

Diplomarbeit

Immunkompetente Zellen und Narbenbildung

Klinisch-immunhistochemische Studie zur Rolle des Immunsystems in
der Pathologischen Narbenbildung

eingereicht von

Jasna Susic

0433620

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

**Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie
und der klinischen Abteilung für Plastische Chirurgie**

unter Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Horst Koch (Erstbetreuer)

Dr. med. univ. Herbert Juch (Zweitbetreuer)

Im Oktober 2010

Vorwort

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Ganz besonders, möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer, Herrn Univ.-Ass. Dr. Herbert Juch vom Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz, für seine großartige fachliche und persönliche Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Er stand mir immer zur Seite und glaubte an mich. Es war mir eine sehr große Ehre und Freude ihn als Betreuer dieser Arbeit gehabt zu haben.

Ein großes Dankeschön ergeht auch an meinen Erstbetreuer, Herrn Univ.-Prof. Dr. Koch von der Abteilung für Plastische Chirurgie LKH Graz, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat. Er hat mich immer mit neuen Materialien und fachlichen Rückmeldungen unterstützt.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Fr. Nina Fliesser, die mir bei den praktischen Arbeiten eine enorme Hilfe war.

Ich möchte mich hiermit auch bei Fr. Christine Daxböck und Fr.Prof. Blaschitz Astrid, für die Einschulungen im Umgang mit den Geräten, Färbemethoden und Materialgewinnung bedanken.

Ein großes Dankeschön an das ganze Team des Instituts für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz, für die Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und die Bereitstellung eines eigenen Arbeitsplatzes.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Vater, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, von ganzen Herzen bedanken.

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war, zu untersuchen, ob eine chronische Entzündung die Ursache von fibrosierenden, rezidivierenden Narbenbildung im Handbereich ist, die bei manchen Patienten nach Sehnenscheidenverletzungen auftreten und zu einer Bewegungseinschränkung führen kann.

In Vorarbeiten wurde eine deutliche Vermehrung der T-Lymphozyten(CD3+) und der Makrophagen im Narbengewebe beschrieben.

Die Vermehrung von Makrophagen, war zwar statistisch nicht signifikant, eine Bedeutung der Makrophagen im Rahmen der chronischen Fibrose im Bereich der Sehnenscheiden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Es gibt in der Literatur auch Hinweise, dass die CD 40 /CD 40 L Interaktion eine funktionelle Bedeutung bei chronisch-fibrosierenden Vorgängen haben könnte.

Im praktischen Teil, wollten wir unsere Hypothese, dass eine chronische Fibrosierung mit einer vermehrten Expression der Marker CD 40 und CD 40 L einhergeht, prüfen.

Wir führten immunhistochemische Färbungen an Gefrier- und Paraffinschnitten von Patienten- und Leichensehnenscheidengewebe durch, mit Antikörpern gegen CD 40 und CD 40 L. Wir konnten keine signifikante Vermehrung dieser Marker feststellen. Diskutiert werden muß, ob es an unserem Material lag oder an einer zu geringen Sensitivität der Methodik – möglicherweise spielt jedoch der CD 40 / CD 40 L – Signalweg für die Fibrosierung nach Sehnenscheidentraumen keine wichtige Rolle, zumindest in dem Stadium der Erkennung, in welchem Fibrosegewebe chirurgisch entfernt wird.

Abstract

The aim of this study was to investigate whether chronic inflammation is the cause of fibrotic scarring and recurrent scarring in the hand, which can appear in some patients after tendon sheath injury and can lead to a restriction of movement.

A significant increase of T-lymphocytes (CD3 +) is described in previous studies.

In addition, a non significant increase of macrophages, was observed in the fibrotic tissue, indicating that the function of macrophages in chronic fibrosis of tendon sheaths, should be further investigated.

Literature suggests that the CD 40 / CD 40 L interaction could play an important role in such chronic fibrotic processes.

In the practical part, we wanted to prove our hypothesis, that chronic fibrosis goes along with an increased expression of the markers CD 40 and CD 40 L in our tissues. We performed immunohistochemical staining of kryo -and paraffin sections from patient- and corpse- tendon sheath tissue, with antibodies against CD 40 and CD 40L. We did not observe a significant increase of these markers in our patient samples. It remains to be discussed whether this was due to the quality of the material, the sensitivity of our methods or whether our results indicate that CD 40 / CD 40 L interaction is not involved anymore in the scarring process after tendon sheath trauma, at least at the stage of the disease when fibrotic tissue is usually surgically removed.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	V
INHALTSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
2 GRUNDLAGEN	3
2.1 Sehnen und Sehnencheiden	3
2.1.1 Sehnen	3
2.2 Das Binde- und Stützgewebe	4
2.2.1 Aufbau des Bindegewebes	5
2.2.2 Die Zellen des Bindegewebes	5
2.3 Die extrazelluläre Matrix	8
2.3.1 Die Grundsubstanz	9
2.3.2 Fasern des Bindegewebes	10
2.3.3 Die Funktion der extrazellulären Matrix	13
2.4 Wundheilung	14
2.4.1 Definition	14
2.4.2 Stadien der Wundheilung.....	14
2.4.3 Formen der Wundheilung.....	17
2.4.4 Beeinflussung der Wundheilung	18
2.4.5 Störungen der Wundheilung	18
2.4.6 Fibrose	19
2.5 Entzündung	20
2.5.1 Akute Entzündung.....	21
2.5.2 Chronische Entzündung.....	25
2.6 Zell-Zell –Interaktionen	32
2.6.1 Adhäsionsmoleküle	32

2.6.2	Endothel-Leukozyten- Interaktion	33
2.6.3	Die CD- Nomenklatur	34
2.7	Mononukleäres phagozytisches System (MPS).....	35
2.7.1	Die Funktionen der Makrophagen.....	36
2.7.2	Die Sekretionsprodukte der Makrophagen	37
2.7.3	Die Chemotaxis.....	37
2.7.4	Aktivierung von Makrophagen	38
2.8	Arthrofibrose.....	38
3	EXPERIMENTELLER TEIL	40
3.1	Immunhistochemie	40
3.1.1	Färbemethoden	41
3.2	Praktische Durchführung	43
3.2.1	Probematerial	43
3.2.2	Verwendete Materialien:	43
3.2.3	Durchführung / Färbeprotokoll	45
3.2.4	Vorversuche	46
4	DISKUSSION	54
5	SCHLUSSFOLGERUNG.....	55
6	LITERATUR	56
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	58
	ERKLÄRUNG.....	60

1 Einleitung

Verletzungen von Sehnenscheiden, entstehen meistens durch Stichverletzungen v.a. im Handbereich. Erkrankungen der Sehnenscheiden entstehen auch oft durch Über- und Fehlbelastungen, z. B. durch monotone Bewegungen, falsche Sporttechnik oder unzureichende Ergonomie am Arbeitsplatz. Entsteht die Erkrankung durch Arbeiten mit der Computermaus, spricht der Arzt von einem „Mausarm“. Für einige Risikogruppen gilt er als Berufskrankheit.

Sehnenscheidenverletzungen können, bei manchen Patienten zu einer chronisch-fibrosierenden Narbenbildung führen, auch wenn man das überschüssige Bindegewebe chirurgisch entfernt hat. Die Fibrosierung vermindert die Beweglichkeit der Gelenke, was ein großes Problem v.a bei Sportlern darstellt, aber auch im Alltag sehr lästig sein kann.

Zur ähnlichen fibrosierenden Prozessen kommt es auch nach operativen Eingriffen an Gelenkkapseln, die einen ähnlichen Aufbau wie Sehnenscheiden aufweisen.

Am häufigsten ist dies nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes am Kniegelenk, zu beobachten. Die sogenannte Arthrofibrose geht mit konstanter schmerzhafter Bewegungseinschränkung der Gelenke einher. Histologische Untersuchungen zeigten eine vermehrte Anzahl von Lymphozyten und Makrophagen, so ließ sich vermuten, dass sich auch in den Sehnenscheiden ähnliche entzündliche Vorgänge abspielen könnten, wie bei Arthrofibrose beschrieben.

Dr. Wagner konnte im Rahmen seiner Dissertation eine, bis zu 15-mal höhere Anzahl der T- Lymphozyten (CD3+) im Narbengewebe im Gegensatz zum Sehnenscheidengewebe bei Leichen feststellen.

T- Lymphozyten und deren mögliche Interaktionen (über IL-13 und Fibroblastenaktivierung) spielen vermutlich eine Rolle in der chronisch-fibrosierenden Narbenbildung.

Fr. Barbara Leopold, BMA, hat Untersuchungen mit einem makrophagen-spezifischen Antikörper (anti CD 68) durchgeführt .Sie konnte eine Vermehrung von Makrophagen im Patientengewebe zeigen, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Eine bedeutende Funktion von Makrophagen, im Rahmen der chronischen Fibrose im Bereich der Sehnenscheiden, kann aber noch nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung des Aktivierungszustandes der Makrophagen sollen diese Fragestellung weiter abklären (klassische Aktivierung / alternative Aktivierung?).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die CD 40/CD 40L Interaktion bei chronisch fibrosierenden Vorgängen bedeutend sein könnte [1].

Im Rahmen dieser Arbeit, wollten wir feststellen, ob ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression der Marker CD 40 und CD 40 L im Narbengewebe und den Fibrosierungsvorgängen am Patientengewebe besteht.

2 Grundlagen

2.1 Sehnen und Sehnenscheiden

2.1.1 Sehnen

Sehnen haben die Aufgabe, die Kraft der Muskulatur auf das Skelett zu übertragen.

Sie bestehen aus kollagenen Bindegewebsfasern, die im unbelasteten Zustand leicht wellig verlaufen und so eine Dämpfung der Kraftübertragung auf den Knochen ermöglichen.

Sie können auch elastische Fasern und Proteoglykane enthalten. Dazwischen befinden sich Tendinozyten oder Sehnenzellen.

Im Bereich der Ursprungssehne ziehen die Sehnenfasern gebündelt zwischen den Muskelfasern und befestigen sich einzeln an den Muskelfaserhüllen.

Im Bereich der Ansatzsehne strahlen die Sehnenfasern gebündelt und sich teilweise überkreuzend in den Knochen ein. Dabei wird zunächst eine vorgelagerte Knorpelzone durchlaufen. Dadurch wird es möglich, die vom Muskel entwickelte Kraft gedämpft auf den Knochen zu übertragen.

Die Sehnenscheiden sind flüssigkeitsgefüllte Gleitröhren.

Sie sind dort angebracht, wo Sehnen abgewinkelt über Knochenvorsprünge verlaufen.

Auf diese Weise wird bei Bewegungen die Reibung der Sehnen mit dem umgebenden Gewebe vermindert.

2.1.1.1 Schematischer Aufbau der Sehne, inkl. Sehnenscheide :

- Stratum fibrosum
- Mesotendineum
- Äusseres Blatt des Stratum Synoviale
- Gleitraum mit Synovia
- Inneres Blatt des Stratum Synoviale
- Sehne

Knorpel- und Knochengewebe zählen als Stützgewebe im etwas weiteren Sinne ebenfalls zum Bindegewebe. Meist wird auch das Fettgewebe als Sonderform des Bindegewebes betrachtet. [3]

2.1.3 Aufbau des Bindegewebes

Im Wesentlichen unterscheiden wir 3 Komponenten:

- Zellen (Fibroblasten)
- Fasern
- Grundsubstanz (extrazelluläre Matrix)

2.1.4 Die Zellen des Bindegewebes

Wir unterscheiden:

- fixe Zellen (Mesenchymzellen-embryonal vorhanden, spezifische ortsständige Zellen)
- freie Zellen(stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab, sind mobile Zellen)

2.1.4.1 Ortsständige Zellen

Fibroblasten sind die spezifischen Zellen des Bindegewebes. Sie sind bewegliche, aber ortsständige Zellen mesenchymaler Herkunft .Sie haben einen lang gestreckten, schmalen, helleren Zelleib und einen ovalen hellen Zellkern mit deutlichem Nucleolus.

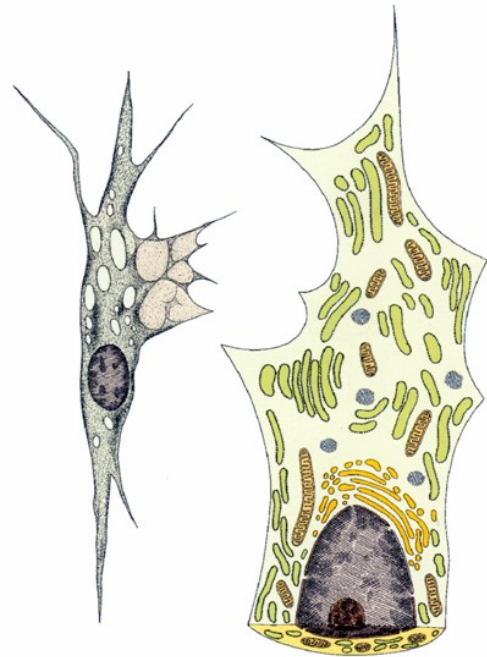


Abbildung 2: Fibroblast [4]

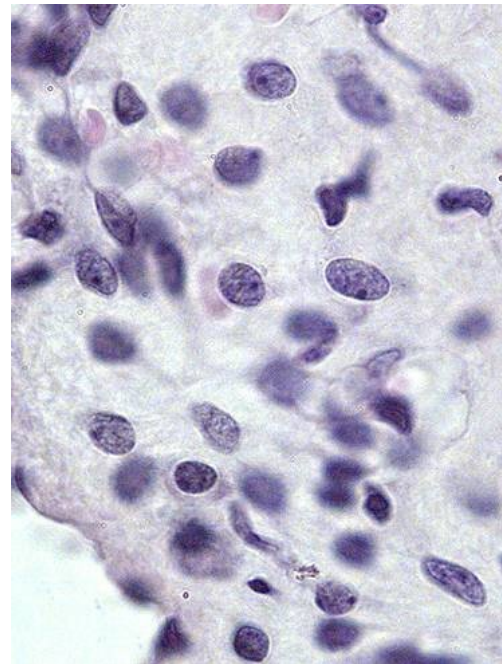


Abbildung 3: Fibroblast, mikroskopische Aufnahme [5]

Es sind viele irreguläre zytoplasmatische Fortsätze vorhanden, über die die Fibroblasten miteinander in Verbindung stehen können.

Fibroblasten sind verantwortlich für den Stoffwechsel der Matrixbestandteile, deren Neubildung und Abbau.

Fibroblasten synthetisieren:

- Prokollagen
- Glykosaminoglycane (saure Mucopolysaccharide, wichtigste Bestandteile der Grundsubstanz)
- Kollagenase (Enzym für den physiologischen Abbau von Kollagen)

Es gibt aber auch Fibroblasten die inaktiv sind und ihre Beweglichkeit verloren haben, so genannten Fibrozyten, auch als ruhende oder inaktive Fibroblasten bezeichnet.

Fibrozyten sind sehr schmale, längliche Zellen, deren Fortsätze in Kontakt stehen mit den Fortsätzen von anderen Fibrozyten (tight- und gap junctions).

Es handelt sich um eine mehr oder weniger fixe Zelle, mit einem azidophilen Zytoplasma und dichtem inaktivem Chromatin. [6]

Bei Bedarf, kann ein Fibrozyt aktiviert und in einen Fibroblasten zurück verwandelt werden.

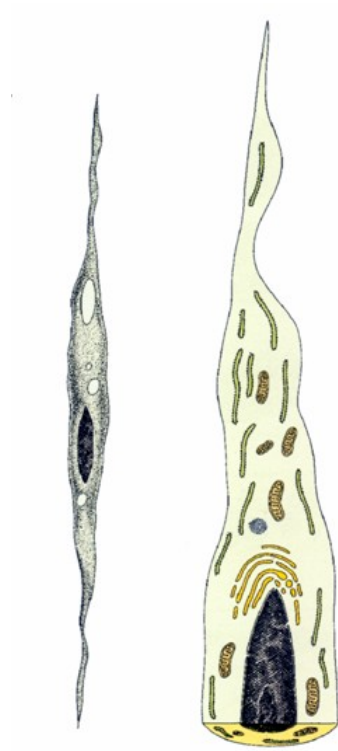


Abbildung 4: Fibrozyt [7]

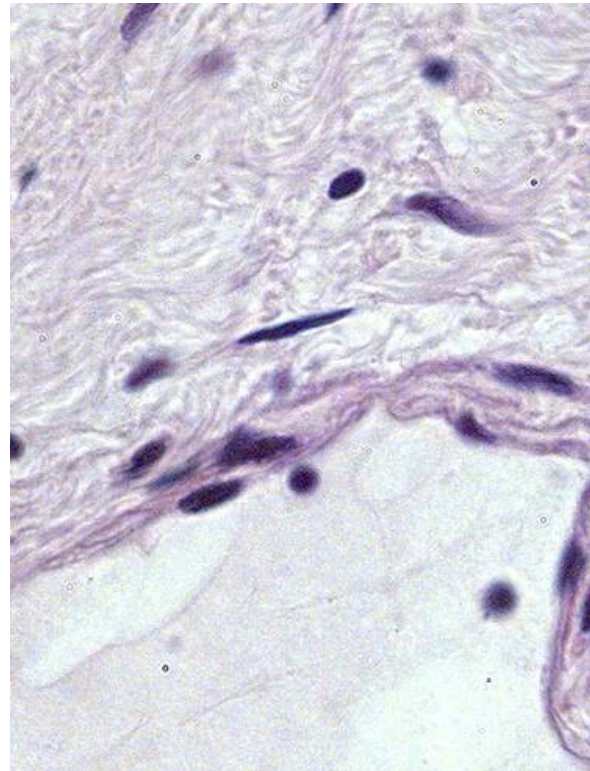


Abbildung 5: Fibrozyt, mikroskopische Aufnahme [8]

Zu unterscheiden als ortständige Zellen sind noch Retikulumzellen (im retikulären Bindegewebe) und Fettzellen.

