

Aus der Anatomischen Anstalt der Universität München
Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. R. Putz

**Molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix
des Ligamentum transversum acetabuli beim Menschen und bei Primaten**

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

vorgelegt von
Georgios Valassis
aus Thessaloniki

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. Putz
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. R. Gräf PD Dr. med. M. Maier
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD. Dr. med. S. Milz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	18.12.2003

Gliederung

1. Einleitung

- 1.1 Anatomische Problematik
- 1.2 Fragestellung

2. Material und Methodik

- 2.1 Material
- 2.2 Methode
 - 2.2.1 Entnahme, Präparation, Lagerung
 - 2.2.2 Feinpräparation, Entkalkung, Kryostatschnitte
 - 2.2.3 Immunhistochemische Markierung

3. Ergebnisse

3.1 Kollagene

- 3.1.1 Kollagen Typ I*
 - 3.1.1.1 Human-frisch
 - 3.1.1.2 Human-fixiert
 - 3.1.1.3 Primaten
- 3.1.2 Prokollagen Typ I*
 - 3.1.2.1 Human-frisch
 - 3.1.2.2 Primaten
- 3.1.3 Kollagen Typ II*
 - 3.1.3.1 Human-frisch
 - 3.1.3.2 Human-fixiert
 - 3.1.3.3 Primaten
- 3.1.4 Kollagen Typ III*
 - 3.1.4.1 Human-frisch
 - 3.1.4.2 Human-fixiert
 - 3.1.4.3 Primaten
- 3.1.5 Kollagen Typ V*
 - 3.1.5.1 Human-frisch & Primaten
- 3.1.6 Kollagen Typ VI*
 - 3.1.6.1 Human-frisch
 - 3.1.6.2 Human-fixiert
 - 3.1.6.3 Primaten
- 3.1.7 Kollagen Typ IX*
 - 3.1.7.1 Human-frisch & Primaten

3.2 Glycosaminoglycane

- 3.2.1 Chondroitin-4-sulfat*
 - 3.2.1.1 Human-frisch
 - 3.2.1.2 Primaten
- 3.2.2 Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat*
 - 3.2.2.1 Human-frisch
 - 3.2.2.2 Primaten

3.2.3 *Natives Epitop von Chondroitin-6-sulfat*

3.2.3.1 Human-frisch

3.2.3.2 Primaten

3.2.4 *Chondroitin-6-sulfat*

3.2.4.1 Human-frisch

3.2.4.2 Primaten

3.2.5 *Chondroitin-6-sulfat (oversulphated)*

3.2.5.1 Human-frisch

3.2.5.2 Primaten

3.2.6 *Keratansulfat*

3.2.6.1 Human-frisch & Primaten

3.3 **Proteoglycane und Glycoproteine**

3.3.1 *Aggrecan*

3.3.1.1 Human-frisch & Primaten

3.3.2 *Link Protein*

3.3.2.1 Human-frisch & Primaten

3.3.3 *Versican*

3.3.3.1 Human-frisch

3.3.3.2 Primaten

3.3.4 *Tenascin*

3.3.3.1 Human-frisch

3.3.3.2 Primaten

3.3.5 *Vimentin*

3.3.5.1 Human-frisch & Primaten

3.3.6 *CD44 (human hyaluronate receptor)*

3.3.6.1 Human-frisch & Primaten

4. **Diskussion**

4.1 Wahl der geeigneten Markierungsmethode

4.2 Humane formalinfixierte Ligg. transversa acetabuli

4.3 Frische humane Ligg. transversa acetabuli

4.4 Frische Primaten Ligg. transversa acetabuli

4.5 Schlussfolgerung

5. **Zusammenfassung**

6. **Literatur**

7. **Lebenslauf**

1. Einleitung

1.1 Anatomische Problematik

Das Lig. transversum acetabuli bildet zusammen mit den knöchernen Bestandteilen des Acetabulums die Gelenkpfanne des Hüftgelenkes. Der Rand der konkaven Gelenkpfanne setzt sich in das Labrum acetabulare fort. Zwischen Vorder- und Hinterhorn der Facies lunata erstreckt sich das Lig. transversum acetabuli (Abb.1 & 2). Es umfasst das Caput femoris jenseits des Äquators und artikuliert mit dessen überknorpelter Gelenkfläche. Dadurch entsteht ein Kugelgelenk, welches drei Freiheitsgrade aufweist. Das Hüftgelenk stellt zudem ein inkongruentes Gelenk dar. Das Acetabulum hat in der Regel bei jüngeren Menschen einen kleineren Durchmesser als das Caput femoris. Das Acetabulum wird während der Beanspruchung elastisch deformiert; die Kongruenz mit dem Hüftkopf nimmt zu. Dieser Mechanismus ist erforderlich für die Optimierung der Druckverteilung und wahrscheinlich auch für die Ernährung des Knorpels (Bullough et al.1968; Löhle & Eckstein et al. 1994, 1996).

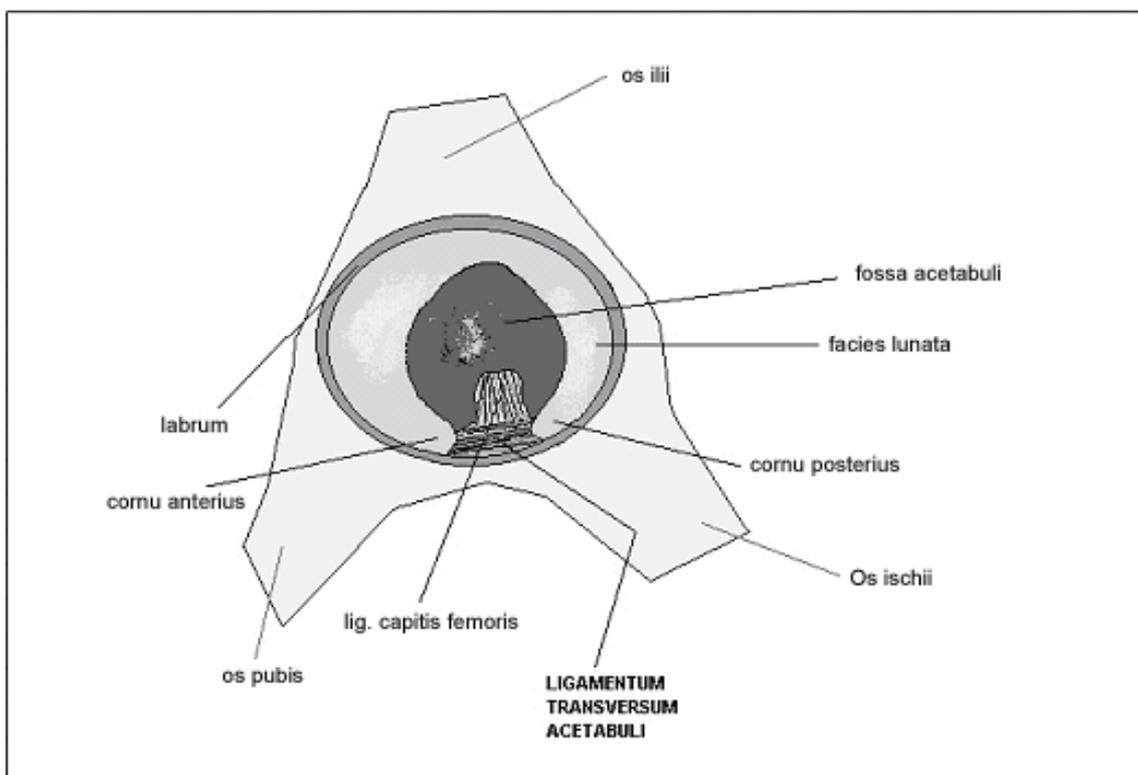


Abb. 1: Schematische Darstellung eines linken Acetabulums

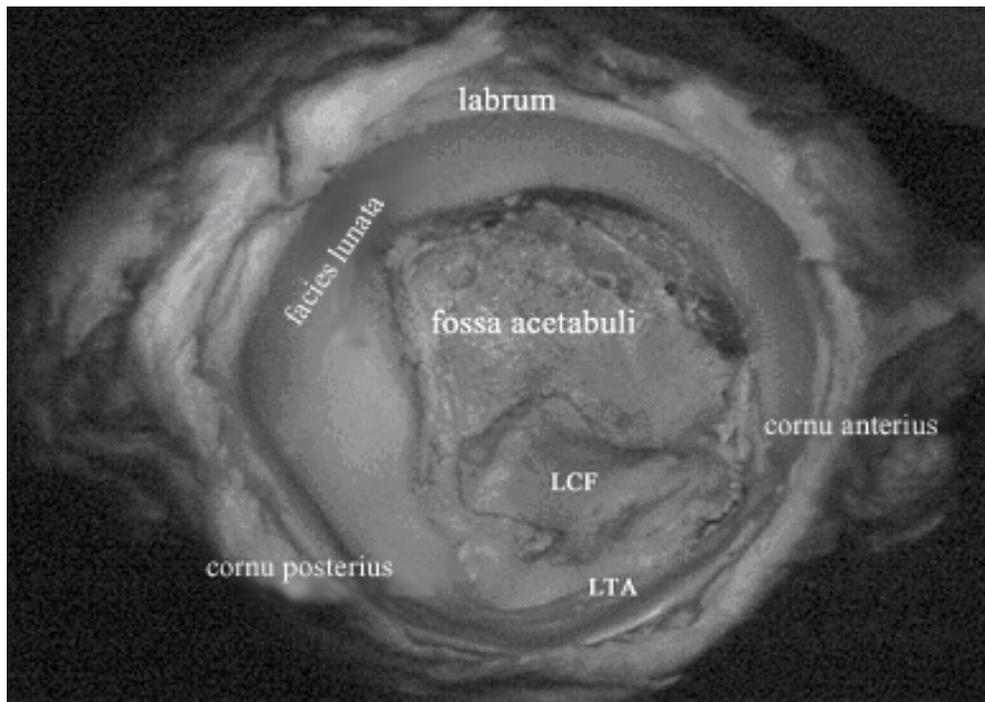


Abb. 2: Acetabulum rechts (LTA: Lig. transversum acetabuli, LCF: Lig. capitis femoris)

Das Lig. transversum acetabuli und seine Bedeutung für die Biomechanik des Hüftgelenkes werden in der Literatur nur vereinzelt diskutiert (Goodfellow et al. 1977, Löhe et al. 1994, Konrath et al. 1998). Klinisch wird das Band häufig als Hindernis bei der Reposition einer angeborenen Hüftluxation betrachtet (Tönis et al. 1984), da ein geschrumpfter Kapselbandapparat, ein verdrehtes Labrum und ein verlagertes und ein prominentes Lig. transversum acetabuli zum Scheitern der nicht invasiven Repositionsversuche und zu einer offenen Reposition führen kann.

Bänder übertragen Kräfte zwischen den verschiedenen Teilen des Skelettsystems. Die Fasern der Bänder stellen dabei aus biomechanischer Sicht ein passives Führungselement für die Krafteinwirkung dar, während die kontraktile Elemente der Muskulatur aktiv Kraft entwickeln. Die Bandfasern wirken unter Zugbeanspruchung dämpfend, da sie sich in begrenztem Umfang dehnen lassen. Auf diese Weise werden Spitzenkräfte gemindert und die Funktion der Gelenke verbessert (Arnold 1977). Projiziert man diese Aussage auf das Lig. transversum acetabuli und betrachtet die Ergebnisse der biomechanischen Experimente an isolierten Hüftgelenken, so ergibt sich die Vermutung, dass das Lig. transversum acetabuli unter Belastung des Hüftgelenkes als Zügel für die dorsale und die ventrale Gelenkfläche der Facies lunata dienen kann und bei der Lastübertragung im Acetabulum das Auseinanderweichen der beiden Hörner der Facies lunata begrenzt (Lanzenec et al. 1997,

Vanderbussche et al. 1999). Biomechanische Untersuchungen an humanen isolierten Hüftgelenken haben bei Erhöhung der Anpresskraft (bis 2800 N) eine zunehmende Dehnung des Lig. transversum acetabuli gezeigt, die bis maximal 3,2 % der Gesamtlänge (Löhe et al. 1997) des unbelasteten Bandes reicht. Bei durchtrenntem Lig. transversum acetabuli kommt es bereits bei nur 1000 N Anpresskraft im Hüftgelenk zu einem weiteren Auseinanderweichen des vorderen und des hinteren Horns der Facies lunata als beim intakten Band (Lazennec et al. 1997).

Ein Problem aller genannten Untersuchungen liegt jedoch darin, dass diese Experimente allesamt an isolierten Hüftgelenken durchgeführt wurden. Bei einem solchen Versuchsaufbau unterscheidet sich die biomechanische Situation grundlegend von derjenigen beim lebenden Individuum. Die Unterschiede bestehen sowohl hinsichtlich der Situation beim Gehen und Stehen, wie auch hinsichtlich der Dauer und Dynamik der einwirkenden Kräfte, da in den Untersuchungen meistens der statische Einbeinstand simuliert wird (vgl. z.B. Konrath et al. 1998). Beim Experiment unterscheidet sich somit die biomechanische Situation von den natürlichen Gegebenheiten nicht nur hinsichtlich der Art der Fixierung der Gelenkanteile in der Materialprüfmaschine, sondern auch durch das völlige Fehlen der muskulären Zugkräfte an den einzelnen Skelettelementen. Aufgrund solcher letztlich unausweichlicher Probleme bei der Simulation der normalen biomechanischen Situation an isolierten Knochen können wir bisher nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob das Lig. transversum acetabuli auch beim lebenden Individuum einer Dehnung und/oder einer lokalen Druckbeanspruchung ausgesetzt ist oder nicht.

1.2 Fragestellung

Ziel der Untersuchung ist es, die regionale Kollagen-, Glycosaminoglycan- und Proteoglycanzusammensetzung des Lig. transversum acetabuli zu untersuchen. Das besondere Interesse gilt der Verteilung der extrazellulären Matrix im mittleren Abschnitt des Bandes um dadurch Schlussfolgerungen bezüglich einer möglichen lokalen Druckbelastung durch den Hüftkopf ziehen zu können. Aber auch die beiden Ansatzzonen (ventral und dorsal) sollen auf ihre Zusammensetzung untersucht werden. Es ist das Ziel, mit Hilfe der immunhistochemischen Befunde Stellung zu nehmen, ob das Lig. transversum acetabuli den beschriebenen Zug- und Scherkräften auch in vivo ausgesetzt ist.

In einem weiteren Schritt wird das humane Lig. transversum acetabuli mit dem Lig. transversum acetabuli zweier Primatenarten (Makaken und Paviane) verglichen. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei den Befunden sollen Aufschluss über die mechanische Situation des Bandes bei nahe verwandten Arten geben.

Im Detail werden folgende Punkte analysiert:

- Regionale Verteilung der verschiedenen Kollagentypen: Kollagene vom Typ I, II, III, V, VI, IX
- Regionale Verteilung der Glycosaminoglycane: Keratansulfat, Dermatansulfat, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat
- Regionale Verteilung der Proteoglycane und Glycoproteine: Aggrecan, Link-Protein, Versican, Tenascin, Vimentin, CD44

2 *Material und Methodik*

2.1 *Material*

Nach vorsichtiger Exartikulation des Hüftgelenks wurden insgesamt 17 menschliche Hüftgelenkpfannen aus den Becken herausgesägt und anschließend das Lig. transversum acetabuli (LTA) entnommen. Dazu wurden an allen Acetabula die Weichteile einschließlich der Gelenkkapsel sorgfältig entfernt und die Ligg. transversa acetabuli in ihrem Verlauf dargestellt. Danach erfolgte die Entnahme des Bandes mit jeweils zirka 5mm knöchernem Ansatz.

Außerdem wurden die Hüftgelenke von insgesamt 9 Primaten (7 Makaken, 2 Paviane) entnommen und in gleicher Weise wie bei den menschlichen Proben präpariert.

Von den menschlichen Acetabula waren 9 mit Formalin fixiert (Altersverteilung: 75–86 Jahre, Mittelwert: 80,9 Jahre, Tab. 1), wurden im Rahmen des anatomischen Präparierkurses gewonnen und nach Entnahme mit 90% Methanol nachfixiert. Die übrigen 8 Präparate wurden unfixiert, d.h. frisch entnommen (Institut für Rechtsmedizin der LMU; An dieser Stelle soll dem Institut für Rechtsmedizin (Vorstand Prof. Dr. Eisenmenger) sehr herzlich für die gewährte Unterstützung gedankt werden) (Altersverteilung: 17-39 Jahre, Mittelwert: 25,4 Jahre, Tab. 2) und wurden nach der Entnahme sofort mit 90% Methanol bei 4°C fixiert.

Die Kadaver der Primaten wurden nach Einschläferung (Versuche am Herz-Kreislaufsystem waren vorangegangen) bei -20°C tiefgefroren, über 1 bis 2 Tage aufbewahrt und erst wenige Stunden vor der Entnahme der Hüftgelenke bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach erfolgte die eigentliche anatomische Präparation. Die entnommenen Ligg. transversa acetabuli wurden ebenfalls in 90% Methanol bei 4°C fixiert (Tab. 3).

Vor der jeweiligen Präparation des Lig. transversum acetabuli wurden alle Hüftgelenksflächen im Hinblick auf mögliche pathologische Erscheinungen inspiziert. Keines der Präparate zeigte makroskopisch sichtbare Veränderungen.

