

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

und der

Klinik für Plastische Chirurgie  
der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Mailänder

und dem

Institut für Medizinische Molekularbiologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. K. Müller

---

**Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen  
am Gewebsverband und  
an in der Zellkultur gezüchteten Myofibroblasten  
zur Klärung der Pathogenese des Morbus Dupuytren**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von  
Anja Katrin Otto  
aus Henstedt-Ulzburg

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Pierre Moubayed
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karl-Hermann Staubach

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2004

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.07.2004

gez. Prof. Dr. med. P. Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1. Einleitung und Fragestellung .....	1
1.1. Einleitung .....	1
1.1.1. Beschreibung der Erkrankung .....	1
1.1.2. Historisches und Epidemiologie des M. Dupuytren .....	1
1.1.3. Ätiologie und Begleiterkrankungen .....	2
1.1.4. Anatomie und Histologie .....	4
1.1.5. Klinik .....	8
1.1.6. Klinische Diagnosestellung .....	9
1.1.7. Klinisch-pathologische Stadieneinteilung nach Luck .....	10
1.1.8. Therapie .....	10
1.1.9. Pathogenese .....	11
1.1.10. Die Myofibroblasten .....	13
1.1.10.1. Morphologie, Vorkommen und Herkunft der Myofibroblasten .....	13
1.1.10.2. Theorien zur Differenzierung der Myofibroblasten aus Fibroblasten .....	14
1.1.10.3. Das Aktin der Myofibroblasten .....	15
1.2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	16
2. Material und Methoden .....	18
2.1. Chemikalien .....	18
2.2. Untersuchungsmaterial .....	18
2.2.1. Untersuchungskollektiv der an M. Dupuytren erkrankten Patienten .....	18
2.2.2. Untersuchungskollektiv der Kontrollpatienten .....	19
2.2.3. Gewebspräparation .....	19
2.3. Morphologische Stadieneinteilung .....	20
2.4. Histologie .....	20
2.5. Immunhistochemie des in Paraffin gebetteten Materials .....	20
2.6. Beurteilung der SMAK-gefärbten Schnitte unter dem Lichtmikroskop .....	21
2.7. Methoden in der Zellkultur .....	22
2.7.1. Methode des „Auswachsens“ .....	22

2.7.2. Gewebsansatz mit Kollagenasebehandlung.....	22
2.7.3. Weiterführende Behandlung der „Monolayer“-Kulturen .....	26
2.7.3.1. Mediumwechsel.....	26
2.7.3.2. Passagieren der Zellen mit Trypsin .....	26
2.7.3.3. Überführen der Zellen auf Chamberslides und Immunhistochemie.....	27
2.8. Bestimmung des Anteils der mit SMAK dargestellten Zellen unter dem Lichtmikroskop .....	28
2.9. Methoden der Statistik.....	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Anordnung der $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Untersuchungsmaterial .....	30
3.2. Vergleich der Methoden: „Auswachsen“ und Kollagenaseabbau .....	34
3.3. Passagieren von Kulturen .....	37
3.4. Vergleich unterschiedlicher Serumbeigaben zum Medium beim M. Dupuytren.....	39
3.5. Zelldichte $\alpha$ SMA-positiver Zellen einer Kultur bei Teilung der Gewebsprobe .....	41
3.5.1. Teilung der Gewebsprobe in 6 gleich große Areale (6-Well-Versuch).....	41
3.5.2. Teilung der Gewebsprobe in 24 gleich große Areale (24-Well-Versuch).....	44
4. Diskussion .....	46
4.1. Anordnung der $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Untersuchungsmaterial .....	46
4.2. Vergleich der Methoden: „Auswachsen“ und Kollagenaseabbau .....	49
4.3. Passagieren von Kulturen .....	49
4.4. Vergleich unterschiedlicher Serumbeigaben zum Medium beim M. Dupuytren.....	50
4.5. Zelldichte der Myofibroblasten einer Kultur bei Teilung der Gewebsprobe .....	50
4.6. Biologisches Verhalten der Myofibroblasten und der Fibroblasten im Gewebsverband bzw. in der Zellkultur .....	51
5. Zusammenfassung .....	52
6. Literaturverzeichnis.....	54
7. Anhang .....	63
7.1. Chemikalien und Arbeitsmaterialien.....	63
7.2. Chemikalien für die Immunhistochemie .....	64
7.3. Fibroblastenisolations-Lösungen.....	65
8. Danksagung .....	67
9. Publikationsliste .....	68
10. Lebenslauf .....	69

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prävalenz des M. Dupuytren nach Altersgruppen gegliedert.....	2
Abb. 2: Ätiologische Belastungsfaktoren des M. Dupuytren.....	2
Abb. 3: Palmarseite der Hand, oberflächliche Schicht.....	5
Abb. 4: Eröffnete Hohlhand mit Blick auf die noch in situ belassene und pathologisch veränderte Palmaraponeurose.....	6
Abb. 5: Drei Resektionspräparate einer pathologisch veränderten Palmaraponeurose, jeweils bestehend aus Knoten- und Strangstrukturen.....	7
Abb. 6: Klinische Morphologie des M. Dupuytren: Knoten- und Strangbildung mit resultierender Verdickung der Palmaraponeurose und Flexionsstellung der Finger.....	8
Abb. 7: Circulus vitiosus der Pathogenese beim M. Dupuytren .....	12
Abb. 8: Darstellung von mit Anti-Aktin-Antikörpern (SMAK) gefärbten, positiven Myofibroblasten. Die benachbarten Fibroblasten weisen eine negative Reaktivität auf. APAAP. 600x.....	14
Abb. 9: Darstellung eines auszuzählenden Gesichtsfeldes. Mit SMAK reagierende Zellen und negativ reagierende Fibroblasten in der Kultur. APAAP. 100x.....	28
Abb. 10: Stadium der Proliferation. Histomorphologisches Bild eines Gewebeknotens mit dichten Proliferationen von monomorphkernigen Spindelzellen. HE. 400x.....	30
Abb. 11: Stadium der Proliferation. Immunhistochem. Darstellung der $\alpha$ SMA-Filamente in zahlreichen $\alpha$ SMA-positiven Spindelzellen im Gewebeknoten. ABC. 400x ...	30
Abb. 12: Stadium der Proliferation. Histomorpholog. Bild des Gewebsstranges. Spärliche Gruppen von Spindelzellen mit einem kollagenreichen hyalinisierten Binde-gewebe in der Umgebung. HE. 400x.....	30
Abb. 13: Stadium der Proliferation. Immunhistochemische Demonstration der spärlichen $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Gewebsstrang. ABC. 400x .....	30
Abb. 14: Stadium der Proliferation. Histomorphologische Darstellung einer Aponeurose. HE. 400x.....	31
Abb. 15: Stadium der Proliferation. Immunhistochem. Darstellung der Aponeurose. ABC. 400x.....	31

Abb. 16: Stadium der Involution. Histomorphologisches Bild eines Gewebsknotens mit abnehmender Zelldichte der Spindelzellen und deutlicher Zunahme des kollagenen Bindegewebes. HE. 400x.....	31
Abb. 17: Stadium der Involution. Immunhistochemische Darstellung der $\alpha$ SMA-Expression in den fibroblastenähnlichen Zellen eines Gewebsknotens. ABC. 400x.....	31
Abb. 18: Stadium der Involution. Histomorphologisches Bild eines Gewebsstranges mit nur vereinzelt sichtbaren Spindelzellen in einem fast homogen kollagenisierten Bindegewebe. HE. 400x.....	32
Abb. 19: Stadium der Involution. Immunhistochemische Demonstration eines Gewebsstranges mit gelegentlich immunhistochemisch positiver Reaktivität von kleinen Gruppen $\alpha$ SMA-positiver Zellen. ABC. 400x.....	32
Abb. 20: Stadium der Involution. Histomorphologisches Bild einer Aponeurose mit äußerst spärlicher Zellularität und reichlich Kollagen. HE. 400x.....	32
Abb. 21: Stadium der Involution. Immunhistochemische Darstellung der Aponeurose. ABC. 400x.....	32
Abb. 22: Immunhistochemische Darstellung eines Gewebsknotens im Stadium der Proliferation. Inhomogene Verteilung der $\alpha$ SMA-positiven Zellen. ABC. 400x.	33
Abb. 23: Immunhistochemische Darstellung eines Gewebsknotens im Stadium der Involution. Inhomogene Verteilung der $\alpha$ SMA-positiven Zellen. ABC. 400x ....	33
Abb. 24: Darstellung der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen entsprechend der verwendeten Methode in Form eines Box-Plots. ....	36
Abb. 25: Darstellung der Abnahme $\alpha$ SMA-positiver Zellen von Passage zu Passage.....	38
Abb. 26: Darstellung der Anteile der $\alpha$ SMA-positiven Zellen von Gewebeproben mit identischer Mediumbehandlung durch je eine Box.....	40
Abb. 27: Die Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen eines Gewebsknotens werden durch je eine Farbe veranschaulicht. Die große Streubreite der Anteile ist besonders deutlich. ....	43
Abb. 28: Die Anteile der $\alpha$ SMA-positiven Zellen der Kulturen eines Gewebsknotens werden durch je eine Farbe veranschaulicht. Ihre Streubreite ist in diesem Versuch noch ausgeprägter als bei der Teilung des Knotens in 6 Gewebsstücke. ....	45

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Aufteilung der Präparate auf die verschiedenen Versuche .....	18
Tab. 2: Vergleich des Einflusses beider Aufarbeitungsmethoden auf die Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen in den Kulturen.....	35
Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim Versuch des Methodenvergleiches.....	35
Tab. 4: Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen jeweils eines Gewebes im Verlauf des Passagierens .....	37
Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim Versuch des Passagierens.....	38
Tab. 6: Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen unter Variation des Serumanteils des Mediums.....	39
Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim Versuch unterschiedlicher Serumbeigaben zum Medium.....	40
Tab. 8: Darstellung der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen der 6 Kulturen von insgesamt 5 Gewebeknoten .....	42
Tab. 9: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim 6-Well-Versuch .....	42
Tab. 10: Darstellung der Anteile der $\alpha$ SMA-positiven Zellen von je 8 Kulturen von insgesamt 4 Gewebeknoten .....	44
Tab. 11: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim 24-Well-Versuch .....	44

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
A.	Arteria
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Aktin
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
DAB	3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
FKS	fetales Kälberserum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF-II	Insulin-like-growth-factor II
IL-4	Interleukin-4
KTS	Karpaltunnel-Syndrom
Lig.	Ligamentum
M. Dupuytren	Morbus Dupuytren
M.	Musculus
N.	Nervus
Nn.	Nervi
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reagenz
PBS	phosphate buffert saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	Platelet-derived growth factor
SMAK	Anti-Human-Smooth-Muscle-Aktin
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEC	continuous-elongation-technique
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Upm	Umdrehungen pro Minute

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1. Einleitung

### 1.1.1. Beschreibung der Erkrankung

Morbus Dupuytren stellt eine gutartige, knotige und strangförmige Fibromatose der Handaponeurose dar. Diese Erkrankung führt zu einer Streckhemmung und gelegentlich zu einer Adduktionskontraktur der Finger. Die bevorzugte Lokalisation betrifft in abnehmender Häufigkeit die Hohlhand, den Ringfinger, den Kleinfinger, den Mittelfinger, seltener den Daumen und den Zeigefinger.

### 1.1.2. Historisches und Epidemiologie des M. Dupuytren

Plater (1614) charakterisierte die Veränderung in der Hand erstmalig als eigenständiges Krankheitsbild und nahm als Ursache eine Flexion der Beugesehnen an. Der französische Chirurg, Baron Guillaume Dupuytren, beschrieb im Jahre 1831 das Krankheitsbild als eine Erkrankung der Palmaraponeurose (Dupuytren, 1831).

Epidemiologischen Berichten zufolge ist die höchste Prävalenz bei den geographischen Manifestationen des M. Dupuytren in Nordeuropa zu finden. Bisweilen gilt M. Dupuytren als Erkrankung der Wikinger (Early, 1962; Hueston, 1990; Whaley und Elliot 1993; Douglas, 1999; Elliot, 1999).

Der M. Dupuytren kann in jedem Lebensalter auftreten. Die Inzidenz des M. Dupuytren nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Typischerweise erkranken Männer häufiger als Frauen, hauptsächlich im fünften Lebensjahrzehnt, während sich bei Frauen der Häufigkeitsgipfel ca. 10 Jahre später einstellt (Mikkelsen, 1972; Lennox et al., 1993; Douglas, 1999). Das Risiko des Fortschreitens der Erkrankung bzw. der Entwicklung eines Rezidivs ist für beide Geschlechter gleich (Zemel et al., 1987; McGrouther, 1990; Burge, 1999) (Abb. 1).

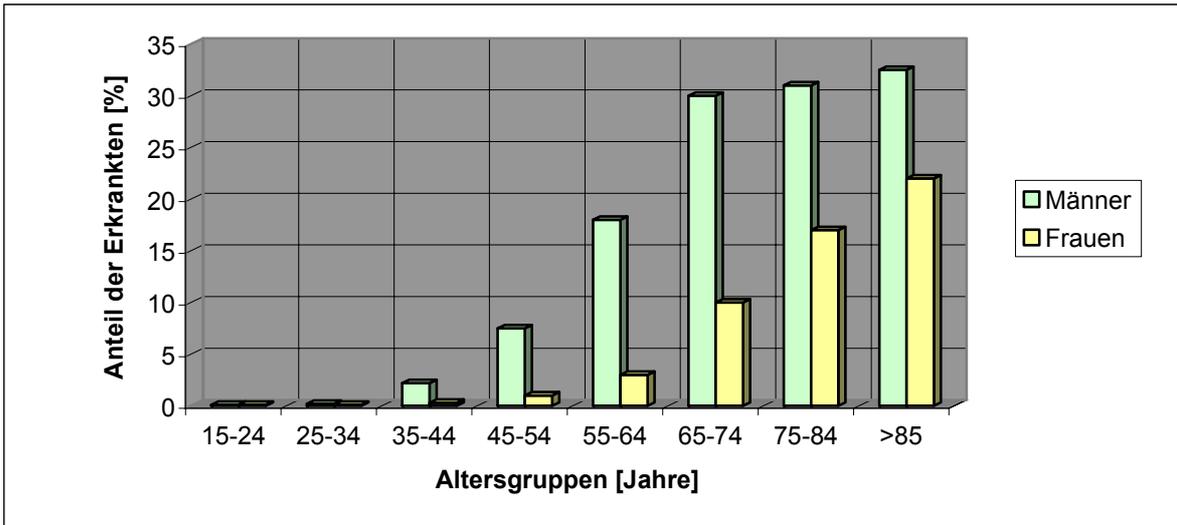


Abb. 1: Prävalenz des M. Dupuytren nach Altersgruppen gegliedert

### 1.1.3. Ätiologie und Begleiterkrankungen

Bislang ist die Ätiologie des M. Dupuytren ungeklärt geblieben. Theoretisch werden endogene und exogene Faktoren diskutiert.

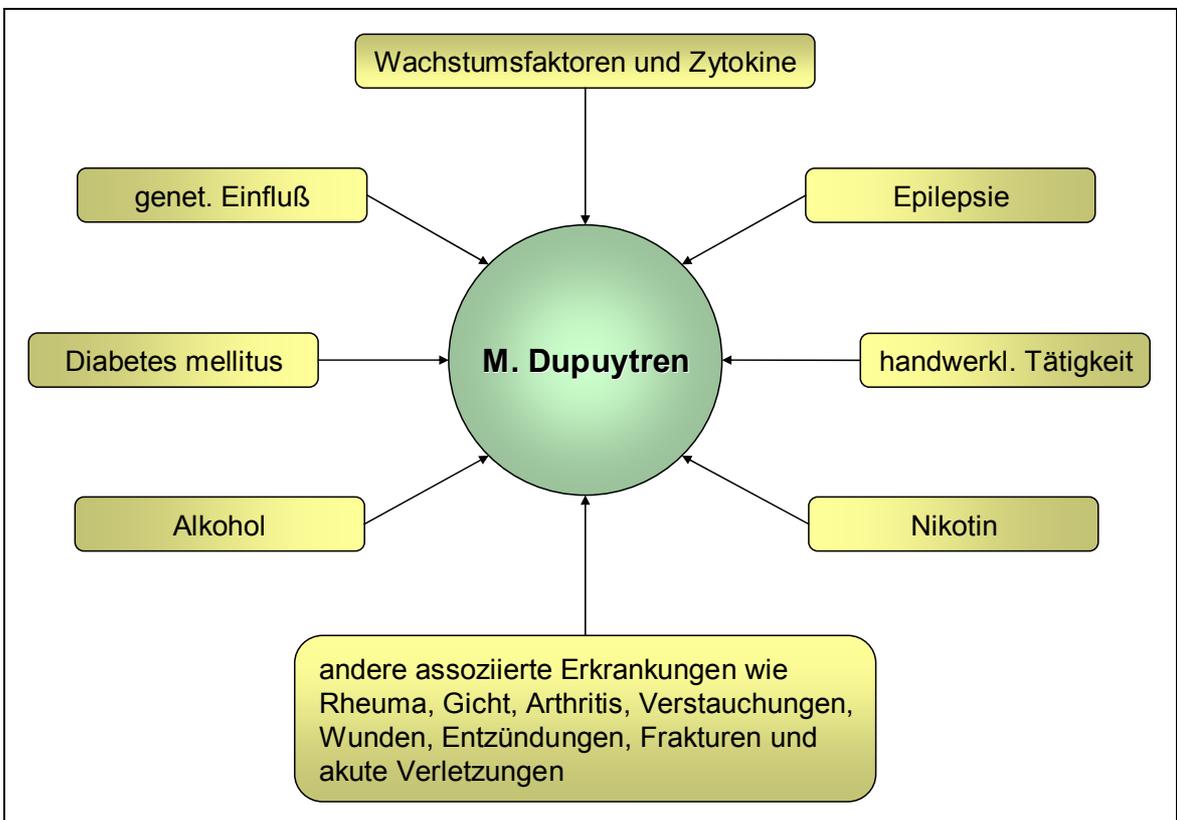


Abb. 2: Ätiologische Belastungsfaktoren des M. Dupuytren

Geographische Prävalenzen und eine familiäre Prädisposition weisen auf einen genetischen Einfluß der Erkrankung hin. Neben einem autosomal-dominanten Erbgang mit höherer Penetranz bei den Männern, wird eine autosomal-rezessive Vererbung diskutiert. Dabei werden Mutationen eines bzw. mehrerer Gene als Ursache für die Entstehung der Erkrankung angenommen (Skoog, 1948a; Ling, 1963; Matthews, 1979; Burge, 1999; Douglas, 1999).