Speziell sind noch die Myofibroblasten zu erwähnen.

Das sind hochdifferenzierte Zellen, die Eigenschaften von Fibroblasten und glatten Muskelzellen besitzen. Sie enthalten kontraktile Aktin- und Myosin-Filamente, und zeichnen sich durch eine hohe endogene Produktion von Kollagen aus.

Myofibroblasten sind ein Zelltyp, der erstmals in der Wundheilung beschrieben wurde.

Sie kommen auch als Perizyten in den Kapillarwänden sowie in der so genannten Tunica albuginea des Hodens vor.

Myofibroblasten entstehen aus Fibroblasten, welche durch aktivierte Makrophagen (in Wunden) zur Zellteilung angeregt wurden. Diese entstandenen Myofibroblasten wandern mit den Makrophagen in das Wundgebiet hinein. Indem Makrophagen Leukozyten ersetzen, stimulieren sie die Einwanderung von weiteren Myofibroblasten und Fibroblasten sowie deren Proliferation. Diese verstärken ihrerseits die Produktion von Kollagen und tragen so zur Narbenbildung bei.

Verglichen mit anderen Zellarten, wie Nerven- oder Muskelzellen, sind Myofibroblasten extrem robust und können unter widrigen Umständen überleben. [9]

Freie Zellen des Bindegewebes:

- Makrophagen (Histiozyten)
- Granulozyten (eosinophile und neutrophile)
- Plasmazellen
- Mastzellen
- Lymphozyten

Diese werden im Kapitel Entzündung näher erläutert.

2.2 Die extrazelluläre Matrix

Der bedeutendste Unterschied zwischen Binde- und Stützgewebes, und anderen tierischen Gewebearten, ist der meist große Raum zwischen den einzelnen Zellen.

Dieser so genannte interstitielle Raum, ist mit interstitieller Flüssigkeit aufgefüllt und der Extrazellulärmatrix.

Mit dieser Bezeichnung wird die Gesamtheit aller Makromoleküle, die von Zellen freigesetzt und im extrazellulären Raum durch Interaktionen mit anderen Molekülen immobilisiert werden, zusammengefasst. [13]

Bei Pflanzen spricht man nicht von einer extrazellulären Matrix, auch wenn bei diesen ebenfalls ein Interzellullarraum vorliegt, der mit einer Substanz gefüllt ist.

Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus diversen Komponenten zusammen, die in zwei große Gruppen eingeteilt werden:

- Grundsubstanz (Flüssigkeit und darin gelöste Substanzen) und
- Fasern

Das Verhältnis der Grundsubstanz zum Faseranteil schwankt je nach Lokalisation ebenso wie der Anteil der extrazellulären Matrix am Gewebe insgesamt, bedingt durch dessen jeweilige Funktion.

2.2.1 Die Grundsubstanz

In die Grundsubstanz des Bindegewebes sind die Bindegewebszellen und die Fasern eingebettet.

Die Grundsubstanzmoleküle sind:

- Glykosaminoglykane
- Proteoglykane
- Glykoproteine
- Niedermolekulare Substanzen
- Wasser

2.2.1.1 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane sind Polysaccharidketten aus repetitiven Disacchrideinheiten, die in der Regel aus je einem Aminozucker (Glukosamin, Galaktosamin) und je einer Glukuronsäure bzw. Induronsäure bestehen. Die meisten können Sulfatgruppen tragen und sind stark sauer (wegen der anionischen Gruppen).

Zu den Glykosaminoglykanen zählen z.B.:

- Hyaluronsäure
- Chondroitin 4/6-sulfat
- Dermatansulfat
- Keratansulfat
- Heparansulfat
- Heparin

Die Glykosaminoglykane unterscheiden sich voneinander nur durch die einzelnen Zuckerbausteine.

2.2.1.2 Proteoglykane

Verbindungen von Glykosaminoglykanen mit Proteinen nennt man Proteoglykane. Binden sich mehrere Proteoglykane über Link-Proteine an Hyaluronat, so entstehen aggregierte Proteoglykane, die größten Grundsubstanzmoleküle des Bindegewebes.

Proteoglykane bestehen aus einem zentralen Protein (Core-Protein), an das Seitenketten mit sulfatierten Glykosaminoglykanen (z.B.: Chondroitinsulfat) geknüpft sind. Sie haben das Vermögen Wasser zu binden und sind dadurch für den Wassergehalt und den Turgor der Gewebe wichtig. Über Linker-Proteine können sie an Hyaluronsäure verknüpft werden und riesige Komplexe ergeben

2.3.2 Fasern des Bindegewebes

Man kann im Bindegewebe drei verschiedene Arten von Fasern kollagene, retikuläre und elastische Fasern, unterscheiden.

Kollagene und retikuläre Fasern sind aus dem Faserprotein Kollagen aufgebaut, und elastische Fasern hauptsächlich aus dem Protein Elastin.

Die Verhältnisse und die Anordnung der drei Fasertypen verleihen den verschiedenen Arten von Bindegewebe ihre charakteristischen Eigenschaften.

2.3.2.1 Kollagen

Das Kollagen ist das häufigste Protein im Säugetier (25% des Gesamtproteins). Es ist ein unlösliches Protein (Skleroprotein), das Fasern bilden kann. Diese Fasern können mit freiem Auge oder einer Lupe betrachtet werden. Die Fasern bestehen aus parallel zueinander geordneten Fibrillen, die nur mit dem Elektronenmikroskop zu sehen sind.

Charakteristisch ist eine Querstreifung der Fibrillen. Diese beruht auf einer Bindung von Schwermetallen an die nicht helikalen Anfangs- und Endstücke der Vorstufe von Kollagen den s.g. Prokollagen.

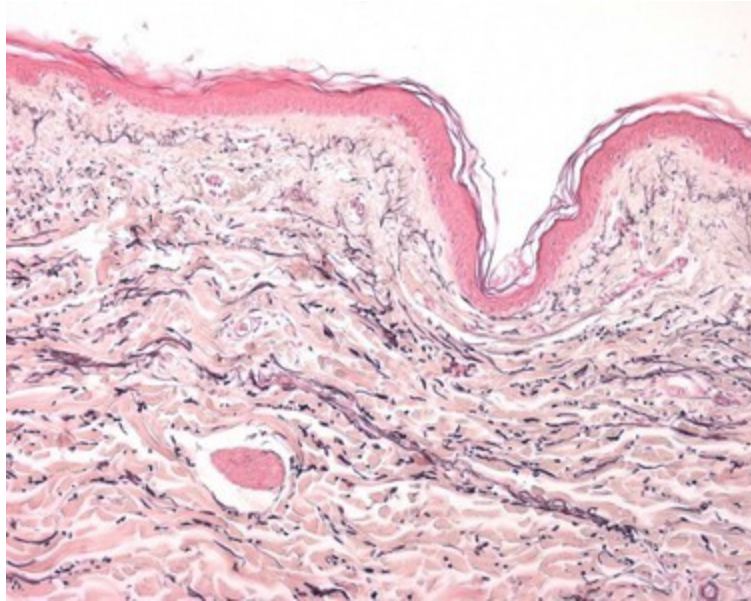


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von Kollagenen Fasern, Lederhaut (Mensch) [10]

Die Fibrillen sind aus parallel zueinander gelagerten Kollagenmolekülen aufgebaut. Kollagenmoleküle bilden eine Tripelhelix, das heißt, drei Proteinketten (sie werden als α -Ketten bezeichnet) sind zum Molekül seilartig verdreht.

Kollagentypen. Zurzeit sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt, die sich in der Aminosäuresequenz der α -Ketten voneinander unterscheiden. Die Typen werden mit römischen Ziffern bezeichnet.

Auch gibt es verschiedene Grundsubstanzmoleküle, aus deren Mischung mit den Kollagentypen sich die unterschiedlichen Eigenschaften von Bindegewebsstrukturen erklären lassen.

Die bekanntesten und mengenmäßig am häufigsten vorkommenden Kollagentypen sind:

- Typ I – Kollagen (Haut, Sehnen, Knochengrundsubstanz, Horn- und Lederhaut des Auges)
- Typ II – Kollagen (im gesunden Knorpel, Glaskörper des Auges)
- Typ III – Kollagen (fetales Kollagen, Arterien, Retikulin. Es bildet sich während des Alterns zurück)
- Typ IV – Kollagen (Basalmembrankollagen)

2.3.2.2 Elastin

Wie schon der Name sagt, verleiht das Elastin dem Gewebe elastische Eigenschaften, und ist ein wesentlicher Bestandteil elastischer Fasern. Elastin ist weitgehend unlöslich in physiologischen Lösungsmitteln.

Es lässt sich auf das 1,3 – 1,4-fache seiner Länge dehnen und kehrt nach der Dehnung in den Ausgangszustand zurück (= Elastizität).

Elastische Fasern werden aus zwei Anteilen aufgebaut. Im Zentrum ist Elastin und peripheren Mikrofibrillen, die aus Fibrillin, einen Glykoprotein bestehen.

Bis zu einem Alter von 20 Jahren wird Elastin im menschlichen Körper produziert.

Mit zunehmendem Alter wird das Elastin abgebaut (Alterserscheinungen). [11]

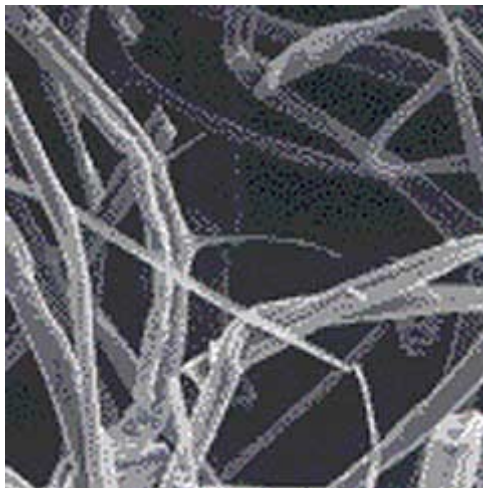


Abbildung 7: Elastin [12]

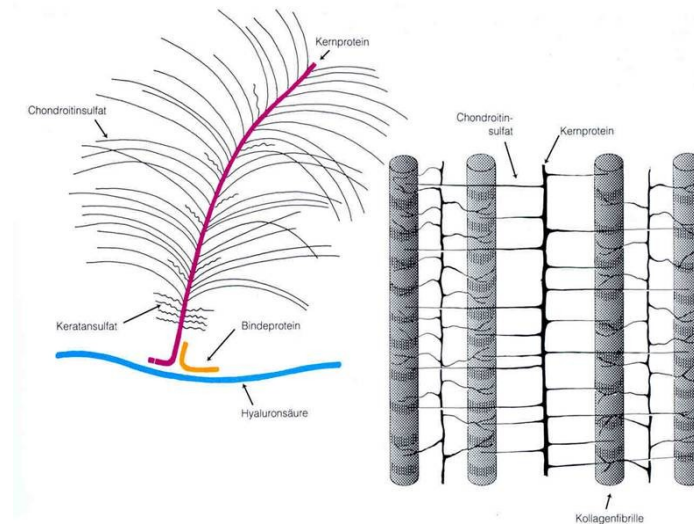


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Komplexe [14]

2.3.2.3 Glykoproteine

Sind Proteine mit kurzen Kohlenhydratseitenketten. Dienen der Verankerung von Bindegewebszellen (über Integrine) an der extrazellulären Matrix (Fasern). Dadurch werden.

Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflusst.

Einige dieser Glykoproteine sind:

- Laminin: bindet Epithelzellen, welche Lamininrezeptoren besitzen, an die Basallamina
- Fibronectin: vermittelt die Haftung von Bindegewebszellen über entsprechende Integrine an Kollagenfasern
- Vitronectin: Oberfläche elastischer Fasern
- Osteospondin, Osteonektin
- Chondronektin

2.2.3 Die Funktion der extrazellulären Matrix

- Formgebung von Geweben und Organen
- Wassergehalt der Gewebe
- Elastizität der Gewebe
- Zugfestigkeit und Stabilität der Knochen, Sehnen und Bänder
- Zytokinreservoir
- Signaltransduktion in Geweben

- Verankerung und Polaritätsvorgabe für Zellen
- Beeinflussung von Wundheilungsprozessen
- Filterleistung der Niere aufgrund ihrer speziellen Basalmembranen

Schließlich bleibt noch anzumerken, dass der Abbau und Umbau der EZM vornehmlich durch die so genannten Matrix-Metalloproteinasen (MMP) erfolgt, von denen bislang über 20 identifiziert wurden. Diese zinkhaltigen Enzyme werden entweder in die EZM durch entsprechende Zellen sezerniert oder befinden sich an der Zellmembran (MT-MMP, membrane type MMP), wobei das katalytische Zentrum des Enzyms in den extrazellulären Raum ragt. [15]

2.3 Wundheilung

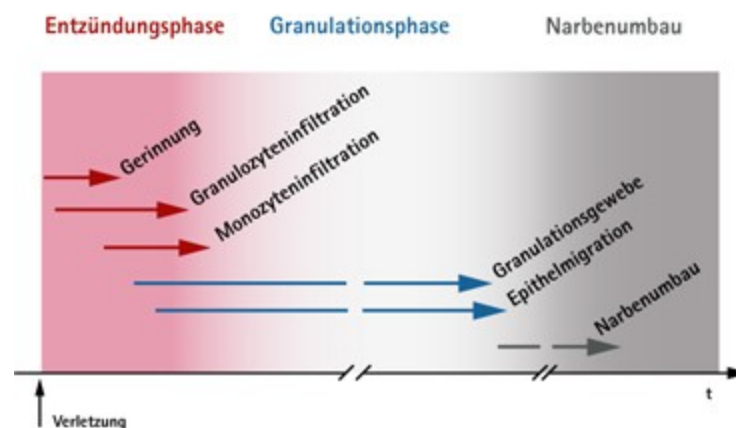


Abbildung 9: Wundheilungsphasen [16]

2.3.1 Definition

Mit Wundheilung bezeichnet man den körpereigenen Verschluss einer Wunde durch weitestgehende Wiederherstellung des beschädigten Körpergewebes. Es handelt sich um einen natürlichen Prozess, der therapeutisch optimiert werden kann.

2.3.2 Stadien der Wundheilung

Die Wundheilung ist ein natürlicher biologischer Prozess, der bereits Minuten nach der Wundsetzung beginnt, wie mit enzymhistochemischen Verfahren nachgewiesen werden konnte.

Man grenzt 4 Phasen der Wundheilung voneinander ab.

Alle 4 Phasen überschneiden sich und sind nicht streng voneinander zu trennen.

2.3.2.1 Exudative Phase

Die erste Phase der Wundheilung erstreckt sich etwa über die ersten fünf Tage nach der Verletzung. In dieser Zeit wird die Wunde provisorisch verschlossen.

Die Lücke im Gewebe wird mit Wundsekret ausgefüllt, die mehr oder weniger starke Blutung durch die Blutgerinnung gestoppt: Dabei wandern Blutzellen (Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten) in den Wundspalt ein. Die Thrombozyten verbinden sich in ein Fibrinnetz und verklumpen zu einem Pfropf (Thrombus).

Die Dilatation der Gefäße im Wundbereich verlangsamt den Blutstrom, es kommt zu einer Hyperämie der Wunde.

Bei oberflächlichen Schürfwunden deckt das geronnene Blut die Wunde nach außen ab und verschorft allmählich, indem es austrocknet. Dieser Schorf ist wie ein „natürliches Pflaster“: Er deckt die Wunde ab, und diese kann darunter gut heilen. Hat sich neues Gewebe gebildet, fällt der Schorf ab.