Liste der Humanpräparate

ID Nr.	ALTER (Jahre)	GESCHLECHT	SEITE	GRÖSSE (cm)
137/96	79	weiblich	links	149
74/96	83	weiblich	links	156
108/96	84	männlich	links	170
17/96	81	weiblich	rechts	160
87/96	78	weiblich	links	155
20/96	86	männlich	rechts	152
40/96	75	weiblich	rechts	157
15/96	81	weiblich	rechts	150

Tabelle 1. Formalinfixierte Humanpräparate

ID Nr.	ALTER (Jahre)	GESCHLECHT	SEITE	VORERKRANKUNGEN
Fr.1	31	weiblich	rechts	Ohne bekannte Vorerkrankungen
Fr.2	25	männlich	rechts	Hepatitis B
Fr.3	33	männlich	rechts	Ohne bekannte Vorerkrankungen
Fr.4	26	männlich	links	Ohne bekannte Vorerkrankungen
Fr.5	18	männlich	rechts	Ohne bekannte Vorerkrankungen
Fr.6	17	weiblich	rechts	Ohne bekannte Vorerkrankungen
Fr.7	39	weiblich	rechts	Ohne bekannte Vorerkrankungen
Fr.8	22	männlich	rechts	Ohne bekannte Vorerkrankungen

Tabelle 2. Humane Frischpräparate

Liste der Primatenpräparate

ID Nr.	ART	GESCHLECHT	SEITE
Pr.1	Makake	männlich	rechts
Pr.2	Makake	männlich	links
Pr.3	Makake	männlich	links
Pr.4	Makake	männlich	links
Pr.5	Makake	männlich	rechts
Pr.6	Makake	männlich	links
Pr.7	Pavian	männlich	rechts
Pr.8	Pavian	männlich	links
Pr.9	Makake	männlich	links

Tabelle 3. Primaten Frischpräparate

2.2 Methode

2.2.1 Entnahme, Präparation, Lagerung

Die Entnahme der formalinfixierten Bänder erfolgte nachdem die Weichteile der Hüfte und des Oberschenkels abgesetzt, der Femurkopf exartikuliert und der Kapselbandapparat freipräpariert wurde. Das Lig. transversum acetabuli wurde mit den knöchernen Ansätzen sowie Teilen des Labrum acetabulare entnommen.

Die frischen Hüftgelenkpfannen wurden im Institut für Rechtsmedizin der LMU höchstens 24 Stunden post mortem entnommen und in 90% Methanol fixiert. Die Präparate wurden anschließend von Teilen der Muskulatur und des Kapselbandapparates befreit. Jede Probe wurde in eine Haltevorrichtung eingespannt und mit einer Diamantbandsäge zerteilt. Dabei wurde parallel zur Pfanneneingangsebene ein Ring entnommen, der das Lig. transversum acetabuli enthielt. In einem zweiten Arbeitsgang wurde das Band mit den Ansätzen aus dem Ring herausgetrennt.

Zur Entnahme der Bänder aus den Primaten wurden die Tiere, die nach sachgerechter Tötung eingefroren worden waren, im aufgetautem Zustand seziiert. Nach einem dorsalen Zugang wurden die Weichteile und die Hüftmuskulatur entfernt, das Caput femoris exartikuliert, Os ilii, Os ischii und Os pubis durchtrennt und die knöcherne Hüftpfanne entnommen. In einem weiteren Schritt wurde das Lig. transversum acetabuli mit beiden Ansätzen und einem Teil des Labrum acetabulare entnommen.

Die Zwischenlagerung bis zur weiten Verarbeitung erfolgte, für alle Gruppen, in 90% Methanol bei -20°C, wobei die Lagerungsdauer zwei Wochen in der Regel nicht überschritt.

2.2.2 Feinpräparation, Entkalkung, Kryostatschnitte

Um die Proben für das Schneiden mit dem Kryomikrotom vorzubereiten, wurden die Bänder von Fettgewebsteilen und lockerem Bindegewebe weitgehend befreit. Die knöchernen Ansätze wurden bis auf eine zirka 2-3mm dicke Knochenschicht reduziert. Anschließend folgte die Entkalkung der Proben, die wegen der knöchernen Anteile der Anheftungsstellen

des Bandes nötig war. Die Entkalkung erfolgte in 5%- 6% EDTA Lösung im Kühlschrank (4°C). Es waren 5-6 Fraktionen EDTA (zu je 2 Tagen) erforderlich, um die gewünschte Demineralisierung zu erzielen. Das Ziel der Entkalkung war es, ein Schneiden des ganzen Bandes und beider Ansätze mit möglichst wenig Widerstand des Knochens zu ermöglichen. Dazu wurden die Proben auf die Haltevorrichtung des Kryomikrotoms mit einem Einbettmedium bei -24° Celsius so aufgefroren, so dass bei eingespanntem Probenhalter eine Schnittführung parallel zur Verlaufsrichtung des Bandes möglich war. Die Schnittdicke betrug 12µm und es wurde vorwiegend von kaudal nach kranial geschnitten. Die Lagerung der fertigen Kryostatschnitte erfolgte bis zur endgültigen Verarbeitung bei -20° Celsius. Die Lagerungsdauer der fertigen Schnitte überschritt zwei Monate nicht.

2.2.3 Immunhistochemische Markierung

Als Verfahren zum Nachweis der spezifischen Reaktion der Primärantikörper wurde die Avidin- Biotin- Peroxidase Methode angewandt (Kirnan 1999). Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Glycoproteins Avidin bis zu 4 Moleküle des Vitamins Biotin chemisch zu binden. Jedoch binden aufgrund der molekularen Konfiguration in der Regel weniger als 4 Biotinmoleküle. Für die Markierung mit der ABC- Technik werden 3 Gruppen von Reagenzien verwendet. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Sodann wird ein biotinylierter Zweitantikörper benötigt, welcher gegen die Spezies und den Immunglobulintyp des Erstantikörpers gerichtet ist. Die Biotinylierung ist ein Vorgang bei dem Biotin kovalent an den Antikörper gebunden wird. Das dritte Reagenz ist ein peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, der sich mit den freien Stellen des Avidinmoleküls an das Biotin des Zweitantikörpers anheftet. Durch das Enzym Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen (hier DAB-Monomer) das gesuchte Antigen markiert. Die Chromogenreaktion lässt keine Unterscheidung zu, ob der nachgewiesene Farbniederschlag durch das Enzym hervorgerufen wurde, das durch die Immunreaktion das Antigen lokalisiert werden soll oder ob es sich um endogene enzymatische Aktivität handelt. Es ist daher zwingend notwendig diese endogene Aktivität vor Zugabe des markierenden Enzyms zu blockieren, da nur dann eine positive Anfärbung eindeutig auf das nachzuweisende Antigen zurückzuführen ist.

Um die endogene Peroxidase im Gewebe irreversibel zu hemmen, werden die Gewebeschnitte vor Beginn der Anfärbung mit 1% H₂O₂ in Methanol für 30 min. inkubiert. Danach werden die Objektträger für 3x5 Minuten in ein Pufferbad (PBS) eingebracht, um die Reste von Wasserstoffperoxid und Methanol auszuwaschen. Um die Epitope der Kollagene und einzelner Proteoglycane und Glycosaminoglycane zu demaskieren, werden die Schnitte mit Enzymen (Hyaluronidase/Chondroitinase ABC oder mit Chondroitinase AC oder ABC) behandelt und 30 min. bei 37° Celsius inkubiert. Nach dieser Inkubation kommen die Proben erneut in ein Pufferbad (PBS, 3x5 min.). Jetzt wird Normalserum (Pferdeserum 1:20) aufgetragen und für 60 min. bei Raumtemperatur blockiert. Dieser Schritt ist zur Reduzierung der unspezifischen Proteinbindung erforderlich. Ohne die Objektträger zu spülen, wird das überschüssige Serum durch Abklopfen entfernt und der Primärantikörper aufgetragen. Es

kommen polyklonale Antikörper gegen Kollagen Typ III und eine Reihe von monoklonalen Antikörpern gegen die Kollagene vom Typ I, II, III, V, VI, IX und Prokollagen I zur Anwendung. Darüber hinaus werden monoklonale Antikörper gegen Glycosaminoglycane (Keratansulfat, Dermatan-sulfat, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat), Proteoglycane (Aggrecan, Versican, Tenascin) und Glycoproteine (Link-Protein, Vimentin, CD44) verwendet (Tab.4). Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgt das Auswaschen im Pufferbad (PBS) für 3x5 min. Der nächste Schritt besteht in der Inkubation mit biotiniliertem Sekundärantikörper. Dabei wird ein biotinilierter Anti-Mausantikörper für die monoklonalen und ein biotinilierter Anti-Kaninchenantikörper für die polyklonalen Antikörper verwendet. Beide Sekundärantikörper stammen aus dem Pferd. Es folgt eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und danach das Auswaschen im Pufferbad (PBS). Inzwischen wird der ABC-Komplex in geeigneter Weise angesetzt (Vectastain Elite ABC-Kit), da dieses Reagenz nur eine gewisse Zeit stabil ist. Das Avidingemisch und die biotin-konjugierte Peroxidase müssen mindestens 30 min. vor der Anwendung gemischt werden, um einen reaktionsfähigen Komplex zu bilden. Diese Lösung wird schließlich auf die Objektträger aufgetragen und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Proben in ein Pufferbad (PBS) eingebracht. Nach vorsichtigem Abklopfen des Flüssigkeitsüberstandes wird die Substratlösung (DAB) zugefügt und für 3-4 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert.

Als nächstes erfolgt die Gegenfärbung mit Mayer'schem Hämatoxylin (für ca. 20 Sek.) mit anschließender Differenzierung in Leitungswasser. Danach werden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol überführt und mit geeignetem Eindeckmedium (DPX - Fluka; Eukitt - Kindler) unter Deckgläsern montiert.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Wirt	Enzymvorbehandlung	Quelle	Referenz
Kollagen I	Col I	1:2000	Maus	Hyal (1.5 IU/ml) & ChABC (0.25 IU/ml)	Sigma	
Prokollagen I	M38	1: 5	Maus	Hyal (1.5 IU/ml) & ChABC (0.25 IU/ml)	DSHB	
Kollagen II	CIICI	1:6	Maus	Hyal (1.5 IU/ml) & ChABC (0.25 IU/ml)	DSHB	Holmdahl et al. 1986
Kollagen III	4H12	1:500	Maus	Hyal (1.5 IU/ml) & ChABC (0.25 IU/ml)	ICN	
Kollagen V	3C9	1:500	Maus	Hyal (1.5 IU/ml) & ChABC (0.25 IU/ml)	ICN	
Kollagen VI	5C6	1:10	Maus	Hyal (1.5 IU/ml) & ChABC (0.25 IU/ml)	DSHB	Hessle & Engvall 1984
Kollagen IX	D1-9	1: 5	Maus	ChABC (0.25 IU/ml)	DSHB	
Dermatansulfat & Chondroitin- 4-sulfat	2B6	1:1500	Maus	ChABC (0.25 IU/ml)	B. Caterson	Caterson et al. 1985
Chondroitin-4- sulfat	2B6	1 :1500	Maus	ChAC (0.25 IU/ml)	B. Caterson	Caterson et al. 1985
Chondroitin-6- sulfat	3B3	1 :150	Maus	ChABC (0.25 IU/ml)	B. Caterson	Caterson et al. 1985

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Wirt	Enzymvorbehandlung	Quelle	Referenz
Chondroitin-6-sulfat (oversulphated)	7D4	1 :350	Maus	Keine	B. Caterson	
Keratansulfat	5D4	1 :1500	Maus	Keine	B. Caterson	
Versican	12C5	1:10	Maus	ChABC (0.25 IU/ml)	B. Caterson	
Tenascin	T2H5	1:100	Maus	ChABC (0.25 IU/ml)	B. Caterson	
Aggrecan	1C6	1:10	Maus	ChAC (0.25 IU/ml) nach Reduktion & Alkylierung	B. Caterson	Calabro et al. 1992
Link Protein	8A4	1:10	Maus	ChAC (0.25 IU/ml)	B. Caterson	
Vimentin	AMF 17-B	1:10	Maus	Keine	DSHB	
CD44 (Hyaluronat-Rezeptor)	H4C4	1:10	Maus	Keine	DSHB	

Tabelle 4: Liste der untersuchten Antikörper

3 Ergebnisse

Die Bänder werden für die Auswertung in vier verschiedene, topographisch unterschiedliche Zonen eingeteilt. Jede Zone wird einzeln begutachtet und ausgewertet. Das in Abbildung 3 gezeigte Schema soll die verwendete Unterteilung der Lig. transversa acetabuli verdeutlichen. Der Knochen wird als Einheit bewertet, d.h. die Knochenschicht der ventralen und der dorsalen Anheftung werden gemeinsam bewertet.

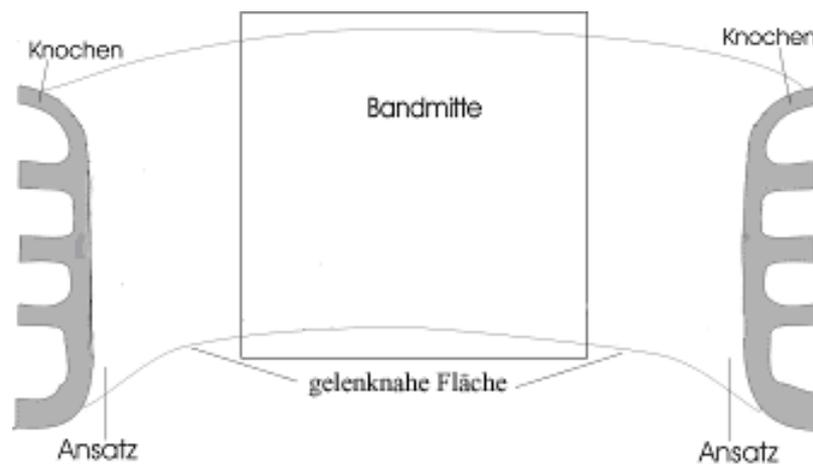


Abb. 3: Schematische Darstellung des Lig. transversum acetabuli

3.1. Kollagene

In allen Regionen des Bandes finden sich bei Mensch und Tier Markierungen für die Kollagene I, III, VI und IX. Einzig bei einigen Enthesis-Faserknorpeln kann gelegentlich eine Zone ohne Markierung für Kollagen I gefunden werden. Kollagen VI ist in allen Bandteilen vorhanden, jedoch findet sich eine besonders ausgeprägte, perizelluläre Markierung vor allem in den Enthesis-Faserknorpeln zu beobachten.

Sowohl bei den ventralen, wie auch bei den dorsalen Enthesis-Faserknorpeln findet sich eine sehr deutlich erkennbare Markierung für Kollagen II. Ein Unterschied zwischen beiden Insertionsstellen hinsichtlich der Ausdehnung der Markierung lässt sich nicht festzustellen. Bei den humanen sesamoiden Faserknorpeln lässt sich eine Markierung für Kollagen II nur in 3 von 8 untersuchten Bändern erkennen. Außerdem ist die Ausdehnung wesentlich geringer als an den knöchernen Anheftungsstellen und beschränkt sich auf die gelenkflächennahen Bandareale. Bei den Primaten findet sich prinzipiell das gleiche Muster, allerdings fanden sich in nahezu allen untersuchten Bändern deutlich ausgeprägte, kollagen-II-positive sesamoide Faserknorpel.

3.1.1 Kollagen Typ I

3.1.1.1 Human-frisch

Bei allen untersuchten Bandabschnitten ließ sich eine von mäßig bis stark positiv variierende Markierung nachweisen. Im entkalkten Knochen wurde Kollagen vom Typ I hauptsächlich extrazellulär nachgewiesen. Einzelne Osteozyten waren intrazellulär und perizellulär positiv markiert. Im Gegensatz dazu zeigten alle Fibrozyten in allen Bandanteilen spezifische Farbstoffablagerungen sowohl intrazellulär als auch perizellulär. In 2 von 7 Fällen fand sich eine Region in Bereich der Enthese, die nicht auf die Kollagen Typ I Markierung anspricht. Diese kollagen-I-freie Zone erstreckt sich über die ganze Breite des Bandansatzes und wird zum Teil von der kollagen-II-positiven Zone der Enthese überlappt.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	+
FR.2	+	+	+	+	+
FR.3	+	+	+	+	+
FR.4	+	+	+	+	+
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	-	-
FR.7	+	+	+	+	+
FR.8	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 4: Kollagen Typ I (Col1), human - frisch

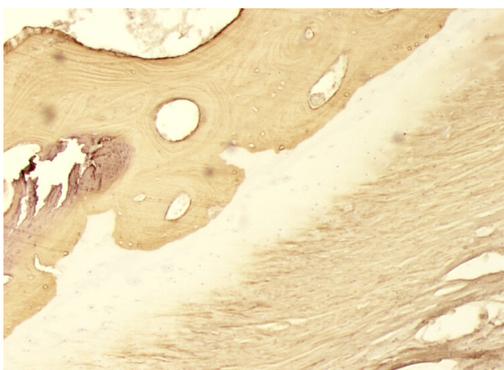


Abb.4: Enthese, kollagen-I-freie Zone

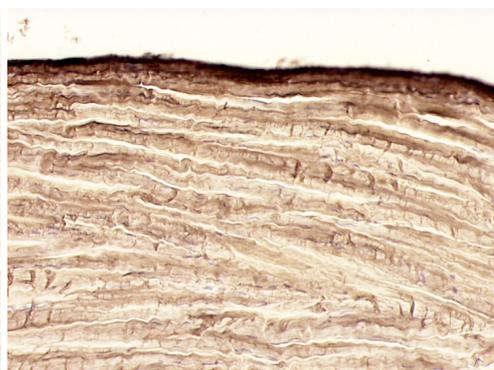


Abb.5: Kollagen Typ I Markierung im Band

3.1.1.2 Human-fixiert

Auch die formalinfixierten Bänder wurden mit dem Antikörper Col1 untersucht. Es zeigt sich eine Farbstoffablagerung in allen Bandanteilen, die durchaus als spezifisch zu bezeichnen ist. Diese Markierung ist hinsichtlich der Intensität etwas schwächer als bei den in Methanol fixierten Frischpräparaten (human und Primaten) und schwankt von schwach bis mäßig stark. Auch die Knochenanteile zeigen das gleiche Färbungsmuster wie bei den Frischpräparaten. Allerdings zeigt sich bei keinem Präparat eine kollagen-I-freie Zone.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
137/96	+	+	(+)	-	-
74/96	(+)	(+)	+	+	+
108/96	+	+	+	+	+
17/96	+	+	+	(+)	(+)
87/96	+	+	+	+	+
40/96	+	+	+	+	+
15/96	+	+	+	+	+
20/96	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 5: Kollagen Typ I (Col1), human - fixiert



Abb.6: Kollagen I im Band

3.1.1.3 Primaten

Bei den Bändern der Primaten zeigt der Antikörper Col1, der Kollagen vom Typ I erkennt, eine vorwiegend kräftige, kontinuierliche Markierung in allen Bandanteilen, wobei auch viele Fibrozyten eine positive intrazelluläre Markierung aufweisen. Auch bei diesen Präparaten wird die extrazelluläre Substanz des Knochens spezifisch markiert, jedoch erscheinen nur wenige Osteozyten positiv markiert. Die bereits zuvor beschriebene kollagen-I-

freie Zone zeigt sich in 2 von 9 Primaten an den Bandansätzen. In beiden Fällen handelt es sich um Bänder von Makaken. Die untersuchten Paviane zeigen keine Hinweise für das Vorliegen einer vergleichbaren kollagen-I-freien Zone.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	+
Pr.2	+	+	+	+	+
Pr.3	+	+	+	+	+
Pr.4	+	+	+	+	+
Pr.5	+	+	+	+	+
Pr.6	+	+	+	-	-
Pr.7	+	+	+	+	+
Pr.8	+	+	+	+	+
Pr.9	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 6: Kollagen Typ I (Coll1), Primaten - frisch