M. Dupuytren wird häufig unter den Alkoholikern beobachtet. Möglicherweise spielt hierbei die pathologisch veränderte metabolische Funktion der Leber eine bedeutsame Rolle. Der genaue Wirkungsmechanismus des Alkohols in der Pathogenese dieses Krankheitsbildes ist unbekannt (Dupuytren, 1831; Noble et al., 1992; Douglas, 1999).

Auch unter Rauchern soll die Erkrankung häufiger als bei Nichtrauchern auftreten. Das Rauchen soll über den Weg von mikrovaskulären Veränderungen die Entstehung und Verschlechterung der Erkrankung begünstigen (An et al., 1988; van Adrichem et al., 1992).

Als Prädisposition für den M. Dupuytren wird ebenfalls harte handwerkliche Tätigkeit diskutiert. Die manuelle Arbeit führe durch Mikrotraumen der Hand zu Mikrorupturen der Kollagenfasern und Kapillaren, wodurch der Erkrankungsprozess gefördert werden soll (Dupuytren, 1831; Goyrand, 1835; Mikkelsen, 1978; Skoog, 1963; Rayan, 1999a).

Zudem weisen Patienten, die insbesondere an Typ-II-Diabetes leiden, mit steigendem Alter und mit Zunahme der Erkrankungsdauer eine höhere Inzidenz von M. Dupuytren auf (Pal et al., 1987; McFarlane und Ross, 1998).

In diesem Zusammenhang wird die für den Diabetes mellitus charakteristische Mikroangiopathie, welche die steigende Kollagenproduktion der Fibroblasten und die Pathogenese des M. Dupuytren beeinflussen soll, als mögliche Ursache diskutiert (Sanderson et al., 1992; Douglas, 1999).

Des Weiteren besteht eine positive Korrelation zwischen der Epilepsie und dem M. Dupuytren (Lund, 1941; Skoog, 1948b; Critchley et al., 1976; Douglas, 1999).

Nicht selten werden andere Erkrankungen wie Rheuma, Gicht, Arthritis, Verstauchungen, Wunden, Entzündungen, Frakturen und akute Verletzungen mit M. Dupuytren assoziiert (Chomel, 1813; Dupuytren, 1831; Goyrand, 1835). Jedoch lassen sich hierbei keine kausalen Zusammenhänge herstellen.

Die Rolle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen finden bei der Erörterung der Ätiologie des M. Dupuytren eine zunehmende Beachtung (Douglas, 1999; Kloen, 1999) (Abb. 2).

#### **1.1.4. Anatomie und Histologie**

Der Palmarfaszienkomplex der Hand besteht aus mehreren anatomischen Komponenten (Rayan, 1999b):

- Palmarfaszie (Palmaraponeurose):
  - radiale (thenare) Aponeurose
  - ulnare (hypothenare) Aponeurose
  - zentrale (palmare) Aponeurose
  
- Palmodigitalfaszie
  
- Digitalfaszie

Alle Komponenten des Palmarfaszienkomplexes untereinander, sowie tiefer gelegene Strukturen der Hand und die Haut sind durch Faserzüge verbunden. So entsteht ein dreidimensionaler Komplex aus longitudinalen, transversalen und vertikalen Fasern. Die longitudinalen Fasern der Palmaraponeurose bilden für jeden Finger ein Band, welches sich distal teilt und an beiden Seiten der Beugesehne inseriert. Ein fünftes schmaleres Band erreicht den Daumen (Grapow, 1887; Rayan, 1999b) (Abb. 3).

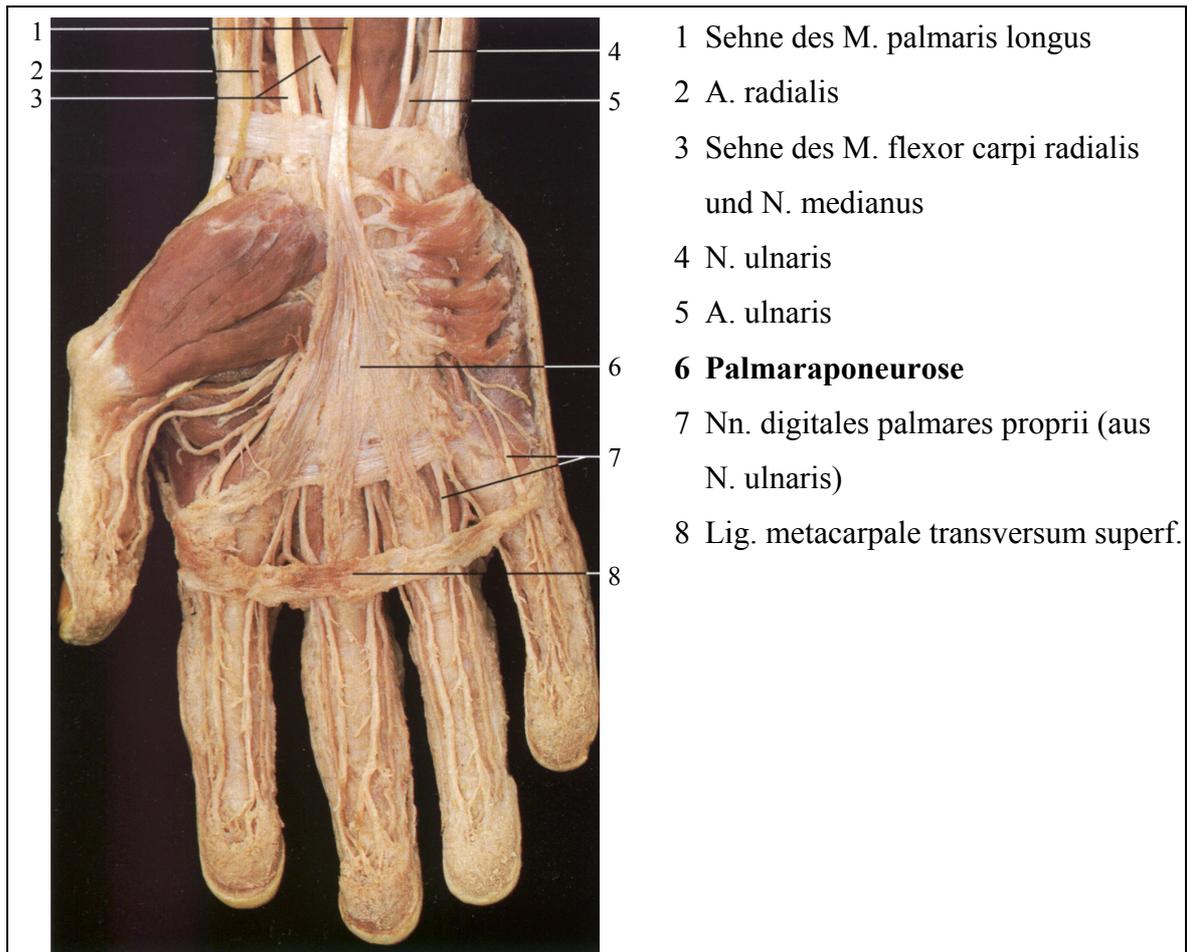


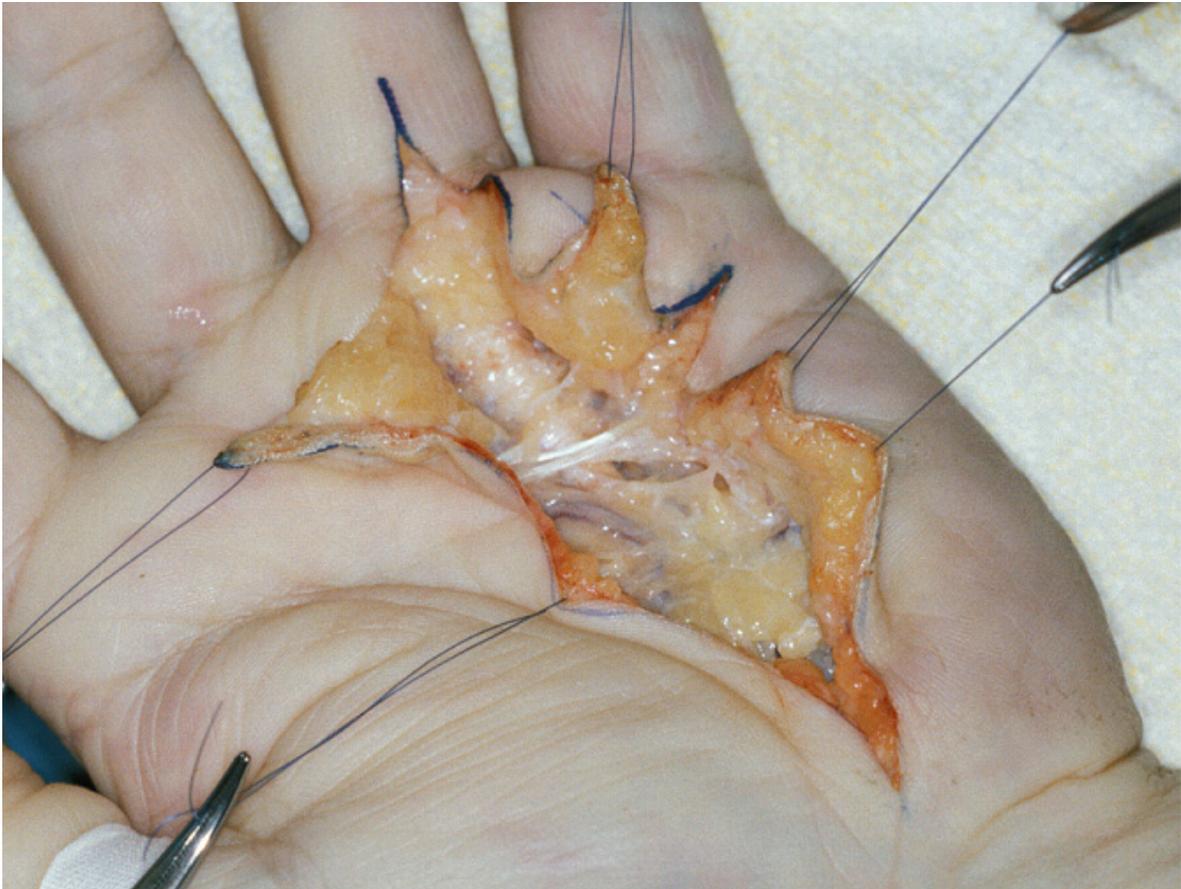
Abb. 3: Palmarseite der Hand, oberflächliche Schicht (Rohen et al., 1998)

Die Palmaraponeurose schützt tiefer gelegene Strukturen, hält Beugesehnen fest und stabilisiert die Metacarpalknochen. Weiterhin stützt sie die Palmarhaut gegen Druck- und Scherkräfte und verankert die bewegliche Palmarhaut bei den unterschiedlichsten Handbewegungen (Ritter, 1973; Rayan, 1999b).

Pathologische Veränderungen in der normalen Faszie führen insbesondere im zentralen, relativ dicken Anteil der Palmaraponeurose zum Krankheitsbild des M. Dupuytren, von dort erfolgt die Ausbreitung entlang der Faserzüge bis in die Finger (Rayan, 1999b).

Das subcutane Fettgewebe wird durch das vermehrte und verdickte Bindegewebe verdrängt und weist eine Kompressionsatrophie auf (Martini, 1985). Die sich aus den normalen Faserzügen und Bändern des Palmarfaszienkomplexes entwickelnden knotigen

und strangförmigen Zellproliferationen sind für M. Dupuytren pathognomisch (McFarlane, 1974; Rayan, 1999a/b) (Abb. 4).



**Abb. 4: Eröffnete Hohlhand mit Blick auf die noch in situ belassene und pathologisch veränderte Palmaraponeurose**

#### Der Knoten:

In der Frühphase des M. Dupuytren ist der Knoten fest mit der Palmarfaszie oder tiefer gelegenen Strukturen der Hand (Beugesehnenscheide) verbacken und besteht aus einer derben Gewebsmasse, die gut vaskularisiert erscheint (Rayan, 1999a/b) (Abb. 5).

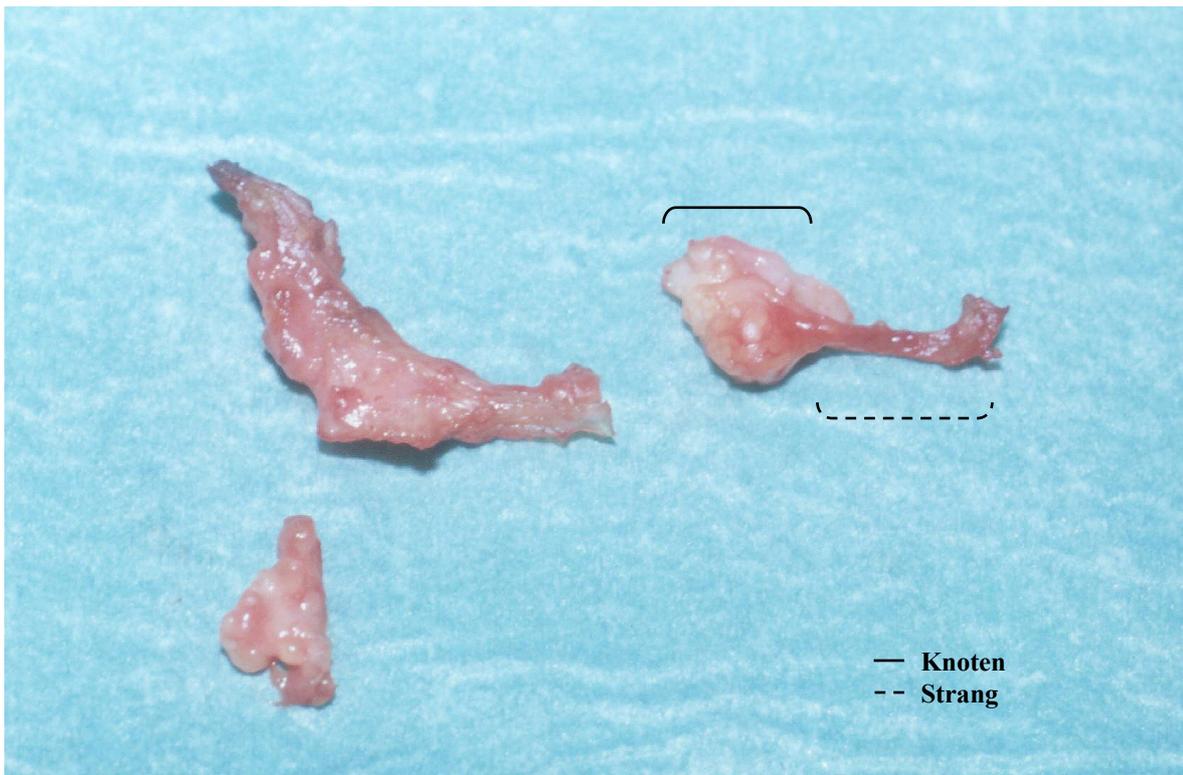
#### Der Strang:

Während der Rückbildung des Knotens entwickelt sich der Strang. Diese Stränge verursachen durch eine fortschreitende Verkürzung der erkrankten Faszie eine Retraktion

in Beugstellung mit folgender Beugedeformität der Finger, meist im Bereich der Metacarpophalangealgelenke der Ring- und kleinen Finger.

In Kontrakturbereichen sind neben Kollagenfasern elastische Fasern auffallend häufig anzutreffen und als überschießende Faserneubildung zu deuten.