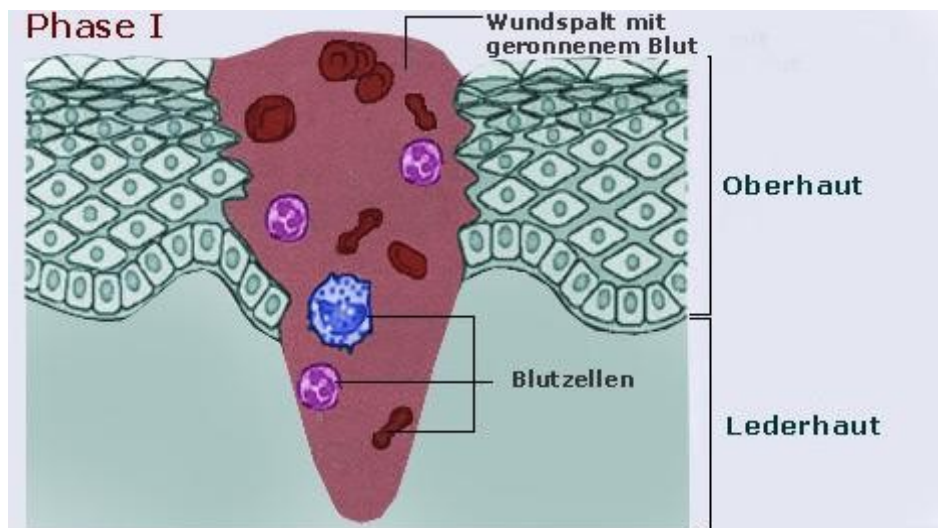


Abbildung 10: Illustrative Darstellung der Phase I der Wundheilung [17]

2.3.2.2 Resorptive Phase (1. – 3. Tag):

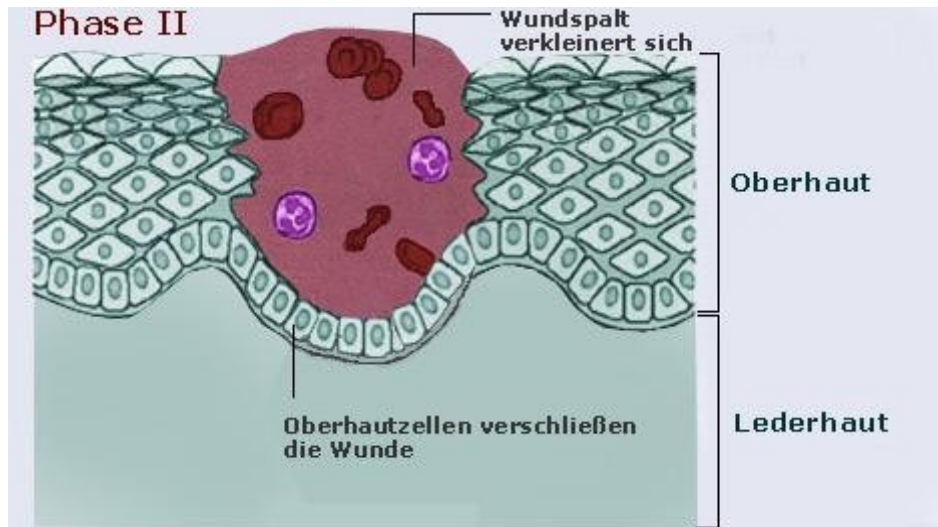


Abbildung 11: Illustrative Darstellung der Phase II der Wundheilung [18]

Phase der katabolen Autolyse:

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen die mit der Phagozytose der Erreger in der Wunde anfangen, nach ca. 12, wenn auch andere Entzündungszellen aktiviert sind, beobachtet man die Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen, die sogar ganze Zellen und Gewebsreste phagozytieren können. Das basale Epithel beginnt sich zu organisieren. Granulationsgewebe bildet sich aus.

2.3.2.3 Proliferationsphase (4.- 7. Tag):

Wie der Name schon sagt, steht hier die Proliferation des neuen Gewebes im Vordergrund. Die Entzündungszellen bilden verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (v.a. TGF-Beta) die die Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten fördern. Diese wiederum produzieren Wachstumsfaktoren die die Angiogenese fördern. Mit der Gefäßeinsprossung ins Granulationsgewebe ist die Nahrungs- und Sauerstoffzufuhr gesichert, und die Wunde kann problemlos abheilen.

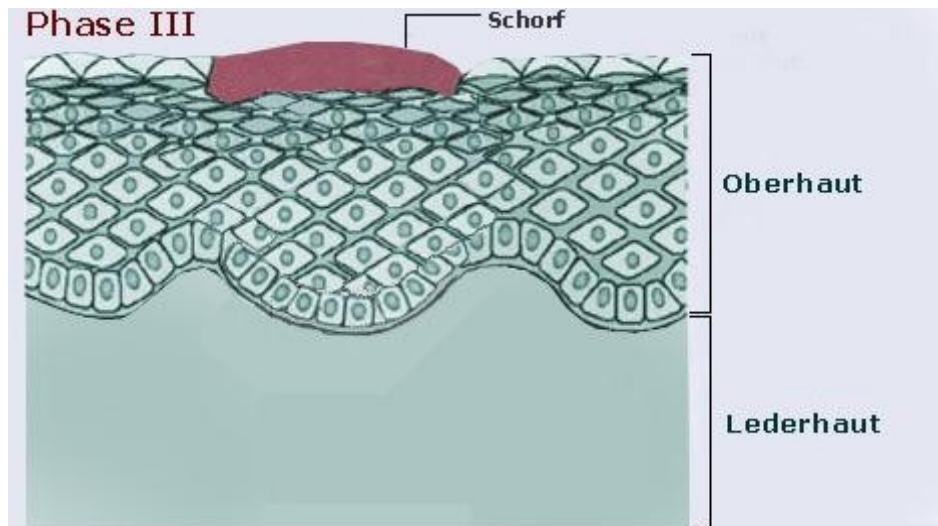


Abbildung 12: Illustrative Darstellung der Phase III der Wundheilung [19]

2.3.2.4 Reparative Phase

In dieser Phase bildet der Körper eine neue Hautoberfläche. Vom Rand der Wunde wachsen neuen Zellen ein (Epidermiszellen), und die Wunde schließt sich allmählich. Die neu produzierten Bindegewebsfasern (Kollagenfasern) reifen aus, das bedeutet sie werden geordnet und verdickt. Durch die Umwandlung von manchen Fibroblasten in Myofibroblasten, zieht sich die Wunde zusammen (Kontraktion). Die Wunde wird reißfest und es entsteht eine Narbe. Die vierte Phase der Wundheilung kann mehrere Monate dauern

2.3.3 Formen der Wundheilung

Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Wundheilung:

2.3.3.1 Primäre Wundheilung:

Glatt begrenzte, eng anliegende Wundränder heilen *per primam intentionem*.

Eine gute Durchblutung der Wunde und saubere, keimarme Wundverhältnisse sind dabei die Voraussetzung für diese Form der Heilung. Besonders nach chirurgischen Eingriffen oder Traumen durch scharfkantige Gegenstände können Wunden primär verheilen.

Aber auch große, oberflächliche Wunden, z.B. Schürfwunden heilen primär, durch Regeneration der Epidermis.

2.3.3.2 Sekundäre Wundheilung:

Lassen sich die Wundränder nicht aneinander legen oder/und sind nekrotisch, und es liegen besonders große Gewebedefekte vor, muss die Wunde *per secundam intentionem*, unter Bildung von Granulationsgewebe heilen. Gewebsneubildung und Wundkontraktion sind dabei die Charakteristika dieser Form der Wundheilung. Auch bei einer Wundinfektion heilt eine Wunde sekundär.

2.3.4 Beeinflussung der Wundheilung

Die Wundheilung kann entweder positiv oder negativ beeinflusst werden.

- Positiv:
 - Sauerstoff
 - Vitamine
 - Wärme
 - Zink
- Negativ:
 - Sauerstoffmangel
 - Grunderkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus
 - Zinkmangel
 - Kälte
 - Keime, Infektion

2.3.5 Störungen der Wundheilung

Die Phasen der Wundheilung können unterbrochen, oder durch bestimmte Einflüsse verzögert werden:

Wundinfektion:

Das Eindringen besonders von Bakterien, kann zu einer Heilungsverzögerung und einer Verschlechterung der Wundverhältnisse führen. Eine tägliche, antiseptische Reinigung des Wundbettes ist hier unerlässlich. In schlimmeren Fällen muss eine systemische Antibiotika-Gabe und/oder chirurgische Intervention erfolgen.

Serom-/Hämatombildung:

Blut- bzw. Gewebsflüssigkeit enthaltene Hohlräume sind eine nicht seltene Komplikation. In einigen Fällen muss eine Punktion der Flüssigkeit erfolgen um das heilende Gewebe zu entlasten.

Keloid:

Derbe Bindegewebswucherungen im Bereich einer Narbe. Charakterisierend ist dabei die Ausbreitung auch auf umliegendes, gesundes Gewebe, Narbenkontrakturen können dabei eine Komplikation darstellen. Man vermutet eine (genetisch bedingte?) Störung der Kollagensynthese als Ursache.

Narbenhypertrophie/Fibrose:

Ebenfalls eine Form der Überwucherung, jedoch im Gegensatz zum Keloid, ist nur das Narbengewebe betroffen. Schnitte längst der Langer'schen Hautlinien können einer Hypertrophie vorbeugen.

Allgemeine Faktoren:

Lebensalter

Begleitkrankheiten

2.3.6 Fibrose

Als Fibrose wird eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes in menschlichen und tierischen Geweben und Organen bezeichnet, dessen Hauptbestandteil Kollagenfasern sind. Dabei wird das Gewebe des betroffenen Organs verhärtet, es entstehen narbige Veränderungen, die im fortgeschrittenen Stadium zur Einschränkung der jeweiligen Organfunktion führen.

Die Vorgänge die zu einer Fibrose führen, sind ähnlich den Mechanismen einer chronischen Entzündung. Es kommt zu einer fehlenden bzw. überschießenden Fehlregulation auf molekularer und zellulärer Ebene im Verlauf der Regenerationsphase. Wahrscheinlich bleibt fehlerhaft ein Stimulus da, der die Aktivierung von Entzündungszellen weiterhin fördert, obwohl der Wundheilungsprozess eigentlich beendet werden sollte. Es kommt nicht zum Stillstand der Proliferation.

Die spontane Entstehung von Autoimmunreaktionen, als einer der begünstigenden Faktoren in der Fibrosierung, wird angenommen.

2.4 Entzündung

Unter einer Entzündung versteht man eine vitale Reaktion auf einen, zumindest in der Anfangsphase, lokalen Gewebeschaden und ggf. auf die zugrunde liegende „Noxe“ (Faktor der eine Gewebeschädigung hervorrufen kann). [20]

Die Entzündung ist eine Schutzreaktion des Organismus. Ziel der Entzündungsreaktion ist die Ursache der Schädigung zu beseitigen, und den ursprünglichen Gewebezustand wiederherzustellen.

Es gibt verschiedene Formen der Entzündung:

Nach der Ätiologie unterscheiden wir: bakterielle, virale, thermische, radiogene, aktinische etc. Entzündungen.

Nach Abwehrlage: normerg, hypererg, hyperg oder anerg.

Nach Dauer und Verlauf: perakute, akute, subakute, chronische und rezidivierende Entzündung.

Je nach Schädigungs- und Reaktionsform: exsudative, nekrotisierende, proliferative und granulomatöse Entzündungen. [21]

Der Entzündungsvorgang findet im gefäßführenden lockeren Bindegewebe (Stroma) der Organe statt. Im Wesentlichen kommt es zu folgenden Reaktionen:

- Dilatation der Arterien - RUBOR - Rötung
- CALOR - Erwärmung (durch vermehrte Durchblutung)
- Öffnung der Interzellularverbindungen der Endothelzellen, Exsudation von Blutplasma ins Gewebe führt zu einem Ödem > TUMOR – Schwellung
- Entzündungszellen setzen Entzündungsmediatoren frei (Leukotriene und Prostaglandine) > DOLOR – Schmerz
- Abheilung mit Heilung (Restitutio ad integrum) oder Narbe (Reparatio)

Rubor, Calor, Tumor und Dolor sind die s.g. **klassischen Kardinalsymptome** einer v.a. akuten Entzündung (Celsus, 30 vor bis 38 nach Christus beschrieben).

Es können sehr viele Faktoren (Noxen) eine Schädigung des Gewebes hervorrufen:

- Mikroben: Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen, Würmer
- Chemische Substanzen: Säuren ,Laugen
- Physikalische Faktoren: Hitze, Kälte, Strahlung
- Immunreaktionen

2.4.1 Akute Entzündung

Diese Reaktion ist durch ein plötzliches, schnelles Auftreten gekennzeichnet.

Das Krankheitsbild ist klinisch und morphologisch sehr vielfältig und auffällig.

Die Entzündungsantwort ist so ziemlich stereotypisch.

Die akute Entzündung ist durch oben genannte Kardinalsymptome charakterisiert.

Vaskuläre Reaktionen

Vaskuläre Reaktionen einer akuten Entzündung können wir in 3 wesentliche Phasen unterteilen:

- **Phase 1:** Kontraktion der Arteriolen durch einen Reiz (Noxe), daraufhin kommt es zu einer Minderdurchblutung (Ischämie).
- **Phase 2:** Tritt wenige Minuten nach der ersten Phase ein. Es kommt hier zu einer Vasodilatation der Arteriolen durch diverse Entzündungsmediatoren (Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Kinine, PAF). Die Permeabilität wird gesteigert durch Endothelveränderung (Histamine, Leukotriene, C3a, C5a). Es kommt zu einer vermehrten Durchblutung, dessen Zeichen Rubor und Color sind. Das Zeichen der erhöhten Permeabilität ist die Schwellung (Tumor). Das Ödem ist erst eiweißarm, dann eiweißreich.
- **Phase 3:** Tritt 1-2 Stunden nach Reizeinwirkung ein. Durch weitere Permeabilitätssteigerung kommt es zum Austritt des Blutplasmas ins Interstitium. Folge ist die Strömungsverlangsamung bis ev. zur kompletten Stase.

Zelluläre Reaktionen

Im Mittelpunkt der akuten Entzündung steht die Auswanderung von Leukozyten aus der Blutbahn ins Gewebe. Die zellulären Reaktionen der Leukozyten lassen sich in 4 Schritte unterteilen. [22]

- Margination (Wechsel aus dem zentralen, schnell fließenden, in den randnahen, langsam fließenden Strombereich)
- Interaktionen mit dem Endothel (endothelial- leukozytäre Interaktion)
- Emigration und positive Chemotaxis
- Phagozytose

2.4.1.1 Zellen der akuten Entzündung

Neutrophile Granulozyten

Zentrale Rolle im Frühstadium der akuten Entzündung stellen die neutrophilen Granulozyten dar. Sie haben einen Durchmesser von 12 µm, einen segmentierten Kern und zytoplasmatische Granula. Ihre wichtigste Funktion ist die Phagozytose von Bakterien. Sie sind in kurzer Zeit in sehr großer Zahl verfügbar. Sie sterben nach der Phagozytose ab. Neutrophile Granulozyten haben drei Arten von Granula, mit verschiedenen Enzymen, manche lysosomale Enzyme werden in den Extrazellulärraum abgegeben. Neutrophile Granulozyten können vermehrt Adhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche exprimieren und durch Mediatoren weitere Entzündungszellen anlocken. Diese Zellen tragen der Verflüssigung des angrenzenden Gewebes bei.

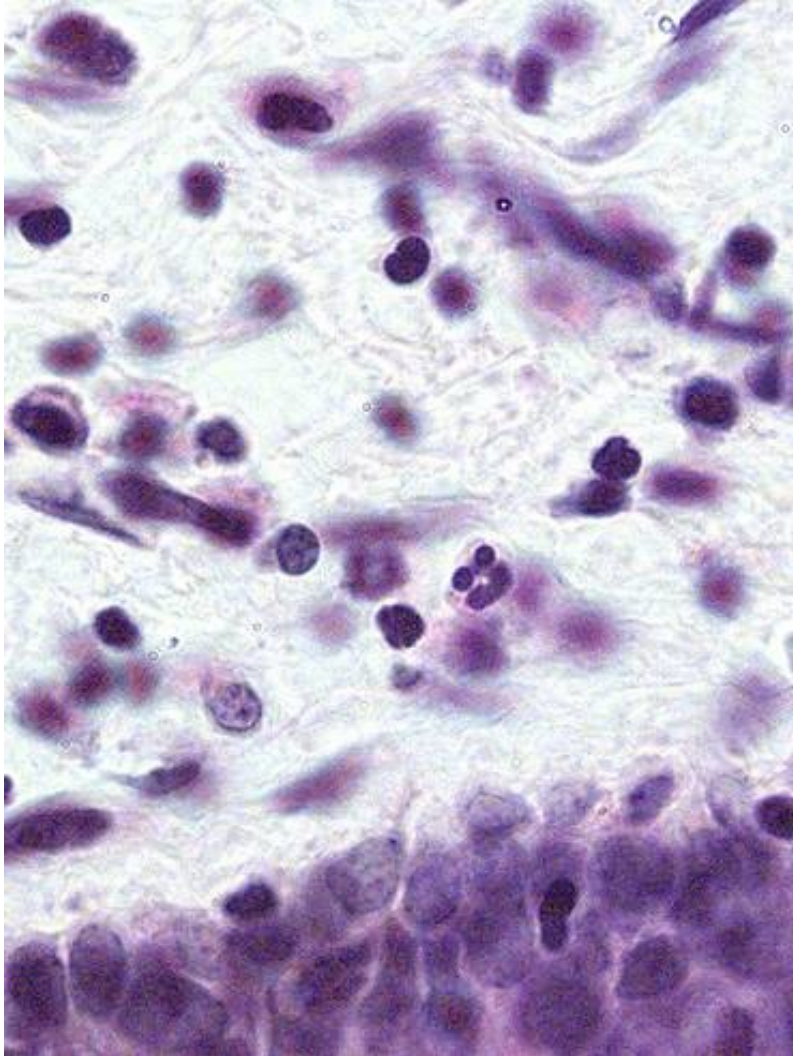


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme von neutrophilen Granulozyten [23]

Eosinophile Granulozyten

Die wichtigste Aufgabe eosinophiler Granulozyten ist die Vernichtung von Parasiten. Durch Chemotaxis gelangen sie in das Entzündungsareal und phagozytieren dort Antigen-Antikörper Komplexe. Sie dämpfen und begrenzen die Entzündungsreaktionen.



Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme von eosinophilen Granulozyten [24]

2.4.1.2 Die Folgen einer akuten Entzündung

Die akute Entzündung kann unterschiedliche Folgen haben. Sie heilt meistens mit einem Restitutio ad Integrum ab, wobei der ursprüngliche Zustand des Gewebes wiederhergestellt wird. Falls die Wunde kontaminiert wird, kann es zu einer Störung der Wundheilung kommen z.B. durch Abszessbildung. In solchen Fällen kann die Wunde nur durch ein neues s.g. Granulationsgewebe verschlossen werden. Dies wäre die sekundäre Wundheilungsart, mit Entstehung einer Narbe. Wenn die Noxe länger vorhanden bleibt, kann die akute Entzündung in eine chronische Verlaufsform übergehen.

Es kann auch zu einer Überwucherung der Narbe im Sinne einer Fibrose kommen.

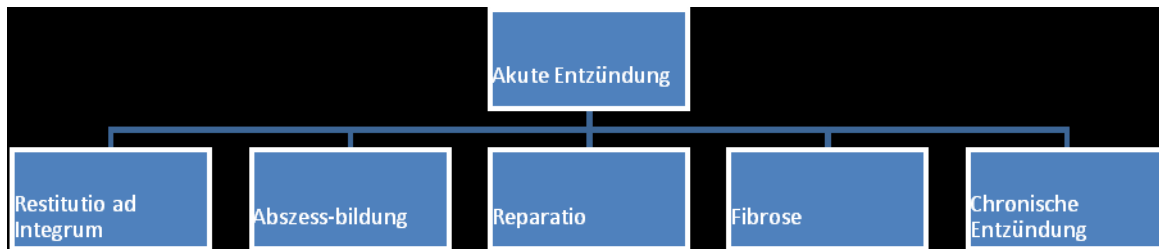


Abbildung 15: Mögliche Folgen der akuten Entzündung

2.4.2 Chronische Entzündung

Die chronische Entzündung wird durch Persistenz des Entzündungsreizes hervorgerufen und kann über Wochen, Monate oder Jahre anhalten. [25] Also, es handelt sich um eine prolongierte Entzündung, in der vier Dinge gleichzeitig ablaufen können: aktive Entzündung, Gewebsschaden, Heilung und Narbenbildung. [26]

Histologisch steht die histiozytenreiche Entzündung im Vordergrund. (Abb.16)

Die Histiozyten sezernieren Monokine, die ihrerseits eine Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen (Angiogenese) auslösen. Das Ergebnis ist ein Granulationsgewebe, welches aus verschiedenen Elementen besteht [27]:

- Zellulären Infiltraten (Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen etc.)
- Kapillaren
- Fibroblasten

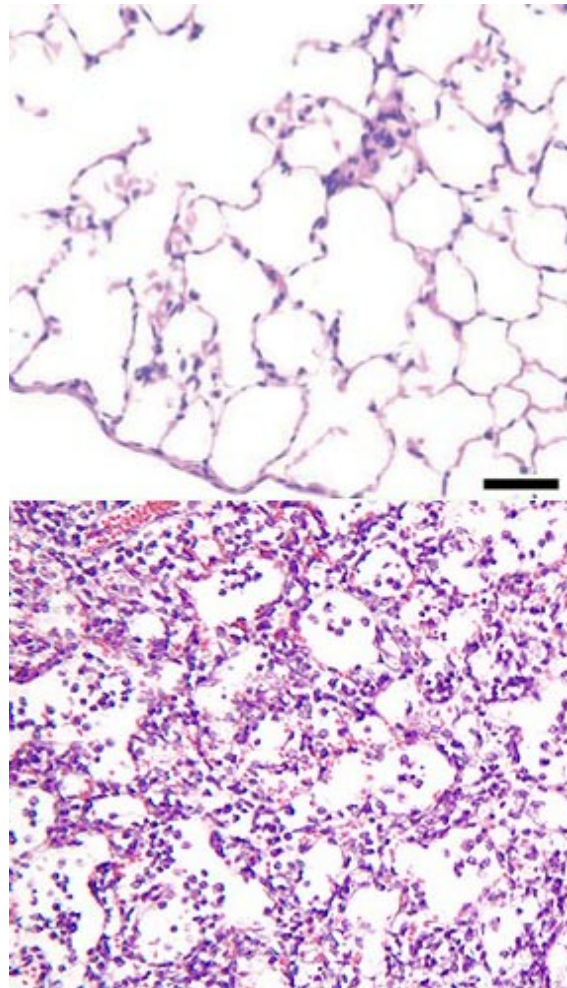


Abbildung 16: Histologische Aufnahme einer Entzündung im Lungengewebe [28]

2.4.2.1 Zellen der chronischen Entzündung

Monozyten/ Makrophagen

Diese Zellen sind Bestandteile des monozytären phagozytischen Systems (MPS). Man unterscheidet nicht spezialisierte von spezialisierten (antigenpräsentierenden) Makrophagen. Nach Auswanderung aus dem Blut ins Gewebe, differenzieren die Monozyten zu Gewebsmakrophagen. Diese phagozytieren, stimulieren Adhensionsmoleküle, aktivieren Fibroblasten und lösen eine Reihe von systemischen Reaktionen aus.

Lymphozyten

Bei akuten Entzündungen sind sie meistens in geringer Anzahl vorhanden, bei chronischen Entzündungen können sie jedoch das Bild bestimmen.

Ihre Aufgabe erfüllen die Lymphozyten auf verschiedene Weise. Sie setzen beispielsweise Botenstoffe (Zytokine) frei, die andere Immunzellen und auch normale Zellen dazu bringen, potentielle Gefahren wie Bakterien und Viren zu bekämpfen. Darüber hinaus produzieren sie Antikörper, die diese „Angreifer“ als „fremd“ markieren, und sie zerstören infizierte Zellen. [29]

Es gibt verschiedene Typen von reifen Lymphozyten:

- T-Lymphozyten - T-Killerzellen (CD8 positiv)
- T-Helferzellen (CD4- positiv)
 - TH1-T-Zellen
 - TH2-T-Zellen
- Regulatorische T- Zellen (T-reg, „T- Suppressorzellen“, vermitteln Toleranz gegenüber Antigenen und können den Entzündungsprozess beenden)
- Gedächtnis-T-Zellen (merken sich das Antigen, so kann im Fall dass dieses Antigen wieder in den Körper gelangt ,eine schnellere Immunantwort geben)
- B-Lymphozyten: - Plasmazellen (produzieren große Mengen an Antikörpern)
 - Gedächtnis B- Zellen

- NK-Zellen (englisch natural killer cells)

Zwischen T- Lymphozyten und Makrophagen besteht eine wechselseitige Abhängigkeit. Sie stimulieren sich gegenseitig im Entzündungsprozess, solange bis das Antigen beseitigt ist.

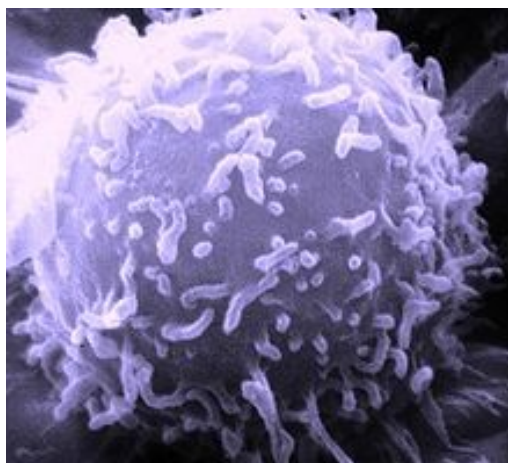


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten [30]

Plasmazellen

Sind Endpunkt der Differenzierung der B- Lymphozyten. Sie sind in der Lage sehr große Mengen von Antikörpern zu produzieren, gegen Antigene die präsentiert worden sind.

In der chronischen Entzündungsreaktion, wie auch in der akuten sind viele Zellpopulationen und Subpopulationen beteiligt. Nur die wichtigsten sind erwähnt.

2.4.2.2 Formen der chronischen Entzündung

Primär chronische Entzündung

Kommt bei persistierenden, weniger aggressiven Reizen vor. Sie hat von Anfang an einen chronischen Verlauf, z.B. HPV, Autoimmunreaktionen etc.

Sekundär chronische Entzündung

Diese Form entwickelt sich meist aus einer akuten Entzündung durch Erregerpersistenz, oder durch Autoimmunphänomene die konstant auf Entzündung eingestellt sind, auch wenn die Noxe z.B. nicht mehr vorhanden ist. Man kann verschiedene Reaktionsphasen parallel beobachten.

2.4.2.3 Morphologische Merkmale der chronischen Entzündung

Pathologisch- anatomisch kann man folgende Subtypen unterscheiden:

- Chronische granulierende Entzündung
- Chronische lymphozytäre Entzündung
- Granulomatöse Entzündung

Chronisch granulierende Entzündung

Bei dieser Entzündungsform steht das Granulationsgewebe, besteht aus Makrophagen, neu gebildeten Kapillaren und Fibroblasten im Mittelpunkt (Abb18.).

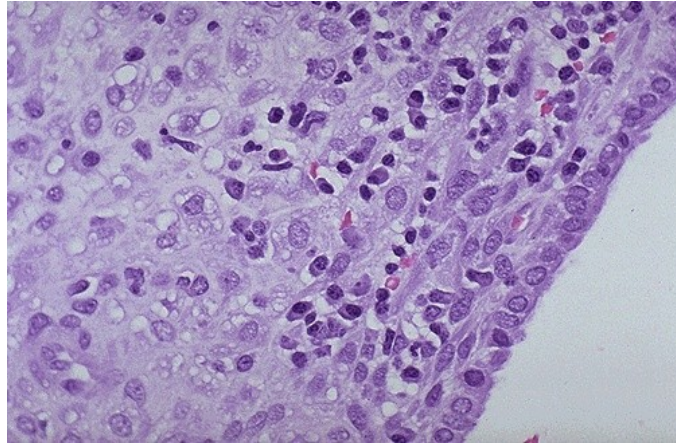


Abbildung 18: Histologisches Bild einer chronisch granulierenden Endometritis [31]

Im Mittelpunkt dieser Entzündungsform steht der Makrophage. Er sezerniert Monokine:

- PDGF (platelet derived growth factor), stimuliert Fibroblasten Bildung von kollagenen Bindegewebe
- b FGF(basic Fibroblast growth factor), verantwortlich für Proliferation von Fibroblasten und Angiogenese
- TNF- α (tumor necrosis factor α) , für Angiogenese und Kapillarbildung

Die Angiogenese beginnt mit Ausbildung von epithelialen soliden Knospen, die sekundär Lumina ausbilden und miteinander anastomosieren. Die Kapillaren besitzen zunächst keine Basalmembran und sind deshalb extrem permeabel. [32] Fibroblasten bilden kollagenes Bindegewebe. Die neu gebildeten Kapillaren versorgen das Granulationsgewebe mit Nahrung und Sauerstoff.

Morphologisch sind drei Zonen zu unterscheiden:

- **Resorptionszone** (Makrophagen phagozytieren, durch Phagozytose von Fettzellen entstehen s.g. Schaumzellen und durch Phagozytose von Erythrozyten entstehen s.g. Siderophagen/Ablagerung von Siderin in den Makrophagen)
- **Reparationzone** (Kapillarsprossen)
- **Bindegewebszone** (kollagene Fasern)

Subtypen der granulierenden Entzündung:

- chronisch xanthomatöse Entzündung: viele Schaumzellen. z.B.: xanthomatöse chronische Pyelonephritis
- hypertropische granulierende Entzündung: Starke Granulationsgewebsbildung z.B.: Granulationspolypen
- fibrosierend- sklerosierende Entzündung: kollagenes Bindegewebe z.B.: Kapsel fibrosensyndrom bei Mammoprothese

Chronische lymphozytäre Entzündung

Im Mittelpunkt dieser Entzündungsform steht die Infiltration von Lymphozyten, durch welche es zu einer Parenchymdestruktion und Vernarbung kommt. Typisch für Autoimmunerkrankungen, z.B. chronische lymphozytäre Thyreoiditis „Hashimoto“.

Granulomatöse Entzündung

Granulomatöse Entzündungen stellen eine besondere Form chronischer Abwehrreaktionen dar, deren Charakteristikum die Ausbildung kleiner knötchenförmiger (granulum = Körnchen) Ansammlungen von Entzündungszellen, hauptsächlich Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen. Diese Granulome sind meist nur wenige Millimeter groß, sie können damit aber bereits makroskopisch sichtbar und tastbar werden. Mitunter erreichen Granulome auch deutlich größere Durchmesser, so z.B. Granulome vom rheumatoiden Typ und Fremdkörpergranulome.[33]

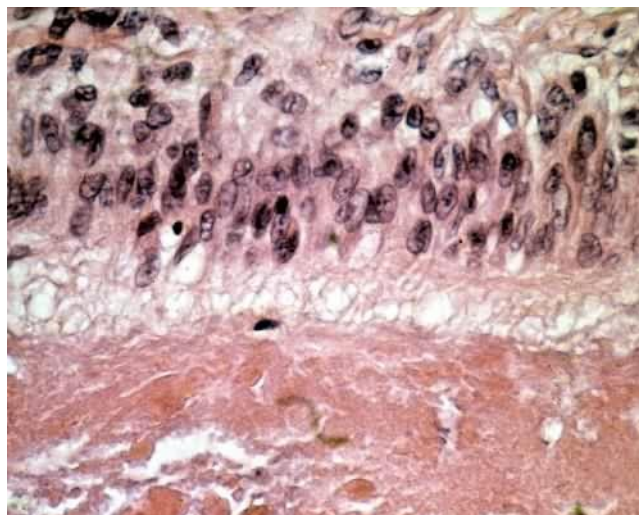


Abbildung 19: Epitheloidzellen [33]

Palisaden-ähnlich angeordnete Epitheloidzellen. Wie das in Abb.19, können Erreger oder andere Bestandteile der zentralen Nekrose nicht aus dem Granulom heraus bzw. über die Palisade hinweg.

Granulomatöse Entzündungen werden auch als "spezifische" Entzündungen bezeichnet. Dieser Begriff ist historisch und geht auf die damalige Auffassung zurück, man könne aus dem histologischen Bild auf die Ursache der Entzündung schließen. Man hatte allerdings bald festgestellt, dass es nicht nur morphologisch verschiedene Granulomtypen gibt, sondern auch verschiedene Erreger und unbelebte Noxen die Bildung gleichartig aufgebauter Granulome induzieren können: Asbest, Silikose, schwer abbaubare Fremdkörper, Plastik, Mykobakterien etc. Der Nachweis von Granulomen erlaubt also nur sehr eingeschränkt Rückschlüsse auf die Ursache der Entzündung.

Aufbau:

- Resorptionszone mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, sowie Nekroseresten.
- Zell- und kapillarreiches Granulationsgewebe (Zone der Bindegewebeneubildung) mit Fibroblasten und Endothelzellen.
- Zellarmes Narbengewebe mit Überwiegen von Bindegewebsfasern.

Im Verlauf der chronischen granulierenden Entzündung wird also eine Nekrose abgebaut und der Gewebedefekt durch eine Narbe verschlossen.

Epitheloidzellen entwickeln sich unter dem Einfluss von T-Helfer-Zellen durch Differenzierung aus Makrophagen/Histiozyten. Die Epitheloidzellen zeigen eine enge Verzahnung ihrer Zellmembranen untereinander und weisen daher ein epithelähnliches ("epitheloides") Bild auf. In den voll ausgebildeten Granulomen umschließen die Epitheloidzellen das Granulomzentrum wie ein Wall oder eine Palisade.