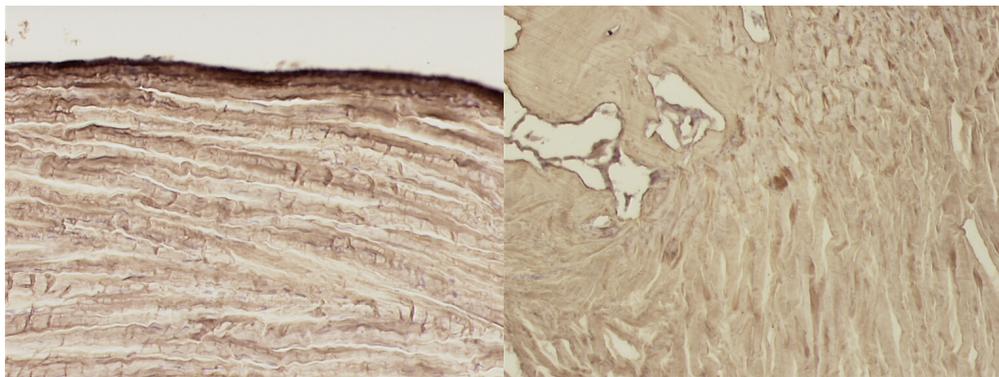


Abb.7: Kollagen-I-Markierung (Band) Abb.8: Kollagen-I-Markierung (Enthesis)

3.1.2 Prokollagen Typ I (M38)

3.1.1.1 Human-frisch

Im humanen Gewebe findet sich eine milde, fast ausschließlich auf das Band beschränkte Markierung, welche sowohl intra- wie auch extrazelluläre Anteile aufweist.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	0	0	0	+	0
FR.2	+	+	+	+	0
FR.3	(+)	(+)	(+)	0	0
FR.4	(+)	(+)	(+)	0	0
FR.5	0	0	0	0	0
FR.6	0	0	+	0	0
FR.7	(+)	+	+	0	0
FR.8	(+)	(+)	(+)	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 7: Prokollagen Typ I (M38), human - frisch

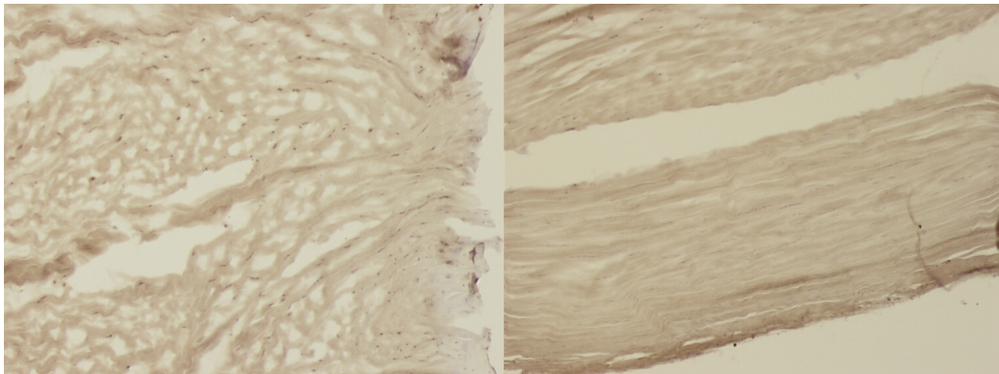


Abb.9: Prokollagen I (Enthesis) human Abb.10: Prokollagen I (Band) human

3.1.1.2 *Primaten*

Es findet sich eine relativ kräftige Markierung des Bandes mit einer in einzelnen Fällen schwach bis mäßig starken, intra- und perizellulären ossären Färbung.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.3	+	+	+	0	(+)
Pr.4	+	+	+	0	(+)
Pr.5	+	+	+	+	+
Pr.6	+	+	+	0	0
Pr.7	+	+	+	-	-
Pr.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 8: Prokollagen Typ I (M38), Primaten - frisch

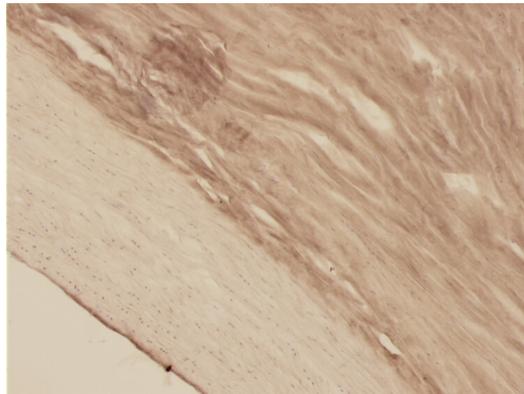


Abb.11: Pro-Kollagen I (Bandmitte) Makake

3.1.3 *Kollagen Typ II*

3.1.3.1 *Human-frisch*

Der Antikörper CIICI, der Kollagen Typ II nachweist, zeigt eine positive Markierung an beiden Ansätzen aller in Methanol fixierten humanen Bänder. Der dorsale Ansatz aller Bänder zeigt eine kräftige Farbstoffablagerung, welche sich über eine größere Fläche erstreckt als beim ebenfalls positiv reagierenden ventralen Ansatz. In 4 von 7 Fällen finden sich darüber hinaus in

der Mitte der Bänder positive Markierungen, die zwischen den Individuen in Größe und Intensität stark variieren. Die Lage dieser positiven „Spots“ ist in allen Fällen identisch und befindet sich etwa in Bandmitte. Der Knochen im Bereich der Bandanheftungen zeigt weder ventral noch dorsal eine positive Markierung für Kollagen Typ II. An den positiv markierten Bandarealen zeigen sich sporadisch Zellen mit intrazellulärer und perizellulärer Farbstoffdeposition. Die Zellen weisen nicht die für Fibrozyten typische longitudinale Form auf, sondern zeigen eine rundliche bis ovale Gestalt, wie sie bei Chondrozyten zu finden ist.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	0	+	0	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	0	0
FR.4	+	0	+	0	0
FR.5	+	+	+	0	0
FR.6	+	0	+	-	-
FR.7	+	0	+	0	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 9: Kollagen Typ II (CIICI), human - frisch

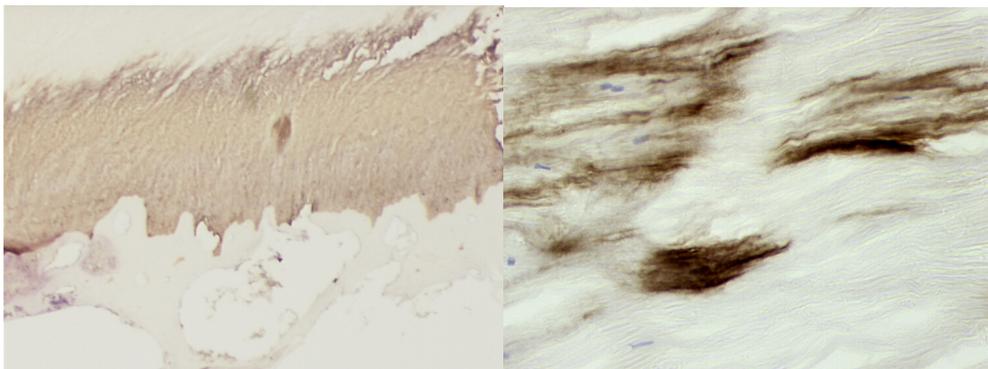


Abb.12: Kollagen-II-Markierung (Enthesis) **Abb.13:** Kollagen-II-Markierung (Bandmitte)

3.1.3.2 Human-fixiert

Die Enthesis aller untersuchten formalin-fixierten Bänder zeigt eine typische Verteilung der Markierung für Kollagen Typ II, die vom knöchernen Ansatz unterschiedlich weit in das Band hinreicht. In 3 von 8 Fällen finden sich Regionen in der Mitte des Bandes („Spots“) die eine positive Markierung aufweisen und die nicht in Verbindung mit der Enthesis stehen. Im Knochen zeigt sich bei keinem Präparat eine spezifische Markierung.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
137/9	+	+	0	0	0
74/96	+	0	+	0	0
108/9	0	0	+	0	0
17/96	+	+	+	0	0
87/96	+	+	+	0	0
40/96	+	0	+	0	0
15/96	+	0	+	0	0
20/96	+	0	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 10: Kollagen Typ II (CIICI), human –fixiert

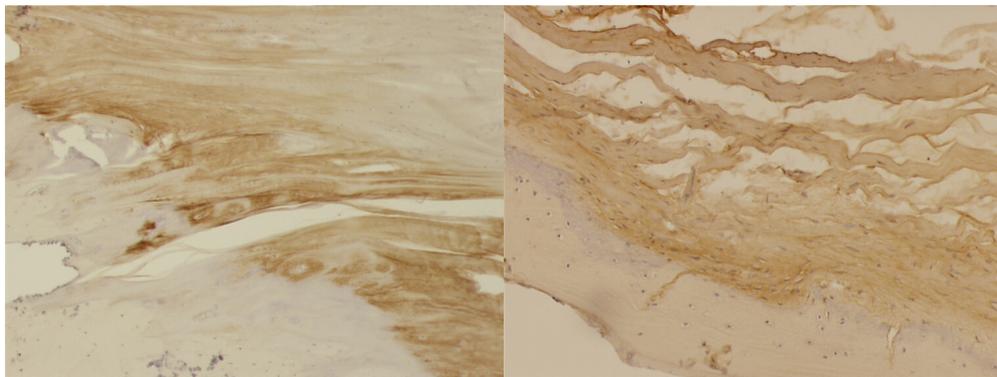


Abb.14: Kollagen II (Enthesis)

Abb.15: Kollagen II (Bandmitte)

3.1.3.3 *Primaten*

Hier zeigt der Antikörper CIICI in allen untersuchten Fällen stark positiv markierte Bandansätze, sowohl ventral wie auch dorsal. In 7 von 9 Fällen findet sich eine spezifische Farbstoffablagerung in den mittleren Regionen des Bandes, in Form von „Spots“, sowohl an der Gelenkfläche als auch in den tieferen Bandabschnitten. Bei einem dieser 7 Fälle handelt es sich um ein vom Pavian stammendes Band. Die Farbstoffablagerung war in diesem Fall sehr schwach. Bei den übrigen 6 positiven Proben handelt es sich um Bänder, die von Makaken stammen. In allen markierten Arealen zeigen sich sporadisch intrazelluläre Markierungen in Zellen die rundliche bis ovale Zellkerne aufweisen und die damit die typische Gestalt von Chondrozyten zeigen.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	+	+	+	0	0
Pr.3	+	++	+	0	0
Pr.4	+	+	+	0	0
Pr.5	+	+	+	+	0
Pr.6	+	+	+	0	0
Pr.7	+	0	-	0	0
Pr.8	+	(+)	+	0	0
Pr.9	+	0	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 11: Kollagen Typ II (CII), Primaten – frisch

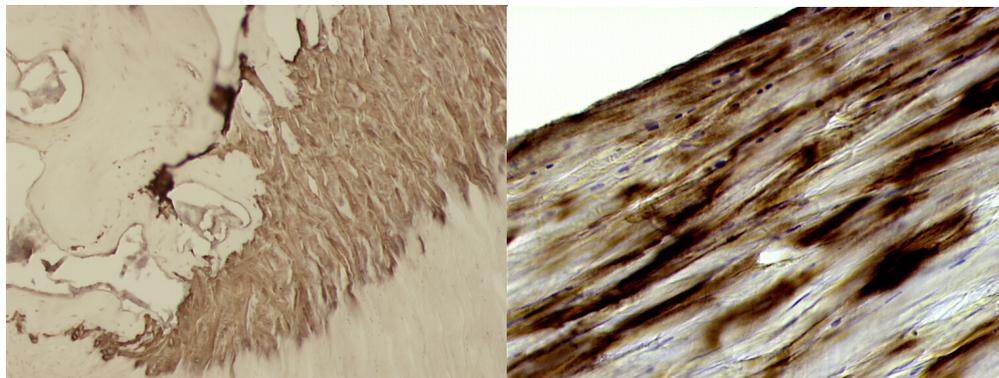


Abb.16: Kollagen II (Enthese)

Abb.17: Kollagen II (Bandmitte)

3.1.4 Kollagen Typ III

Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen III erfolgt mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern. Es kommt ein polyklonaler (P3) sowie ein monoklonaler (4H12) Antikörper zum Einsatz.

3.1.4.1 Human-frisch

Der polyklonale Antikörper gegen Kollagen Typ III zeigt starke Markierungen in allen untersuchten Bändern. In fast allen Fällen ist die Zellschicht der Gelenkfläche stärker markiert als die Bandabschnitte. In den übrigen Bandanteilen zeigt die Farbstoffablagerung eine gleichmäßige Verteilung. In einem Fall (FR.1) erscheint eine schwächere Markierung im Bereich der kollagen-I-freien Zone.

Der monoklonale Antikörper 4H12 markiert alle untersuchten Bandabschnitte. Im Gegensatz zu P3 zeigt 4H12 so gut wie keine Reaktion mit der Knochengrundsubstanz. Einzig die Kittlinien, d.h. die Grenzen zwischen den einzelnen Lamellen erscheinen als dünne positive Markierungen.

NR.	Vent.	Mitte	Dors.	Knochen	
				intr.zel	extra.
FR.1	+	+	+	0	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	0	0
FR.4	+	+	+	0	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	(+)	(+)	(+)	-	-
FR.7	+	+	+	0	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 12: Kollagen Typ III (4H12), human – frisch

NR.	Vent.	Mitte	Dors.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	+
FR.2	+	+	+	+	+
FR.3	+	+	+	+	+
FR.4	+	+	+	+	+
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	-	-
FR.7	+	+	+	+	+
FR.8	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 13: Kollagen Typ III (P3), human – frisch

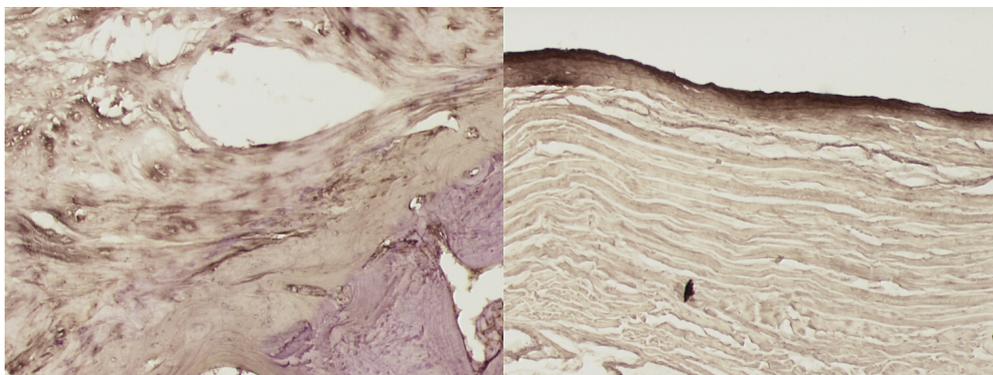


Abb.18: Kollagen Typ III (P3), Enthesis Abb.19: Kollagen Typ III (P3), Bandmitte

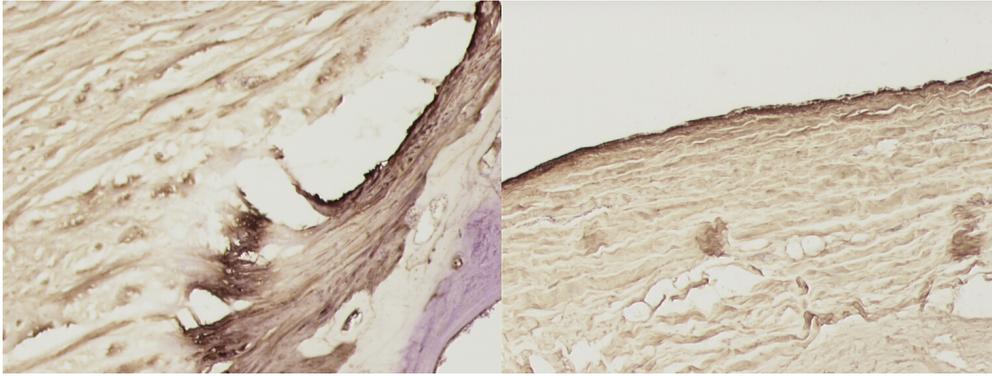


Abb.20: Kollagen Typ III (4H12), Enthese

Abb.21: Kollagen Typ III (4H12), Bandmitte

3.1.4.2 *Human-fixiert*

Alle Bandabschnitte weisen positive Farbstoffablagerungen mit dem polyklonalen Antikörper P3 auf. In 5 von 8 Fällen erscheinen einzelne Bereiche im Knochen schwach positiv markiert. Auch vereinzelte Osteozyten scheinen spezifisch durch den Antikörper P3 erfasst zu werden.

NR.	Vent.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
137/96	+	+	+	+	+
74/96	+	+	+	-	-
108/96	+	+	+	+	+
17/96	+	+	+	(+)	(+)
87/96	+	+	+	0	(+)
40/96	+	+	+	+	+
15/96	+	(+)	(+)	0	0
20/96	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 14: Kollagen Typ III (P3), human - fixiert

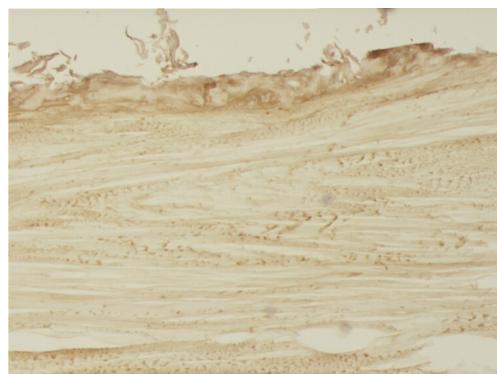


Abb.22: Kollagen Typ III (P3), human – fixiert, Markierung im Band

3.1.4.3 *Primaten*

Kollagen III findet sich in allen untersuchten Fällen und in allen Bandabschnitten sowohl mit (P3, Tab.15a) als auch mit (4H12, Tab.15b). Die Markierung hat einen kontinuierlichen Verlauf, und eine Intensität die von stark bis sehr stark schwankt. Der Knochen zeigt in den meisten mit dem polyklonalen Antikörper behandelten Fällen eine zwischen schwach und stark variierende positive Färbung der extrazellulären Matrix. In 3 von 8 Fällen finden sich eindeutig markierte Osteozyten in den positiv gefärbten knöchernen Regionen. Die monoklonale Markierung ist intrazellulär stark (Osteozyten) in 6 von 8 Fällen ausgeprägt. Es findet sich meistens auch eine schwache extrazelluläre Markierung.