Oft ist das neurovaskuläre Bündel mit dem pathologisch veränderten Gewebe verflochten und gelangt dadurch in eine subcutane verletzliche Position (Schramm et al., 1985; Lubahn, 1999; Rayan, 1999a/b) (Abb. 5).



**Abb. 5: Drei Resektionspräparate einer pathologisch veränderten Palmaraponeurose, jeweils bestehend aus Knoten- und Strangstrukturen**

#### Hautpathologie:

Die Hautveränderungen stellen bisweilen die ersten morphologischen Zeichen der Manifestation dieser Erkrankung dar.

Die Verbindungsfasern zwischen der Haut und tieferen Strukturen der Palmarfaszie, die Gropowfasern, verdicken sich und führen zu einer Adhäsion der Haut mit der Faszie und schließlich zum Verlust ihrer normalen Mobilität.

Zusätzlich können sich meist distal der Dupuytrenknoten Hautgrübchen entwickeln. Sie entstehen durch die Kontraktion der longitudinalen Fasern der Palmaraponeurose, die in die Haut inserieren (Rayan, 1999b).

### 1.1.5. Klinik

M. Dupuytren beginnt in der Regel mit typischen Hautveränderungen und einer Schwellung im Bereich der palmaren Handfläche (Abb. 6).



**Abb. 6: Klinische Morphologie des M. Dupuytren: Knoten- und Strangbildung mit resultierender Verdickung der Palmaraponeurose und Flexionsstellung der Finger**

Durch eine zunehmende Kontrakturbildung kommt es zu einer fortschreitenden Beugedeformität der Finger.

Selten wird eine initiale Entwicklung der Erkrankung in den Fingern beobachtet und darauf beschränkt bleiben. Dabei scheint die ulnare Seite häufiger als die radiale involviert zu sein.

Am häufigsten ist der Ringfinger betroffen, gefolgt von dem kleinen Finger, dem Mittelfinger und schließlich dem Daumen und dem Zeigefinger. Es können alle Finger

einer Hand oder auch beide Hände gleichzeitig von M. Dupuytren betroffen sein (Dupuytren, 1831; Guérin, 1833; Rayan, 1999a/b).

Bei schweren Verläufen kann sich die Erkrankung regional bis in den Arm ausbreiten. Außerdem kann die Läsion in Form von Fingerknöchelpolstern, einer Plantarfibromatose (Morbus Ledderhose) oder einer Penisfibromatose (Induratio penis plastica) in anderen Regionen des Körpers auftreten (Okano, 1992; Rayan, 1999a).

Unter den an M. Dupuytren erkrankten Patienten werden klinisch zwei Typen unterschieden:

Beim typischen M. Dupuytren sind die hauptbetroffenen Patienten männliche Nordeuropäer im fünften Lebensjahrzehnt mit beidhändiger Erkrankung, einer positiven Familienanamnese und einer genetischen Prädisposition mit autosomal-dominantem Erbgang. Bei diesem Typ scheinen ektope Lokalisationen und eine Rezidivneigung nicht selten vorzukommen (Ling, 1963; McFarlane, 1974; McFarlane et al., 1990; Rayan, 1999a).

Vom atypischen M. Dupuytren sind Patienten beider Geschlechter und aller Altersgruppen, hauptsächlich die der Nichtweißen-Rasse, betroffen. Häufig geht die Erkrankung mit Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis, Epilepsie und vorausgegangenen Traumen einher. Eine positive Familienanamnese oder eine genetische Prädisposition liegt bei solchen Patienten nicht vor (Rayan, 1988; Rayan, 1999a).

### **1.1.6. Klinische Diagnosestellung**

Die klinische Diagnose des M. Dupuytren stützt sich hauptsächlich auf klinische Aspekte und Funktionsprüfungen. Daneben sind die Familienanamnese und das Forschen nach Begleiterkrankungen wichtig.

### **1.1.7. Klinisch-pathologische Stadieneinteilung nach Luck (1959)**

#### Proliferationsstadium (Stadium 1):

Dichte perivaskuläre Proliferationen von Myofibroblasten mit Knotenbildung, jedoch ohne Kontrakturzeichen charakterisieren dieses Stadium.

#### Involutionsstadium (Stadium 2):

In diesem noch aktiven Stadium der Erkrankung ist der Knoten ausgebildet, und es kommt zu Kontrakturen der Gelenke. Proliferationen von Myofibroblasten herrschen vor. Daneben treten immer häufiger kollagenisierte und hyalinisierte Areale in Erscheinung.

#### Residualstadium (Stadium 3):

Dieses fortgeschrittene Stadium zeichnet sich durch fibrotische Verdickungen der Aponeurosis palmaris aus. Im Vordergrund des morphologischen Bildes sind große hyalinisierte Narbenfelder mit äußerst spärlicher Zellularität und Ausbildung von Narbensträngen zu finden.

### **1.1.8. Therapie**

Die totale Aponeurektomie ist heute, wegen der hohen Rezidivrate bei der begrenzten Strangexzision, die Therapie der Wahl. Um einer Ausweitung der Erkrankung entgegenzuwirken, wird die totale Fasziektomie mit der Entfernung aller longitudinalen auch gesunden Fasern durchgeführt.

Zusätzlich werden die am pathologischen Prozeß beteiligten, oberflächlich liegenden queren Anteile der Palmarfaszie (Lig. natatorium) entfernt, da sie eine Abduktion der Finger limitieren können.

Die pathologisch unveränderten, quer verlaufenden Fasern der tiefen Hohlhand bleiben erhalten, wodurch die unterhalb dieser Fasern gelegenen neurovaskulären Bündel geschützt bleiben (Skoog, 1967; Tubiana, 1955; Jabaley, 1999; Mailänder et al., 2000).

Aufgrund von schlechteren postoperativen Ergebnissen werden nur in besonderen Fällen Therapieverfahren wie die „continuous-elongation-technique“ (TEC) nach Messina, die Dermotofasziektomie, die perkutane Nadelfasziektomie, die Arthrodesse oder in Fällen mit fortgeschrittener Kontrakturbildung die Amputation durchgeführt (Hurst und Badalamente, 1999; Mailänder et al., 2000).

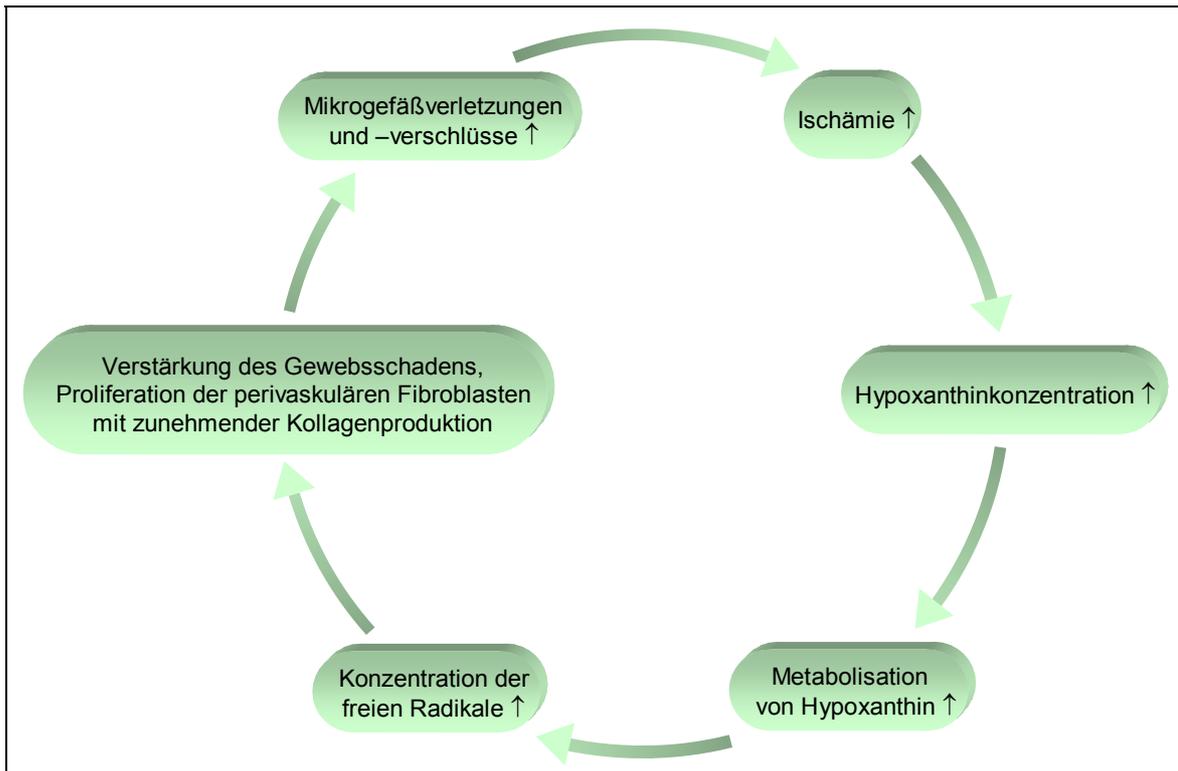
Die Ausweitung des Krankheitsprozesses auf nicht operierte Gebiete der Hand oder das erneute Auftreten der Erkrankung in bereits operierten Arealen lässt sich oft nicht vermeiden. Eine Operation wird daher erst bei stärkeren Funktionsverlusten oder Schmerzen durchgeführt (Boyer und Gelberman, 1999; Mailländer et al., 2000).

### **1.1.9. Pathogenese**

Offensichtlich beruht die Erkrankung auf einer Störung der Hypoxanthin-Konzentration innerhalb der betroffenen Abschnitte der Palmaraponeurose.

Bei einer protrahierten Ischämie, Mikrogefäßverletzungen und -verschlüssen, konnten im erkrankten Gewebe sechsfach höhere Hypoxanthin-Konzentrationen als in der normalen Palmarfaszie gefunden werden.

Hypoxanthin wird unter der Abgabe freier, instabiler, hoch reaktiver Radikale (Hydrogenperoxid, Hydroxyl, Superoxid) metabolisiert. Diese freien Radikale bewirken eine Proliferation der perivaskulären Zellen, die ihrerseits eine Verstärkung des Gewebsschadens und der Ischämie hervorrufen. Gleichzeitig wird durch die Proliferation der Fibroblasten vermehrt Kollagen gebildet, so dass ein Circulus vitiosus entsteht, der letztlich zum Fortschreiten der Erkrankung führt (Kischer und Speer, 1984; Murrell et al., 1987; Murrell et al., 1990; Murrell und Huesten, 1990; Murrell, 1991) (Abb. 7).



**Abb. 7: Circulus vitiosus der Pathogenese beim M. Dupuytren (in Anlehnung an Murrell et al., 1990)**

Neben der Interaktion von Aktin-Mikrofilamenten durch den Hypoxanthin-Stoffwechsel werden Kaskaden von molekularbiologischen Prozessen getriggert, an denen Fibronectin, Tenascin und Laminin beteiligt sind. Hierdurch kommt es zur Anreicherung von Typ-III-, -IV- und -IX-Kollagen in der extrazellulären Matrix.

Die nachweisbare Flexionsstellung der betroffenen Körperpartien beim M. Dupuytren (die Kontraktur) ist eine Summation aller kontraktile Elemente in den Myofibroblasten und wird durch die Expression von  $\alpha$ -SMA verursacht (Badalamente et al., 1983; Tomasek et al., 1987; Tomasek und Rayan, 1995; Yi et al., 1999).

Gemäß Untersuchungen von Hoch et al. (2002) ist das Kontraktionsverhalten der Zellen beim M. Dupuytren von ihrer Gewebslokalisierung abhängig: Zellen aus zur Haut ziehenden Bindegewebssträngen zeigen ein höheres Kontraktionsvermögen als Zellen des Gewebesknotenzentrums und der normalen Palmaraponeurose.

## 1.1.10. Die Myofibroblasten

### 1.1.10.1. Morphologie, Vorkommen und Herkunft der Myofibroblasten

Spindelzellen repräsentieren die morphologische Grundlage des M. Dupuytren. Gabbiani und Majno (1972) haben diese Zellen wegen morphologischer Ähnlichkeiten zu den Fibroblasten sowie zu den glatten Muskelzellen als Myofibroblasten beschrieben. Die zelluläre Herkunft bildet jedoch Gegenstand zahlreicher Diskussionen.

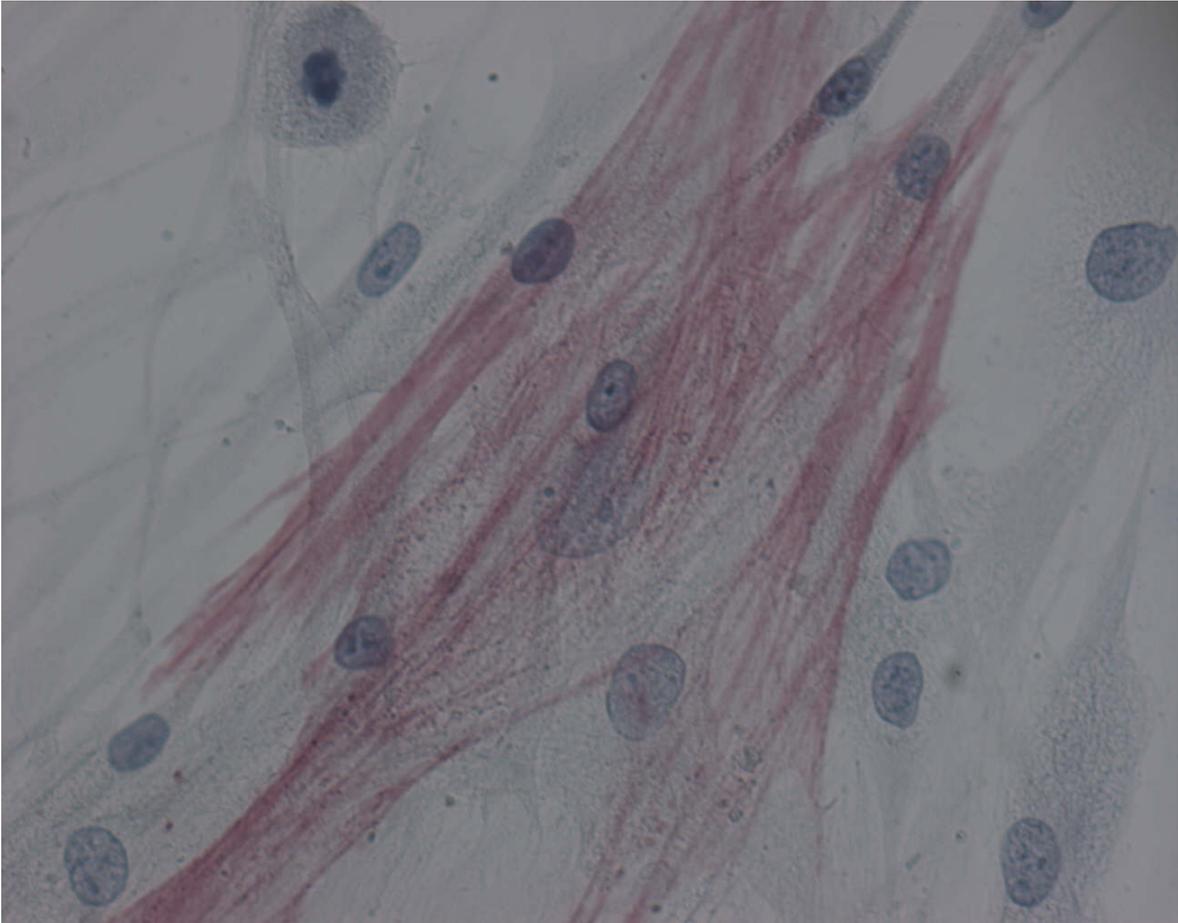
Myofibroblasten sind große, spindel-, oft sternförmige Zellen mit eingedellten Zellkernen (Tomasek et al., 1999). Anders als bei den Fibroblasten bilden ihre Aktin-Mikrofilamentbündel (stress fibers) kein kortikales Netzwerk längs der Zellmembran, sondern sind entlang der langen Zellachse orientiert. Die Filamente sind seltener und schmaler als in den glatten Muskelzellen (Tomasek et al., 1987).

Das dominierende Mikrofilament der Myofibroblasten ist das  $\alpha$ SMA (Darby et al., 1990). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der  $\alpha$ SMA-Expression und der Erzeugung kontraktile Kräfte (Tomasek und Rayan, 1995; Ronnov-Jessen und Petersen, 1996).

Aktin-Mikrofilamentbündel können mit spezifischen Anti-Aktin-Antikörpern (SMAK) oder Fluoreszenz-Proben, die filamentöses Aktin binden, intensiv angefärbt werden (Skalli et al., 1986; Tomasek et al., 1986). Fibroblasten werden aufgrund ihres andersartigen Verlaufes des filamentösen Aktins nicht angefärbt (Tomasek et al., 1999) (Abb. 8).

Ebenso wie Fibroblasten enthalten die Myofibroblasten einen gut entwickelten Golgi-Apparat, ein ausgedehntes raues endoplasmatisches Retikulum und verfügen über keine Basalmembran. Myofibroblasten sind untereinander durch „gap-junctions“ verbunden.