Mehrkernige Riesenzellen sind oft Bestandteile von Granulomen. Diese Riesenzellen entstehen durch Konfluenz zahlreicher Histiozyten bzw. Gewebsmakrophagen unter Ausbildung eines Synzytiums (Abb.20). [34]

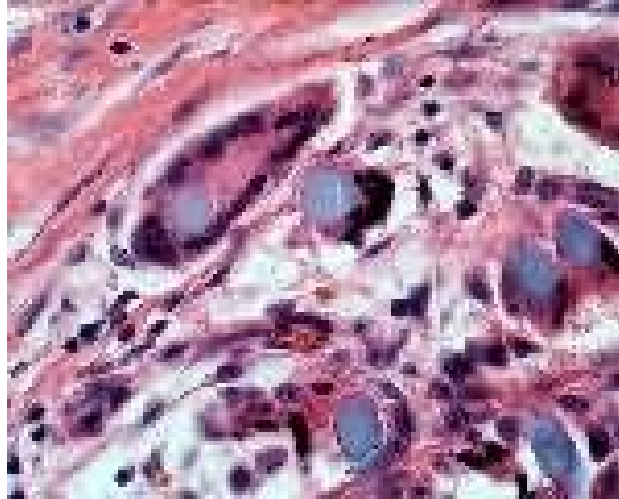


Abbildung 20: Mehrkernige Riesenzellen [35]

Granulomtypen:

- Epitheloidzellgranulom
- Histizytäres Granulom

Man unterscheidet unter den epitheloidzelligen Reaktionsformen [36]:

- kleinherdige Epitheloidzellansammlungen ("sarcoid-like lesions"),
- Epitheloidzell-Granulome ohne verkäsungsartige Nekrose (Sarkoidose-Typ),
- Epitheloidzell-Granulome mit verkäsungsartiger Nekrose (Tuberkulose-Typ),
- Epitheloidzell-Granulome mit zentralem Abszess (Pseudotuberkulose-Typ),
- Granulome vom rheumatoiden Typ

und unter den histiozytären granulomatösen Reaktionsformen:

- Granulome vom rheumatischen Typ,
- Granulome vom Fremdkörpertyp
- gemischtzellige Granulome.

2.5 Zell-Zell –Interaktionen

2.5.1 Adhäsionsmoleküle

Die Kommunikation und Interaktion von Zellen ist für fast alle Abläufe im Immunsystem erforderlich, v.a. beim Entzündungsvorgang ist die Zellinteraktion

essentiell. Es sind verschiedene Zellinteraktionsarten beschrieben. Eine wichtige Rolle bei diesen Vorgängen spielen die s.g. Adhäsionsmoleküle.

Zelladhäsionsmoleküle (auch CAMs, engl. cell adhesion molecule) sind Membranständige Proteine, die an der Zelloberfläche der meisten Zellen exprimiert werden. Nach dem Rezeptor-Ligand-Prinzip wird ein gezielter Kontakt zwischen Zellen hergestellt und auf diese Weise eine Kommunikation ermöglicht. Der Zell-Zell-Kontakt induziert eine Vielfalt von Folgereaktionen, wie die intrazelluläre Aktivierung von Botenstoffen mit damit verbundenen Ereignissen (Umgestaltung und Steuerung des Cytoskeletts, Clusterbildung von Oberflächenproteinen im Zell-Zell-Kontaktbereich usw.). Viele Adhäsionsmoleküle werden nur zeitlich begrenzt auf der Zelloberfläche präsentiert. Durch entsprechende Signale kann in kürzester Zeit eine temporäre Erhöhung der Konzentration der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche erreicht werden, wodurch es zu einer Verstärkung des Zell-Zell-Kontaktes kommt. Nach Abklingen des Signals und des damit verbundenen Effektes nimmt die Zahl dieser Verbindungen auf der Zelloberfläche wieder ab. Die verschiedenen Familien von Adhäsionsmolekülen üben im menschlichen Körper eine Vielzahl bedeutender Funktionen aus, die auf die meisten dynamischen Prozesse im Organismus ausgerichtet sind. [37]

Adhäsionsmoleküle können wir in Familien unterteilen:

- Selektinfamilie: GMP 140, PAGDEM, ELAM-1, LECAM-1 etc.
- Immunglobulinfamilie: ICAM-1, ICAM-2 etc.
- Integrinfamilie: LFA-1, VLA-1, p 150/95 etc.
- Sonstige Glykoproteine: GlyCAM, sLeA etc.

2.5.2 Endothel-Leukozyten- Interaktion

Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in das geschädigte Gewebe ist für die Entzündungsreaktion essentiell, und wird über Adhäsionsmoleküle gesteuert (Abb.21).

Schema einer Leukozytenemigration

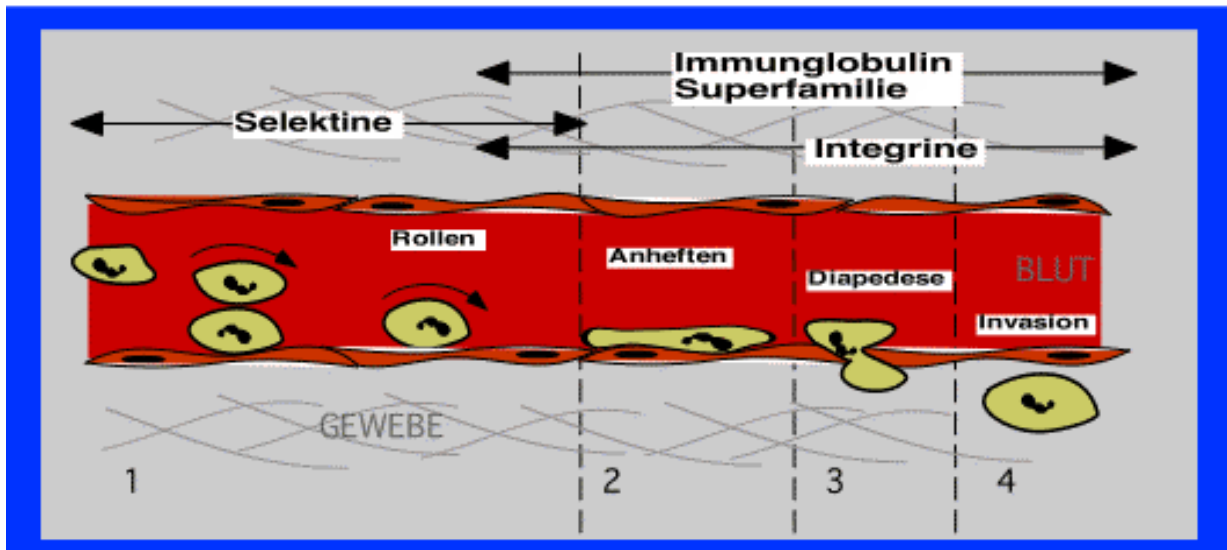


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Endothel-Leukozyten-Interaktionen [37]

Die leukozytäre Adhärenz an das Endothel wird durch die Affinität der Integrin-Rezeptoren bestimmt. Durch Adhäsionsmolekül PAF werden neutrophile Leukozyten aktiviert und es kommt zu einer Konformationsänderung des LFA-1 Integrins, dadurch entsteht eine feste Bindung zwischen Leukozyten und Endothelzelle.

2.5.3 Die CD- Nomenklatur

Für Adhäsionsmoleküle gibt es auch eine CD (Clusters of differentiation)-Nomenklatur, z.B. ICAM-1 ist CD 54. Zur Zeit sind über 300 Cluster bekannt. Clusters sind Gruppen von immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen, die sich biochemisch oder funktionell unterscheiden.

Manche sind spezifisch für bestimmte Zellen, z.B.:

- CD 1- Thymozyten, Langerhanszellen, dendritische Zellen, einzelne B-Zellen
- CD2- T-Zellen, Thymozyten, NK-Zellen
- CD 4- T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen
- CD8- zytotoxische T-Zellen, Supressorzellen
- CD 19- alle B-Zellen
- CD 30- aktivierte B- und T- Zellen, Hodgkin- und Sternberg-Reed- Zellen
- CD 40- reife B-Zellen, einzelne Epithelzellen, dendritische- und karzinom Zellen

Im Zusammenhang mit chronisch fibrosierenden Prozessen sind die Interaktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen (MHC-Klasse II) und T-Lymphozyten (CD4+) von Bedeutung, sowie deren Interaktion mit Fibroblasten. Der T-Zell Rezeptor interagiert mit dem CD3-Komplex und CD 40 bzw. CD 8 als Co-Rezeptor-Moleküle, und die T-Zelle wird aktiviert.

Sie proliferieren und produzieren Zytokine, und wirken so auf andere Entzündungszellen.

Das co-stimulatorische Molekül CD 40 ist nicht nur an der Oberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen zu finden, sondern auch auf Fibroblasten und Keratinozyten. Deshalb scheint CD 40 eine besondere Rolle in der Entstehung von unerwünschten fibrosierenden Vernarbungen zu spielen. Die CD 40+ -Zellen können somit mit T-Lymphozyten, Mastzellen und aktivierten Thrombozyten interagieren. Diese exprimieren an ihrer Oberfläche den CD 40-Ligand bzw. CD 154 Rezeptor. Die CD 40-CD 40 Ligand Interaktion stimuliert wiederum Fibroblasten zu Proliferation und Produktion von Zytokinen.

2.6 Mononukleäres phagozytisches System (MPS)

Das MPS ist ein wichtiger Teil des s.g. retikuloendothelialen Systems. Die Zellen des MPS gemeinsam mit den Granulozyten stellen das unspezifische zelluläre Abwehrsystem dar.

Die Zellen des MPS sind die Makrophagen. Alle Abwehrzellen haben die gleiche hämatopoetische Vorläuferzelle (Abb.21). Die hämatopoetische Vorläuferzelle entwickelt sich unter dem Einfluss von Zytokinen und Stromafaktoren (IL-3, SCF etc) im Knochenmark zum Monoblasten, der sich weiter zum Monozyten differenziert. Monozyten bleiben im peripheren Blut wenige Stunden bis drei Tage. Monozyten sind 10-11 µm im Durchmesser und haben wenige Granula. Wenn der Monozyt im Blut durch chemotaktische Mediatoren angeregt wird, wandert er ins Gewebe aus (Chemotaxis). Im Gewebe differenziert sich der Monozyt, morphologisch und funktionell in den Makrophagen. Makrophagen sind größer 15-80 µm im Durchmesser, phagozytieren aktiv und leben mehrere Wochen. In jedem Gewebe gibt es Makrophagen, ohne diese Zellen könnte der Körper nicht überleben.

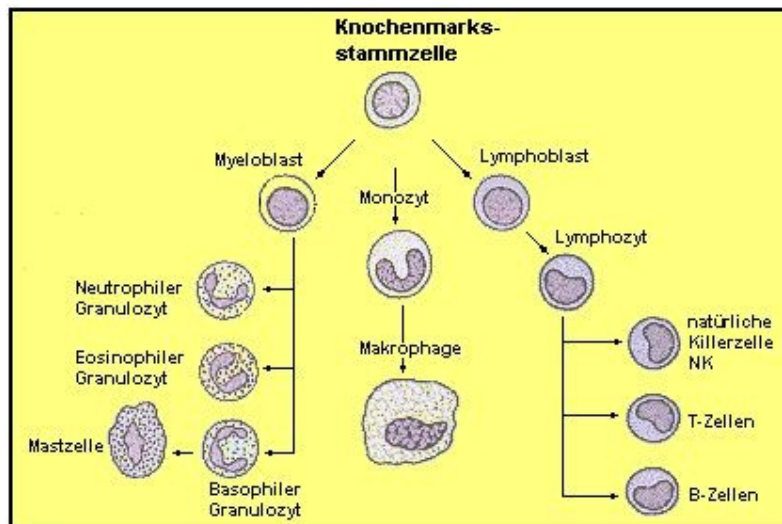


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Myeloopoese [39]

Man unterscheidet nicht spezialisierte Makrophagen, die durch Kontakt mit einem Antigen aktivieren (Monozyten des Blutes, Osteoklasten, Kupffer-Sternzellen etc.) von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen, die ortsständig sind und lange Ausläufer haben (Langerhans-Zellen, interdigitierende Retikulumzellen, folliculäre dendritische Retikulumzellen).

Makrophagen haben verschiedene Rezeptoren an ihrer Oberfläche (CD 14, TLR etc.) und damit auch verschiedene Funktionen.

2.6.1 Die Funktionen der Makrophagen

- Phagozytose
- Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und anderen Mediatoren
- Antigenpräsentation

2.6.1.1 Phagozytose und Antigenpräsentation

Makrophagen eliminieren mittels Phagozytose nekrotisches Gewebe und Zellreste ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, wie „Saubermacher“ im Gewebe. Die zentrale Funktion ist jedoch die Beseitigung von Erregern (Bakterien, Viren etc.). Der Makrophage wird durch verschiedene Mediatoren aktiviert (IFN, Komplementfaktor C3a, Lipopolysaccharide etc.). Der aktivierte Makrophage nimmt unspezifisch den Erreger auf, er umfasst ihn mit Pseudopodien (Scheinfüßchen). Es kommt zu einer Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran im Zytoplasma und der aufgenommene Erreger befindet sich also in einer Vakuole, dem s.g. Phagosom. Das Phagosom verschmilzt mit dem Lysosomen im Zytoplasma und von dort werden

Verdauungsenzyme freigesetzt welche den Erreger zerkleinern (Abb.22). Die entstandenen Antigene werden den T-Helferzellen mit Hilfe von MHC-Klasse –II und CD 28 präsentiert. Makrophagen beteiligen sich also sowohl am unspezifischen Immunsystem durch die Phagozytose, als auch am spezifischen durch die Antigenpräsentation. Die Makrophagenmembran wird parallel zu diesen Vorgängen permanent neu synthetisiert.

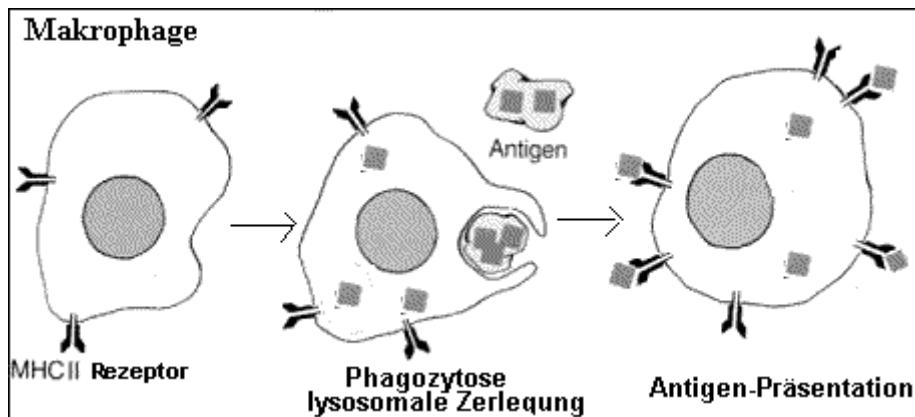


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation [40]

2.6.2 Die Sekretionsprodukte der Makrophagen

Makrophagen setzen eine viele Substanzen frei, die zur Immunabwehr beitragen, auf andere Zellen stimulierend wirken, Erreger abtöten können und Umbau von Gewebe fördern können. Antimikrobiell wirken Lysosomale Enzyme die freigesetzt werden im Rahmen der Phagozytose, wie z.B. Lysozym, saure Phosphatase, Elastase etc. Von Makrophagen gebildeter Stickstoffmonoxid(NO) wirkt nicht nur antimikrobiell sondern fördert die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen, wie Histamin. Makrophagen produzieren auch Zytokine(TGF, FGF, VEGF, PDGF) die auf Fibroblasten wirken, eine Angiogenese und Kollagensynthese bewirken. Es werden auch Chemokine freigesetzt(Substanzen die chemotaktisch wirken): MCP1, MCP1 a/b, Interferone, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine etc.

2.6.3 Die Chemotaxis

Chemokine (chemotaktische Substanzen) wie Komplementfaktor C5a, IL-16, MCP-1, MIP-1 und LTB4 werden von Entzündungszellen oder von Erregern selbst freigesetzt.

Diese Substanzen aktivieren die Makrophagen, so dass sie sich in Richtung höhere Konzentration der Chemokine bewegen. Diese Bewegung in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration nennt man Chemotaxis.

2.6.4 Aktivierung von Makrophagen

Makrophagen können auf zwei Arten aktiviert werden: klassisch (zelluläre Immunantwort) und alternativ (humorale Immunantwort).

Unter einer Immunantwort versteht man eine Reaktion des Immunsystems auf einen Erreger oder eine Substanz die als „Fremd“ erkannt wird. Die Immunantwort wird in eine angeborene und eine erworbene Immunantwort unterteilt. Die angeborene Immunantwort, wie der Name sagt ist eine angeborene Reaktion, die erworbene wird erst durch diverse Reaktionen im Körper erworben. Makrophagen werden im Rahmen der erworbenen Immunantwort unterschiedlich aktiviert, je nachdem, ob eher eine humorale Immunantwort, oder eher eine Zelluläre zytotoxische Immunantwort im Vordergrund steht.

2.7 Arthrofibrose

Die Arthrofibrose ist eine gefürchtete, in ihrer Ätiologie weitgehend unaufgeklärte Gelenkerkrankung nach operativen Eingriffen oder Verletzungen, aus der eine teils schmerzhafte Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit resultiert. Es handelt sich um eine massive Bindegewebsneubildung. Es gibt Studien die auf eine chronische Entzündung hinweisen. Es finden sich hyperplastische, mehrlagige Synovialzellschichten in den betroffenen Gelenken. Lymphoplasmazelluläre Infiltrate v.a. MHC-Klasse II-positive Zellen und Kollagen Typ IV sind vermehrt und man findet eine lokale perivaskuläre Fibrosierung. Dies sind Faktoren die auf einen chronischen entzündlichen Vorgang deuten.

Folgende Ursachen der exzessiven Narbenbildung werden zusammengefasst diskutiert:

- Aktivierung und Vermehrung von Fibroblasten (Bindegewebszellen) im Rahmen eines initialen Entzündungsprozesses.
- Chronische Entzündungsreaktion im Rahmen eines immunreaktiven Prozesses.
- Dysbalance zwischen pro- und kontrainflammatorischen Zytokinen (Entzündungsbotenstoffen).