Grundsätzlich fällt auf, dass der monoklonale Antikörper 4H12 Primatenknochen deutlich positiv markiert, während menschlicher Knochen (bis auf die Kittlinien) nicht markiert wird.

NR.	Vent.	Mitte	Dors.	Knochen	
				intr.zel	extra.
Pr.1	+	+	+	+	(+)
Pr.2	+	+	+	+	+
Pr.3	+	+	+	+	+
Pr.4	+	+	+	0	(+)
Pr.5	+	+	+	+	+
Pr.6	+	+	+	+	(+)
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	+	+	+	(+)	(+)

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 15a: Kollagen Typ III (4H12), Primaten - frisch

NR.	Vent.	Mitte	Dors.	Knochen	
				intr.zel	extra.
Pr.1	+	+	+	+	+
Pr.2	+	+	+	+	+
Pr.3	+	+	+	0	(+)
Pr.4	+	+	+	0	(+)
Pr.5	+	+	+	+	+
Pr.6	+	+	+	-	-
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 15b: Kollagen Typ III (P3), Primaten - frisch

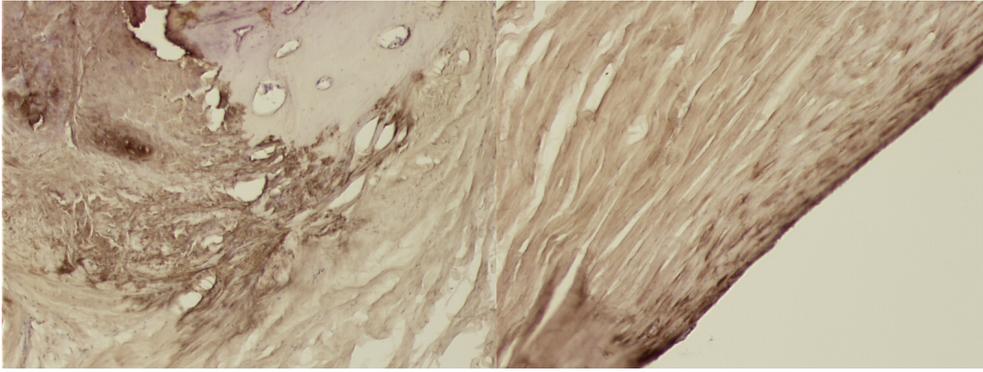


Abb.23: Kollagen Typ III (P3), Enthesis **Abb.24:** Kollagen Typ III (P3), Bandmitte



Abb.25: Kollagen Typ III (4H12), Enthesis **Abb.26:** Kollagen Typ III (4H12), Bandmitte

3.1.5 Kollagen Typ V (3C9)

3.1.5.1 Human-frisch & Primaten

Kollagen V (3C9) ist in den gelenknahen Bandanteilen als vorwiegend zelluläre Markierung präsent. Im Band finden sich sporadisch einzelne positive Areale. Osteozyten bleiben ohne Markierung. Dieses Verteilungsmuster ist sowohl in humanem als auch in Primaten Gewebe zu finden.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	0	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	0	0
FR.4	+	+	+	0	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	-	-
FR.7	+	+	+	0	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 16: Kollagen Typ V (3C9+HC), human – frisch

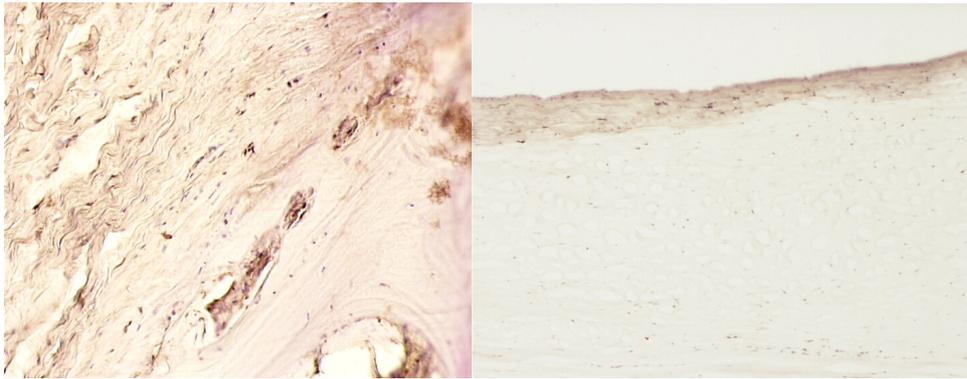


Abb.27: Kollagen V (Enthesis) human

Abb.28: Kollagen V (Bandmitte) human

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.2	+	+	+	0	0
Pr.3	+	+	+	0	0
Pr.4	0	0	0	0	0
Pr.5	+	+	+	0	0
Pr.6	+	+	+	0	0
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 17: Kollagen Typ V (3C9+HC), Primaten - frisch

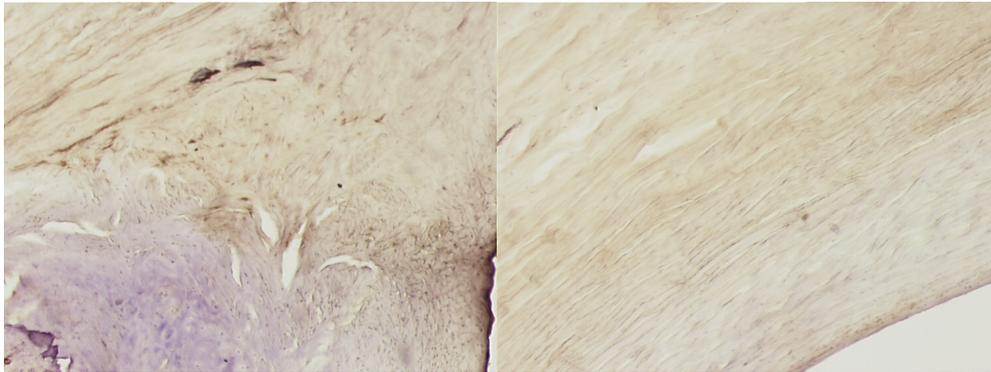


Abb.29: Kollagen V (Enthesis) Primat

Abb.30: Kollagen V (Bandmitte) Primat

3.1.6 Kollagen Typ VI

3.1.6.1 Human-frisch

Kollagen VI ist in allen Fällen nachweisbar. Die Verteilung zeigt keine regionalen Unterschiede zwischen den einzelnen Bandabschnitten; die Farbintensität schwankt zwischen stark und sehr stark. Lediglich die extrazelluläre Matrix des Knochens der Enthese zeigt keine Markierung, allerdings weisen hier einige Osteozyten eine deutliche Markierung für Kollagen Typ VI auf.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	+	0
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	+	+	+	+	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	-	-
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	++	++	++	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, += normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 18: Kollagen Typ VI (5C6), human – frisch

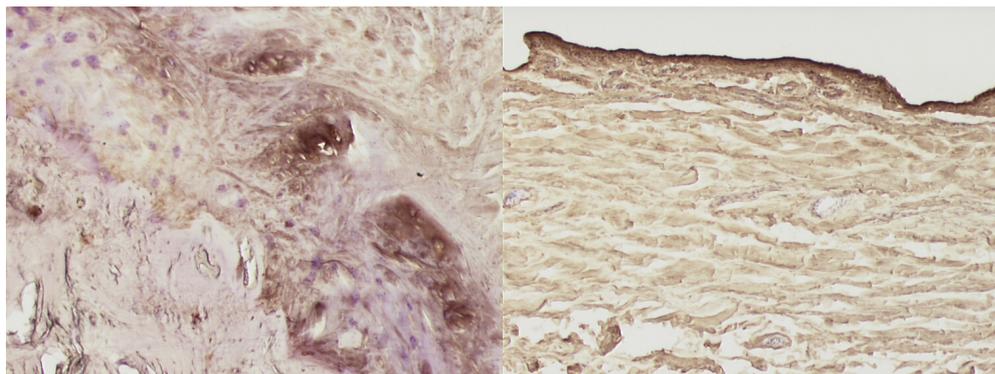


Abb.30: Kollagen VI, Enthese

Abb.31: Kollagen VI, Bandmitte

3.1.6.2 Human-fixiert

Die positive Markierung aller Bandabschnitte ist auch hier erkennbar. Das Färbungsmuster und die Farbintensität war identisch im Vergleich zu den nur in Methanol

fixierten Schnitten. Auch der Knochen zeigt eine starke intrazelluläre Markierung der Osteozyten und in den meisten Fällen (5 von 8) eine eher schwache extrazelluläre Färbung.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
137/96	+	+	+	+	0
74/96	(+)	(+)	(+)	+	+
108/96	+	+	+	+	+
17-96	+	+	+	-	-
87-96	+	+	+	+	0
40-96	+	+	+	+	(+)
15/96	+	+	+	+	+
20-96	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 19: Kollagen Typ VI (5C6), human - fixiert

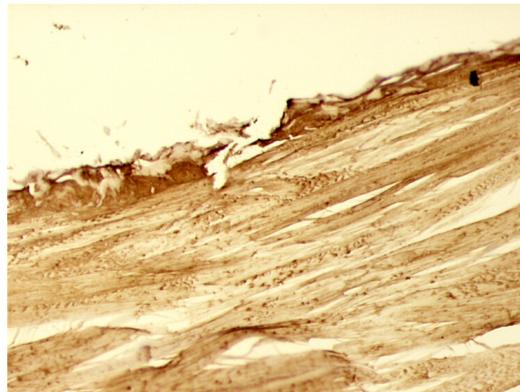


Abb.32: Kollagen VI, Bandmitte

3.1.6.3 *Primaten*

Auch bei den Primaten zeigt der Antikörper gegen Kollagen VI eine eindeutige Farbstoffablagerung in allen untersuchten Abschnitten. Die kontinuierliche Markierung der extrazellulären Matrix des Bandes wird durch die Markierung der Fibrozyten ergänzt. Auch in der Zellschicht der gelenkzugewandten Fläche finden sich spezifische Farbstoffdepositionen sowohl intrazellulär als auch perizellulär. Die untersuchten Abschnitte des Knochens zeigen spezifische Markierungen, die nicht nur auf die Osteozyten begrenzt sind, sondern in 6 von 9 Fällen auch Regionen der extrazellulären Matrix erfassen.

NR.	Ven.An.	Mitte	Dor.An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	+	+	+	+	0
Pr.3	+	+	+	+	+
Pr.4	+	+	+	0	(+)
Pr.5	+	+	+	+	+
Pr.6	+	+	+	+	0
Pr.7	+	+	+	+	+
Pr.8	+	+	+	+	(+)
Pr.9	+	+	+	+	(+)

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, += normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 20: Kollagen Typ VI (5C6), Primat - frisch

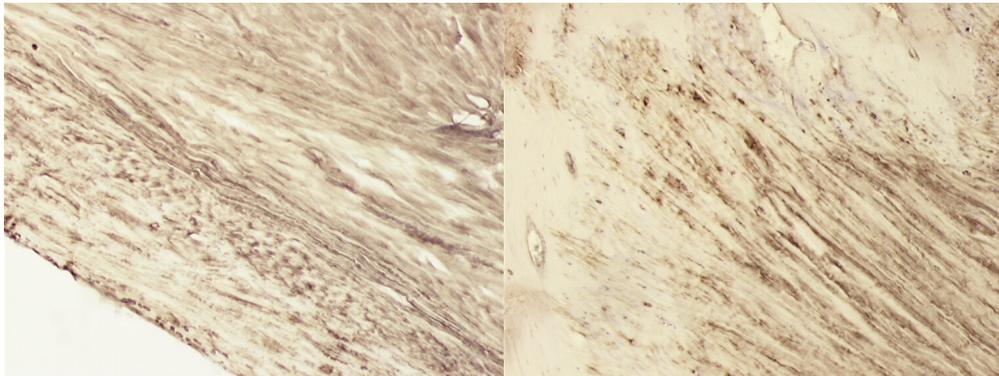


Abb.33: Kollagen VI, Bandmitte

Abb.34: Kollagen VI, Enthesis

3.1.7 Kollagen Typ IX (D1-9+ChABC)

3.1.7.1 Human-frisch & Primaten

Kollagen IX (D1-9) ist im Band extrazellulär und auch in einigen Fibrozyten zu finden. Die häufigsten Markierungen sind in den gelenknahen Schichten des Bandes nachzuweisen. Der Knochen ist extrazellulär und mit wenigen markierten Osteozyten schwach positiv markiert. Dieses Markierungsmuster wiederholt sich in allen Primaten-Bändern. Es fehlt jedoch in zwei menschlichen Bändern, die keine Reaktion aufweisen.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	(+)	+	+	+	(+)
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	+	(+)
FR.4	+	+	+	+	+
FR.5	0	0	0	-	-
FR.6	0	0	0	0	0
FR.7	+	+	+	+	(+)
FR.8	+	+	+	+	(+)

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 21: Kollagen Typ IX (D1-9), human - frisch

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	+
Pr.2	+	+	+	+	+
Pr.3	+	+	+	+	+
Pr.4	+	+	+	+	+
Pr.5	+	+	+	+	+
Pr.6	+	+	+	+	+
Pr.7	+	+	+	+	+
Pr.8	+	+	+	+	+
Pr.9	+	+	+	+	(+)

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 22: Kollagen Typ IX (D1-9), Primaten - frisch

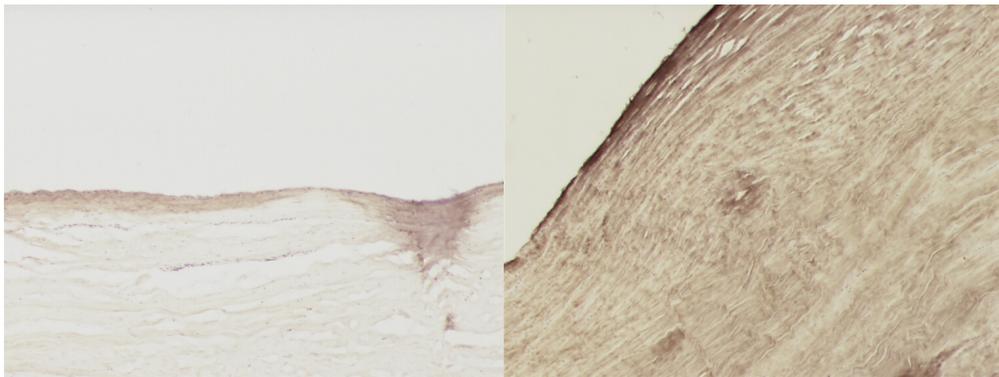


Abb.35: Kollagen IX (Bandmitte) human

Abb.36: Kollagen IX (Bandmitte) Primat

3.2 Glycosaminoglycane

Keratan-, Dermatan- und Chondroitin-4-sulfat finden sich in praktisch allen untersuchten Bandregionen. Chondroitin-6-sulfat dagegen findet sich mit stark schwankender Intensität der Markierung bevorzugt in den sesamoiden Faserknorpeln und den Faserknorpeln der knöchernen Anheftungsstellen (Abb. 47 und 48).

Bei den Primatenbändern findet sich prinzipiell die gleiche Verteilung der verschiedenen Antigene wie bei den humanen Präparaten (Abb. 49 und 50).

3.2.1 Chondroitin-4-sulfat

3.2.1.1 Human-frisch

Eine positive Markierung der mit den Antikörper 2B6 und dem Enzym Chondroitinase AC (2B6+ChAC) behandelte Bänder ist in allen Bandzonen zu finden. Der Knochen zeigt nahezu keine Markierung (in 1 von 8 Fällen ist eine schwache Färbung zu erkennen) im extra- und perizellulären Bereich. Dafür finden sich in 4 von 7 Fällen Markierungen der Osteozyten.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	0	0
FR.2	+	+	+	+	(+)
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	0	0	0	0	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	0	0
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 22: Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChAC), human – frisch

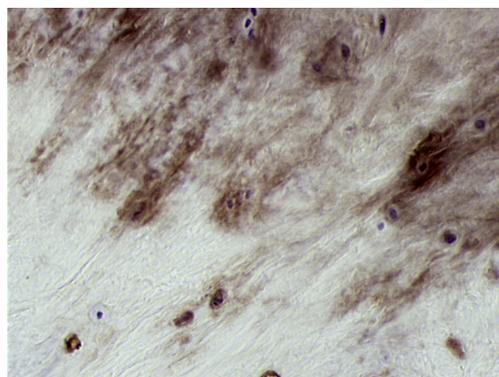


Abb.37: Chondroitin-4-sulfat, Enthesis

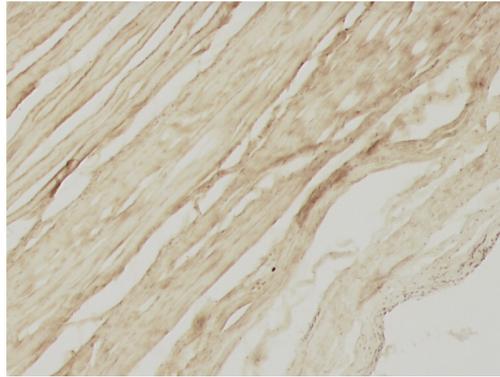


Abb.38: Chondroitin-4-sulfat, Bandmitte

3.2.1.2 *Primaten*

Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChAC) findet sich in allen untersuchten Primaten-Bändern. Die Markierung ist in der Regel homogen verteilt. Im Knochen ist in 7 von 9 Fällen sowohl extra- als auch intrazellulär eine Markierung vorhanden.

