Gynäkologie
03-06/2000 Auslandssemester an der Universität Wien
1999-2001 Co-Assistentin im Kursus der Makroskopischen Anatomie der LMU München

Famulaturen:

08/2001 Gynäkologie: Praxisklinik, München
03/2001 Chirurgie: Praxisklinik, Ottobrunn
08/2000 Chirurgie: Praxisklinik, Sauerlach
10/1999 Innere Medizin: Krankenhaus Dritter Orden, München
09/1999 Neurochirurgie: Unfallklinikum Murnau
03/1999 Radiologie: New York University Medical Center, U.S.A.

Medizinische Nebentätigkeiten:

2000-2003 Telefonische Koordination bei der Deutschen Stiftung Organtransplantation, Region Bayern
1998-1999 Sitzwachen im Klinikum Innenstadt, München
08/1997 Praktikum, Wang Jing Hospital, Peking
05/1997 Assistentin bei der AOK Bayern, Abteilung Krankenhausabrechnung

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Milz für die Überlassung des Themas, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, die Einarbeitung in die experimentellen Untersuchungen, die umfassende und geduldige Betreuung, sowie die effizienten Korrekturen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Reinhard Putz für seine fachliche und menschliche Unterstützung in jeder Phase der Entstehung dieser Arbeit.

Bei Frau Dinter und Frau Harbauer möchte ich mich für die freundliche Förderung meiner Laborarbeiten bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Peter Stumpf für die Korrektur der Legenden danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich jederzeit und uneingeschränkt unterstützt und motiviert haben und somit wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.