Für eine Differenzierung der Myofibroblasten aus Fibroblasten spricht der positive Nachweis von Vimentin und identischem Myosin sowohl in Fibroblasten als auch in Myofibroblasten. Der negative Nachweis von Laminin und Desmin in den Myofibroblasten, Proteine, die für die glatten Muskelzellen charakteristisch sind, unterstützt diese These (Ryan et al., 1973; Schurch et al., 1984; Tomasek et al., 1986; Murrell, 1991).



**Abb. 8: Darstellung von mit Anti-Aktin-Antikörpern (SMAK) gefärbten, positiven Myofibroblasten. Die benachbarten Fibroblasten weisen eine negative Reaktivität auf. APAAP. 600x**

#### **1.1.10.2. Theorien zur Differenzierung der Myofibroblasten aus Fibroblasten**

Die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten vollzieht sich offenbar durch eine wachsende Fibrinolyse-Aktivität (Plasminogen-Aktivator-Enzyme) im pathologisch veränderten Gewebe (Merlo et al., 1986).

Durch Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- $\beta$ , PDGF, IGF-II, IL-4) kann bei mechanischem Streß die Differenzierung zu Myofibroblasten gefördert werden (Grinnell, 1994; Halliday und Tomasek, 1995; Tomasek et al., 1999).

Experimentelle Untersuchungen belegen, dass sich Fibroblasten in der Kultur in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte direkt in Myofibroblasten differenzieren (Masur et al., 1996). Danach kann die Differenzierung durch Ansetzen der Zellen bei einer geringen

Zelldichte induziert werden. Der Myofibroblastenphänotyp geht nach einer Passage hoher Zelldichte, der Fibroblastenphänotyp nach einer Passage geringer Zelldichte verloren.

### **1.1.10.3. Das Aktin der Myofibroblasten**

Mehrere Aktinmoleküle zusammen bilden eine doppelsträngige polare Helix, das Aktinfilament. Aktinfilamente sind sehr flexibel und gruppieren sich meist zu Netzwerken oder Bündeln, assoziiert mit der Plasmamembran. Sie sind Bestandteil aller eukaryotischen Zellen und für die Zellbewegung wichtig. Viele aktinbindende Proteine können mit den Aktinfilamenten verbunden sein und somit viele Funktionen übernehmen.

Bei den Myofibroblasten können sich die Aktinfilamente im Cytoplasma zu kontraktile Bündeln formieren, während sie sich bei den Fibroblasten in Form von flächen- und fingerartigen Fortsätzen zur Fortbewegung anordnen (Alberts et al., 1999; Badid et al., 2000).

Das Aktinmolekül spielt in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle, da es als Marker für die Myofibroblasten verwendet wurde.

Simmons et al. (1999) zufolge färbt sich nur der Teil der Fibroblasten mit  $\alpha$ SMA-Antikörpern (SMAK) *in vivo* oder in der Kultur an, der sich zu Myofibroblasten differenziert hat. Durch diesen Sachverhalt wurde es in den Versuchen der vorliegenden Arbeit möglich, den Anteil der Myofibroblasten in einer Kultur zu bestimmen. Hingegen reagieren Hautfibroblasten SMAK-negativ (Tomasek et al., 1999).

## 1.2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das morphologische Substrat eines M. Dupuytren wird durch Proliferationen von  $\alpha$ SMA-positiven Zellen repräsentiert, die den weiteren Verlauf der Erkrankung in seinen verschiedenen Phasen beeinflussen und das klinische Symptomenbild prägen.

Diese Zellen verfügen durch ihre kontraktilen Elemente über funktionelle Besonderheiten, die den Fibroblasten nicht zu Eigen sind. Daher ist anzunehmen, dass beiden Zellarten trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit unterschiedliche Eigenschaften im Gewebsverband zugrunde liegen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden folgende Fragen in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gestellt:

- Welche morphologischen Bilder liefern die verschiedenen Stadien der Erkrankung? Treten Unterschiede im histologischen Verteilungsmuster der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen auf?
- Bestehen morphologische und immunhistochemische Unterschiede zwischen den  $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Gewebsverband und solchen in der Zellkultur? Welche Bedeutung bezüglich der zellulären Interaktion kommt dabei den Fibroblasten zu?

Um die letzte Frage zu klären, erscheint es notwendig mittels Zellkulturen morphologische Aspekte und biologisches Verhalten der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen zu charakterisieren und sie mit denen der Fibroblasten zu vergleichen. Daraus resultieren folgende Fragen:

- Welche Arbeitsmethode eignet sich, um die interzelluläre Aktion zwischen den Fibroblasten und  $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Gewebe sowie das Verteilungsmuster der einzelnen Zellarten herauszufinden?
- Da durch Passagieren in der Zellkultur eine Anreicherung von verschiedenen Zellarten erreicht werden kann, erhebt sich die Frage, ob der Prozeß des Passagierens auf die Anwesenheit bzw. die Stabilität der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen eine Rolle ausübt.

- Auf welche Weise beeinflusst eine Variation des Serumanteils im Medium der Kultur die Zelldichte der proliferierenden  $\alpha$ SMA-positiven Zellen?
- In wie weit wird die Zelldichte der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen einer Kultur durch die Größenordnung des Ausgangsgewebes beeinflusst?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Im Anhang befinden sich Hinweise zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien.

### 2.2. Untersuchungsmaterial

#### 2.2.1. Untersuchungskollektiv der an M. Dupuytren erkrankten Patienten

Die Untersuchungen wurden an Gewebe von Patienten mit einem klinisch gesicherten M. Dupuytren durchgeführt.

Tabelle 1 veranschaulicht die für jeden Versuch benötigten Präparate. Exemplarisch sind für den Versuch des Methodenvergleichs insgesamt sieben Präparate mit M. Dupuytren (zwei Gewebsknoten, zwei Gewebstränge, drei Palmaraponeurosen) und drei Kontrollpräparate verwendet worden.

Gewebsknoten wurden entsprechend der Tabelle für alle Versuche benötigt, während Gewebstränge, Aponeurose und Kontrollgewebe nur für die Versuche des Methodenvergleichs, des Passagierens und für immunhistochemische Untersuchungen herangezogen wurden.

Versuch	M. Dupuytren			Kontrolle
	Knoten	Strang	Aponeurose	
Methodenvergleich	2	2	3	3
Passagieren von Kulturen	3	3	5	4
Untersch. Serumbeigaben zum Medium	8	0	0	0
6-Well-Versuch	5	0	0	0
24-Well-Versuch	4	0	0	0
Immunhistochemie der Paraffinschnitte	32	32	32	7

**Tab. 1: Aufteilung der Präparate auf die verschiedenen Versuche**

Die Gewebentnahme erfolgte nach einem standardisierten Vorgehen der Operationstechnik. Die sichtbar pathologisch veränderten Anteile der Aponeurosis palmaris wurden unter lupenchirurgischer Abgrenzung sorgfältig radikal entfernt.

Ein positives Votum der Ethikkommission zur Gewebentnahme lag vor.

Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurden die entnommenen Gewebeproben in Kochsalzlösung überführt und für die vorgesehenen histomorphologischen, immunhistochemischen und Untersuchungen in der Zellkultur aufgearbeitet.

### **2.2.2. Untersuchungskollektiv der Kontrollpatienten**

Als Kontrolle wurden Präparate von 14 Fällen mit einem klinisch bekannten KTS und einer normalen Palmaraponeurose als Kontrolle herangezogen (Tab. 1).

### **2.2.3. Gewebspräparation**

Um eine Kontamination mit Mikroorganismen wie Hefen, Pilze, Viren oder Bakterien zu vermeiden, wurden sämtliche Versuche unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

Die Fibroblasten wurden zum einen aus an M. Dupuytren erkranktem Gewebe, zum anderen aus der Palmarfaszie von KTS-Patienten isoliert.

1. Desinfizieren des Gewebes in 70% Alkohol für einige Sekunden unter der „Bench“
2. Spülen in PBS (auf Eis)
3. Entfernung des Fettgewebes und Teilung des Gewebes mit Hilfe eines Präparierbesteckes und unter gekühlten Bedingungen in:
  - Knotengewebe der Fibromatosis palmaris
  - Strangewebe um die noduläre Region
  - Gewebe der Aponeurosis palmaris
4. Teilung der Gewebsabschnitte jeweils spiegelbildlich in zwei Hälften, um eine vergleichende Untersuchung zwischen Ergebnissen der konventionellen Histologie

und der Immunhistochemie einerseits sowie der Zellkulturen andererseits vorzunehmen.

### **2.3. Morphologische Stadieneinteilung**

Die histomorphologische Stadieneinteilung erfolgte am erkrankten Gewebe nach Luck (1959):

- Proliferationsstadium
- Involutionsstadium
- Residualstadium

Das Gewebe des Kontrollkollektives wurde histologisch beurteilt und verglichen.

### **2.4. Histologie**

Die histologischen Untersuchungen aller Gewebeproben erfolgten an 3 $\mu$ m Schnitten des in Paraffin gebetteten Gewebes. Folgende Routinefärbungen wurden durchgeführt: HE, Trichrom, Eisen, PAS.

### **2.5. Immunhistochemie des in Paraffin gebetteten Materials**

1. Anfertigen von 3 $\mu$ m-Paraffinschnitten
2. Trocknen der Schnitte für 12 Stunden im Brutschrank
3. Entparaffinieren der Schnitte mit der absteigenden Ethanolreihe: dreimal 10min Xylol, zweimal 3min 100% Alkohol, einmal 3min 96% Alkohol, einmal 3min 70% Alkohol
4. Rehydrieren durch Spülen in TBS

5. Inkubation der Schnitte in einer mit Zitronensäure-Monohydrat p.a. gefüllten Küvette für 1min bei 850Watt und für 10min bei 150Watt in der Mikrowelle unter strenger Einhaltung des pH-Wertes, um eine Antigendemaskierung zu erreichen.
6. Spülen in TBS, um eine Unterbrechung der Nassphase zu vermeiden.

Anschließend wurden die entparaffinierten Schnitte nach der Avidin-Biotin-Methode bei Raumtemperatur gefärbt:

7. Inkubation mit dem Primärantikörper: Anti-Human-Smooth-Muscle-Aktin (SMAK), monoklonaler AK von der Maus gegen humanes Aktin für 30min
8. Spülen in TBS für 10min
9. Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin für 30min
10. Spülen in TBS für 10min
11. Inkubation mit  $H_2O_2$  für 10min, zum Blockieren einer möglichen Peroxidaseaktivität des Gewebes
12. Inkubation mit dem Tertiärantikörper: ABCComplex/HRP
13. Spülen in TBS für 10min
14. Inkubation mit dem Substrat-Chromogen für die Peroxidase (DAB) für 10min
15. Spülen in Leitungswasser
16. Eindeckeln mit Aquatex

## **2.6. Beurteilung der SMAK-gefärbten Schnitte unter dem Lichtmikroskop**

Die SMAK-gefärbten entparaffinierten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Leitz) betrachtet und je nach Intensität der Anfärbbarkeit ausgewertet, um die Verteilung der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den Gewebeproben zu beurteilen.

Zur besseren Orientierung wurden HE-gefärbte Standardschnitte bei der Auswertung der positiven Reaktivität von SMAK herangezogen.

## **2.7. Methoden in der Zellkultur**

Nach dem Vorgang des Gewebsansatzes und dem Aussähen der Zellen auf eine neue Zellkulturflasche wurde eine Manipulation an den Gefäßen in den ersten 24 Stunden vermieden. Ein Mediumwechsel konnte erst nach frühestens 48 Stunden erfolgen. Damit wurde für das Anwachsen der Zellen eine optimale Voraussetzung geschaffen.

### **2.7.1. Methode des „Auswachsens“**

Dieses Verfahren des Ansatzes wurde an Gewebe von Patienten mit M. Dupuytren und an Gewebe des Kontrollkollektives durchgeführt:

1. Entnahme des Gewebeknotens, -stranges und der Aponeurose einer definierten Gewebsgröße von  $5\text{mm}^3$  aus dem mit PBS gefüllten Gefäß
2. Zerteilung des Gewebes mit einem Präparierbesteck in ca.  $1\text{-}2\text{mm}^2$  kleine Stücke
3. Einpipettieren von je ca. 5ml bereits vorgewärmten DMEM zur kurzen Benetzung des Bodens der Kulturflasche
4. Fixierung von ca. 6-8 Gewebsstücken je Flasche mit einer Pasteurpipette auf dem feuchten Boden der Kulturflasche. Diese wurde dabei stets senkrecht gehalten, um ein Ablösen des Gewebes von dem Kulturflaschenboden durch das Medium zu vermeiden.
5. Auswachsen der Zellen aus den Gewebsstücken im Brutschrank
6. Vorsichtiges Hinlegen der Kulturflasche auf die Seite des fixierten Gewebes nach ca. 4-5 Stunden

### **2.7.2. Gewebsansatz mit Kollagenasebehandlung**

Der Ansatz des Gewebes mit der Kollagenasebehandlung erstreckte sich jeweils über zwei Tage. Vor der eigentlichen Kollagenasebehandlung wurde die jeweils benötigte Enzym- bzw. Lösungsmenge jedes Inkubationsschrittes für einen möglichst vollständigen Kollagenabbau zum Freilegen der Zellen festgelegt. Diese Testung erfolgte an einer vorher definierten Gewebsgröße von  $5\text{mm}^3$ . Das Ursprungsgewebe dieser Größe und die

Enzymlösungen wurden dann je nach Versuchsreihe auf die entsprechenden Gefäße verteilt.

#### Tag 1:

1. Entnahme der vorbereiteten Gewebsprobe (festgelegte Gewebsgröße: 5mm<sup>3</sup>) aus dem mit PBS gefüllten Gefäß
2. Aufarbeitung der Gewebsprobe in Glaspetrischalen mit einer sterilen Schere entsprechend der Versuchsreihen:
  - Vergleich der Methoden: „Auswachsen“ und Kollagenaseabbau / Passagieren von Kulturen:
    - Zerkleinern der Gewebstücke des Knoten-, Strang-, Aponeurose- und Kontrollgewebes mit einer sterilen Schere in 1mm<sup>2</sup> große Stückchen zur Vergrößerung der Angriffsfläche der Kollagenase
    - Weiterbehandlung aller Stücke eines Gewebsareals in einem 15ml-Zentrifugenröhrchen
  - Vergleich unterschiedlicher Serumbeigaben zum M. Dupuytren-Gewebe:
    - Teilen des Knotenbereichs mit einer sterilen Schere in zwei bzw. drei Areale
    - Zerschneiden jedes Areals in jeweils 1mm<sup>2</sup> große Stückchen
    - Getrennte Weiterbehandlung der Areale in zwei bzw. drei 15ml-Zentrifugenröhrchen
  - Teilung der Gewebsprobe in 6 gleich große Areale (6-Well-Versuch):
    - Unterteilen eines Gewebeknotenbereichs mit einem sterilen Präparierbesteck in 6 Areale
    - getrenntes Zerschneiden der sechs Bereiche in maximal 1mm<sup>2</sup> große Stücke, Überführung in 6 kleine Reagiergefäße
    - Anlegen je einer Kultur aus den Zellen eines Reagiergefäßes, insgesamt also 6 Kulturen für eine Ausgangsprobe der Größe 5mm<sup>3</sup>

- Teilung der Gewebprobe in 24 gleich große Areale (24-Well-Versuch):
    - Zerkleinern des Gewebeknotens mit einer sterilen Schere in 24 Stückchen mit einer maximalen Größe von 1mm<sup>2</sup>
    - Überführen jedes dieser Stückchen in ein eigenes kleines Reagiergefäß, um 24 isolierte Kulturen zu züchten.
3. Spülen der Gewebstücke in PBS, um das Austrocknen des Gewebes bis zur Weiterbehandlung zu vermeiden.
  4. Herstellung der Fibroblastenisolations-Lösungen (vgl. Abschnitt 7.3)
  5. Zentrifugieren der Suspension aus Gewebstückchen und PBS bei 1500Upm für maximal 2min
  6. Absaugen des Überstandes
  7. Inkubation des Gewebes in 4ml Hyaluronidase 0,5% für 15min bei Raumtemperatur zur Verbesserung der Kollagenasewirkung am Gewebe.
  8. Zentrifugieren bei 1500Upm für maximal 2min
  9. Absaugen des Überstandes
  10. Spülen in PBS
  11. Wiederholung der Schritte 8. und 9.
  12. Spülen in 5ml Trypsin 0,25%
  13. Wiederholung der Schritte 8. und 9.
  14. Wiederholung der Schritte 12. und 13.
  15. Inkubation in 4ml Kollagenase 0,1%, Trypsin 0,25% für 20min im Brutschrank
  16. Wiederholung der Schritte 8. und 9.
  17. Spülen in PBS
  18. Wiederholung der Schritte 8. und 9.
  19. Zweimalige Wiederholung der Schritte 17. und 18. zur Beseitigung aller Enzymreste
  20. Inkubation in 6ml Kollagenase 0,2% und DMEM ohne FKS über Nacht im Brutschrank bei 37°C
- (Die Kollagenasewirkung konnte bei dieser Temperatur und in diesem Zeitintervall optimal ausgenutzt werden. Ein vollständiger Abbau des Kollagens war somit gewährleistet.)