NR.	Ven.An.	Mitte	Dor.An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.2	+	+	+	+	+
Pr.3	+	+	+	+	+
Pr.4	+	+	+	+	+
Pr.5	+	+	+	+	(+)
Pr.6	+	+	+	+	+
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	+	+	+	+	(+)
Pr.9	(+)	(+)	(+)	+	(+)

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 23: Chondroitin-4-sulfat (2B6+ChAC), Primaten – frisch

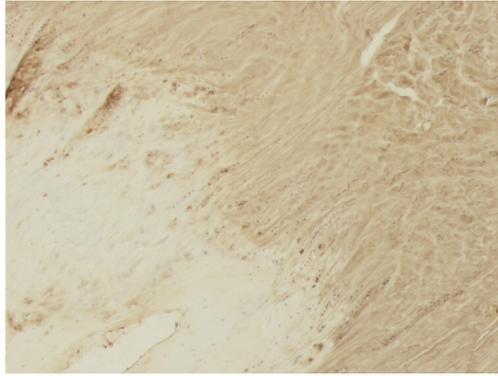


Abb.39: Chondroitin-4-sulfat - Markierung (Enthesis)



Abb.40: Chondroitin-4-sulfat - Markierung (Bandmitte)

3.2.2 Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat

3.2.2.1 Human-frisch

Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat (Antikörper 2B6 in Verbindung mit Enzymvorbehandlung mit Chondroitinase ABC) sind in allen Bandabschnitten aber auch im Knochen sowohl intra- als auch extrazellulär zu finden. Nur ein Band zeigte keine Reaktion nach der Behandlung mit 2B6+ChABC.

NR.	Vent. Ans.	Mitte	Dors. Ans.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	(+)
FR.2	+	+	+	+	+
FR.3	++	++	++	+	+
FR.4	0	0	0	0	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	++	++	++	+	+
FR.7	++	++	++	+	0
FR.8	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 24: Chondroitin-4-sulfat + Dermatansulfat (2B6+ChABC), human – frisch

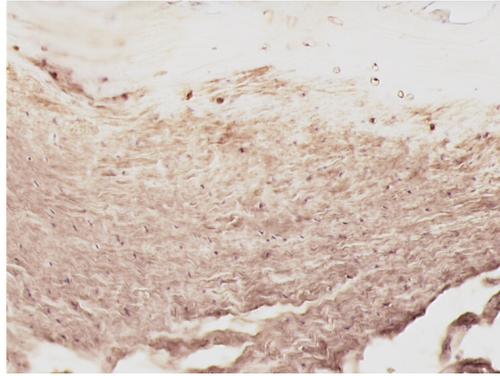


Abb.41: Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat (Enthesis)

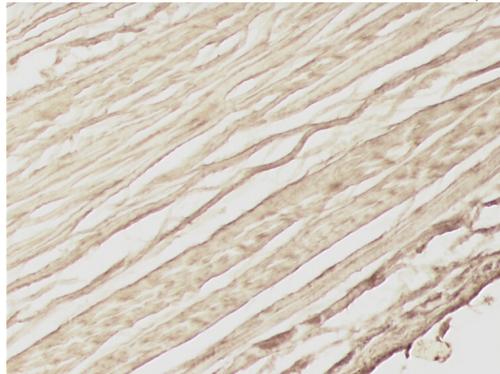


Abb.42: Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat (Band)

3.2.2.2 *Primaten*

In den Primaten-Bändern zeigt sich das gleiche Bild der Markierung wie bei den Bändern humanen Ursprungs. Lediglich im Knochen ist die Markierung schwächer ausgeprägt, aber dennoch in 8 von 9 Fällen zu finden.

NR.	Ven.An.	Mitte	Dor.An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	(+)
Pr.2	+	+	+	+	+
Pr.3	+	+	+	+	+
Pr.4	+	+	+	+	+
Pr.5	+	+	+	+	(+)
Pr.6	-	(+)	(+)	(+)	(+)
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	(+)	(+)	(+)	0	(+)
Pr.9	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 25: Chondroitin-4-sulfat + Dermatansulfat (2B6+ChABC), Primaten – frisch

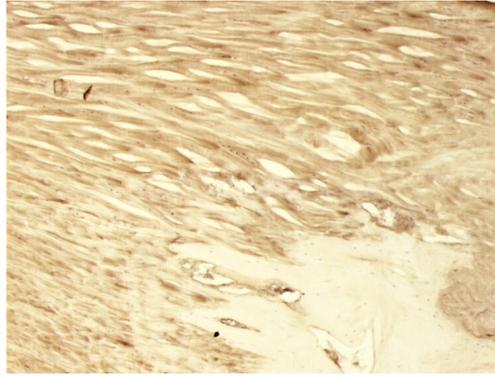


Abb.43: Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat (Enthesis)



Abb.44: Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat (Band)

3.2.3 Natives Epitop von Chondroitin-6-sulfat (3B3-)

3.2.3.1 Human-frisch

In 5 von 8 Fällen zeigt sich eine schwache bis mäßige Färbung, die ausschließlich im Band zu finden ist und teilweise nur die der Gelenkfläche zugewandte Seite markiert. Die untersuchten knöchernen Anteile reagieren negativ.

NR.	Ven.An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	0	+	0	0
FR.2	0	0	0	0	0
FR.3	+	+	(+)	0	0
FR.4	0	+	+	0	0
FR.5	0	+	0	-	-
FR.6	0	+	+	0	0
FR.7	0	0	0	0	0
FR.8	0	0	0	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 26: (3B3-) natives Epitop von Chondroitin-6-sulfat, human – frisch

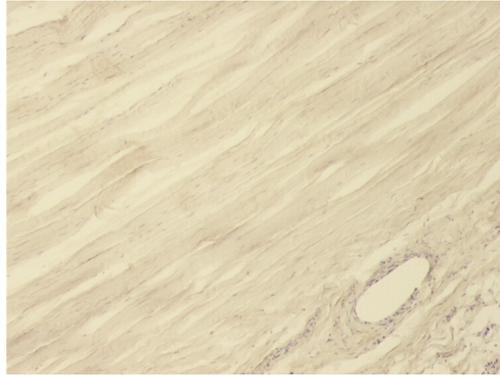


Abb.45: Natives Epitop von Chondroitin-6-sulfat

3.2.3.2 *Primaten*

Auch in den aus Primaten entnommenen Bänder ist eine schwache positive Markierung zu finden (4 von 9 Fällen), die allerdings nur sporadisch auftritt.

NR.	Ven.An.	Mitte	Dor.An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	0	0	0	0	0
Pr.2	0	0	0	0	0
Pr.3	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.4	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.5	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.6	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.7	0	0	0	0	0
Pr.8	0	0	0	0	0
Pr.9	0	0	0	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 27: (3B3-) natives Epitop von Chondroitin-6-sulfat, Primaten - frisch



Abb.46: Natives Epitop von Chondroitin-6-sulfat (Bandmitte)

3.2.4 Chondroitin-6-sulfat (3B3+ChABC)

3.2.4.1 Human-frisch

Nach Enzymvorbehandlung mit Chondroitinase ABC findet sich Chondroitin-6-sulfat bei allen untersuchten Bänder im Bereich der Enthese aber auch in Bandmitte vorwiegend nahe der mit dem Femurkopf artikulierenden Zone. In 4 von 8 Fällen sind einzelne, intrazellulär markierte Osteozyten zu finden.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	+	+	-	+	(+)
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	+	0
FR.7	+	+	+	0	0
FR.8	+	0	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 28: Chondroitin-6- Sulfat (3B3+ChABC), human - frisch

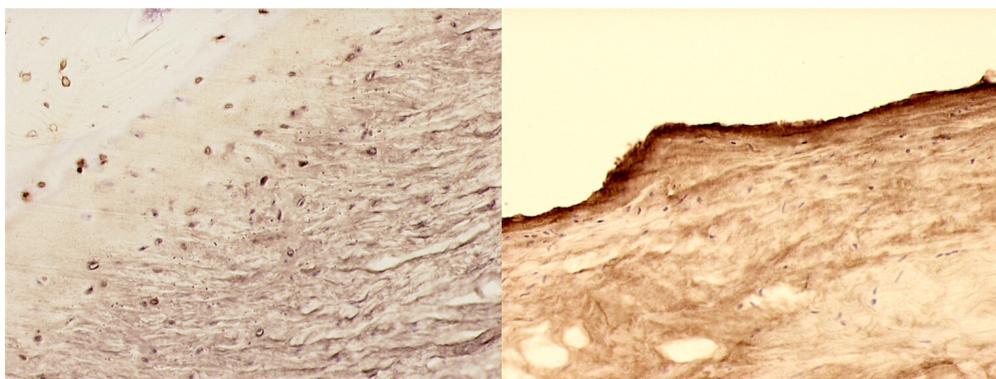


Abb.47: Chondroitin-6-sulfat (Enthese)

Abb.48: Chondroitin-6-sulfat (Band)

3.2.4.2 Primaten

Hier finden sich in allen Bandanteilen positive Markierungen für Chondroitin-6-sulfat. Der Knochen zeigt keine positive Markierung.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	0	0
Pr.2	+	+	+	0	0
Pr.3	+	+	+	0	0
Pr.4	+	+	+	0	0
Pr.5	+	+	+	0	0
Pr.6	+	+	+	0	0
Pr.7	+	(+)	(+)	0	0
Pr.8	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.9	(+)	0	(+)	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 29: Chondroitin-6- sulfat (3B3+ChABC), Primaten - frisch

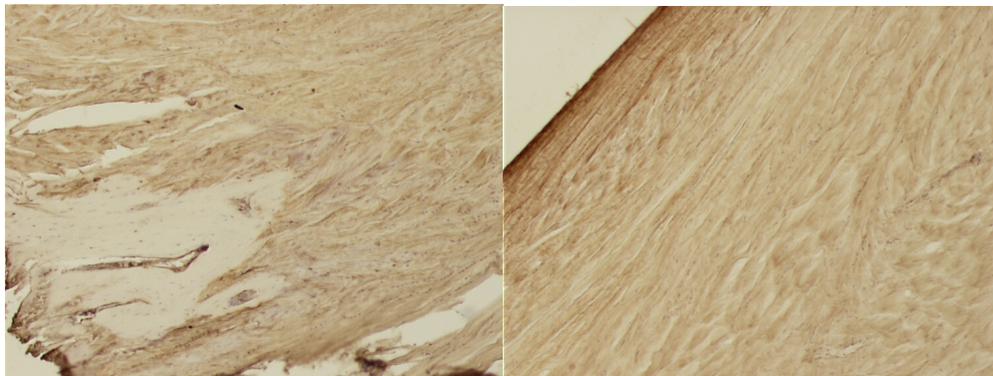


Abb.49: Chondroitin-6-sulfat (Enthese)

Abb.50: Chondroitin-6-sulfat (Band)

3.2.5 Chondroitin-6- sulfat (“oversulphated”) (7D4)

3.2.5.1 Human-frisch

Die Markierung mit den Antikörper 7D4 zeigt in 6 von 8 Fällen eine Markierung, die vorwiegend in der Bandmitte zu finden ist. Die Anheftungsstellen des Bandes sind in 5 von 8 Fällen schwach positiv markiert.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	0	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	0	0
FR.4	0	0	-	0	0
FR.5	0	+	0	-	-
FR.6	0	+	0	0	0
FR.7	0	0	0	0	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, += normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 30: Chondroitin-6- sulfat (“oversulphated”) (7D4), human - frisch

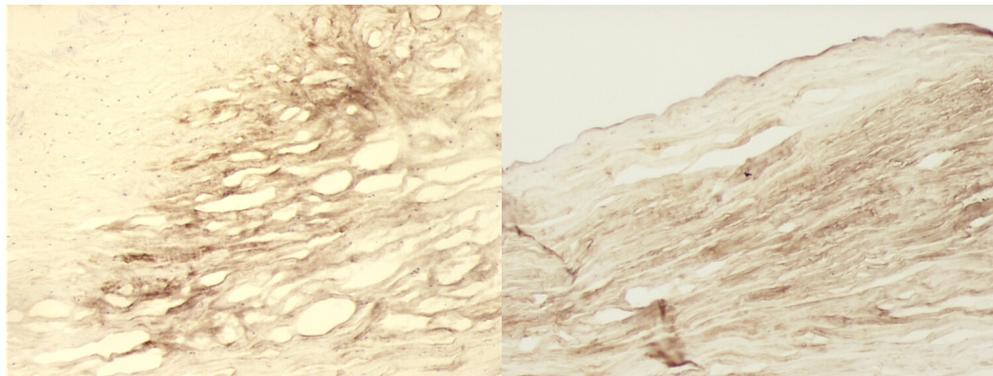


Abb.51: Chondroitin-6-sulfat, „oversulphated“
Enthesis

Abb.52: Chondroitin-6-sulfat „oversulphated“
Band

3.2.5.2 Primaten

Hier zeigte sich das gleiche Bild mit 8 positiven von insgesamt 9 untersuchten Bändern. Darüber hinaus sind auch wenige, positiv markierte Osteozyten zu finden, die extrazelluläre Matrix des Knochens ist negativ.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	(+)	(+)	(+)	+	0
Pr.3	(+)	+	(+)	+	0
Pr.4	(+)	(+)	(+)	0	0
Pr.5	+	+	+	0	0
Pr.6	0	0	0	+	0
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	+	+	+	+	0
Pr.9	0	+	0	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 31: Chondroitin-6- sulfat („oversulphated“) (7D4), Primaten - frisch



Abb.53: Chondroitin-6-sulfat „oversulphated“
Enthesis

Abb.54: Chondroitin-6-sulfat „oversulphated“
Band

3.2.6 Keratansulfat (5D4)

3.2.6.1 Human-frisch & Primaten

Keratansulfat (5D4) findet sich in allen untersuchten Proben mit einer homogenen, starken bis sehr starken Markierung in allen Bandanteilen. Die untersuchten knöchernen Anteile der Anheftungszone zeigen eine Markierung der Osteozyten, die nur in 1 von 8 humanen und in 1 von 9 Primaten Bändern nicht zu beobachten ist.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	(+)
FR.2	+	+	+	+	(+)
FR.3	+	+	+	+	+
FR.4	+	+	+	+	+
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	+	(+)
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	+	(+)

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 32: Keratansulfat (5D4), human - frisch

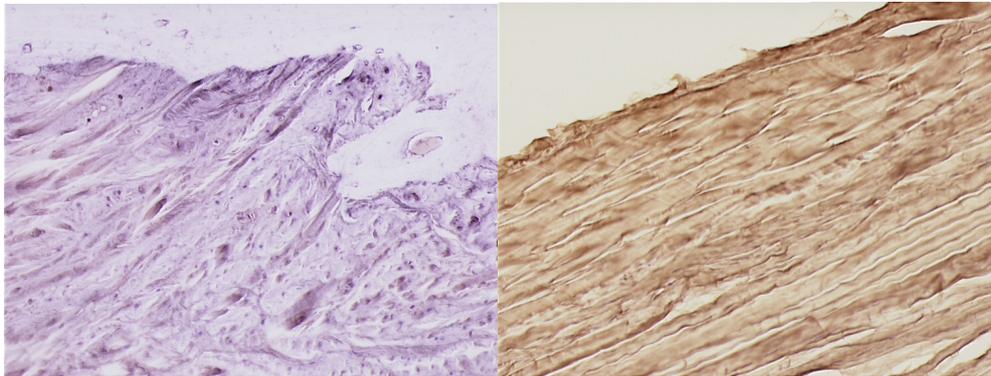


Abb.55: Keratansulfat (Enthesis) human

Abb.56: Keratansulfat (Band) human

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	(+)
Pr.2	+	+	+	+	(+)
Pr.3	+	+	+	+	(+)
Pr.4	+	+	+	+	(+)
Pr.5	+	+	+	+	(+)
Pr.6	+	+	+	+	(+)
Pr.7	+	+	+	0	0
Pr.8	+	+	+	+	(+)
Pr.9	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 33: Keratansulfat (5D4), Primaten - frisch

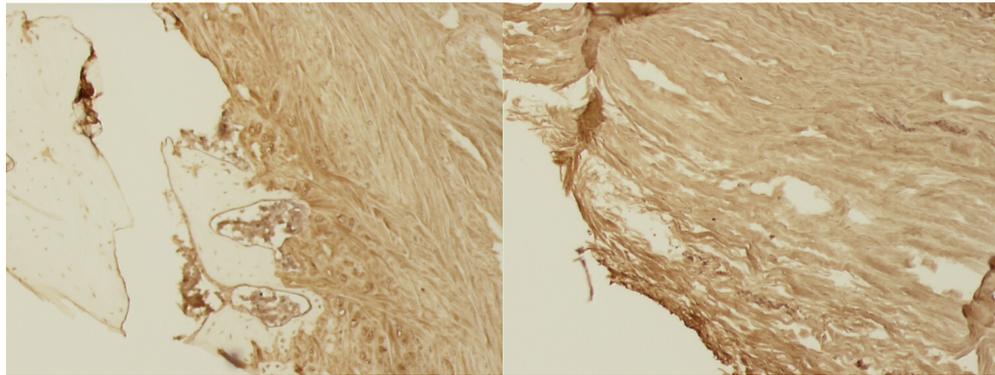


Abb.57: Keratansulfat (Enthesis) Primaten **Abb.58:** Keratansulfat (Band) Primaten

3.3 *Proteoglycane und Glycoproteine*

Eine Markierung für Versican und Tenascin findet sich bevorzugt in den zugsehnentypischen, weniger knorpeligen Regionen des Bandes (Abb. 67, 68, 71 und 72). Im Gegensatz dazu lassen sich Aggrecan und Link Protein nur in den faserknorpeligen Arealen erkennen (Abb. 59, 60, 63 und 64). Wenn vorhanden, ist die Markierung für Aggrecan und Link Protein meist mehr oder weniger diffus über die extrazelluläre Matrix verteilt. In einigen sehr deutlich ausgeprägten Faserknorpeln zeigt sich aber auch ein perizelluläres Markierungsmuster, welches dann dem Muster für Chondroitin-6-sulfat besonders ähnlich erscheint.

Bei den Primatenbändern findet sich prinzipiell die gleiche Verteilung der verschiedenen Antigene wie bei den humanen Präparaten.