- Hypoxie - Reperfusionsschaden – Theorie (Durchblutungsstörung)
- Genetische Faktoren

Die meisten Studien in der Literatur beschäftigten sich mit der Ausbildung einer Arthrofibrose des Kniegelenkes nach Verletzungen und Kreuzbandplastik. Unter klinischen Gesichtspunkten wird eine Arthrofibrose des Kniegelenkes durch eine dauerhafte Bewegungseinschränkung von $> 10^\circ$ für die Streckung und $<125^\circ$ für die Beugung definiert. (vgl. dr-gumpert.de/html/arthrofibrose.html)

Unterschieden werden:

Primäre Arthrofibrose, welche durch eine generalisierte Narbenbildung im Gelenk gekennzeichnet ist.

Sekundäre Arthrofibrose, bei der lokale mechanische Irritatoren für eine Bewegungseinschränkung ursächlich sind.

Da die genaue Ätiologie noch nicht bekannt ist, bleibt nur die konservative Therapie als Therapieoption.

Diese beinhaltet: Physiotherapie, NSAR, Physikalische Therapie (Wärme, Kälte, Elektrotherapie, Ultraschall etc.)

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Immunhistochemie

Zur Lokalisation von Proteinen in Zellen und Geweben wird die Immunhistochemie eingesetzt. Dazu werden markierte, mit Mikroskop nachweisbare, Antikörper (Immunglobuline) benötigt. Diese sind in der Regel mit fluoreszierenden Farbstoffen, Enzymen oder Goldpartikeln gekoppelt. [40] In der Immunhistochemie nutzt also man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Dazu eignen sich besonders Antigene, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten. Das Färberegebnis wird anschließend lichtmikroskopisch beurteilt.

Antigene:

Ein Antigen ist eine Substanz, die einen „Fremdstoff“ für den Wirtsorganismus darstellt, die Bindung von spezifischen Antikörpern stimuliert und mit den Antikörpern, die gebildet wurden, entsprechend reagieren kann. [41] Diese Reaktion führt zu Bildung von Antigen-Antikörper Komplexen.

Antikörper:

Ein Antikörper ist ein Serumprotein, das als Antwort auf den Kontakt mit einem Antigen gebildet wird. Antikörper sind in der Gammaglobulinfraktion des Serums enthalten und werden Immunglobuline (Ig) genannt. Sie werden nach Größe, Gewicht, Struktur und Funktion in fünf Klassen unterteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Antikörperlösungen enthalten meistens IgG Antikörper können je nach Anzahl der Epitope (Bindungsmöglichkeiten), mono- oder polyklonal sein. Antikörper mit einem Epitop haben gewisse Vorteile gezeigt, wie hohe Homogenität und niedrige Qualitätsschwankungen.[42]

Enzyme, Substrate und Chromogene:

Enzyme die farblose Chromogene in gefärbte Endprodukte umwandeln sind meistens:

Meerrettichperoxidase (HRP-horseradish peroxidase)

Diese aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnen und ist in Lösung braun gefärbt. Aktives Zentrum ist das Hämatin. Am häufigsten wird AEC (3 Amino-9Ethylcarbazol) verwendet. AEC oxidiert in ein rotes, alkohollösliches Endprodukt. Der Nachteil ist die Empfindlichkeit gegenüber fortschreitender Oxidation (bleicht aus).

Peroxidase wird aus folgenden Gründen verwendet:

- Sie ist klein, verdrängt Antikörper nicht
- In hochgereinigter Form leicht erhältlich
- Stabil
- Endogene Peroxidase leicht unterdrückbar
- Viele Chromogene bilden mit ihr ein färbiges Präzipitat
- Billig

Alkalische Phosphatase (AP):

Wird aus dem Darm von Kälbern gewonnen und übertragen Phosphatgruppen von organischen Estern. Es entstehen unlösliche Azofarbstoffe (meistens rot oder blau).

3.1.1 Färbemethoden

Es gibt verschiedene Färbemethoden um zelluläre Antigene zu lokalisieren. Es hängt von verwendeten Präparaten, Schnittarten und dem Kosten-Nutzen-Verhältnis ab, für welche Methode man sich entscheidet. Die wichtigsten sind: direkte, indirekte, PAP- und Avidin-Biotin-Methode.

Direkte Methode/1-Schritt-Methode

Ein spezifischer Antikörper ist an Peroxidase gekoppelt und gegen ein spezifisches Antigen gerichtet. Sie ist eine der ältesten Immunhistochemischen Methoden.

Vorteil: Wenig unspezifische Reaktionen, aber der Nachteil ist, dass die Sensitivität im Vergleich zu den indirekten Methoden geringer ist.[43]

Indirekte Methode

Diese Methode ist vielseitiger als die direkte Methode, da eine Vielzahl von Primärantikörpern mit einem konjugierten Sekundärantikörper reagieren kann.

Es kommt auch zur Signalverstärkung, die Sensitivität ist erhöht. Der Nachteil dieser Methode ist, dass unspezifische Reaktionen wahrscheinlicher sind.

- 2-Schritt Methode: Primärantikörper +Sekundärantikörper= Präzipitat
- 3-Schritt Methode: Primärantikörper+ zwei Sekundärantikörper= Präzipitat

Lösliche Enzym-Immunkomplex-Methoden (APAAP,PAP)

Bei dieser Methode werden folgende Reagenzien gebraucht:

- Primärantikörper(Spezifisch gegen das Antigen)
- Sekundärantikörper oder Brückenantikörper (kann an Primärantikörper und an PAP/APAAP-Komplex binden) und
- der PAP oder APAAP-Komplex
- PAP= Peroxidase und Anti-Peroxidase
- APAAP= Alkalische Phosphatase und Anti-Alkalische Phosphatase

Diese Methode zeigt eine größere Empfindlichkeit, ist aber zeitaufwändiger. Eine der wichtigsten Anwendungen der PAP-Methode ist die Bestimmung des Tumorursprungs, v.a. bei metastasierten Tumoren.

(Strept)Avidin-Biotin-Komplexmethoden

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweissglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Es werden 3 Reagenzien benötigt:

- Primärantikörper
- Sekundärantikörper (kann an Primärantikörper binden und ist mit Biotin konjugiert)
- Peroxidase -konjugierter Avidin-Biotin-Komplex

Polymerkonjugat-methoden (EPOS ,ENVISION):

Diese Methoden haben ein enzym- und antikörpermarkiertes Polymerasekonjugat. Das Dextran-Trägermolekül wird konjugiert. Die Vorteile dieser Methoden sind die höhere Sensitivität und niedrigere Wahrscheinlichkeit einer Hintergrundfärbung.

Unspezifische Hintergrundfärbung :

Die positive Anfärbung eines Präparats, die nicht das Ergebnis einer Antigen-Antikörper-Bindung ist stellt eine unspezifische Färbung dar. Die häufigste Ursache ist die Anlagerung von Proteinen an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate Durch Fixierungsmethoden und durch verwendete Antikörper, insbesondere bei Antikörper-Verdünnungspuffern können hydrophobe Wechselwirkungen auftreten. Es kommt zu einer kurzfristigen Polarisierung von Molekülen. Durch Hinzufügen einer neutralen Proteinlösung (1-5% Normalserum oder nicht-Immunsrum oder 1% Rindererumalbumin) kann dies verhindert werden. Es ist wichtig dass da Serum, welches zum Blocken der unspezifischen Färbung verwendet wird, keine Zeichen einer Hämolyse zeigt.

Durch Fixierungsmethoden und durch verwendete Antikörper, insbesondere bei Antikörper-Verdünnungspuffern, können hydrophobe Wechselwirkungen auftreten. Es kommt zu einer kurzfristigen Polarisierung von Molekülen. Meistens sind unspezifische Färbungen eine Kombination von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen.

Endogene Peroxidase- und Phosphataseaktivitäten sind auch zu blocken, da sie oft eine Hintergrundfärbung hervorrufen. Dafür gibt es spezifische Reagenzien.

Man sollte auch auf die optimale Verdünnung des Antikörpers achten, da zu hohe Konzentrationen auch eine unspezifische Färbung verursachen können.

3.2 Praktische Durchführung

3.2.1 Probematerial

Es wurden insgesamt 22 Sehnenscheidengewebsproben untersucht.

Fibrosiertes Sehnenscheidengewebe von elf verschiedenen Patienten (nach Unfällen) wurde verglichen mit normalem Sehnenscheidengewebe der Kontrollgruppe (elf verschiedene Leichenpräparate). Die Gewebeproben wurden mit einem Gefriermikrotom 6µm dick geschnitten und bei -30° C tiefgefroren. Für die Probesammlung wurde eine Genehmigung der lokalen Ethikkommission eingeholt.

Zur meiner persönlichen Übung und Kontrolle der Reagenzien wurden Gefrierschnitte von Lymphknoten, Gefrier- und Paraffinschnitte von Tonsillen, vom Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt.

Da wir uns für die immunhistochemische Färbemethode entschieden haben, brauchten wir auch bestimmten Materialien.

3.2.2 Verwendete Materialien:

- Aceton
- AEC (3- amino-9-ethylcarbazol) + High Sensitivity Substrat Chromogen System-, Fa. DakoCytomation
- Alufolie
- Ammoniumwasche
- 2,5 ml Ammoniaklösung 25 %
- Antibody Diluent- Fa. DakoCytomation

- Aqua dest (A.D.)
- DakoCytomation Pen (PAP- Pen)
- Feuchte Kammer
- Handschuhe
- Hämalaun
- Humanes AB- Serum (wird dem UV- Block zugesetzt)
- Kaiser´s Glyceringelatine
- Large Volume Hydrogen Peroxide Block- Fa. LAB VISION
- Negativ- bzw. Isotypenkontrollen:
- Negative Kontrolle:
 - Mouse Ig G 1: Fa. DakoCytomation
 - Konzentration : 100 ug/ ml
 - Klone: DAK- G01
- Positive Kontrolle :
 - Monoclonal mouse Anti- human T- cell/ CD3
 - Fa. DakoCytomation
 - Konzentration : 0,92 ug/ml
 - Klone: T3-4B5
 - Monoclonal mouse antibody IgG1-Vimetin Ab 2
 - Fa. NeoMarkers
 - Konzentration : 0,92 ug/ml
 - Klone: V9
- Objektträger (diverse)
- Papier
- Primärantikörper:
 - Monoclonal anti- human CD 40: Fa. Ancell
 - Konzentration: 1.0 mg/ ml
 - Isotyp: Mouse IgG 1
 - Klon: BE-1
 - Monoclonal anti –human CD 154 (CD 40 Ligand):
 - Fa.Ancell
 - Konzentration: 1.0 mg/ ml
 - Isotyp : Murine IgG 1
 - Klon : 24- 31

- Monoclonal anti- human CD 40:
 - Fa. Thermo Scientific
 - Konzentration: 1:10 – 1:20 in antibody diluent
 - Isotyp: Mouse IgG 2b
 - Klon: 11E9
- Ultra Vision LP Detection System – Fa. LAB VISION , bestehend aus:
 - Ultra Vision Block
 - Primary Antibody Enhancer
 - HRP – Polymer
- Waschlösung: TBS-Tween(0.05 %)

3.2.3 Durchführung / Färbeprotokoll

Während des Färbeporgangs muss unbedingt darauf geachtet werden, dass die Schnitte nicht austrocknen, da sie dann für die Auswertung nicht brauchbar sind. Daher werden alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Inkubationsschritte sind zeitlich begrenzt, möglichst exaktes Einhalten der Zeitvorgaben ist essentiell.

3.2.3.1 Immunhistochemie von Kryoschnitten

- Gefrierschnitte aus dem Kühlschrank nehmen und ca. 15 min in Alufolie, 15 min offen bei Raumtemperatur trocknen lassen
- 5 min mit Aceton fixieren
- Schnitte mit PAP- Pen umranden, trocknen lassen
- 5min in 1x TBS / 0.05 % Tween rehydrieren
- Peroxidase Block auftropfen, 10 min inkubieren
- 3 mal 2 min mit 1x TBS/ 0.05 % Tween waschen
- Ultra Vision- Block + 10 % humanes AB- Serum auftropfen,10 min inkubieren
- Ultra Vision - Block abkippen
- Primärantikörper auftropfen, 30 min inkubieren
- 3 mal 2 min mit 1x TBS/ 0.05 % Tween waschen
- Antibody Enhancer auftropfen, 20 min inkubieren

- 3 mal 2 min mit 1x TBS/ 0.05 % Tween waschen
- HRP- Polymer auftropfen, 30 min inkubieren lassen
- 3 mal 2 min mit 1x TBS/ 0.05 % Tween waschen
- AEC auftropfen, 4 min inkubieren
- Einstellen und Spülen mit A.D.
- Bläuen im Ammoniumwasser für 2 min
- Mehrmals mit A.D. spülen
- Eindecken mit Kaiser`s Glycingelatine

3.2.4 Vorversuche

CD 40 und CD 40 L

CD 40 und CD 154 sind Co-stimulatorische Proteine, von der TNF-Rezeptor Superfamilie, befinden sich an Antigen-präsentierenden Zellen v.a. B-Zellen, an dendritischen Zellen, Makrophagen, aber sind auch an Tumorzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu finden.

Deren Funktion in der B-Zell Proliferation und Differentierung, ist bisher noch unklar. Man vermutet durch die CD40-CD 40 L Interaktion kommt es zu einer Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und Fortleitung einer Entzündungskaskade.

Um herauszufinden ob die Primärantikörper, die wir hatten

- Monoclonal anti- human CD 40: Fa. Ancell
- Monoclonal anti –human CD 154 (CD 40 Ligand): Fa.Ancell

tatsächlich an B- und T-Zellen zu finden sind, haben wir als Kontrolle Gefrierschnitte von Lymphknoten und Tonsillen verwendet (da dort eine sehr hohe Anzahl an B- ,T-Zellen und Antigen- präsentierenden Zellen zu finden ist).

Und um Fehler im Färbevorgang auszuschließen:

- Negative Kontrolle:
 - Mouse Ig G 1:Fa. DakoCytomation
- Positiv Kontrolle:
 - Monoclonal mouse Anti- human T- cell/ CD3: Fa. DakoCytomation
 - Monoclonal mouse antibody IgG1-Vimentin Ab 2 :Fa. NeoMarkers

In der Positiv- Kontrolle mit CD3 Antikörper sieht man bereits in der Übersichtsaufnahme des Lymphknotengefrierschnittes (Abb.24), eine deutliche Färbung. Damit ist sicher gestellt, dass das Detektionssystem funktioniert und die Qualität des Gewebes in Ordnung ist. Unter Vergrößerung werden einzelne, positiv gefärbte Zellen sichtbar (Abb.26).

In der Negativ- Kontrolle des gleichen Präparates, ist wie erwartet keine Färbung sichtbar, weder in Übersicht (Abb.25), sonst in der Vergrößerung (Abb.27). Damit ist ausgeschlossen, dass unser Detektionssystem unspezifisch mit unseren Proben reagiert. Der Maus- Antikörper ist gegen ein „ nicht humanes “Antigen gerichtet und soll nicht an unsere Gewebe binden. Er ist wie unser spezifischer Antikörper vom Typ IgG- 1- man spricht daher auch von einer „ Isotyp- Kontrolle“. Da unsere Reagenzien, Material und Färbevorgang die erwarteten Ergebnisse in den Kontrollversuchen ergaben, konnten wir mit der Färbung der Patienten- und Leichenpräparaten beginnen.