Tag 2:

21. Zentrifugieren bei 1200Upm für 5min
22. Absaugen des kollagenhaltigen Überstandes
23. Resuspendieren in dem für den Versuch entsprechenden Medium (DMEM ohne FKS, DMEM mit 10% FKS, DMEM mit 20% FKS)
24. Zentrifugieren bei 1500Upm für maximal 2min
25. Absaugen des Überstandes
26. Wiederholung der Schritte 23. bis 25.
27. Resuspension des Pelletts:
  - Vergleich der Methoden: „Auswachsen“ und Kollagenaseabbau / Passagieren von Kulturen:  
Resuspension in 5ml Kultivierungsmedium (DMEM mit 10% FKS) und Transfer in eine 25cm<sup>3</sup>-Kulturflasche
  - Vergleich unterschiedlicher Serumbeigaben zum M. Dupuytren-Gewebe:  
Resuspension in 5ml Kultivierungsmedium (DMEM ohne FKS, DMEM mit 10% FKS, DMEM mit 20% FKS) und Transfer in eine 25cm<sup>3</sup>-Kulturflasche
  - Teilung der Gewebprobe in 6 gleich große Areale (6-Well-Versuch):  
Resuspension der 6 Reagiergefäße in jeweils 2-2,5ml Medium (DMEM mit 10% FKS) und Überführen auf eine 6-Well-Platte
  - Teilung der Gewebprobe in 24 gleich große Areale (24-Well-Versuch):  
Resuspension der 24 Reagiergefäße mit 0,5ml Medium (DMEM mit 10% FKS) und Überführen auf je einen Well von insgesamt drei 8-Well-Chamberslides
28. Überführen der Kulturflaschen, 6-Well-Platten und Chamberslides in den Brutschrank
29. Fixierung der Chamberslides nach 24 Stunden (30% Aceton / 70% Methanol) für 5min

### **2.7.3. Weiterführende Behandlung der „Monolayer“-Kulturen**

#### **2.7.3.1. Mediumwechsel**

Der erste Mediumwechsel einer „Monolayer“-Kultur wurde nach Beobachtung der ersten auswachsenden Zellen aus den Gewebstücken durchgeführt. Anschließend wurde das Nährmedium alle 2-3 Tage gewechselt:

1. Kontrolle der Kultur unter dem Mikroskop (Leitz) und Bewertung von: Zelldichte (vereinzelt, halbkonfluent, konfluent), Größe und Form der Einzelzellen, Anheftungsgrad (festhaftend oder schwimmend)
2. Absaugen des alten Mediums inklusive abgelöster Gewebstücke in der sterilen „Bench“
3. Spülen in PBS
4. Einpipettieren von neuem angewärmten Medium (DMEM ohne FKS, DMEM mit 10% FKS, DMEM mit 20% FKS) in die Kulturflasche

#### **2.7.3.2. Passagieren der Zellen mit Trypsin**

Die „Monolayer“-Kulturen wurden zum Zeitpunkt der Zellkonfluenz auf eine größere Fläche subkultiviert, um ein Absinken der Proliferationsrate bei zu hoher Zelldichte oder ein Absterben der Kultur zu vermeiden. Gleichzeitig wurde die Passagenzahl erhöht.

1. Absaugen des alten Mediums
2. Spülen in PBS, um eine Beeinträchtigung der Trypsinwirkung durch Mediumrückstände zu verhindern.
3. Inkubation in auf 37°C vorgewärmtem Trypsin 0,05% für 3-5min im Brutschrank zum Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden.
4. Vorsichtiges Abklopfen der Kulturflasche bzw. Einsatz eines Gummischabers beim 6-Well-Versuch (um ein Vermischen der Medien benachbarter Wells zu verhindern) zur Unterstützung des Ablösevorganges der Zellen.
5. Zugabe der doppelten Menge an warmem Nährmedium bei Lösung >90% der Zellen (Kontrolle unter dem Mikroskop (Leitz)). Der Serumzusatz des Mediums bewirkte

eine sofortige Bindung des EDTAs und Inaktivierung des Trypsins und seiner zytotoxischen Wirkung.

6. Zentrifugieren bei 1500Upm für 10min
7. Absaugen des Überstandes
8. Resuspension des Pellets mit frischem Nährmedium
9. Verteilung des Resuspendats auf Kulturgefäße

### **2.7.3.3. Überführen der Zellen auf Chamberslides und Immunhistochemie**

Beim Trypsinieren wurde eine vorgegebene Anzahl an Zellen (75.000 Zellen in 0,5ml Medium je Well) auf die Chamberslides überführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Durch die folgende immunhistochemische Reaktion konnte der Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen der jeweiligen Passage bestimmt werden.

Nach 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Wells in PBS gespült. Es folgte das Fixieren der Zellen mit einem 70% Methanol-30% Aceton-Gemisch für ca. 5min.

Die Chamberslides wurden bei Raumtemperatur nach der APAAP-Methode gefärbt.

Die zu suchenden spezifischen Antigene, im vorliegenden Fall die Aktinfilamente, wurden durch Antikörper markiert und anschließend sichtbar gemacht:

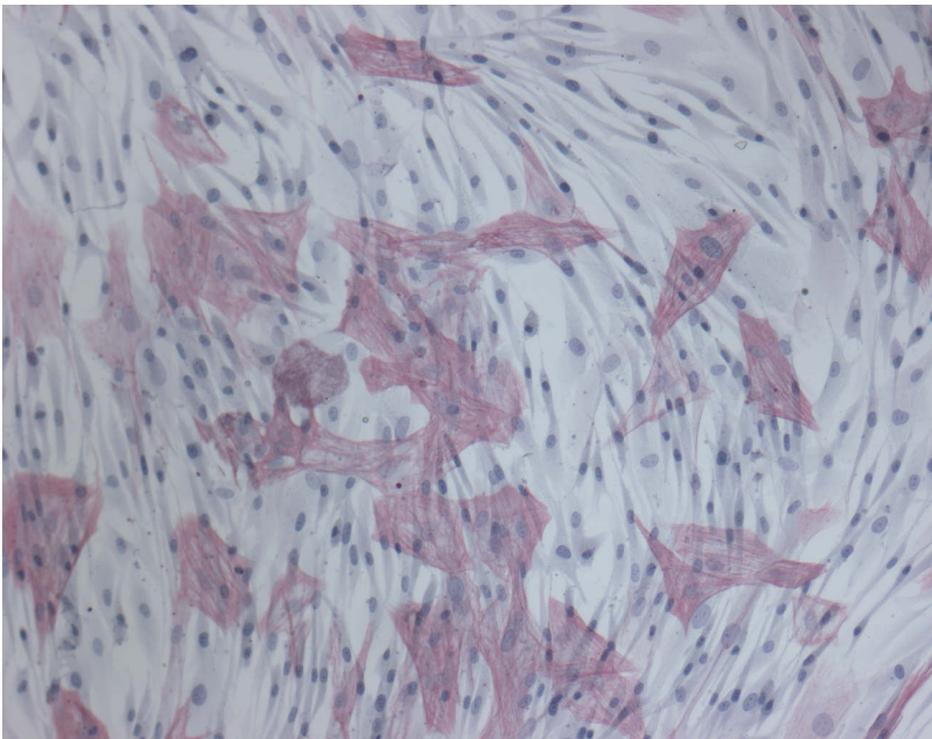
1. Inkubation mit dem Primär-Antikörper: SMAK von der Maus für 30min
2. Spülen in einer TBS-haltigen Küvette für 10min
3. Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin für 30min
4. Wiederholung des 2. Schrittes
5. Inkubation mit dem Tertiärantikörper: ein mit einem Enzym (alkalische Phosphatase) gekoppelter APAAP-Komplex von der Maus für 30min
6. Wiederholung des 2. Schrittes
7. Wiederholung der Inkubationsschritte 3.-6. für jeweils 10min, um eine Intensitätssteigerung der Immunfärbung zu erreichen.
8. Färben mit einer Substrat-Chromogen-Gebrauchslösung (ein Neufuchsin-Substrat-System zum Rotfärben der aktinhaltigen Zellen) in einer Küvette für 5-7min
9. Spülen in Aqua dest. für 10min

10. Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer (Zellkerne blau)
11. Spülen der Chamberslides unter fließendem Wasser für 10min
12. Eindeckeln mit Aquatex

## **2.8. Bestimmung des Anteils der mit SMAK dargestellten Zellen unter dem Lichtmikroskop**

Im Anschluß an das Überführen der Zellen auf Chamberslides und das Färben nach der APAAP-Methode konnte der Anteil der mit SMAK dargestellten Zellen an einer Kultur bestimmt werden.

Von jeder Probe wurden jeweils vier Gesichtsfelder mit der höchsten Reaktivität mit SMAK bei einer 10er-Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Leitz) mit einer CCD-Kamera aufgenommen, abgespeichert und über die Bildanalyse-Software Pic-Klick ausgezählt. Nach der Markierung aller Zellkerne eines Gesichtsfeldes (im Mittel ca. 1000 Zellen) wurden die rot-(SMAK) gefärbten Zellen gekennzeichnet, um den Anteil der SMAK-gefärbten Zellen eines Gesichtsfeldes und der Monolayer-Kultur bestimmen zu können (Abb. 9).



**Abb. 9: Darstellung eines auszählenden Gesichtsfeldes. Mit SMAK reagierende Zellen und negativ reagierende Fibroblasten in der Kultur. APAAP. 100x**

## **2.9. Methoden der Statistik**

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Microsoft EXCEL 2000 und dem Statistikprogramm SPSS 10.0 für Windows aufgearbeitet. Zur Beurteilung der Signifikanz wurden die Ergebnisse verschiedener Gruppen auf ihre Normalverteilung überprüft. Für die Untersuchungen kamen der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben, der Friedman-Test und der Kruskal-Wallis-Test für k unabhängige Stichproben zur Anwendung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Anordnung der $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Untersuchungsmaterial

Die Verteilung der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den verschiedenen Stadien des M. Dupuytren:

Die Abbildungen 10 bis 15 stellen den Knoten-, Strang- und Aponeurosebereich des Proliferationsstadiums dar.

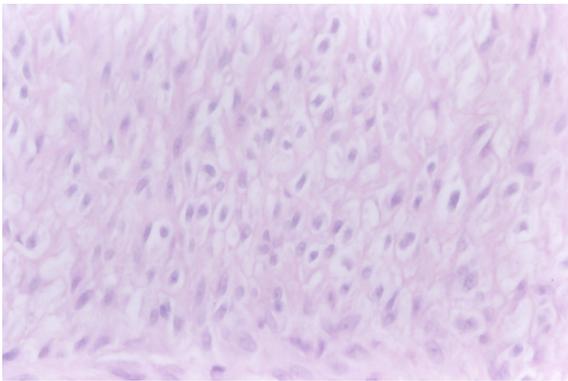


Abb. 10: Stadium der Proliferation. Histomorphologisches Bild eines Gewebeknotens mit dichten Proliferationen von monomorphkernigen Spindelzellen. HE. 400x

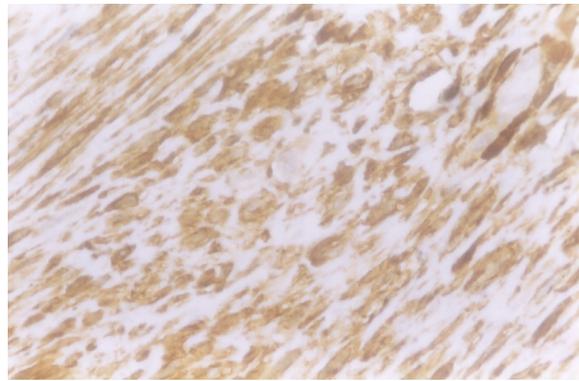


Abb. 11: Stadium der Proliferation. Immunhistochem. Darstellung der  $\alpha$ SMA-Filamente in zahlreichen  $\alpha$ SMA-positiven Spindelzellen im Gewebeknoten. ABC. 400x

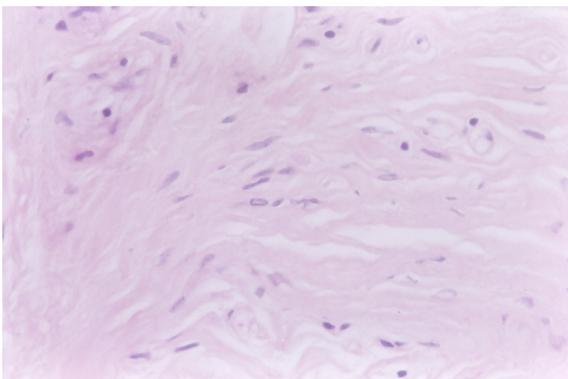


Abb. 12: Stadium der Proliferation. Histomorpholog. Bild des Gewebestranges. Spärliche Gruppen von Spindelzellen mit einem kollagenreichen hyalinisierten Bindegewebe in der Umgebung. HE. 400x

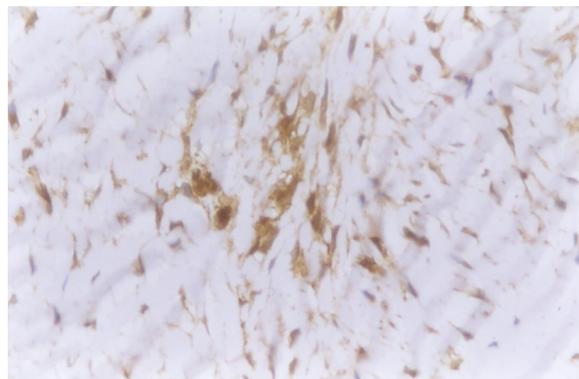
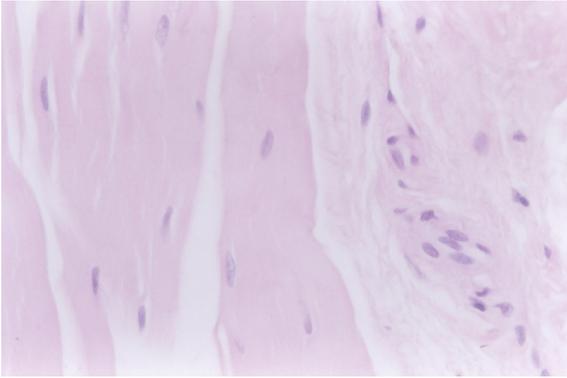
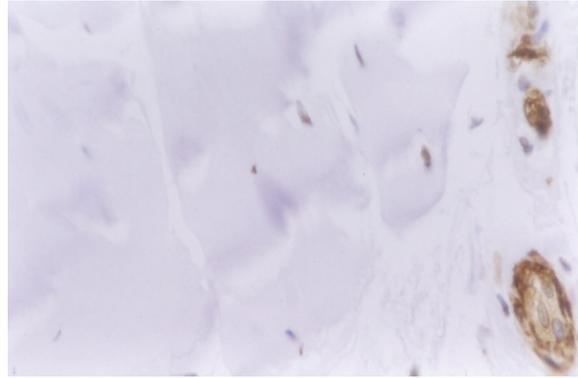


Abb. 13: Stadium der Proliferation. Immunhistochemische Demonstration der spärlichen  $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Gewebestrang. ABC. 400x



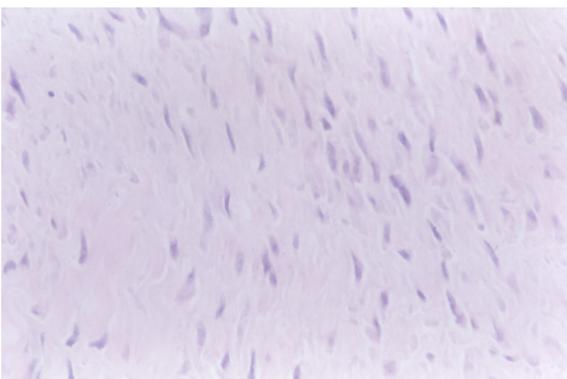
**Abb. 14: Stadium der Proliferation. Histomorphologische Darstellung einer Aponeurose. HE. 400x**



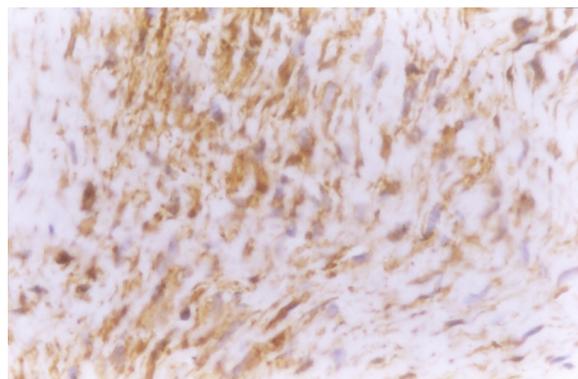
**Abb. 15: Stadium der Proliferation. Immunhistochem. Darstellung der Aponeurose. ABC. 400x**

Der Knoten zeigt aufgrund seines Zellreichtums eine deutliche positive Reaktivität der  $\alpha$ SMA-Expression (Abb. 11). Im Gegensatz dazu lassen sich im Gewebsstrang mäßig viele (Abb. 13) und in der Aponeurose (Abb. 15) äußerst spärliche oder nur vereinzelt  $\alpha$ SMA-positive Zellen nachweisen.