3.3.1 *Aggrecan (1C6+ChAC)*

3.3.1.1 *Human-frisch & Primaten*

Aggrecan (1C6+ChAC) lässt sich in allen untersuchten Bandanteile mit unterschiedlicher Intensität der Markierung nachweisen. In einzelnen Fällen (in 3 von 8 Humanpräparaten, bzw. in 3 von 9 Primatenpräparaten) waren auch Osteozyten im Bereich der Anheftungsstellen positiv markiert.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	0	0	(+)	-	-
FR.4	+	+	+	+	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	0	0
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 34: Aggrecan (1C6+ChAC), human – frisch

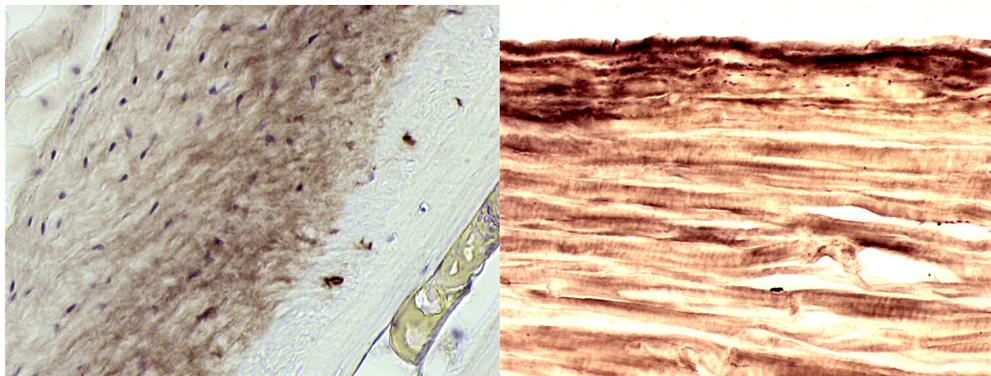


Abb.59: Aggrecan (Enthesis) human

Abb.60: Aggrecan (Band) human

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	0	+	+	0
Pr.2	+	+	+	0	0
Pr.3	+	+	+	0	0
Pr.4	+	+	+	0	0
Pr.5	+	+	+	0	0
Pr.6	+	+	+	0	0
Pr.7	+	+	+	-	-
Pr.8	+	+	+	+	0
Pr.9	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 35: Aggrecan (1C6+ChAC), Primaten – frisch

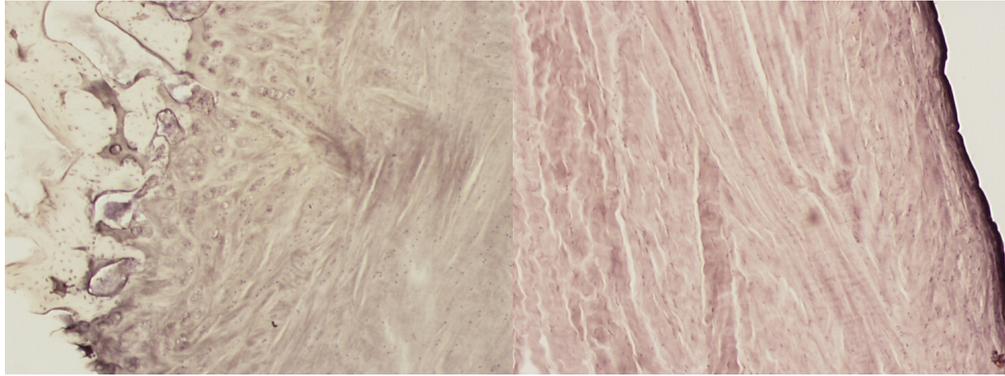


Abb.61: Aggrecan (Enthesis) Primat

Abb.62: Aggrecan (Band) Primat

3.3.2 Link Protein (8A4+ChAC)

3.3.2.1 Human-frisch & Primaten

Link Protein findet sich in allen untersuchten Bändern, vor allem im Bereich der Enthese sowie in Bandmitte an der dem Femurkopf zugewandten Seite. Im Knochen der humanen Bänder findet sich bei humanen Präparaten keine Markierung, während bei den Präparaten von Primaten in 4 Fällen eine vorwiegend intrazelluläre Markierung der Osteozyten auftritt.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	0	0
FR.2	+	+	+	0	0
FR.3	+	+	+	0	0
FR.4	0	0	+	0	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	0	0
FR.7	+	+	+	0	0
FR.8	+	+	+	0	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 36: Link Protein (8A4+ChAC), human – frisch

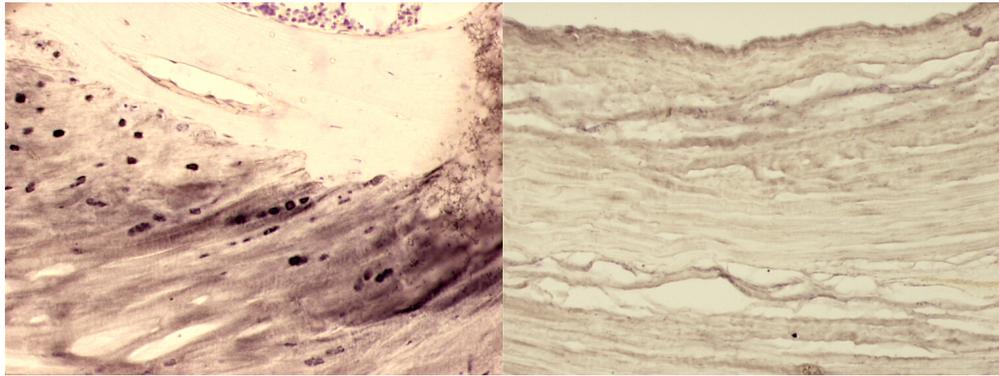


Abb.63: Link Protein (Enthesis) human **Abb.64:** Link Protein (Band) human

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	0	+	0	0
Pr.2	+	+	+	+	0
Pr.3	+	+	+	0	0
Pr.4	+	+	+	0	0
Pr.5	+	+	+	0	0
Pr.6	+	+	+	+	0
Pr.7	+	+	+	-	-
Pr.8	+	+	+	+	0
Pr.9	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, += normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 37: Link Protein (8A4+ChAC), Primaten – frisch

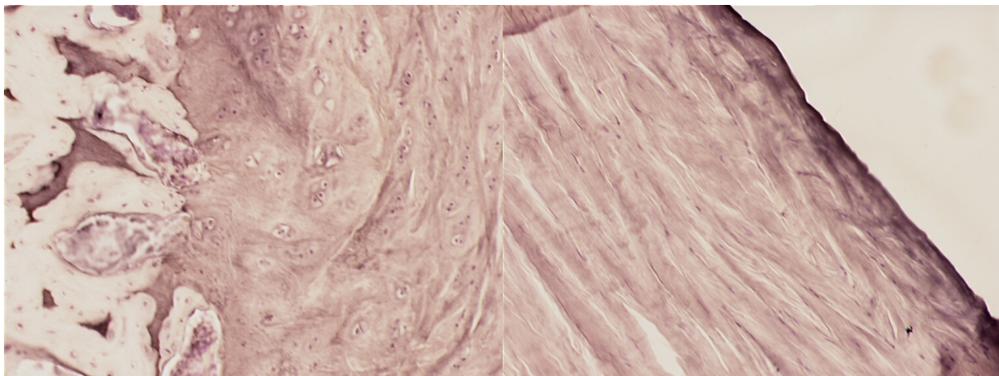


Abb.65: Link Protein (Enthesis) Primat **Abb.66:** Link Protein (Band) Primat

3.3.3 Versican (12C5+ChAC)

3.3.3.1 Human-frisch

Obwohl sich keine Markierung der extrazellulären Matrix des Knochens findet, sind nahezu alle Osteozyten und auch ihre Lakunen stark positiv markiert. Im Band findet sich eine mäßig starke Markierung in allen Bandabschnitten, wobei die Markierung im Bereich prominenter Faserknorpel etwas schwächer ausfällt.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	+	0
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	0	0	0	0	0
FR.5	+	+	+	+	0
FR.6	+	+	+	+	0
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 38: Versican (12C5+ChAC), human – frisch

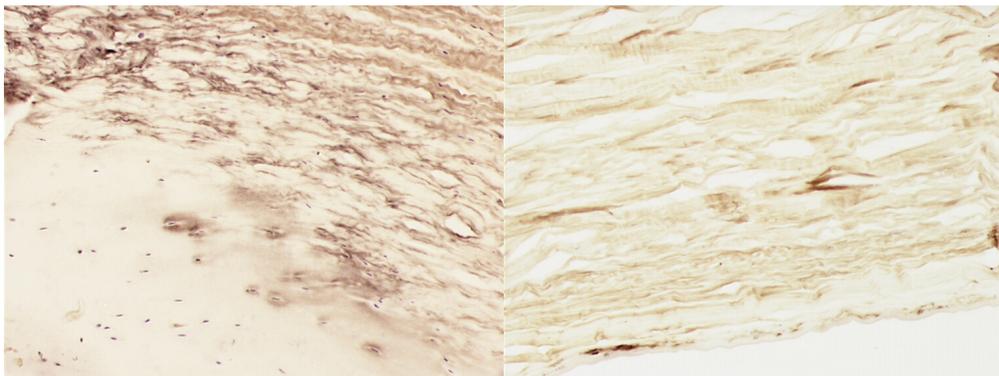


Abb.67: Versican (Enthesis) human

Abb.68: Versican (Band) human

3.3.3.2 Primaten

Grundsätzlich findet sich eine ähnliche Markierung des Knochens wie bei humanen Präparaten. Im Band findet sich eine kontinuierliche mäßig starke Markierung in allen Abschnitten. In einem Band (Pr.7) reagiert die faserknorpelreiche Region fast gar nicht positiv für Versican (12C5).

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	++	0
Pr.2	+	+	+	+	0
Pr.3	+	+	+	+	0
Pr.4	+	+	+	+	0
Pr.5	+	+	+	+	0
Pr.6	+	+	+	++	0
Pr.7	(+)	(+)	(+)	+	0
Pr.8	+	+	+	++	0
Pr.9	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 39: Versican (12C5+ChAC), Primaten – frisch

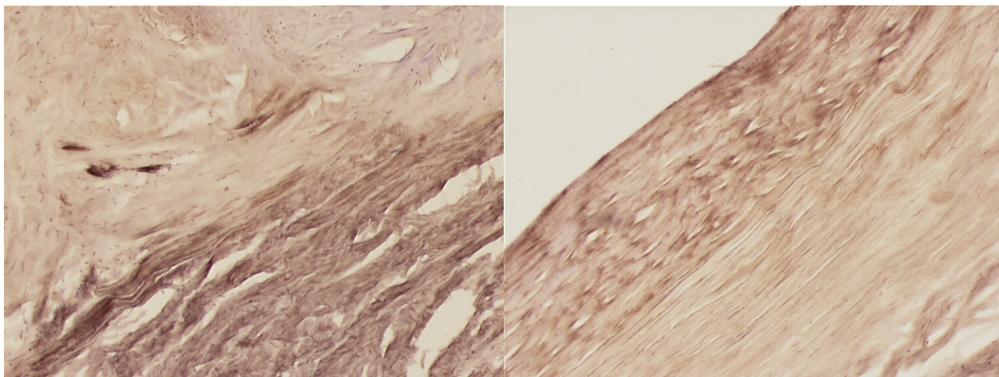


Abb.69: Versican (Enthesis) Primat

Abb.70: Versican (Band) Primat

3.3.3 Tenascin (T2H5+ChAC)

3.3.3.1 Human-frisch

In allen Bandbereichen findet sich eine gleichmäßige Markierung der extrazellulären Matrix. Wie auch bei Versican findet sich in den meisten Fällen (7 von 8) keine extrazelluläre Knochenmarkierung und nur eine mäßige Markierung der Osteozyten.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	+	(+)
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	0	0	0	0	0
FR.5	(+)	+	(+)	+	0
FR.6	+	+	+	+	0
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 40: Tenascin (T2H5+ChAC), human - frisch

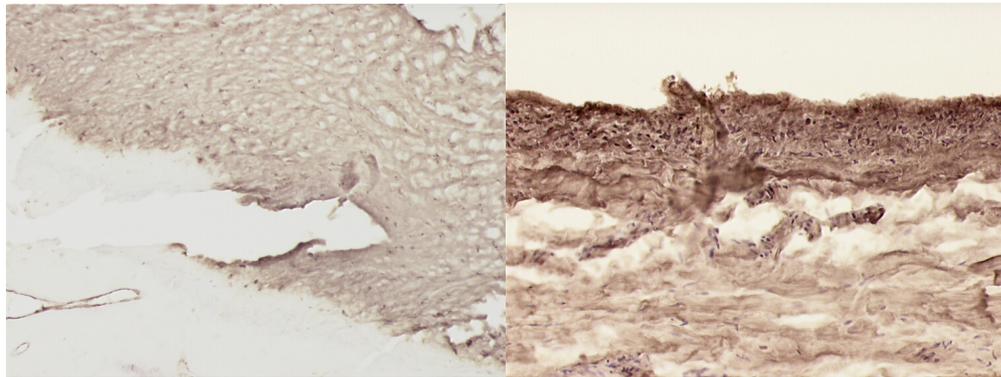


Abb.71: Tenascin (Enthesis) human

Abb.72: Tenascin (Band) human

3.3.3.2 Primaten

Ähnlich wie bei den humanen Präparaten zeigt sich eine mäßige meist homogene Markierung in allen untersuchten Bandabschnitten. Es ist praktisch keine extrazelluläre Markierung des Knochens erkennbar (8 von 9) statt dessen jedoch eine positive Markierung der Osteozyten.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	+	+	+	+	0
Pr.3	+	+	+	+	0
Pr.4	+	+	+	+	0
Pr.5	+	+	+	+	0
Pr.6	+	+	+	+	0
Pr.7	+	+	+	+	0
Pr.8	+	+	+	+	+

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 41: Tenascin (T2H5+ChAC), Primaten - frisch

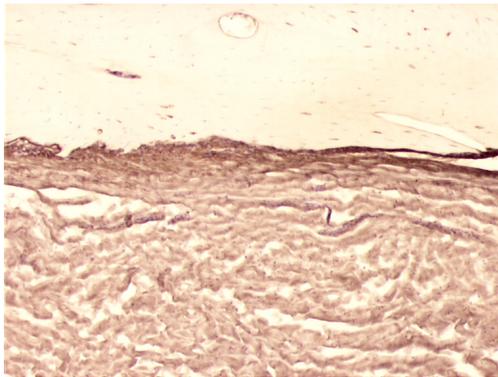


Abb.73: Tenascin (Enthesis) Primat



Abb.74: Tenascin (Band) Primat

3.3.4 Vimentin (AMF 17-b)

3.3.4.1 Human-frisch & Primaten

Alle Präparate zeigen eine deutliche zelluläre Markierung in praktisch allen untersuchten Bandarealen. Es werden auch vereinzelte Osteozyten markiert. Die zelluläre Markierung scheint in den faserknorpeligen Regionen besonders kräftig ausgeprägt zu sein. Dies gilt gleichermaßen für Mensch und Primat.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	+	0
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	+	+	+	+	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	-	-
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 43: Vimentin (AMF 17-b), human - frisch

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	+	+	+	+	0
Pr.3	+	+	+	+	0
Pr.4	+	+	+	+	0
Pr.5	+	+	+	+	0
Pr.6	+	+	+	+	0
Pr.7	+	+	+	+	0
Pr.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 44: Vimentin (AMF 17-b), Primaten – frisch

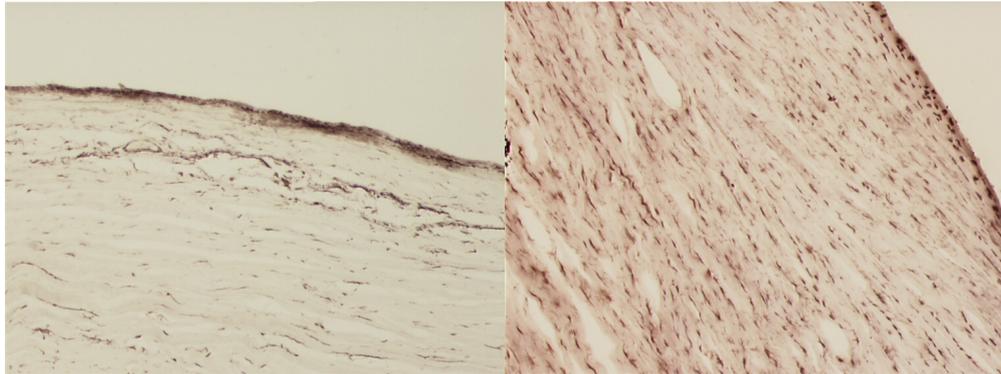


Abb.77 Vimentin (Band) human **Abb.78:** Vimentin (Band) Primat

3.3.5 CD44 (human hyaluronate receptor, H4C4)

3.3.5.1 Human-frisch & Primaten

Der Antikörper H4C4, der den humanen Hyaluronatrezeptor erkennt, markiert viele Fibrozyten und deren Lakunen. Die Markierung zeigt eine streifige Verteilung im Band und fehlt in 3 der 8 untersuchten humanen Präparate. Im Knochen zeigt sich nur eine intrazelluläre Markierung. Die Bänder der Primaten zeigen das gleiche Markierungsmustermuster.