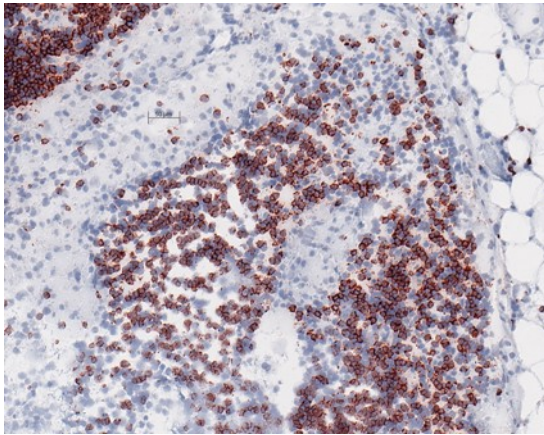


Abbildung 24: Lymphknoten CD 3x 10

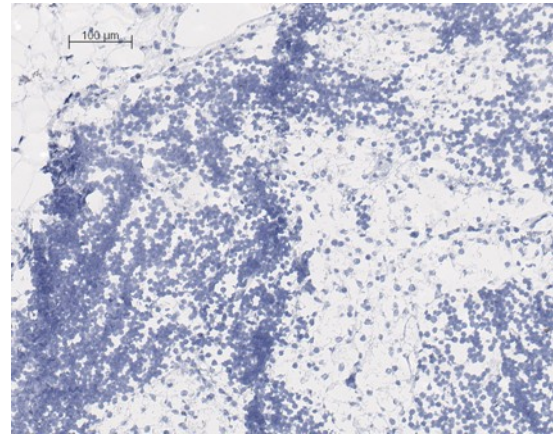


Abbildung 25: Lymphknoten neg x 10

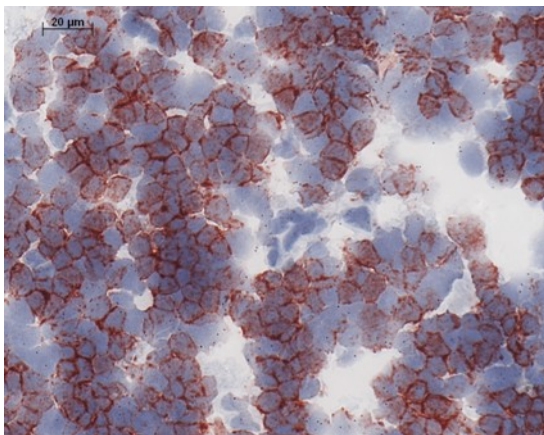


Abbildung 26: Lymphknoten CD3 x40

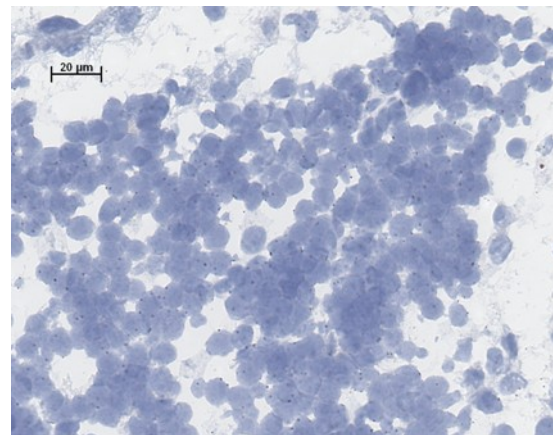


Abbildung 27: Lymphknoten neg x 40

Die bestellten Marker CD 40 und CD 40 L waren speziell für Kryoschnitte geeignet. Als erstes probierten wir die Marker auf Kryoschnitten des Lymphknotengewebes, da hier sehr viele B- und T- Lymphozyten, sowie Antigenpräsentierenden Zellen vorhanden sind, und daher viele positiv gefärbte Zellen zu erwarten waren.

Bei CD 40 in der Übersicht (Abb.28) sieht man ca. 3-4 Stellen mit einer Rotfärbung, wo man nicht abgrenzen kann ob das eine relevante Färbung ist oder ein Färbeartefakt. Eine sehr geringe Hintergrundfärbung ist sichtbar.

In der vergrößerten Aufnahme sind diese Färbungen nicht richtig beurteilbar (Abb.29).

Bei CD 40 L ist die Hintergrundfärbung stärker (Abb.30), aber es sind auch deutlich positiv gefärbte, vereinzelte Zellen in der Vergrößerung sichtbar (Abb.31).

Lymphknotenkryoschnitte wurden mehrmals mit den Primärantikörpern CD 40 und CD 40 L gefärbt, bis wir die richtige Konzentration gefunden haben, wo man am besten die einzelnen gefärbten Zellen beurteilen kann, und wo gleichzeitig die Hintergrundfärbung minimal gehalten werden konnte (Abb 28.-31.).

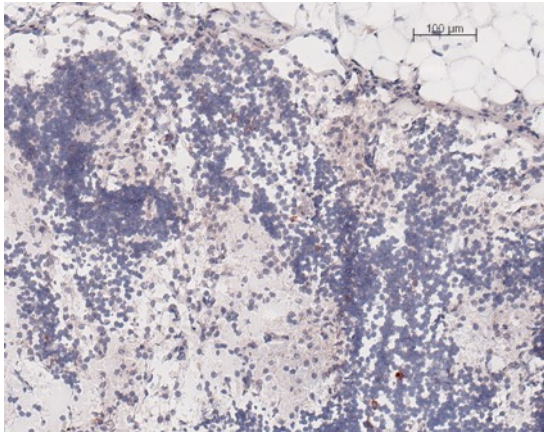


Abbildung 28: Lymphknoten CD 40 x 10

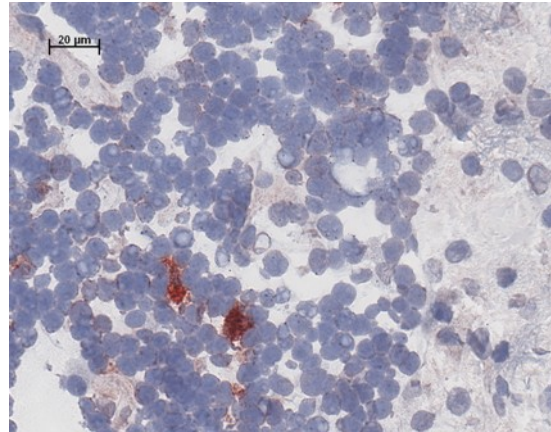


Abbildung 29: Lymphknoten CD 40 x 40

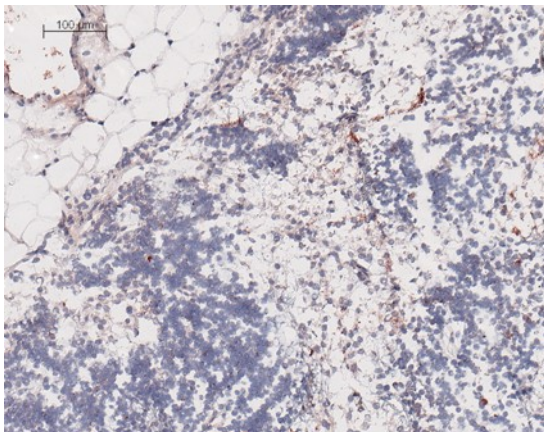


Abbildung 30: Lymphknoten CD 40 L x 10

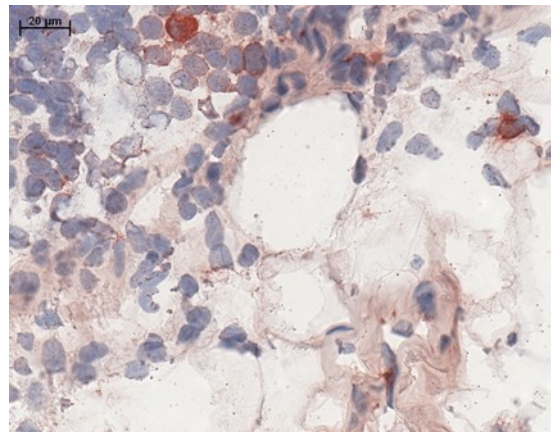


Abbildung 31: Lymphknoten CD 40 Lx 40

Der gleiche Vorgang wurde an Leichen – und Patientengewebe durchgeführt. Mit CD 40 Antikörper war fast gar keine Färbung zu sehen. In der Vergrößerung des Leichengewebes (Abb. 33) ist ein minimaler rötlicher Ton vorhanden, aber keine eindeutige, spezifische Färbung sichtbar.

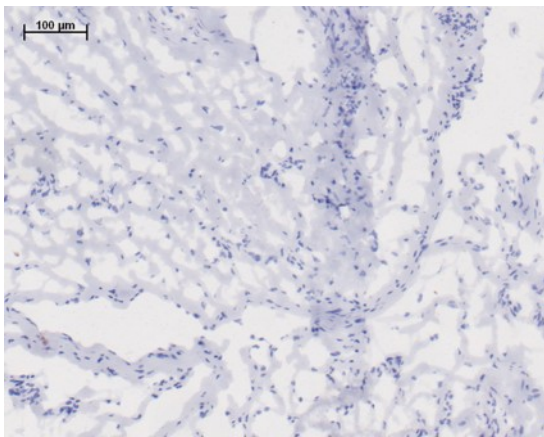


Abbildung 32: Leichengewebe(L6), CD 40x10

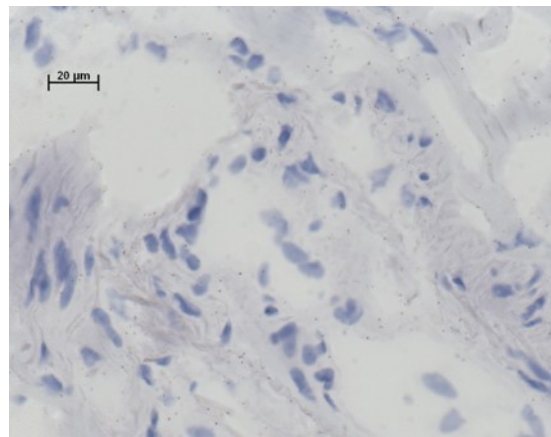


Abbildung 33: Leichengewebe (L 6),CD 40x40

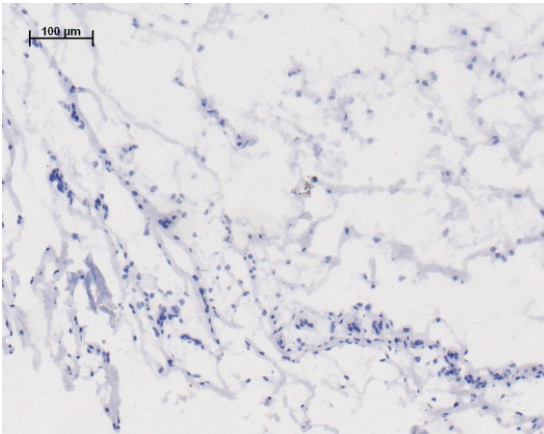


Abbildung 34: Patientengewebe(P11), CD 40x10

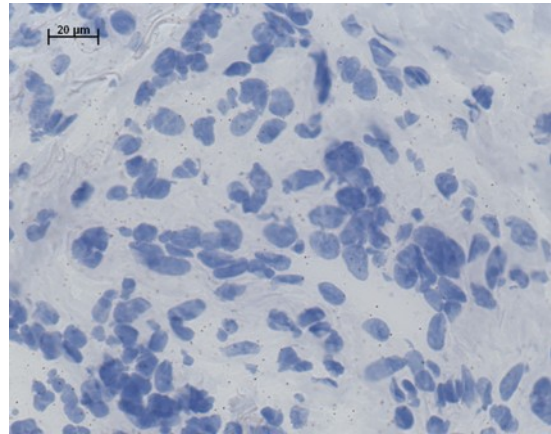


Abbildung 35: Patientengewebe (P1),CD 40x40

Die Färbungen mit den CD 40 L zeigten nur vereinzelte und nicht deutlich positive Zellen. Am Leichengewebe in der Übersicht (Abb.36) ist eine geringe, vermutlich unspezifische Färbung sichtbar. In der Vergrößerung (Abb.37) sind positiv gefärbte Zellen sichtbar, jedoch mit einer eher unspezifischen Hintergrundfärbung. Am Patientengewebe sind in der Übersicht bestimmte scharf abgrenzbare Bereiche (meist glatte Muskelzellen der Arterienwand) positiv gefärbt (Abb.38).

In der Vergrößerung des gleichen Präparates (Abb.39) sind wie in der Vergrößerung des Leichenpräparates (Abb.37), nur vereinzelte Zellen positiv gefärbt, auch hier ist eine unspezifische Färbung erkennbar.

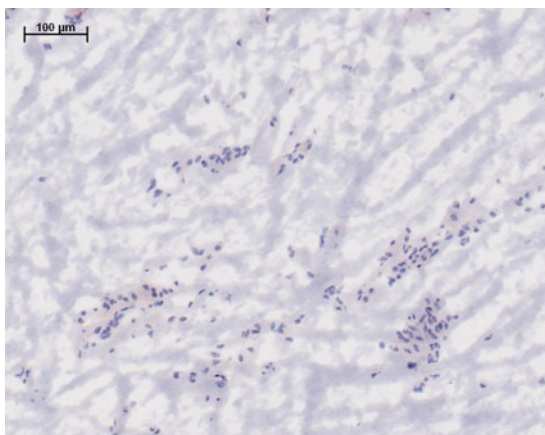


Abbildung 36: Leichengewebe(L10), CD 40L,40 x 10

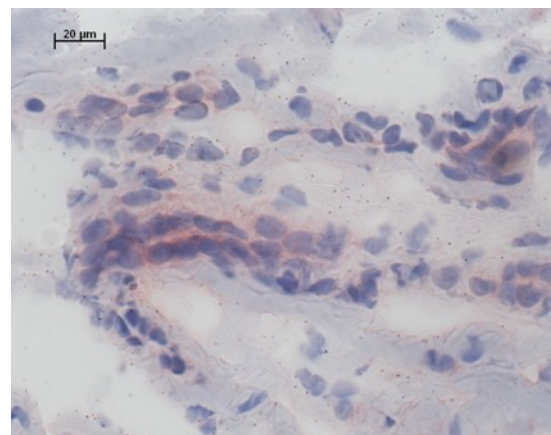


Abbildung 37: Leichengewebe (L 10),CD 40L, 40 x 40

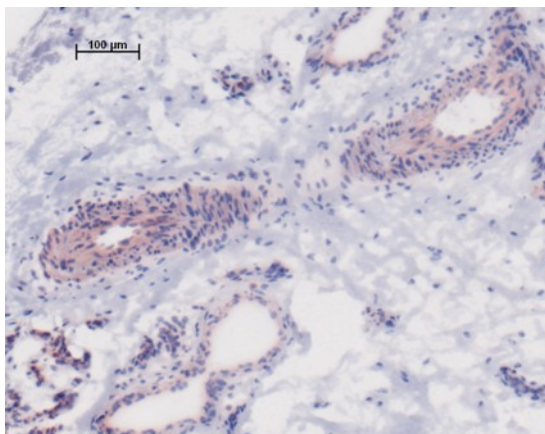


Abbildung 38: Patientengewebe(P11),CD 40L, 40x 10

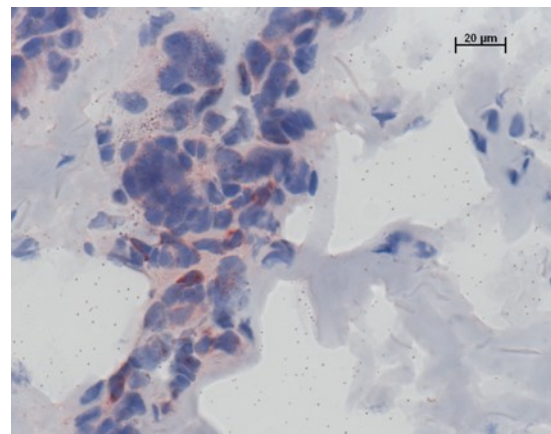
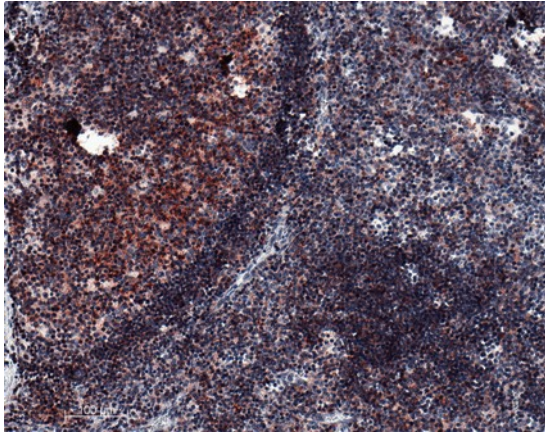
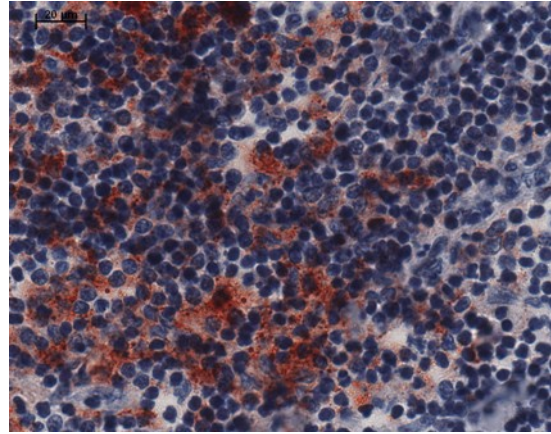


Abbildung 39: Patientengewebe (P11),CD 40L, 40 x 40

Wir bestellten einen anderen CD 40 Antikörper, von einer anderen Firma (Thermo Scientific), da wir an der Leistungsfähigkeit des Antikörpers der Firma Ancell zweifelten. Der „neue CD 40“ Antikörper der Firma Thermo Scientific war für Paraffinschnitte geeignet.