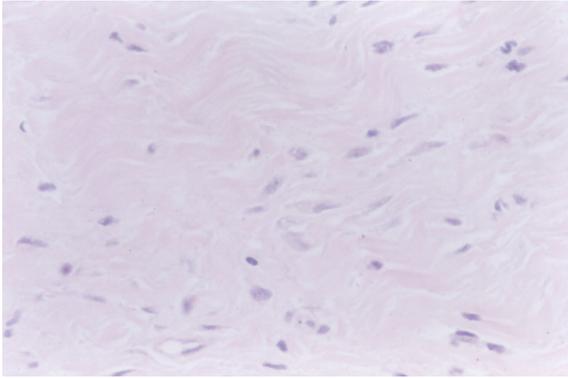
Auch das Gewebe des **Involutionsstadiums** (Abb. 16 bis Abb. 21) spiegelt diese große Diskrepanz zwischen der positiven Reaktivität des Knotens im Vergleich zum Strang bzw. der Aponeurose wider.



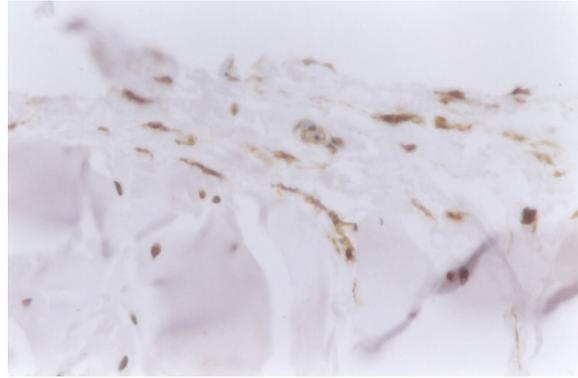
**Abb. 16: Stadium der Involution. Histomorphologisches Bild eines Gewebeknotens mit abnehmender Zelldichte der Spindenzellen und deutlicher Zunahme des kollagenen Bindegewebes. HE. 400x**



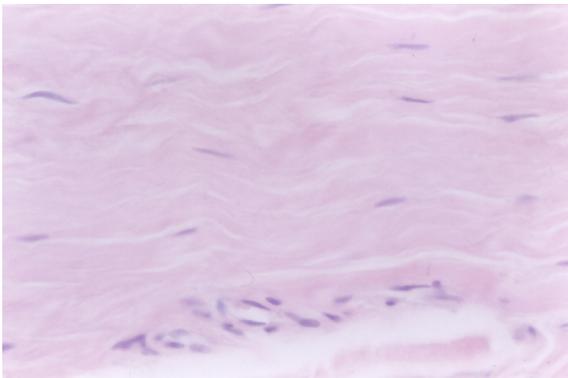
**Abb. 17: Stadium der Involution. Immunhistochemische Darstellung der  $\alpha$ SMA-Expression in den fibroblastenähnlichen Zellen eines Gewebeknotens. ABC. 400x**



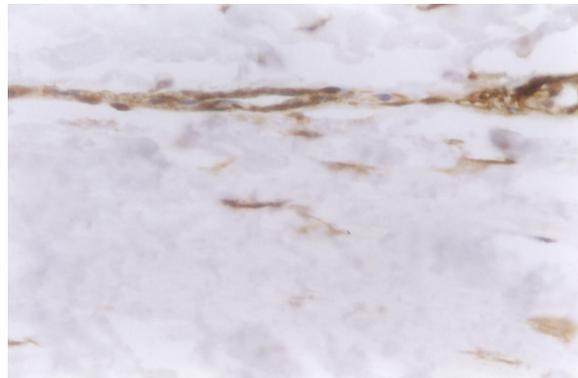
**Abb. 18:** Stadium der Involution. Histomorphologisches Bild eines Gewebsstranges mit nur vereinzelt sichtbaren Spindelzellen in einem fast homogen kollagenisierten Bindegewebe. HE. 400x



**Abb. 19:** Stadium der Involution. Immunhistochemische Demonstration eines Gewebsstranges mit gelegentlich immunhistochemisch positiver Reaktivität von kleinen Gruppen  $\alpha$ SMA-positiver Zellen. ABC. 400x



**Abb. 20:** Stadium der Involution. Histomorphologisches Bild einer Aponeurose mit äußerst spärlicher Zellularität und reichlich Kollagen. HE. 400x



**Abb. 21:** Stadium der Involution. Immunhistochemische Darstellung der Aponeurose. ABC. 400x

Auch im Stadium der Involution lassen sich im Bereich des Knotens noch relativ viele  $\alpha$ SMA-positive Zellen nachweisen (Abb. 17). Hingegen ist die Dichte der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Strang wesentlich geringer (Abb. 19).

Die Aponeurose dieses Stadiums weist nur noch eine minimale positive Reaktivität auf (Abb. 21). Die Anzahl  $\alpha$ SMA-positiver Zellen dieses Areals ist demzufolge sehr gering.

Sowohl beim Proliferations- als auch beim Involutionsstadium wird eine Abnahme der positiven Reaktivität bzw. des Gehaltes an  $\alpha$ SMA-positiven Zellen vom Gewebeknoten, über den Gewebsstrang, bis zur Aponeurose deutlich (Abb. 10 bis Abb. 21).

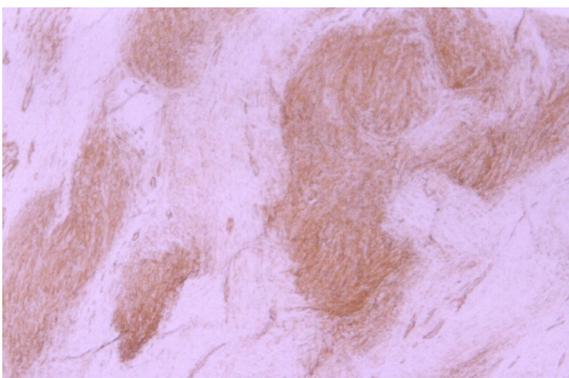
Hingegen enthalten die Gewebsareale im Residualstadium keine bzw. nur einzelne  $\alpha$ SMA-positive Zellen, vergleichbar mit den Bildern des Proliferations- bzw. Involutionsstadiums im Bereich der Aponeurose (Abb. 15 und Abb. 21).

Bei der Gegenüberstellung der immunhistochemischen Bilder unterschiedlicher Erkrankungsstadien ist der Gewebeknoten des Proliferationsstadiums, aufgrund der hohen Zelldichte der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen, stärker mit SMAK gefärbt als der Gewebeknoten des Involutionsstadiums. Im Gewebsstrang findet sich primär eine spärliche Zellularität der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen, die in den nachfolgenden Stadien bis zum völligen Verschwinden dieser Zellart abnimmt. Die Aponeurose aller drei Stadien enthält keine bzw. sehr wenig  $\alpha$ SMA-positive Zellen.

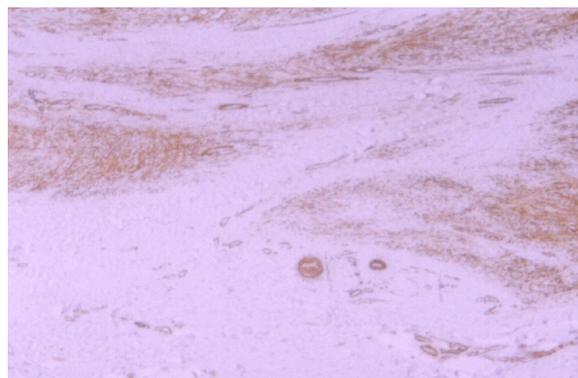
Das **Kontrollgewebe** enthält keine  $\alpha$ SMA-positiven Zellen. Damit ist es vergleichbar mit dem Aufbau der Aponeurose des M. Dupuytren und dem erkrankten Gewebe des Residualstadiums.

Die immunhistochemisch nach der Avidin-Biotin-Methode gefärbten primären Gewebeproben zeigen eine ungleichmäßige Reaktion der Zellen mit SMAK.

Besonders deutlich ist dieses Verhalten in den Gewebeknoten zu beobachten (Abb. 22 und Abb. 23).



**Abb. 22:** Immunhistochemische Darstellung eines Gewebeknotens im Stadium der Proliferation. Inhomogene Verteilung der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen. ABC. 400x



**Abb. 23:** Immunhistochemische Darstellung eines Gewebeknotens im Stadium der Involution. Inhomogene Verteilung der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen. ABC. 400x

Während die Antikörperdarstellung in einigen Arealen des Knotens deutlich ausgeprägt ist, lassen sich andere Gebiete des Knotens nicht anfärben. Dabei repräsentieren die reagierenden Bereiche die  $\alpha$ SMA-positiven Zellen.

Die Proliferation der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen erfolgt somit in unterschiedlich großen Zellhaufen, die voneinander durch Bindegewebszüge und Fibroblasten abgegrenzt werden. Der Gewebeknoten enthält demzufolge auch Areale ohne  $\alpha$ SMA-positiv Zellen.

### **3.2. Vergleich der Methoden: „Auswachsen“ und Kollagenaseabbau**

In diesem Versuch wurde der Einfluß zweier Aufarbeitungsmethoden der Gewebeproben auf den Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen untersucht.

Bei der Methode des „Auswachsens“ wurden kleine Gewebstücke in toto und ohne enzymatische Vorbehandlung auf Zellkulturflaschen transferiert, während die Gewebeproben bei der Methode des Kollagenaseabbaus vor der Überführung auf Zellkulturflaschen mit einem Enzymcocktail behandelt wurden. Der Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in der jeweiligen Kultur diente als Vergleichsparameter beider Methoden und wurde durch Auszählen von vier Gesichtsfeldern unter dem Lichtmikroskop festgestellt.

In Tabelle 2 repräsentiert der Mittelwert  $\bar{x}$  jeweils den Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen einer Kultur. Um den Vergleich beider Methoden zu verdeutlichen, sind ermittelte Werte von beiden Versuchen in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Eine Unterscheidung des untersuchten Gewebes nach Knoten, Strang, Aponeurose und Kontrollgewebe ist in diesem Versuch von untergeordneter Bedeutung, da es lediglich auf den Vergleich beider Methoden ankommt.

Gewebss- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]		Gewebss- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]		
	"Auswachsen"	Kollagenase- abbau		"Auswachsen"	Kollagenase- abbau	
1		6,67	2,73	6	2,61	2,80
		3,49	2,33		3,59	2,60
		5,36	2,08		5,63	2,54
		4,98	3,47		2,65	1,89
	$\bar{x}$	<b>5,13</b>	<b>2,65</b>		$\bar{x}$	<b>3,62</b>
2		1,58	20,35	7	2,24	8,44
		1,81	21,91		1,16	7,63
		1,20	31,33		1,07	7,25
		3,97	17,26		0,94	8,31
	$\bar{x}$	<b>2,14</b>	<b>22,71</b>		$\bar{x}$	<b>1,35</b>
3		5,84	3,05	A	2,20	8,56
		6,08	1,82		1,56	8,71
		6,71	3,62		1,68	8,96
		8,40	2,96		0,61	6,80
	$\bar{x}$	<b>6,76</b>	<b>2,86</b>		$\bar{x}$	<b>1,51</b>
4		4,16	5,31	B	0,00	5,76
		3,18	3,02		0,00	4,31
		2,93	5,34		0,00	7,20
		3,24	2,48		0,00	9,17
	$\bar{x}$	<b>3,38</b>	<b>4,04</b>		$\bar{x}$	<b>0,00</b>
5		4,05	9,46	C	0,00	8,67
		2,13	11,21		0,00	9,63
		2,40	6,73		0,00	8,46
		2,24	5,19		0,00	9,48
	$\bar{x}$	<b>2,71</b>	<b>8,15</b>		$\bar{x}$	<b>0,00</b>

Tab. 2: Vergleich des Einflusses beider Aufarbeitungsmethoden auf die Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in den Kulturen (1-7: Gewebe mit M. Dupuytren; A-C: Kontrollgewebe)

Versuch	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]				
	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Median
"Auswachsen"	2,66	2,16	0,00	6,76	2,43
Kollagenasebehandlung	7,47	5,95	2,46	22,71	7,26

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim Versuch des Methodenvergleiches

Mit dem Box-Plot (Abb. 24) können die gewonnenen Werte beider Methoden graphisch verglichen werden. Beide Boxen repräsentieren jeweils die Anteile der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen der Kulturen. Die linke Box ist das Ergebnis der Methode des „Auswachsens“. Entsprechend beinhaltet die rechte Box die Ergebnisse der mit Kollagenase behandelten Kulturen.

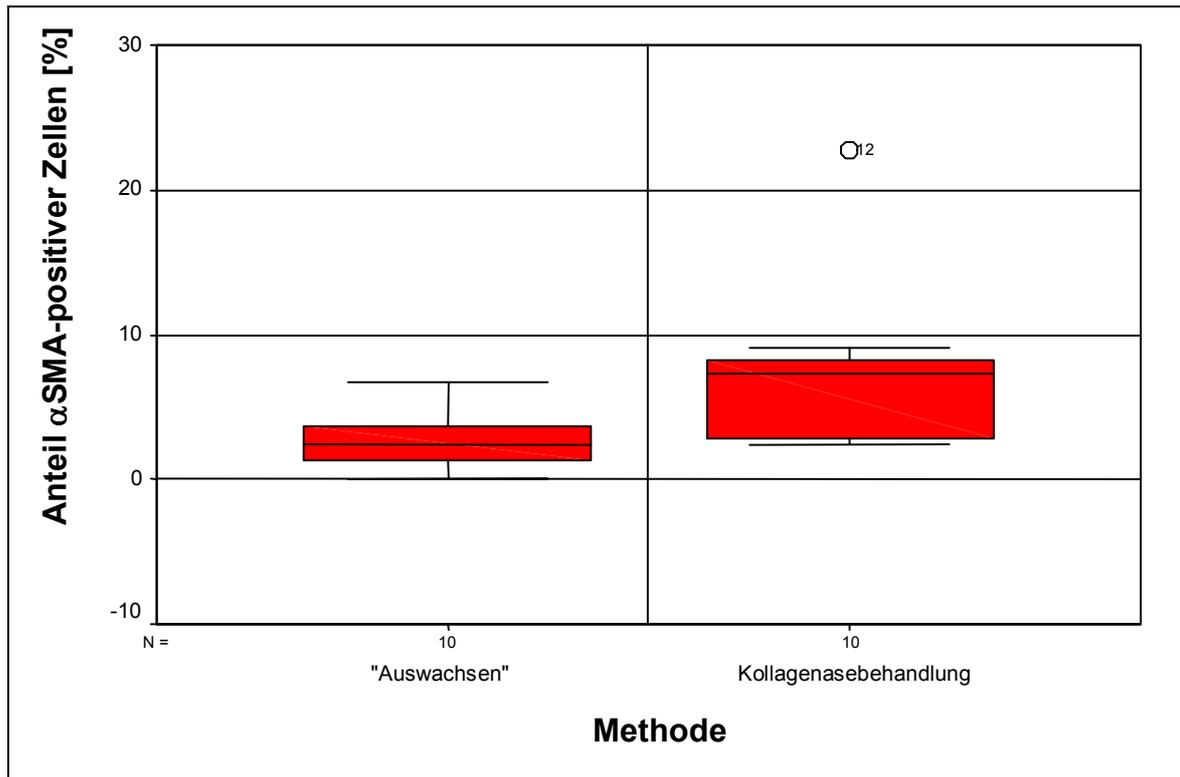


Abb. 24: Darstellung der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen entsprechend der verwendeten Methode in Form eines Box-Plots.

Der Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in einer Kultur variiert bei der Behandlung der Gewebeproben des M. Dupuytren mit der „Auswachs“-Methode zwischen 0,00% und 6,76%, bei der Kollagenaseabbau-Methode zwischen 2,46% und 22,71% (Tab. 3). Der Median bei der Kollagenaseabbau-Methode liegt entsprechend höher (7,26%) als bei der „Auswachs“-Methode (2,43%).

Die Ergebnisse dieses Versuches lassen auf einen höheren Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in Gewebeproben, die mit der Methode des Kollagenaseabbaus aufgearbeitet wurden, als in Gewebeproben ohne eine enzymatische Vorbehandlung schließen. Der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben untermauert diese Annahme ( $p=0,0295$ ). Folglich wurde für die weiteren Versuche die Methode des Kollagenaseabbaus ausgewählt.

Der Vergleich der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in den Gewebeproben des M. Dupuytren und im Kontrollgewebe liefert höhere Prozentanteile dieser Zellen in den Gewebeproben des M. Dupuytren. Tabelle 2 zeigt den Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den Kulturen, der in der pathologisch veränderten Aponeurose zwischen 1,35% und 22,71% und im Kontrollgewebe zwischen 0,00% und 9,06% liegt.

### 3.3. Passagieren von Kulturen

In diesem Versuch wurde untersucht, welchen Einfluß der Prozeß des Passagierens auf die Anwesenheit bzw. die Stabilität der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in der Kultur nimmt.