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				int.zel.	extra.
FR.1	+	+	+	+	0
FR.2	+	+	+	+	0
FR.3	+	+	+	+	0
FR.4	0	0	0	0	0
FR.5	+	+	+	-	-
FR.6	+	+	+	-	-
FR.7	+	+	+	+	0
FR.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, += normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 45: CD44 (human hyaluronate receptor, H4C4), human - frisch

NR.	Ven. An.	Mitte	Dor. An.	Knochen	
				intr.zel.	extra.
Pr.1	+	+	+	+	0
Pr.2	+	+	+	+	0
Pr.3	+	+	+	+	0
Pr.4	+	+	+	+	0
Pr.5	+	+	+	+	0
Pr.6	+	+	+	+	0
Pr.7	+	+	+	+	0
Pr.8	+	+	+	+	0

0 = kein Nachweis, (+) = schwacher Nachweis, + = normaler Nachweis, - = nicht vorhanden

Tabelle 46: CD44 (human hyaluronate receptor, H4C4), Primaten -frisch

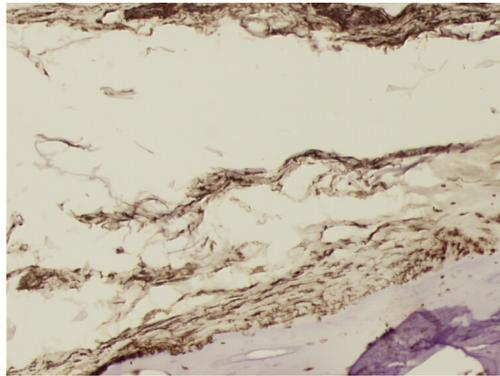


Abb.79: CD44 (human hyaluronate receptor), (Enthesis) human



Abb.80: CD44 (human hyaluronate receptor), (Band) human

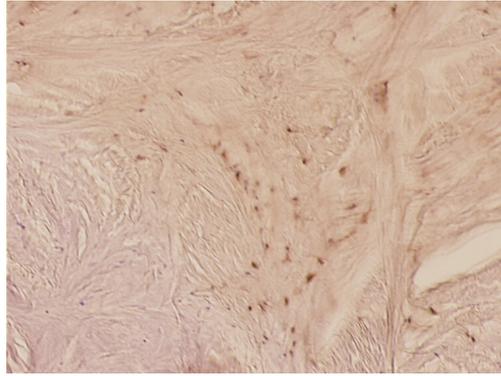


Abb.81: CD44 (human hyaluronate receptor), (Enthesis) Primat

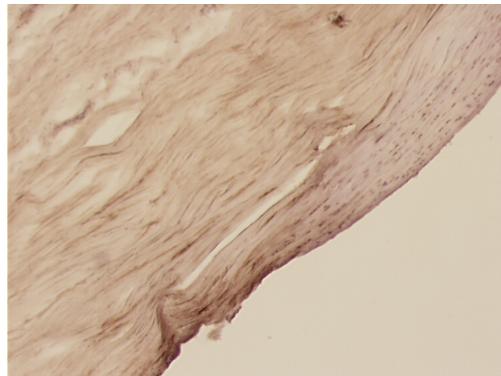


Abb.82: CD44 (human hyaluronate receptor), (Band) Primat

4 Diskussion

4.1 Wahl der geeigneten Markierungsmethode

Um einen histologischen Überblick über die zu untersuchenden Regionen zu gewinnen, wurden zu Beginn der Untersuchung zwei in Formalin fixierte Bänder (mit ihren knöchernen Anheftungsstellen) aus Präparaten des anatomischen Präparierkurses entnommen. Nach der Entkalkung wurden 12µm dicke Kryoschnitte angefertigt und mit der gleichen immunhistologischen Färbemethode behandelt wie später alle anderen Präparate. Es zeigte sich, dass Formalin ein gewebeverträgliches Fixativ ist, welches eine gute Penetration in das Gewebe zeigt. Allerdings zeigte sich auch, dass die vorangegangene langandauernde Fixierung mit Formalin (ca.1,5- 2 Jahre) die immunhistochemische Markierung der Epitope nahezu aller Antigene schwer beeinträchtigt, bzw. gänzlich unmöglich macht. Nach bisherigem Kenntnisstand geschieht dies aufgrund einer Vernetzung der Aminosäuren der Proteine durch Bildung von Methylenbrücken (French et al. 1945, Boskey et al. 1982). Zudem kommt es bei den formalinfixierten Proben im Verlauf der immunhistochemischen Färbung zu einer massiven Hintergrundreaktion, was die Beurteilung der Präparate sehr erschwert. Verschiedene Autoren (Caron & Banks 1979) haben versucht, mit einer speziellen Postfixation diese unspezifische Hintergrundfärbung bei formalinfixiertem Gewebe zu dämpfen. Entsprechend diesen Empfehlungen haben wir die Schnitte von formalinfixiertem Gewebe vor der immunhistochemischen Markierung gesondert vorbehandelt. Hierfür wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min. in Bouin'scher Lösung inkubiert. Danach erfolgte die Auswaschung in 90% Methanol (2x15min) und in PBS (2x15min). Die Zeiten wurden durch eigene Vorversuche bestimmt und für die ganze Versuchsreihe mit fixierten Präparaten übernommen. Nach dieser Behandlung war die Hintergrundfärbung deutlich reduziert, konnte aber dennoch nicht ganz ausgeschaltet werden. Somit zeigte sich im Rahmen der Vorversuche sehr früh, dass bei für längere Zeit in Formalin fixierten Präparaten keine sinnvolle Auswertung der Markierungen der Glycosaminoglycane und Proteoglycane möglich ist. Aus diesem Grund wurden nur einige Kollagen-Antikörper am formalinfixierten Material verwendet, dabei handelt es sich vorwiegend um Antikörper gegen Kollagen Typ I, II, III und VI.

Ein weiteres Problem besteht bei der Erzeugung der Kryoschnitte selbst. Hier kommt es oft zu Zerreißung, Stauchung und mangelhafter Adhäsion der formalinfixierten Schnitte auf den Objektträgern, aufgrund des Schrumpfungsprozesses während der Fixierung mit Formalin.

Diese Probleme traten bei den frisch entnommenen und nur mit Methanol fixierten Bändern in wesentlich geringerem Umfang auf.

4.2 *Humane formalinfixierte Ligg. transversa acetabuli*

In dieser Versuchsgruppe ist nur eine begrenzte Zahl von Primärantikörpern gegen Kollagene untersucht worden (Kollagen Typ I, II, III, IV, VI). Die extreme Maskierung/Zerstörung der Epitope durch die Fixierung mit Formalin aber auch die mangelhafte Adhäsion der Kryoschnitte auf den Objektträgern schränkten die Verwendbarkeit dieser Präparate deutlich ein. Trotzdem lassen sich die Ergebnisse mit denen der Versuchsreihe mit frischen Präparaten vergleichen. Im Bereich der Enthesis des Bandes fanden sich faserknorpelige Formationen die sich bis zur Mitte des jeweiligen Banddrittels erstreckten. Auch in mittleren drittel des Bandes konnte Faserknorpel isoliert werden, dieser trat jedoch begrenzt und in den gelenknahen Bandanteilen auf. Die Existenz des Faserknorpels konnte durch den Nachweis von Kollagen II bestätigt werden.

Die Interpretation dieser Befunde führt zu der Annahme der Druckbelastung der Bandmitte durch das Caput femoris und der Zugbeanspruchung der Ansätze. Diese Verformung des Lig. transversum acetabuli entsteht bei Belastung des Hüftgelenkes wie biomechanische Untersuchungen beschreiben (Löhe et al. 1994,1996), (Lazennec et al. 1997).

4.3 *Frische humane Ligg. transversa acetabuli*

Die hier erhobenen Befunde zeigen, dass im mittleren, gelenkflächennahen Teil des Lig. transversum acetabuli ein kleiner sesamoider Faserknorpel vorliegt. Bei allen untersuchten Bändern findet sich an der Innenseite in Bandmitte im Bereich der Kontaktzone mit dem Hüftkopf ein durch Zellmorphologie und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix charakterisierter, sesamoiden Faserknorpel. Zusätzlich finden sich an beiden knöchernen Anheftungsstellen kräftig ausgeprägte Enthesis Faserknorpel. Alle übrigen Bandregionen zeigen straffes, faserreiches Gewebe, wie es für Sehnen und Bänder typisch ist. Die Anordnung der verschiedenen Gewebe ist in Abbildung 4 dargestellt. Obwohl die Größe des sesamoiden Faserknorpels zwischen den einzelnen Donatoren sehr stark schwankt, ist seine Existenz doch immer nachweisbar.

Die immunhistochemischen Befunde unterstützen damit die Schlussfolgerungen, die sich aus den biomechanischen Daten vom Löhe et al. (1994, 1996), Lazenec et al. (1997) und Vandenbussche et al. (1999) ergeben. Entsprechend dieser Vorstellungen ist das Lig. transversum acetabuli bei Belastung des Hüftgelenkes einer lokalen Druckbeanspruchung ausgesetzt, welche entweder durch das Auseinanderweichen der Hörner der Facies lunata zustande kommt, und/oder als Folge der leichten Inkongruenz der artikulierenden Flächen des Hüftgelenkes betrachtet wird. In beiden Fällen würde dabei das Lig. transversum acetabuli gegen die Gelenkfläche des Caput femoris gepresst (Abb. 83)

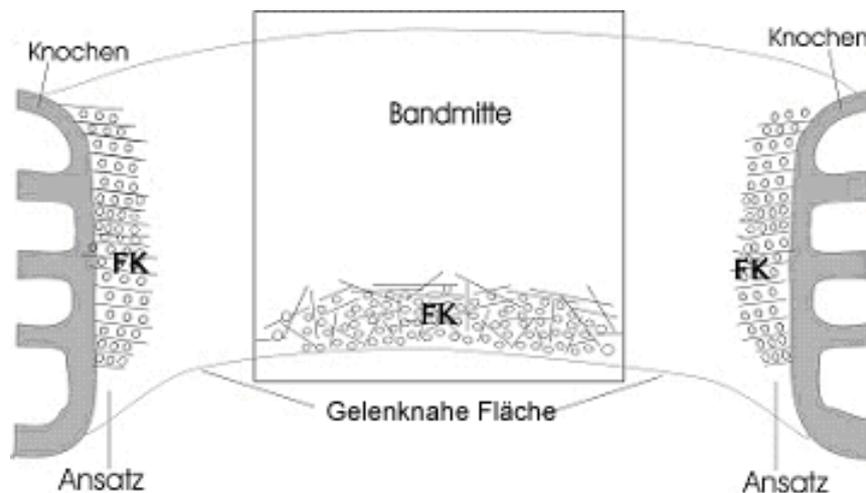


Abb.83: Faserknorpel in Lig. transversum acetabuli (FK: Faserknorpel)

Die hier erhobenen Befunde erlauben allerdings keinerlei Aussage über das Ausmaß der lokalen Druckbeanspruchung des Bandes. Im Vergleich mit anderen Sehnen und Bändern ist das Lig. transversum acetabuli deutlich faseriger als beispielsweise das Lig. transversum atlantis (Milz et al. 1999), jedoch noch knorpeliger als z.B. die Sehne des M. extensor pollicis longus im Bereich ihrer Umlenkung am Tuberculum dorsale des Radius (Benjamin et al. 1995). Das Lig. transversum acetabuli weist eine kleinere Anzahl strategisch angeordneter Faserknorpelzellen an seiner gelenkflächenbildenden Innenseite auf, genau dort wo es in direktem Kontakt mit dem Femurkopf steht. Diese Beobachtung widerlegt gegenteilige Aussagen früherer Autoren (Williams et al., 1995). Darüber hinaus fand sich zumindest in einigen Proben eine schwache Markierung für Aggrecan und Kollagen Typ II, d.h. für Moleküle die typischerweise im Gelenkknorpel vorkommen und die für die Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegen Druckbeanspruchung verantwortlich sein sollen. Wie Rougley & Lee (1994) feststellen, führt die hohe Ladungsdichte der sulfatierten Glycosaminoglycane, Chondroitinsulfat und Keratansulfat, die den Hauptanteil des Aggrecans

ausmachen, zu einer starken Wasserbindung im Gelenkknorpel. Das Aggrecan-Wassergemisch wird dann durch das faserige Netzwerk der Kollagen II Moleküle (zumindest temporär) an seinem Ort fixiert. Das in allen Faserknorpelzellen nachweisbare Hyaluronsäure bindende Protein CD44 (Hyaluronatrezeptor) unterstützt diese Wasserbindungsfähigkeit noch zusätzlich und kann ebenfalls mit Aggrecan reagieren (Fujimoto et al. 2001). Darüber hinaus weist das Vorkommen von CD44 (Dowthwaite et al. 1999) in Verbindung mit dem ebenfalls nachweisbaren Vorkommen von Vimentin auf eine mechanische Beanspruchung der Zellen hin (Carvalho & Felisbino 1999).

Zusätzlich zum sesamoiden Faserknorpel in Bandmitte fanden sich deutlich ausgeprägte Enthesisfaserknorpel an beiden knöchernen Anheftungsstellen des Lig. transversum acetabuli. Dies ist interessant, weil dieses Band nicht, wie viele andere Bänder, über ein Gelenk hinweg zieht und verschiedene Knochen verbindet, sondern weil es statt dessen zwei Teile ein und desselben Knochens (Os coxae) miteinander verbindet. Dementsprechend können Gelenkbewegungen, die normalerweise zur Richtungsänderung der Kollagenfasern im Enthesisbereich führen, hier nicht auftreten. Damit fehlt zunächst scheinbar ein Mechanismus der, durch verstärkte Scherbeanspruchung („*stress concentration*“) an der Anheftungsstelle des Bandes (Benjamin & Ralphs 1995), normalerweise mit der Bildung und Existenz eines Enthesisfaserknorpels in Zusammenhang gebracht wird. Allenfalls kann eine geringfügige Richtungsänderung des Lig. transversum acetabuli erfolgen, wenn es bei Belastung des Hüftgelenkes (durch direkten Druck des Caput femoris auf den Mittelteil des Bandes) unter starke Zugspannung gesetzt wird. An anderen Stellen des Körpers können bei Gelenkbewegungen sehr starke Richtungsänderungen (Abknickung, Scherbeanspruchung) von Sehnen und Bandfasern erfolgen, die zusammen mit der normalen Zugbeanspruchung schon ausreichen, um die Existenz eines prominenten Enthesis Faserknorpels zu rechtfertigen (Benjamin et al. 1986; Lewis et al. 1998). Grundsätzlich gilt, je größer der Grad der Abknickung, desto mehr Faserknorpel findet sich (Evans et al. 1990, Benjamin & Ralphs 1995). Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Faktor für die Existenz eines so kräftigen Enthesisfaserknorpels im Lig. transversum acetabuli ist vermutlich im ungewöhnlich starken Anstieg der Scherbeanspruchung zu sehen, welcher durch die schnell steigende Zugspannung im Band hervorgerufen wird. Obwohl der Grad der maximalen Zugspannung im Lig. transversum acetabuli bisher unbekannt ist, so ist der Wert doch, im Hinblick auf die gemessenen Längenänderungen bei Belastung des Hüftgelenkes (Löhe et al. 1994, 1996; Lazennec et al. 1997; Vandenbussche et al. 1999), vermutlich relativ hoch. Es wäre daher in

diesem Fall denkbar, dass biologisch relevante Scherbeanspruchungen (trotz einer nur geringfügigen Auslenkung) als Resultat eines starken Anstieges der Zugbeanspruchung auftreten und dass dies der eigentliche mechanische Stimulus ist, der für die Ausbildung der Enthesis Faserknorpel verantwortlich ist. Darüber hinaus tragen zyklische Längenänderungen des Bandes bei statischer und dynamischer Beanspruchung (Gehen, Laufen, Springen) sicher ebenfalls zur Bildung der Faserknorpel bei (Löhe et al. 1994, 1996; Lazennec et al. 1997; Vandenbussche et al. 1999). Bei jeder Längenänderung eines Bandes muss dieses unvermeidlich seinen Durchmesser verringern, eine solche Formveränderung im Bereich einer Anheftungsstelle am Knochen muss aber unbedingt vermieden werden, da sonst hier eine außerordentliche Stresskonzentration (besonders von Scherbeanspruchung) die Folge wäre. Diese ursprünglich von Knese und Biermann (1958) vorgetragene "Dehnungsbremsen-Theorie" des Enthesisfaserknorpels hat bisher wenig Anerkennung gefunden. Unsere Ergebnisse passen jedoch gut zu diesen Vorstellungen, da das verstärkte Vorkommen von Aggrecan und Link Protein im Enthesisfaserknorpel des Lig. transversum acetabuli erklären könnte (Waggett et al. 1998), wieso an dieser Stelle selbst bei starker Zugbeanspruchung keine Verringerung des Banddurchmessers erfolgt. Aggrecan mit seinen osmotischen Eigenschaften setzt einer Verformung durch Druck Widerstand entgegen, indem es große Wassermengen einlagert und wenn ein Band an einer bestimmten Stelle nicht komprimiert werden kann, so kann es dort auch nicht verformt werden. Somit besteht dann auch kein Grund zur Änderung des Banddurchmessers.

Klinisch interessant ist die Tatsache, dass zwar in der Literatur häufig über die Manifestation der juvenilen Form der rheumatoiden Arthritis am Hüftgelenk berichtet wird (Witt & McCullough 1994; Spencer & Bernstein 2002), allerdings ein Befall des Lig. transversum acetabuli nie erwähnt wird. Dies erstaunt, da das Vorkommen von Kollagen II, Aggrecan und Link Protein in den Faserknorpeln anderer Bänder mit einer Manifestation der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht werden kann (Milz et al. 2001; Boszczyk et al. 2003). Ursächlich ist hierfür vor allem das Vorkommen von Aggrecan und Link Protein in den Enthesisfaserknorpeln. Diese Moleküle stellen antigene Ziele der Autoimmunreaktion bei rheumatoider Arthritis dar und können eine nicht nur auf die Gelenkknorpel begrenzte Manifestation erklären helfen (Guerassimov et al. 1997, 1998; Zhang et al. 1998).

Vermutlich geht eine mögliche rheumatoide Manifestation im Bereich der Faserknorpel des Lig. transversum acetabuli im Gesamtgeschehen des rheumatoiden Hüftgelenkes unter, bzw. ist von diesem Geschehen diagnostisch nicht abgrenzbar.

4.4 Frische Primaten Ligg. transversa acetabuli

Im Lig. transversum acetabuli aller untersuchten Primaten findet sich ein „sesamoider“ Faserknorpel im gelenkflächennahen Abschnitt, etwa in der Mitte des Bandes, wie er in ähnlicher Weise bereits bei den humanen Ligg. transversa acetabuli beobachtet wurde. Zusätzlich zeigen die immunhistochemischen Befunde ausgeprägte Faserknorpel an beiden Anheftungsstellen (ventral und dorsal) des Lig. transversum acetabuli, welche in ähnlicher Anordnung auch bei den menschlichen Bändern gefunden wurden. Obwohl die Verteilung der sesamoiden Faserknorpel dem gleichen Schema wie beim Menschen folgt, gibt es doch für die untersuchten Primaten spezifische Besonderheiten bei den Befunden. Im Unterschied zu den Ergebnissen bei humanen Ligg. transversa acetabuli, besitzt der in Bandmitte gelegene, sesamoide Faserknorpel bei den Primaten meist eine größere flächenhafte Ausdehnung. Aber auch die Enthesisfaserknorpel aller untersuchten Primaten erscheinen ausgeprägter und reichen weiter in das Band hinein. In manchen Fällen fusionieren sogar die Markierungen der Faserknorpel von Bandmitte und Anheftungsstellen.