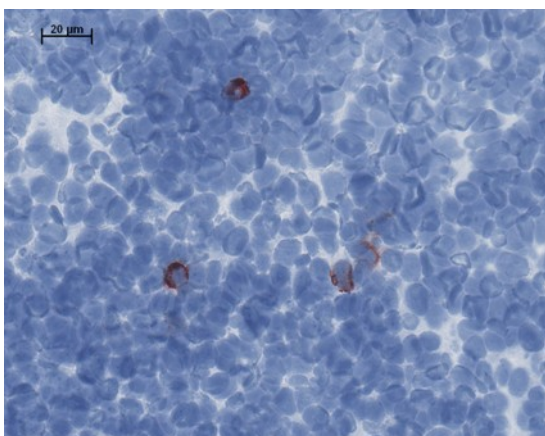
**Abbildung 40: Tonsille, Paraffin, CD 40 neu
20x10**



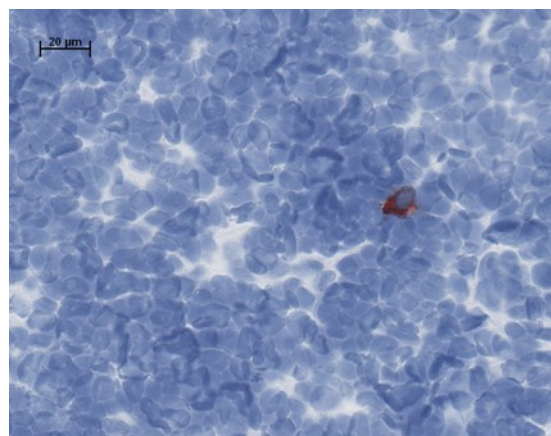
**Abbildung 41: Tonsille, Paraffin, CD 40 neu
40x40**

Es wurden Paraffinschnitte vom tonsillären Gewebe hergestellt. Wir färbten diese mit dem neuen Marker. In der Übersicht (Abb. 40) war eine stark positive Färbung sichtbar. In der Vergrößerung (Abb. 41) waren stark positive Zellen zu sehen, aber man konnte eine leichte unspezifische Färbung nicht genau von den Zellen abgrenzen.

Obwohl der neue Marker für Paraffinschnitte geeignet war, wollten wir testen, wie er sich auf Kryoschnitten verhält. Wir färbten als Probe zuerst Gefrierschnitte vom tonsillären Gewebe. Man konnte wieder nur vereinzelte positiv gefärbte Zellen sehen (Abb. 42, Abb. 43), die Färbung erscheint allerdings vom Muster her spezifisch, da sie klar einzelnen Zellen zugeordnet werden kann.

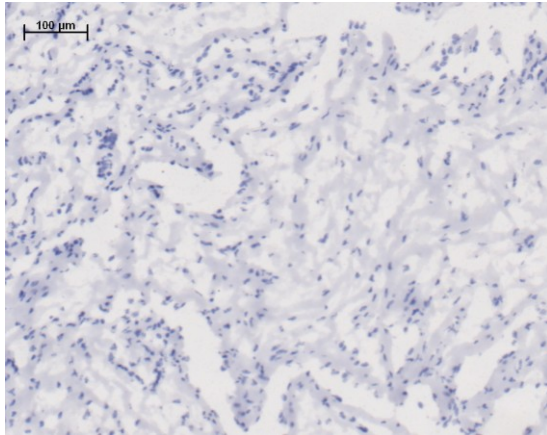


**Abbildung 42: Tonsille, Kryo, CD 40 neu,
80x10**

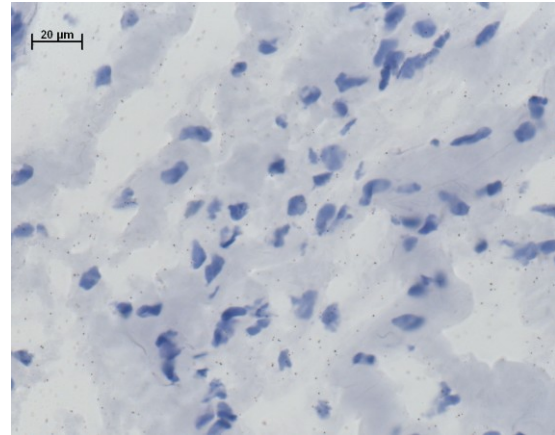


**Abbildung 43: Tonsille, Kryo, CD 40 neu,
80x40**

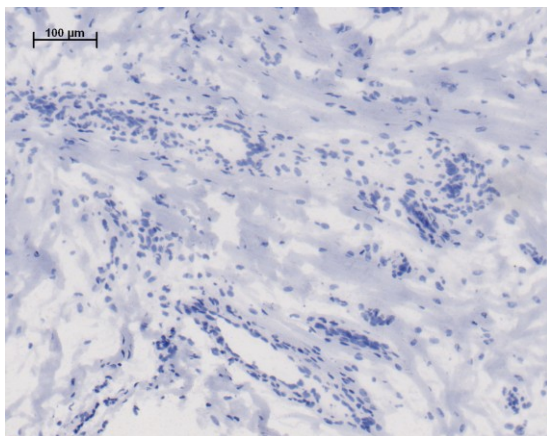
CD 40 „neu“ ergab praktisch keine Färbung (wie schon der zuvor getestete anti CD 40 Antikörper), weder in Leichen- noch in Patientengewebe (Abb.44 -47).



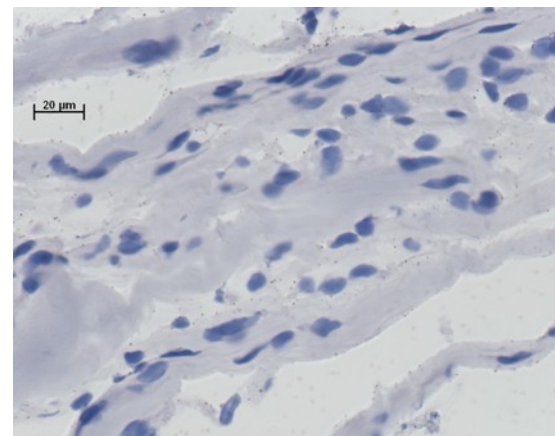
**Abbildung 44: Leichengewebe(L5), CD 40
neu x 10**



**Abbildung 45: Leichengewebe (L5), CD 40
neu x 40**



**Abbildung 46: Patientengewebe(P1), CD 40
neu x10**



**Abbildung 47: Patientengewebe (P1), CD 40
neu x 40**

Die vereinzelt schwach gefärbten Bereiche in Gefrierschnitten von Patienten- und Leichengewebe konnten nicht als eine signifikante Anhäufung von CD 40 und CD 40 L positiven Zellen betrachtet werden, und daher auch nicht quantitativ ausgewertet werden.

4 Diskussion

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die CD 40 / CD 40 L Interaktion bei chronisch fibrosierenden Vorgängen bedeutend sein könnte. [1] Es wurde die Rolle der Interaktion von Fibroblasten und mononukleären Infiltraten durch CD 40-CD 154 Engagement in der Entwicklung von Gewebsfibrose untersucht.

Die Interaktion zwischen Fibroblasten und Mastzellen oder T-Zellen durch CD40-CD154 Signalisierung ist entscheidend für die Fibroblastenaktivierung früh im Verlauf der Fibrose. Die Blockade des CD40-CD154-Signals könnte eine neue therapeutische Strategie für die menschlichen fibrotischen Erkrankungen werden.

Aufgrund unserer Arbeitshypothese, dass eine chronische Entzündung die Ursache von fibrosierenden, rezidivierenden Narbenbildung im Handbereich sein könnte, haben wir postuliert, dass eine vermehrte Expression von CD 40 und CD 40 Ligand im Narbengewebe darstellbar sein müsste.

Die Ergebnisse konnten wir nicht wirklich quantitativ auswerten, da nur sehr wenige Zellen mit CD 40 L positiv angefärbt wurden, und praktisch gar keine CD 40 positiven Zellen beobachtet werden konnten.

Technisch besteht die Möglichkeit, dass unser Detektionssystem bzw. die verwendeten Antikörper nicht ausreichend sensitiv waren. Da kein gereinigtes CD 40 Protein bzw. CD 154 Protein vorhanden war, konnte die Antikörpersensitivität nicht geprüft werden. Es ist theoretisch auch nicht ausgeschlossen, dass das Probematerial selbst, durch das längere Einfrieren qualitativ beeinträchtigt war. Die CD 3- Kontrollfärbungen haben jedoch keine Hinweise auf den Verlust der Antigenität im Probematerial ergeben.

Möglicherweise spielt die CD 40/ CD 40 L Interaktion zumindest in dem Stadium der Fibrose, wie sie bei unseren Patienten vorlag, keine Rolle (mehr?). Damit ist nicht ausgeschlossen, dass im Frühstadium der Fibrosierungsreaktion doch keine CD 40 / CD 40 L Interaktion für die Erkrankungsentstehung relevant war, und wir nur Präparate aus späteren Krankheitsstadien untersucht haben, in welchen dieser Signalweg bereits abgeschaltet ist.

5 Schlussfolgerung

Eine quantitative Untersuchung mit anti CD 40 und anti CD 40 L ist an unserem Material nicht möglich. Es ist keine CD 40 Expression vorhanden und auch die CD 154 Färbungen lassen keine spezifische Auswertung zu.

Nach unseren Befunden scheint es, als würde die CD 40 / CD 40 L –Wechselwirkung bei der Sehnenscheidenfibrose keine Rolle spielen.

Wichtig ist jedoch zu bedenken, dass diese Wechselwirkung möglicherweise im Zeitverlauf der Erkrankung unterschiedlich ausgeprägt sein könnte, so dass in weiteren Analysen Material von unterschiedlichen (ev. sehr frischen) Krankheitsstadien auf CD 40/ CD 40 L Expression untersucht werden sollte.

6 Literatur

- [1] Kawai M., Masuda A., Kuwana M.A. CD 40-CD 154 Interaction in tissue fibrosis. Arthritis Rheum. 2008 Nov; 58(11):3562-73
- [2]<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/35/Sehnenscheide.jpg/180px-Sehnenscheide.jpg>
- [3] <http://de.wikipedia.org/wiki/Bindegewebe>
- [4] Junqueira .Carneiro. Histologie. Springer; 6.Auflage: Abb.4.15 a, Seite 68
- [5] Hartmann et al. Zytologie. Histologie und Mikroskopische Anatomie .Facultas; 3.Auflage: CD
- [6]www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/bindegewebe/zelle/fixe/d-fibroblast.php
- [7] Junqueira .Carneiro. Histologie. Springer; 6.Auflage: Abb.4.15 b, Seite 68
- [8] Hartmann et al. Zytologie. Histologie und Mikroskopische Anatomie .Facultas; 3.Auflage: CD
- [9] Lüllmann-Rauch Renate. Histologie-Verstehen-Lernen-Nachschnagen. Georg Thieme Verlag: Stuttgart; 2003:96 und <http://de.wikipedia.org/wiki/Myofibroblast>
- [10] http://www.kgu.de/zmorph/histopatho/histo4/pub/data/gb/s002_b.jpg
- [11] O. Univ.-Prof. Dr. Gottfried Dohr.Institut für Zellbiologie, Histologie und Embriologie. .Gewebe-Bindegewebe. VMC Vortrag. Meduni Graz..2005; und Junqueira .Carneiro. Histologie. Springer; 6.Auflage: Abb.4.15 a, Seite 63
- [12] www.dermaxime.com/images/elastin
- [13] Lüllmann-Rauch Renate. Histologie-Verstehen-Lernen-Nachschnagen. Georg Thieme Verlag: Stuttgart; 2003:94ff
- [14] Benninghoff,Drenckhahn.Anatomie. Urban & Fischer Verlag;Abb. 3.3.-12, Seite 119
- [15] www.wikipedia.de
- [16] http://www.wundheilung.bb Braun.de/images/Wundheilungsphasen_530px.jpg
- [17],[18],[19]<http://www.netdokter.de/Krankheiten/Wundversorgung/Wissen/Wundheilung-10183.html>
- [20],[21] Herbst ,H., Böcker W., Denk H.,Heitz Ph. U. Pathologie. München: Elsevier GmbH- Urban& Fischer;2004:78
- [22] Herbst ,H., Böcker W., Denk H.,Heitz Ph. U. Pathologie. München: Elsevier GmbH- Urban& Fischer;2004:84ff

- [23] Hartmann et al.: Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie, Verlag: Facultas, 3.Auflage: CD
- [24] Hartmann et al.: Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie, Verlag: Facultas, 3.Auflage: CD
- [25], [27] Herbst ,H.,Böcker W.,Denk H.,Heitz Ph. U. Pathologie. München: Elsevier GmbH- Urban& Fischer;2004:100ff
- [26] www.imbie.meb.uni-bonn.de
- [28] <http://de.wikipedia.org/wiki/Entz%C3%BCndung>
- [29] <http://de.wikipedia.org/wiki/Lymphozyt>
- [30] <http://de.wikipedia.org/wiki/Lymphozyt>
- [31] <http://www.siumed.edu/~dking2/intro/inflam.htm>
- [32] Herbst ,H.,Böcker W.,Denk H.,Heitz Ph. U. Pathologie. München: Elsevier GmbH- Urban& Fischer;2004:102
- [33] http://www.pathologie-online.de/ap/6/pop-6-0_04.htm
- [34] [http://www.pathologie-online.de/ap/6/index.php\).Epitheloidzellen](http://www.pathologie-online.de/ap/6/index.php).Epitheloidzellen)
- [35] http://www.pathologie-online.de/ap/6/pop-6-0_16.htm
- [36] [http://www.pathologie-online.de/ap/6/index.php\):](http://www.pathologie-online.de/ap/6/index.php):)
- [37] <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biochemie/141>
- [38]www.medizin-netz.de/forschung/die-rolle-von-adhaesionsmolekuelen-bei-entzuendlichen-erkrankungen
- [39]<http://www.medizinfo.de/immunsystem/abwehr/abwehrzellen.htm>
- [40]<http://www.scheffel.og.bw.schule.de/faecher/science/biologie/immunologie/2kommunik/ma.gif>
- [41] www.dr-gumpert.de/html/arthrofibrose.html
- [41] Junqueira .Carneiro. Histologie. Springer; 6.Auflage: Abb.4.15 b, Seite 447
- [42] Janice A. Bourne. Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden.3.Auflage.Hamburg:DAKO CORPORATION;1983: Seite 7
- [43] Janice A. Bourne. Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden.3.Auflage.Hamburg:DAKO CORPORATION;1983: Seite 11- 17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt einer Sehnenscheide [2]	4
Abbildung 2: Fibroblast [4].....	6
Abbildung 3: Fibroblast, mikroskopische Aufnahme [5]	6
Abbildung 4: Fibrozyt [7].....	7
Abbildung 5: Fibrozyt, mikroskopische Aufnahme [8]	7
Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von Kollagenen Fasern, Lederhaut (Mensch) [10]	11
Abbildung 7: Elastin [12].....	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Komplexen [14]	13
Abbildung 9: Wundheilungsphasen [16].....	14
Abbildung 10: Illustrative Darstellung der Phase I der Wundheilung [17]	15
Abbildung 11: Illustrative Darstellung der Phase II der Wundheilung [18]	16
Abbildung 12: Illustrative Darstellung der Phase III der Wundheilung [19]	17
Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme von neutrophilen Granulozyten [23].....	23
Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme von eosinophilen Granulozyten [24]	24
Abbildung 15: Mögliche Folgen der akuten Entzündung.....	25
Abbildung 16: Histologische Aufnahme einer Entzündung im Lungengewebe [28].....	26
Abbildung 17: Rastermikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten [30]	27
Abbildung 18: Histologisches Bild einer chronisch granulierenden Endometritis [31]	29
Abbildung 19: Epitheloidzellen [33]	30
Abbildung 20: Mehrkernige Riesenzellen [35].....	32
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Endothel-Leukozyten-Interaktionen [37]	34
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Myelopoese [39].....	36
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation [40]	37
Abbildung 24: Lymphknoten CD 3x 10	48
Abbildung 25: Lymphknoten neg x 10	48
Abbildung 26: Lymphknoten CD3 x40	48
Abbildung 27: Lymphknoten neg x 40	48
Abbildung 28: Lymphknoten CD 40 x 10	49
Abbildung 29: Lymphknoten CD 40 x 40.....	49
Abbildung 30: Lymphknoten CD 40 L x 10.....	49
Abbildung 31: Lymphknoten CD 40 Lx 40.....	49
Abbildung 32: Leichengewebe(L6), CD 40x10	50
Abbildung 33: Leichengewebe (L 6),CD 40x40	50
Abbildung 34: Patientengewebe(P11), CD 40x10.....	50
Abbildung 35: Patientengewebe (P1),CD 40x40.....	50
Abbildung 36: Leichengewebe(L10), CD 40L,40 x 10.....	51
Abbildung 37: Leichengewebe (L 10),CD 40L, 40 x 40.....	51
Abbildung 38: Patientengewebe(P11),CD 40L, 40x 10.....	51
Abbildung 39: Patientengewebe (P11),CD 40L, 40 x 40.....	51

Abbildung 40: Tonsille,Paraffin,CD 40 neu 20x10	52
Abbildung 41: Tonsille,Paraffin,CD 40 neu 40x40	52
Abbildung 42: Tonsille, Kryo, CD 40 neu, 80x10.....	52
Abbildung 43: Tonsille, Kryo, CD 40 neu, 80x40.....	52
Abbildung 44: Leichengewebe(L5), CD 40 neu x 10.....	53
Abbildung 45: Leichengewebe (L5), CD 40 neu x 40.....	53
Abbildung 46: Patientengewebe(P1), CD 40 neu x10.....	53
Abbildung 47: Patientengewebe (P1), CD 40 neu x 40.....	53

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die gegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Zudem erkläre ich, dass diese Arbeit noch an keiner anderen MTA-Akademie als Diplomarbeit vorgelegt wurde.

Graz, am

.....
Jasna Sisic