Anhand von je vier Gesichtfeldern wurde der Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen einer Kultur einer Passage lichtmikroskopisch bestimmt und jeweils der Mittelwert  $\bar{x}$  gebildet (Tab. 4).

Gewebs- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]					
	Passage					
	1	2	3	4	5	
1		6,67	1,47	1,18	1,19	0,00
		3,49	0,69	1,59	1,56	0,00
		5,36	2,17	0,49	1,02	0,00
		4,98	2,00	1,30	1,55	0,00
	$\bar{x}$	<b>5,13</b>	<b>1,58</b>	<b>1,14</b>	<b>1,33</b>	<b>0,00</b>
2		20,35	9,03	7,91	2,89	2,32
		21,91	11,30	2,60	3,50	2,26
		31,33	14,30	4,63	2,86	2,54
		17,26	11,22	3,41	3,14	2,65
	$\bar{x}$	<b>22,71</b>	<b>11,46</b>	<b>4,64</b>	<b>3,10</b>	<b>2,44</b>
3		9,65	4,40	1,33	0,39	0,73
		10,48	2,62	0,67	0,87	0,43
		8,45	1,81	1,56	0,86	0,00
		7,27	4,39	0,76	0,96	0,00
	$\bar{x}$	<b>8,96</b>	<b>3,31</b>	<b>1,08</b>	<b>0,77</b>	<b>0,29</b>
4		5,83	4,95	3,95	1,48	0,39
		6,84	10,23	3,32	0,57	0,16
		9,52	9,18	3,87	0,68	0,00
		8,96	12,77	3,55	0,61	0,97
	$\bar{x}$	<b>7,79</b>	<b>9,28</b>	<b>3,67</b>	<b>0,84</b>	<b>0,38</b>
5		5,84	2,12	2,90	-	-
		6,08	2,29	1,64	-	-
		6,71	2,00	1,79	-	-
		8,40	1,51	0,75	-	-
	$\bar{x}$	<b>6,76</b>	<b>1,98</b>	<b>1,77</b>	-	-
6		7,16	8,16	5,34	2,94	1,78
		7,87	7,36	4,31	1,61	1,85
		8,81	4,74	5,70	2,32	1,87
		4,91	4,26	4,46	3,01	0,84
	$\bar{x}$	<b>7,19</b>	<b>6,13</b>	<b>4,95</b>	<b>2,47</b>	<b>1,59</b>
7		9,17	2,03	2,33	0,76	1,25
		10,68	1,45	2,73	1,65	0,89
		5,84	2,45	2,26	0,74	0,54
		6,03	1,27	1,95	1,31	0,39
	$\bar{x}$	<b>7,93</b>	<b>1,80</b>	<b>2,32</b>	<b>1,12</b>	<b>0,77</b>
8		7,11	2,40	1,29	1,55	1,36
		7,48	3,51	0,85	0,79	0,52
		6,22	2,48	0,94	1,57	1,21
		6,25	3,40	2,99	1,65	0,41
	$\bar{x}$	<b>6,77</b>	<b>2,95</b>	<b>1,52</b>	<b>1,39</b>	<b>0,88</b>
Gewebs- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]					
	Passage					
	1	2	3	4	5	
9		9,46	5,98	2,79	-	-
		11,21	5,37	2,83	-	-
		6,73	6,01	3,02	-	-
		5,19	5,23	2,38	-	-
	$\bar{x}$	<b>8,15</b>	<b>5,65</b>	<b>2,76</b>	-	-
10		8,44	6,57	2,45	2,19	0,58
		7,63	4,78	2,15	1,73	0,00
		7,25	3,45	0,78	3,11	0,00
		8,31	3,98	1,19	1,10	0,00
	$\bar{x}$	<b>7,91</b>	<b>4,70</b>	<b>1,64</b>	<b>2,03</b>	<b>0,15</b>
11		3,03	3,52	0,85	2,75	2,36
		5,26	4,62	1,22	0,62	1,29
		4,95	5,78	3,40	1,32	0,72
		8,33	4,51	1,20	1,34	0,96
	$\bar{x}$	<b>5,39</b>	<b>4,61</b>	<b>1,67</b>	<b>1,51</b>	<b>1,33</b>
A		10,90	10,97	-	3,49	1,97
		7,63	9,89	6,52	2,37	2,13
		8,70	11,59	6,47	2,59	1,49
		6,50	11,63	7,62	3,90	0,29
	$\bar{x}$	<b>8,43</b>	<b>11,02</b>	<b>6,87</b>	<b>3,09</b>	<b>1,47</b>
B		8,56	0,89	1,30	-	-
		8,71	0,00	0,33	-	-
		8,96	0,00	1,46	-	-
		6,80	0,00	1,23	-	-
	$\bar{x}$	<b>8,26</b>	<b>0,22</b>	<b>1,08</b>	-	-
C		5,76	0,99	0,00	-	-
		4,31	0,68	0,00	-	-
		7,20	0,58	0,73	-	-
		9,17	0,27	0,00	-	-
	$\bar{x}$	<b>6,61</b>	<b>0,63</b>	<b>0,18</b>	-	-
D		8,67	2,48	2,19	-	-
		9,63	5,95	2,42	-	-
		8,46	3,36	3,29	-	-
		9,48	4,67	3,85	-	-
	$\bar{x}$	<b>9,06</b>	<b>4,12</b>	<b>2,94</b>	-	-

Tab. 4: Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen jeweils eines Gewebes im Verlauf des Passagierens (1-11: Gewebe mit M. Dupuytren; A-D: Kontrollgewebe)

Da die Anzahl der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in der Kultur, unabhängig von der Art des Gewebes (erkranktes Gewebe oder Kontrollgewebe), im Verhältnis gleichmäßig abnimmt, ist es zulässig, die ermittelten Werte weiter zusammenzufassen (Tab. 5).

Passage	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]					
	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Minimum	Maximum	Median
1	8,47	4,11	1,06	5,13	22,71	7,91
2	4,63	3,56	0,92	0,22	11,46	4,12
3	2,55	1,80	0,47	0,18	6,87	1,77
4	1,77	0,87	0,27	0,77	3,10	1,45
5	0,93	0,77	0,24	0,00	2,44	0,83

Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim Versuch des Passagierens

In Passage 1 liegt der Mittelwert bei 8,47%, während er in Passage 5 nur noch 0,93% beträgt (Tab. 5).

Diese Tendenz wird durch die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern in Abbildung 25 graphisch dargestellt und durch den Friedman-Test belegt ( $p=0,000$ ).

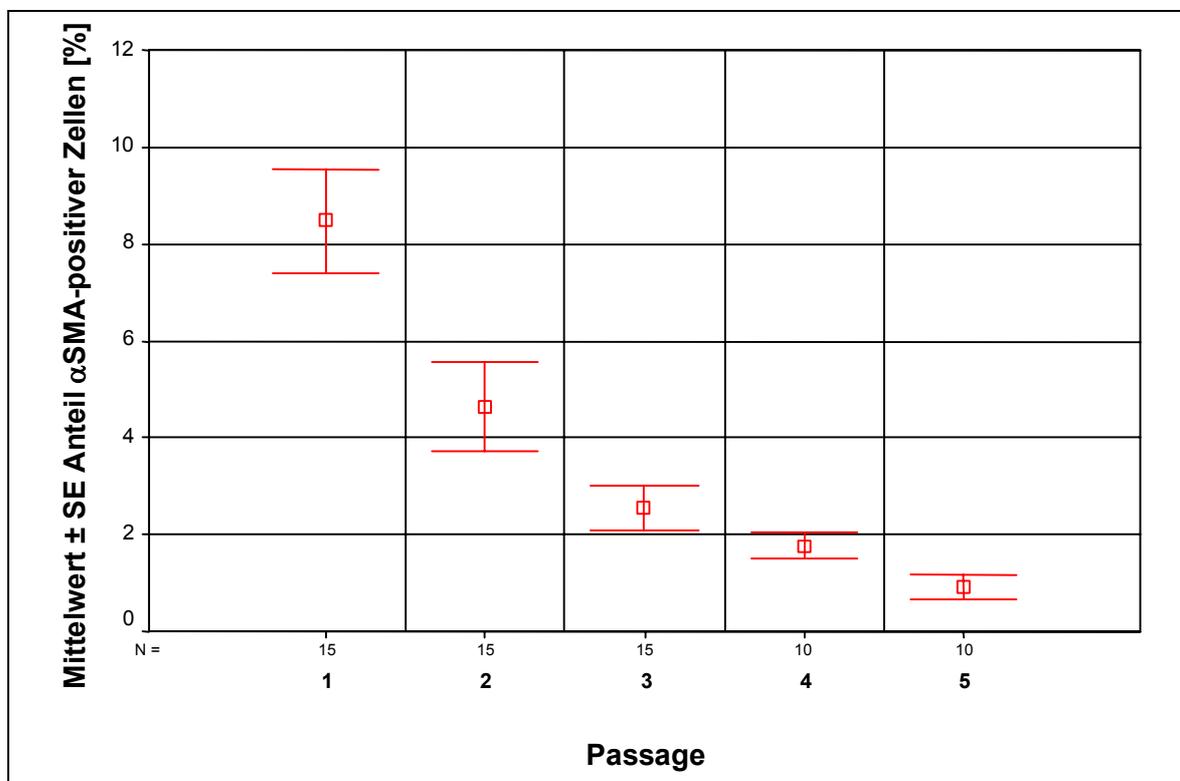


Abb. 25: Darstellung der Abnahme  $\alpha$ SMA-positiver Zellen von Passage zu Passage.

Die Abnahme der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen von Passage zu Passage bedeutet, dass diese Zellen nur temporär in der Kultur nachweisbar sind. Das heißt,  $\alpha$ SMA-positive Zellen verhalten sich in der Kultur nicht stabil.

### 3.4. Vergleich unterschiedlicher Serumbeigaben zum Medium beim M. Dupuytren

Bei diesem Versuch wurde der Effekt einer Variation des Serumanteils im Medium einer Kultur auf die Zelldichte bzw. die Anzahl der proliferierenden  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in der Kultur getestet.

Dafür wurden zwei bzw. drei gleich große Gewebstücke einer Gewebprobe eines M. Dupuytren-Patientens mit je einem anderen Medium (Medium ohne FKS, Medium supplementiert mit 10% FKS und Medium ergänzt mit 20% FKS) behandelt.

Der Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen einer Kultur ist als Mittelwert  $\bar{x}$  in Tabelle 6 dargestellt. Tabelle 7 listet zusammenfassend die Daten auf.

Gewebprobe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]			Gewebprobe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]				
	Medium ohne FKS	Medium +10%FKS	Medium +20%FKS		Medium ohne FKS	Medium +10%FKS	Medium +20%FKS		
1		-	25,69	15,05	5		7,14	25,94	22,06
		-	31,16	33,13			11,32	26,14	19,54
		-	24,59	18,46			10,00	34,00	13,51
		-	29,01	18,46			4,44	30,85	20,11
	$\bar{x}$	-	<b>27,61</b>	<b>21,28</b>		$\bar{x}$	<b>8,23</b>	<b>29,23</b>	<b>18,81</b>
2		-	-	30,37	6		0,00	21,29	18,44
		-	42,20	33,82			15,00	28,99	20,03
		-	39,02	37,17			20,00	34,06	18,18
		-	25,96	23,16			0,00	19,68	21,53
	$\bar{x}$	-	<b>35,73</b>	<b>31,13</b>		$\bar{x}$	<b>8,75</b>	<b>26,01</b>	<b>19,55</b>
3		-	20,33	8,09	7		0,00	42,28	47,17
		-	20,18	13,72			5,71	36,03	44,80
		-	7,53	8,45			0,00	39,60	36,91
		-	8,33	10,86			0,00	43,21	41,35
	$\bar{x}$	-	<b>14,09</b>	<b>10,28</b>		$\bar{x}$	<b>1,43</b>	<b>40,28</b>	<b>42,56</b>
4		0,00	56,35	57,92	8		-	16,27	20,24
		3,09	39,79	53,85			-	16,08	18,05
		3,70	36,00	53,13			-	11,90	17,34
		3,10	33,83	56,78			-	18,62	20,67
	$\bar{x}$	<b>2,47</b>	<b>41,49</b>	<b>55,42</b>		$\bar{x}$	-	<b>15,72</b>	<b>19,08</b>

Tab. 6: Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen unter Variation des Serumanteils des Mediums (1-8: Gewebe mit M. Dupuytren)

	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]		
	Medium ohne FKS	Medium +10%FKS	Medium +20%FKS
<b>Median</b>	5,35	28,42	20,42
<b>Mittelwert</b>	5,22	28,77	27,26
<b>Minimum</b>	1,43	14,09	10,28
<b>Maximum</b>	8,75	41,49	55,42

Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim Versuch unterschiedlicher Serumbeigaben zum Medium

Entsprechend der drei Medien mit unterschiedlichen Serumbeigaben wurden die Gewebeproben des M. Dupuytren in drei Gruppen geteilt. Der Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Gewebeproben mit identischer Mediumbehandlung wird in Abbildung 26 durch je eine Box veranschaulicht.

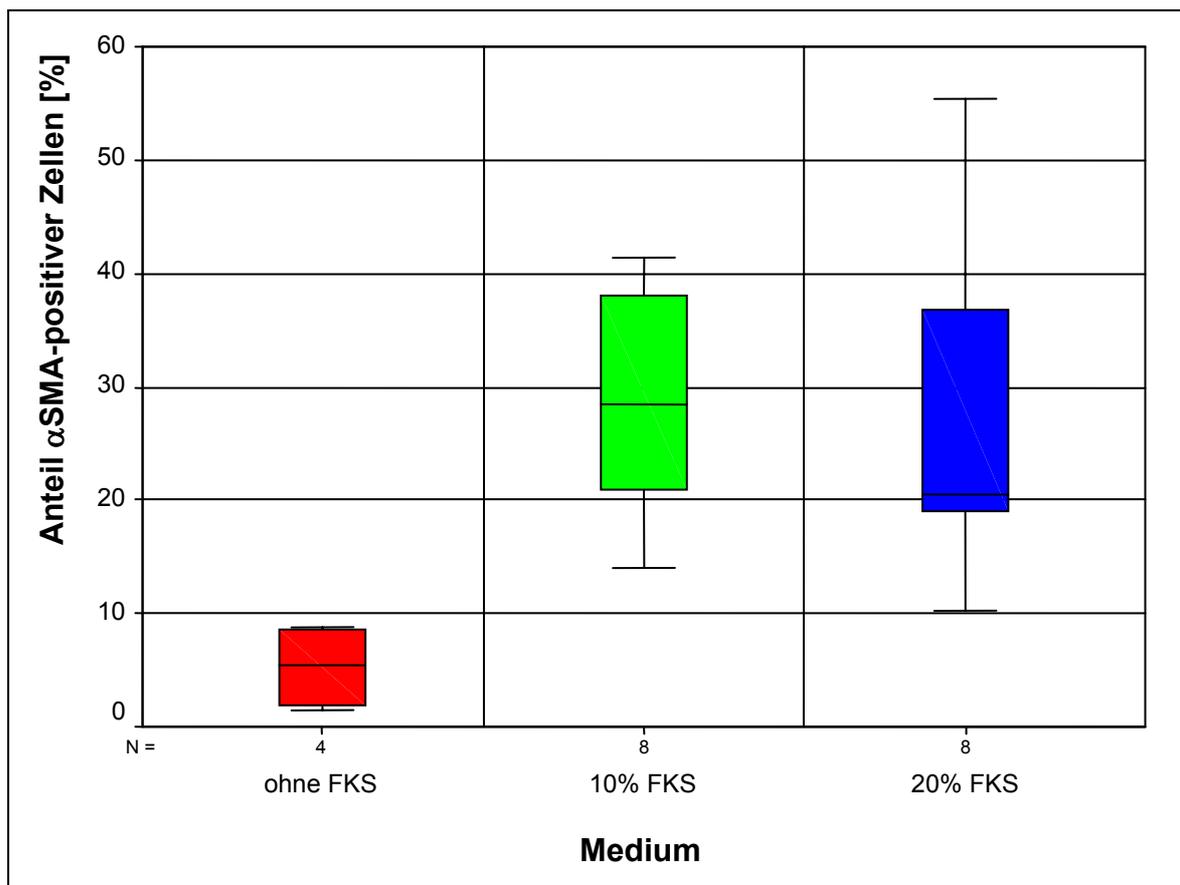


Abb. 26: Darstellung der Anteile der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen von Gewebeproben mit identischer Mediumbehandlung durch je eine Box.

Für die Gewebsbehandlung mit serumfreiem Medium variieren die Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in den Kulturen zwischen 1,43% und 8,75%. Die Behandlung der Kulturen mit dem üblichen Medium (Medium mit 10% FKS) geht mit einem Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen zwischen 14,09% und 41,49% einher. Bei der Verdopplung des Serumzusatzes (Medium mit 20% FKS) liegt der Anteil zwischen 10,28% und 55,42% (Tab. 6 und Tab. 7).