Kollagen II findet sich in allen Proben im Bereich der Anheftungsstellen aber auch in Bandmitte im Vergleich zum menschlichen Faserknorpel ist die Markierung kräftiger ausgeprägt und erstreckt sich über weitere Areale.

Ein vergleichbares Bild wie bei den menschlichen Präparaten findet sich für Chondroitin-4-sulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat.

So beobachten Flint et al. (1974) am Gelenkknorpel eine höhere Proteoglycankonzentration unter Kompression während Parkkinen et al. (1992) eine verstärkte Proteoglycansynthese unter dynamischer Kompression zeigten. Gillard et al (1977a,b) fanden sowohl in druckbelasteten Hautarealen wie auch in druckbelasteten Abschnitten der Flexorsehnen des Kaninchens deutlich mehr GAG, als in nicht druckbelasteten Gewebeabschnitten. Ergänzend zu diesen Befunden lässt sich die in allen untersuchten Bandabschnitten zu findende Markierung für Dermatansulfat analog zu Befunden an Flexorsehnen des Kaninchens (Gillard et al. 1977b) erklären, wo das Auftreten von Dermatansulfat mit der Fähigkeit des Gewebes, Zug zu widerstehen, in Zusammenhang

gebracht wurde. Nach Watanabe et al. (1994) kann damit die im ganzen untersuchten Abschnitt zu findende Markierung für Dermatansulfat als ein Hinweis auf eine im Bandverlauf gleichmäßig wirksame Zugbeanspruchung gewertet werden, die zur Bildung von größeren, zugfesten Komplexen aus Hyaluronsäure und Dermatansulfat führt.

Ein Gewebe, welches Druck und Zug zugleich widerstehen muss, ist der menschliche Meniskus, der ebenfalls hohe Dermatansulfatkonzentrationen aufweist (Roughley and White 1992). In Übereinstimmung mit den Befunden von Gillard et al. (1977b) zeigten Parry et al. (1982) beim Kaninchen, dass Dermatansulfat in Flexorsehnen vor allem im zugbeanspruchten Teil der Sehne vorkommt, während Chondroitinsulfat hauptsächlich in den direkt unter Kompression stehenden Teilen der Sehne zu finden ist. Häufig ist hier zusätzlich noch eine gegenüber den ausschließlich zugbelasteten Sehnenabschnitten erhöhte Dermatansulfatkonzentration zu finden (Gillard et al. 1977b). Flint et al. (1982) werten eine höhere Konzentration an Chondroitinsulfat in den Flexorsehnen der Hand als Zeichen für eine lokale Druckbeanspruchung zusätzlich zu der normalen Zugbeanspruchung. Glycosaminoglycane werden in Verbindung mit der Entstehung des Faserknorpels gebracht. Die Verteilung der Markierung des Chondroitin-6-sulfats, das ein wesentlich empfindlicher Marker für Faserknorpelbildung ist, führt uns zu der gleichen Aussage. Junqueira et al. (1981) zeigen, dass in Strukturen die Kollagen Typ II beinhalten (z.B. hyaliner oder/und Faserknorpel) vorwiegend Chondroitinsulfate gefunden werden. Man kann diese Interpretation, direkt auf unsere Befunde an den Ligg. transversa acetabuli übertragen, da es hier vor allem Kollagen Typ II, Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat sind, die sich im Bereich der druck- aber auch zugbelasteten Teile der Bänder finden. Die Existenz des Chondroitin-6-sulfates bestätigt damit die Faserknorpelbildung im Bereich der Enthesis aber auch im Band selbst. Morphologisch lassen sich diese Teile als sesamoide Faserknorpel vom übrigen Bandgewebe gut abgrenzen.

Wir interpretieren das Auftreten des größeren sesamoiden Faserknorpels bei den Präparaten von Makaken und Pavianen als Anpassung an die lokale mechanische Druckbeanspruchung des Bandes durch das Caput femoris. Da der Radius des Acetabulums der Primaten im Vergleich zum humanen Acetabulum deutlich kleiner ist, ist die Auslenkung des Lig. transversum acetabuli beim Primaten größer als beim Menschen. Das Band wird somit an der Kontaktstelle mit dem Caput femoris einer größeren Druckbeanspruchung ausgesetzt. Grundsätzlich gilt, je größer der Grad der Abweichung des Bandverlaufes von der geraden Verbindung beider Ansatzstellen, desto deutlicher ist der sesamoide Faserknorpel ausgeprägt.

Die ebenfalls stärkere Ausprägung der Enthesefaserknorpel erklärt sich analog durch die größere Zugbeanspruchung des Bandes, wodurch die Beanspruchung an den Insertionsstellen ebenfalls steigt. Damit findet sich auch dort mehr Faserknorpel (Evans et al. 1990, Benjamin und Ralphs 1995).

4.5 Schlussfolgerung

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass das Lig. transversum acetabuli durch das Caput femoris einer lokalen Druckbeanspruchung ausgesetzt ist, welche in der Folge auch eine Anspannung des Bandes bewirkt. Die Abschnitte des Lig. transversum acetabuli welche einer lokalen Druckbeanspruchung unterliegen, zeigen bei Mensch und Tier einen faserknorpeligen Phänotyp. Die wesentlichen Charakteristika dieses Gewebstyps sind das Vorkommen von Kollagen Typ II, Chondroitin-6-sulfat, Aggrecan und Link Protein. Diese molekularen Bestandteile der extrazellulären Matrix kommen auch in anderen Regionen des menschlichen Körpers in Faserknorpeln vor und bedingen dort die Drucktoleranz des Gewebes. Eine vergleichbare Aufgabe kommt diesen Matrixbestandteilen auch in den Faserknorpeln des Lig. transversum acetabuli beim Mensch und beim Tier zu.

5 *Zusammenfassung*

Sowohl beim Menschen wie auch bei verschiedenen Primaten kann im Lig. transversum acetabuli im Bereich der Kontaktzone mit dem Hüftkopf ein unterschiedlich stark ausgeprägter sesamoider Faserknorpel gefunden werden. Dieser weist neben der typischen Morphologie der Zellen auch eine charakteristische Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix auf molekularer Ebene auf. Diese mehr oder weniger deutlich ausgeprägten faserknorpeligen Areale lassen sich kausal auf in diesem Bereich auftretende lokale Druckbeanspruchungen zurückführen.

Innerhalb des Bandes fällt die faserknorpelige Anpassung in Abhängigkeit von der topographischen Anordnung unterschiedlich aus. Die dem Hüftkopf zugewandten Anteile des Bandes sowie die knöchernen Anheftungsstellen zeigen ein faserknorpeliges Erscheinungsbild, während in den anderen Bandabschnitten der faserige Phänotyp vorherrscht.

Das häufigere Vorkommen von Kollagen II in den Bändern der Primatengelenke interpretieren wir als das Resultat einer etwas höheren lokalen Druckbeanspruchung des Lig. transversum acetabuli aufgrund des geringeren Radius der Primatenhüftgelenke. Das geringere Körpergewicht der Tiere beeinflusst dabei offensichtlich das Anpassungsverhalten des Bandes in geringerem Maße, als die gegenläufig wirksame Abnahme der Hüftgelenkradius.

In Bezug auf die klinische Relevanz beim Menschen lassen die Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der Daten in der Literatur, einen möglichen Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen knorpeltypischen Bestandteilen der extrazellulären Matrix und lokalen Manifestationen der rheumatoiden Arthritis im Bereich der Faserknorpel des Lig. transversum vermuten.

6 *Literatur*

Arnold G., Groß F., Moll C., (1977): Gewebemechanisches Verhalten von Sehnenfasern unter statischen und dynamischen Beanspruchungen. *Gegenbaurs morph. Jahrb.*, (Leipzig), 123, 6: 857-866.

Benjamin M., Evans EJ., Copp L., (1986): The histology of tendon attachments in man. *J. Anat.* 149: 89-100.

Benjamin M., Qin S., Ralphs JR., (1995): Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J. Anat.* 187: 625-633.

Benjamin M., Ralphs JR., (1995): Functional and developmental anatomy of tendons and ligaments. In: *Repetitive Motion Disorders of the Upper Extremity*. S.L. Gordon, S.J. Blair, and L.J. Fine, eds. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, pp:185-203.

Boszczyk A., Boszczyk B., Putz R., Benjamin M., Milz S., (2003): Expression of a wide range of fibrocartilage molecules at the entheses of the alar ligaments - possible antigenic targets for rheumatoid arthritis? *J. Rheumatol.* 30:1420-5.

Boskey AL., Cohen ML., Bullough P., (1982): Hard Tissue Biochemistry: A Comparison of Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Tissue samples. *Calcif Tissue Int.* 34: 328-331.

Bullough P., Goodfellow J., Greenwald A.S., O'Connor J., (1968): Incongruent Surfaces in the Human Hip Joint. *Nature (London)*, 217: 1290.

Caron BL., Banks PM., (1979): Acetic Acid-Formalin Postfixation for Routine Tissue Processing. *Lab. Investig.* 40: 244-245.

Carvalho HF., Felisbino SL., (1999): The development of the pressure – bearing tendon of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat. Embryol.* 200: 55-64.

Dowthwaite GP., Ward AC., Flannely J., Suswillo RF., Flannery CR., Archer CW., Pitsillides AA., (1999): The effect of the mechanical strain on hyaluronan metabolism in embryonic fibrocartilage cells. *Matrix Biol.* 18: 523-32.

Evans EJ., Benjamin M., Pemberton DJ., (1990): Fibrocartilage in the attachment zones of the quadriceps tendon and patellar ligament of man. *J. Anat.* 171: 155-62.

- Flint MH.** (1974): Pathogenesis of osteoarthritis (Letter). *Lancet* 865: 1047-1048.
- Flint MH., Gillard GC., Reilly HC.,** (1982): The glycosaminoglycans of Dupuytren's disease. *Connect. Tissue Res.* 9: 173-179.
- French D., Edsall JT.,** (1945): The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Protein Chem.* 2: 277-335.
- Fujimoto T., Kawashima H., Tanaka T., Hirose M., Toyama-Sorimachi N., Matsuzawa Y., Miyasaka M.,** (2001): CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan. *Int. Immunol.* 13(3): 359-66.
- Guerassimov A., Duffy C., Zhang Y., Banerjee S., Leroux JY., Reimann A., Webber C., Delaunay N., Vippiarti V., Ronbeck L., Cartman A., Arsenault L., Rosenberg LC., Poole AR.,** (1997): Immunity to cartilage link protein in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 24: 959-64.
- Guerassimov A., Zhang .Y, Banerjee S., Cartman A., Webber C., Esdaile J., Fitzcharles MA., Poole AR.,** (1998): Autoimmunity to cartilage link protein in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* 25: 1480-4.
- Gillard GC., Reilly HC., Bell-Booth PG., Flint MH.,** (1977a): A comparison of the glycosaminoglycans of weight-bearing and non-weight-bearing human dermis. *J. Invest. Dermatol.* 69: 257-261.
- Gillard GC., Merrilees MJ., Bell-Booth PG., Reilly HC., Flint MH.,** (1977b): The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon. *Biochem. J.* 163: 145-151.
- Goodfellow J., Mitsou A.,** (1977): Joint surface incongruity and Maintenance. An experimental Study. *J. Bone Joint Surg., 59-B,* 4: 446-451.
- Junqueira LCU., Toledo OMS., and Montes GS.,** (1981): Correlation of Specific Sulfated Glycosaminoglycans with Collagen Types I, II, and III. *Cell Tissue Res,* 217: 171-175.
- Kiernan J.A.,** (1999): *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice.* 3rd Edition, Butterworth-Heinemann.
- Knese K.H., Biermann H.,** (1958): Die Knochenbildung an Sehnen und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. *Z. Zellforsch.* 49: 142-187.

Konrath A., Hamel A., Olson S., Bay B., and Sharkey A., (1998): The Role of the Acetabular Labrum and the Transverse Acetabular Ligament in Load Transmission in the Hip. *J. Bone Joint Surg.*, 80-A: 1781-1787.

Lazennec JY., Laudet CG., Guerin-Surville H., Roy-Camille R., Saillant G., (1997): Dynamic anatomy of the acetabulum: an experimental approach and surgical implications. *Surg. Radiol. Anat.*, 19: 23-30.

Lewis AR., Ralphs JR., Kneafsey B., Benjamin M., (1998): The distribution of collagens and glycosaminoglycans in the joint capsule of the proximal interphalangeal joint of the human finger. *Anat. Rec.* 250:281-291.

Löhe F., Eckstein F., Putz R., (1994): Die Beanspruchung des Ligamentum transversum acetabuli unter physiologischer Belastung des Hüftgelenks. *Unfallchirurg*, 97: 445-449.

Löhe F., Eckstein F., Sauer T., Putz R., (1996): Structure, Strain and Function of the Transverse Acetabular Ligament. *Acta Anat.* 157: 315-323.

Milz S., Putz R., Ralphs JR., Benjamin M., (1999): Fibrocartilage in the extensor tendons of the human metacarpophalangeal joints. *Anat. Rec.* 256: 139-145.

Milz S., Schlüter T., Putz R., Moriggl B., Ralphs JR., Benjamin M., (2001): Fibrocartilage in the transverse ligament of the human atlas. *Spine* 26:1765-1771.

Parkkinen JJ., Lammi MJ., Helminen HJ., Tammi M., (1992): Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro. *J. Orthop. Res.* 10: 610-620.

Parry DAD., Flint MH., Gillard GC., Craig AS., (1982): A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. *FEBS-Letters* 149: 1-7.

Roughley PJ., Lee ER., (1994): Cartilage Proteoglycans: Structure and Potential Functions. *Microscopy Research and Technique*, 28: 385-397.

Roughley PJ., White RJ., (1992): The dermatan sulphate proteoglycans of the adult human meniscus. *J. Orthop. Res.* 10: 631-7.

Spencer CH., Bernstein BH., (2002): Hip disease in juvenile rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14(5): 536-41.

Tönnis D., Itoh K., Heinecke A., Behrens K., (1984): Die Einstellung der angeborenen Hüftluxation unter Arthrographiekontrolle, eine individuelle, risikoverringende und zeitsparende Methode. *Z. Orthop.* 122: 50-61.

Vandenbussche E., Massin P., Augereau B., Lavaste F., (1999): Etude cadavérique de la mobilité des cornes acetabulaires de la hanche saine et prothésée par simulation d'aquiel monopode. *Revue de Chirurgie Orthopédique*, 85: 136-145.

Waggett A., Ralphs J., Kwan A., Woodnutt D., Benjamin M., (1998): Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol.* 16:457-70.

Watanabe M., Nojima M., Shibata T., Hamada M., (1994): Maturation-related biochemical changes in swine anterior cruciate ligament and tibialis posterior tendon. *J. Orthop. Res.* 12: 672-82.

Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ., (1995): *Gray's Anatomy* 38th edition. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Witt JD., McCulloch CJ., (1994): Anterior soft-tissue release of the hip in juvenile chronic arthritis. *J. Bone Joint Surg.* 76-Br (2): 267-70.

Zhang Y., Guerassimov A., Leroux JY., Cartman A., Webber C., Lalic R., deMiguel E., Rosenberg LC., Poole AR., (1998): 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.

Danksagung

Ich bedanke mich auf diesem Weg herzlich bei Allen, die mich auf meinem wissenschaftlichen und klinischen Werdegang begleitet und unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Dr. med. h.c. Reinhard Putz, Vorstand des Lehrstuhl I der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des interessanten Themas und der Aufgabenstellung.

Herrn PD Dr. med. Stefan Milz (Anatomische Anstalt, Lehrstuhl I) danke ich für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, die Einarbeitung in die experimentellen Untersuchungen, die Gelegenheit mich an wissenschaftlichen Publikationen zu beteiligen sowie für die zahlreichen, fruchtbaren Diskussionen und sinnvollen Korrekturhinweisen. Insbesondere will ich mich für seine unerschöpfliche Geduld und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bedanken. Nicht zuletzt danke ich ihm für die im Lauf der letzten sechs Jahre gewonnene Freundschaft.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. med. Andreas Büttner, Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Unterstützung bei der Gewinnung und Entnahme der frischen Präparate.

Großen Dank schulde ich Frau Mayer und Frau Dinter (Anatomische Anstalt), die mich bei der Erstellung und Färbung der histologischen Schnitte unterstützten, sowie für die zahlreichen Hilfestellungen auf die technischen und logistischen Voraussetzungen dieser Arbeit.

Meinen Eltern, ohne deren jahrelange uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung sowie ihre Geduld und deren Glaube an mich, mein Studium im Allgemeinen und speziell die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich wäre, widme ich diese wissenschaftliche Arbeit.

Abschließend doch am wichtigsten verdanke ich meiner liebevollen Ehefrau Susanna, mit einem Wort: Alles!

Lebenslauf

Georgios Valassis

Geboren: 03. August 1969 in Thessaloniki/GR
Eltern: Vasilias Valassis, Arbeiterin i.R.
Dimitrios Valassis, Arbeiter i.R.
Konfession: Griechisch-Orthodox
Familienstand: Verheiratet
Schulbildung:
1975 – 1987 private griechische Volksschule, Gymnasium und
Lyzeum in München
1987 Abitur (Apolysterion)
1987 Panhellenische Aufnahmeprüfung für medizinische und
biologische Studiengänge
Zulassung zum humanmedizinischen Studium

Studium der Humanmedizin:

Oktober 1987 – 1990 Vorklinisches Studium an der
Aristoteles Universität in Thessaloniki/GR,
Fakultät für Humanmedizin
Oktober 1990 – 1993 Klinisches Studium an der
Demokritos Universität in Thrazien, Fakultät für
Humanmedizin in Alexandroupolis/GR
November 1993 Approbation in Griechenland
Juni 1994 Approbation in Deutschland
Oktober 1998 – September 1999 Promotionssemester an der Ludwig-Maximilians
Universität München

Berufliche Laufbahn:

Juni 1994 – September 1994 Assistenzarzt bei Dr. med. Walter Weede in Praxis.
(Pulmologie–Allergologie, Prinzregentenhof, München)
Juni 1995 – November 1996 Landarzt (A.i.P) Außenstelle des Gesundheitszentrums
Nea Maditos in Stavros Thessaloniki/GR
November 1996 – November 1997 Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik im
Präfekturkrankenhaus in Kilkis/GR
November 1998 bis heute Assistenzarzt in der 1. Orthopädischen Klinik im
Präfekturkrankenhaus in Kilkis/GR