Gemäß des Wilcoxon-Tests für k unabhängige Stichproben liegt der Gehalt an  $\alpha$ SMA-positiven Zellen bei der Gewebsbehandlung mit einem serumhaltigen Medium (supplementiert mit 10% bzw. 20% FKS) signifikant höher als bei der Behandlung mit serumfreiem Medium ( $p=0,034$ ). Demzufolge kann der Zusatz von Serum zu einer Kultur deren Anteil an  $\alpha$ SMA-positiven Zellen steigern. Hingegen führt eine Verdopplung der Serumbeigabe zum Medium, aufgrund einer Sättigung der Zellen, zu keinem signifikant höheren Anteil in der Kultur der Gewebsprobe ( $p=0,164$ ).

Darüber hinaus verlieren die Zellen unter der Behandlung mit serumfreiem Medium ihre ausgestreckte Spindelform und nehmen eine runde Form an. Zusätzlich schwimmen viele kleine Vesikel im Medium.

### **3.5. Zelldichte $\alpha$ SMA-positiver Zellen einer Kultur bei Teilung der Gewebsprobe**

#### **3.5.1. Teilung der Gewebsprobe in 6 gleich große Areale (6-Well-Versuch)**

Aus den 6 Arealen einer Gewebsprobe bzw. des Gewebeknotens wurde jeweils eine Kultur angelegt, um die Zelldichte der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den Kulturen zu untersuchen.

Tabelle 8 zeigt für jede Gewebsprobe die Anteile der SMA-positiven Zellen in den jeweiligen Kulturen. Der Mittelwert  $\bar{x}$  der vier auszuzählenden Gesichtsfelder steht für den Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen einer Kultur.

Gewebs- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]						
	Kultur 1	Kultur 2	Kultur 3	Kultur 4	Kultur 5	Kultur 6	
1		9,94	5,23	15,96	21,59	22,69	28,46
		16,64	8,84	20,42	25,88	36,28	22,80
		21,55	6,57	32,50	22,20	30,66	36,41
		10,73	9,54	12,28	20,02	25,03	25,08
	$\bar{x}$	<b>14,72</b>	<b>7,55</b>	<b>20,29</b>	<b>22,42</b>	<b>28,67</b>	<b>28,19</b>
2		9,58	23,22	26,45	-	18,51	19,56
		13,10	17,35	19,54	10,44	39,10	17,41
		10,42	20,29	28,83	8,19	30,99	25,11
		7,12	13,51	35,95	13,08	12,80	13,36
	$\bar{x}$	<b>10,06</b>	<b>18,59</b>	<b>27,69</b>	<b>10,57</b>	<b>25,35</b>	<b>18,86</b>
3		19,90	32,41	15,80	20,79	28,85	11,33
		24,22	26,71	13,67	15,64	19,35	7,43
		17,47	38,21	33,15	37,06	21,83	7,00
		22,57	33,48	31,25	32,75	21,96	7,60
	$\bar{x}$	<b>21,04</b>	<b>32,70</b>	<b>23,47</b>	<b>26,56</b>	<b>23,00</b>	<b>8,34</b>
4		8,19	3,06	-	9,52	4,41	11,99
		8,98	23,03	18,74	8,69	3,49	26,76
		9,20	17,70	28,01	12,19	6,80	11,78
		12,21	12,75	21,41	13,33	7,37	13,69
	$\bar{x}$	<b>9,65</b>	<b>14,14</b>	<b>22,72</b>	<b>10,93</b>	<b>5,52</b>	<b>16,06</b>
5		17,75	45,14	26,87	23,39	9,41	13,47
		20,47	-	32,69	39,04	9,72	9,98
		17,20	36,97	25,36	16,84	4,60	11,35
		22,35	33,52	21,79	23,69	10,79	12,6
	$\bar{x}$	<b>19,44</b>	<b>38,54</b>	<b>26,68</b>	<b>25,74</b>	<b>8,63</b>	<b>11,85</b>

Tab. 8: Darstellung der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der 6 Kulturen von insgesamt 5 Gewebeknoten (1-5: Gewebe mit M. Dupuytren)

Gewebs- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]		
	Median	Maximum	Minimum
1	21,36	28,67	7,55
2	18,73	27,69	10,06
3	23,24	32,70	8,34
4	12,54	22,72	5,52
5	22,59	38,54	8,63

Tab. 9: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim 6-Well-Versuch

Abbildung 27 verdeutlicht die Ergebnisse graphisch. Hierin repräsentiert ein Punkt den Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen einer Kultur. Alle 6 Kulturen einer Gewebprobe sind übereinander angeordnet und farblich differenziert. Das Kreuz zeigt die Lage des jeweiligen Medians.

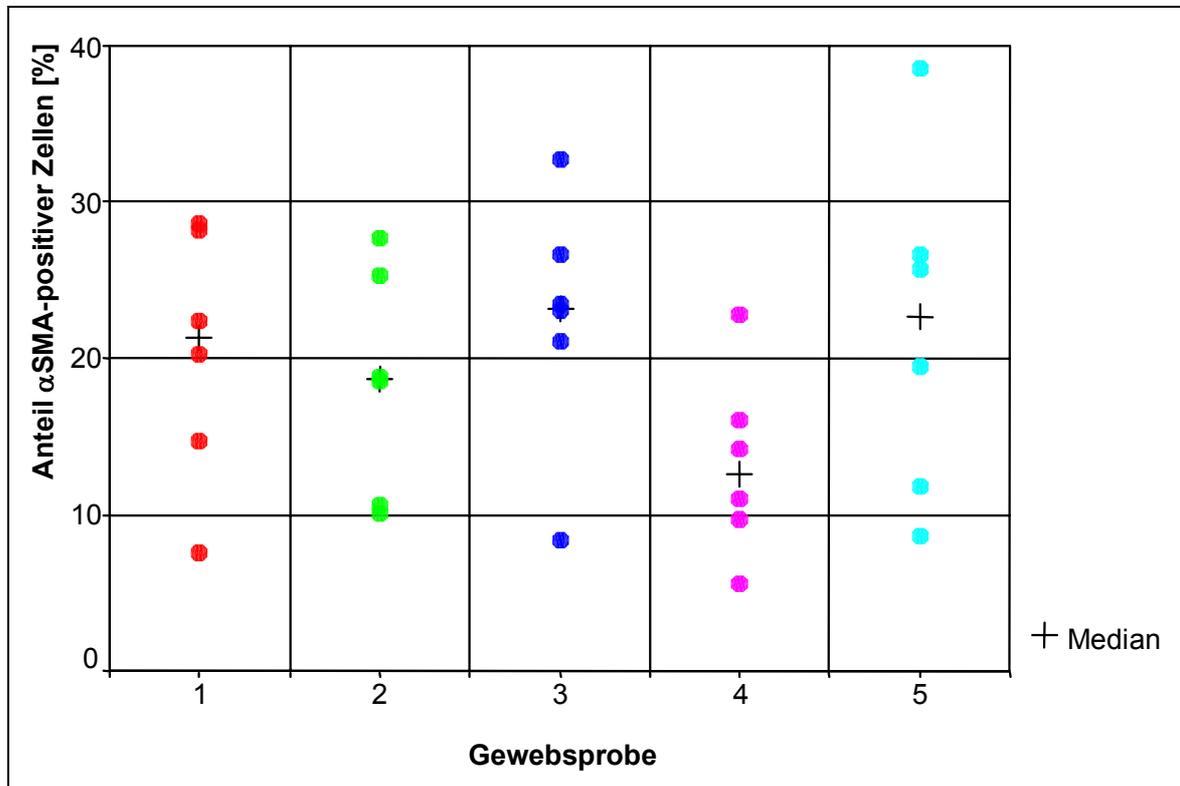


Abb. 27: Die Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen eines Gewebeknotens werden durch je eine Farbe veranschaulicht. Die große Streubreite der Anteile ist besonders deutlich.

Diese Form der Darstellung veranschaulicht sehr deutlich eine extreme Streubreite der Anteile der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen zwischen den Kulturen einer Gewebprobe. In Gewebe 5 beispielsweise schwankt der Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den Kulturen zwischen 8,63% und 38,54% (Tab. 9).

Der Kruskal-Wallis-Test für  $k$  unabhängige Stichproben belegt, dass der Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den Kulturen signifikant unterschiedlich ist ( $p=0,000$ ).

### 3.5.2. Teilung der Gewebprobe in 24 gleich große Areale (24-Well-Versuch)

In diesem Teilversuch wurden Gewebeknoten gleicher Größe (5mm<sup>3</sup>) in jeweils 24 Gewebstücke geteilt und entsprechend 24 isolierte Kulturen angelegt.

Nur in den zellreichen Kulturen, zufälligerweise je 8 von 24 Kulturen pro Gewebprobe, wurde der Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen (Mittelwert  $\bar{x}$  in Tab. 10) bestimmt. Tabelle 11 gibt zusätzlich den Median-, den Maximal- und den Minimalwert einer Gewebprobe an.

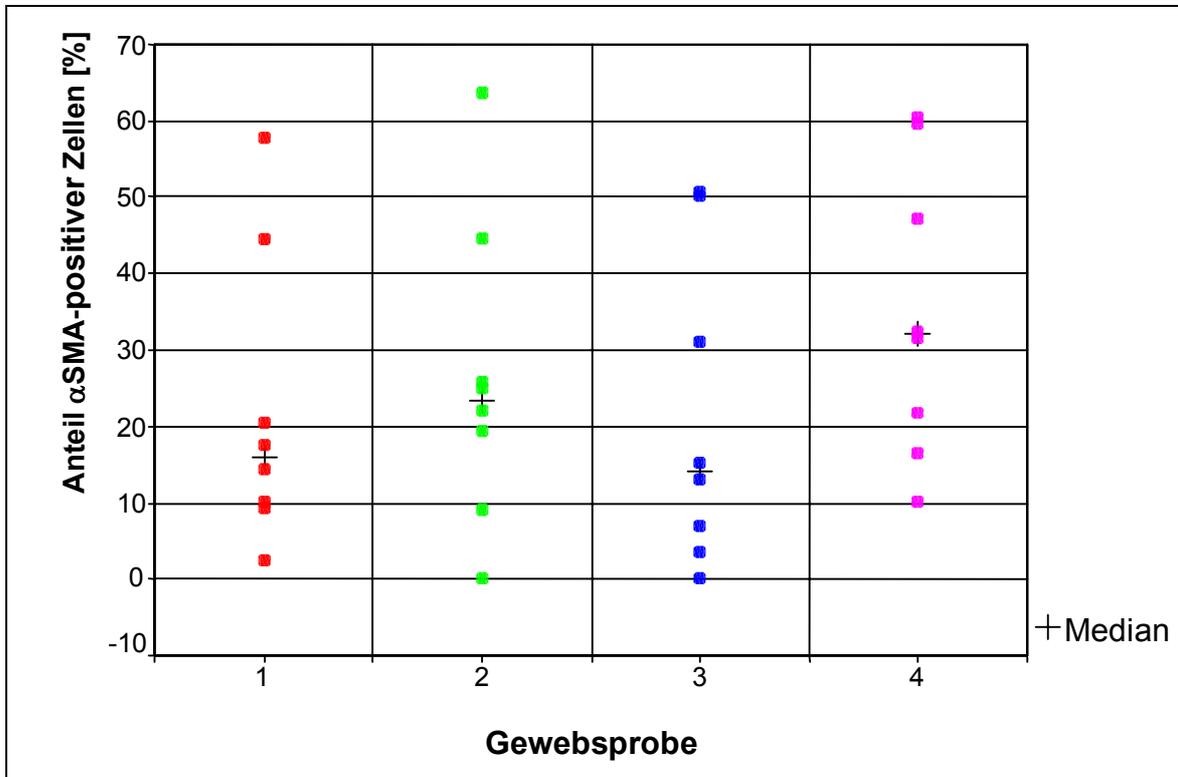
Geweb- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]							
	Kultur 1	Kultur 2	Kultur 3	Kultur 4	Kultur 5	Kultur 6	Kultur 7	Kultur 8
1	40,23	20,00	60,76	6,58	-	16,39	3,44	2,21
	69,23	4,71	33,84	18,69	16,00	22,09	1,12	9,35
	13,39	7,97	58,54	20,05	24,70	12,77	1,55	8,70
	55,28	4,35	77,78	11,71	-	19,13	4,18	19,86
	$\bar{x}$	<b>44,53</b>	<b>9,26</b>	<b>57,73</b>	<b>14,26</b>	<b>20,35</b>	<b>17,60</b>	<b>2,57</b>
2	12,37	0,00	17,41	11,28	15,35	81,82	64,29	5,86
	23,53	0,00	24,40	6,58	31,00	52,07	60,00	24,48
	25,78	0,00	23,82	6,99	37,95	62,50	35,85	28,54
	16,23	0,00	22,71	11,03	18,97	58,02	18,42	40,53
	$\bar{x}$	<b>19,48</b>	<b>0,00</b>	<b>22,09</b>	<b>8,97</b>	<b>25,82</b>	<b>63,60</b>	<b>44,64</b>
3	37,04	45,25	1,39	26,38	1,70	15,83	21,43	0,00
	31,58	55,40	16,96	9,12	2,11	15,86	57,90	0,00
	71,43	40,13	7,38	14,22	4,37	14,59	27,14	0,00
	60,56	62,39	2,01	10,73	5,67	5,92	17,65	0,00
	$\bar{x}$	<b>50,15</b>	<b>50,79</b>	<b>6,94</b>	<b>15,11</b>	<b>3,46</b>	<b>13,05</b>	<b>31,03</b>
4	6,31	40,54	54,17	26,61	23,94	31,36	74,51	10,84
	12,99	26,78	50,88	39,33	19,47	60,35	61,11	14,86
	21,38	31,93	71,43	31,10	15,60	39,01	55,17	4,31
	25,49	27,55	61,94	32,14	27,91	58,53	50,98	11,01
	$\bar{x}$	<b>16,54</b>	<b>31,70</b>	<b>59,61</b>	<b>32,30</b>	<b>21,73</b>	<b>47,31</b>	<b>60,44</b>

Tab. 10: Darstellung der Anteile der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen von je 8 Kulturen von insgesamt 4 Gewebeknoten (1-4: Gewebe mit M. Dupuytren)

Geweb- probe	Anteil $\alpha$ SMA-positiver Zellen [%]		
	Minimum	Median	Maximum
1	2,57	15,93	57,73
2	0,00	23,47	63,60
3	0,00	14,08	50,79
4	10,26	32,00	60,44

Tab. 11: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Durchschnittswerte der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in % beim 24-Well-Versuch

Abbildung 28 veranschaulicht diese Daten. Die 8 ausgewerteten Kulturen einer Gewebprobe sind gleichfarbig übereinander angeordnet. Der Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen kann dadurch leicht verglichen werden.



**Abb. 28:** Die Anteile der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen der Kulturen eines Gewebeknotens werden durch je eine Farbe veranschaulicht. Ihre Streubreite ist in diesem Versuch noch ausgeprägter als bei der Teilung des Knotens in 6 Gewebsstücke.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen eine sehr starke Streubreite der Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen der Kulturen eines Gewebes. Diese schwanken beispielsweise in Knoten 2 zwischen 0,00% und 63,60% (Tab. 11). Der Kruskal-Wallis-Test für  $k$  unabhängige Stichproben belegt einen signifikant unterschiedlichen Anteil  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in den Kulturen ( $p=0,000$ ).

Für jede Gewebprobe ist die Kultur mit dem höchsten Gehalt  $\alpha$ SMA-positiver Zellen aufgeführt (Maximumwerte in Tab. 11). Die Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen von 57,73%, 63,60%, 50,79% und 60,44% entsprechen einer sehr hohen Zelldichte in den Kulturen. Folglich kann die Zelldichte der erwünschten Zellen durch Teilen der Gewebprobe in 24 Gewebsstücke in einigen Kulturen erhöht werden. Weder beim Anlegen nur einer Kultur noch 6 isolierter Kulturen einer Gewebprobe gleicher Größe können Anteile  $\alpha$ SMA-positiver Zellen in dieser Höhe erreicht werden.

## 4. Diskussion

Im Erkrankungsprozeß des Morbus Dupuytren imponiert die progredient verlaufende Beugekontraktur der Hand mit daraus resultierender Bewegungseinschränkung der betroffenen Finger.

Kennzeichnend für diese Erkrankung sind pathologische Veränderungen in der Palmaraponeurose. Aus den normalen Faserzügen und Bändern des Palmarfaszienskomplexes formieren sich im Rahmen fibrotischer Umbauvorgänge Knoten und Stränge. Entlang der Faserzüge erfolgt eine Ausbreitung bis in die Finger.

Die Pathogenese des M. Dupuytren ist bis heute Gegenstand vieler Untersuchungen. Die grundlegenden molekularbiologischen Mechanismen sowie die Entstehung der am Erkrankungsprozeß beteiligten Zellen und deren Eigenschaften im Gewebsverband sind weitgehend ungeklärt.

### 4.1. Anordnung der $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Untersuchungsmaterial

Aufgrund des biologischen Verhaltens der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen im Gewebsverband besteht Grund zur Annahme, dass es sich hierbei um eine eigenständige Zellpopulation handelt, die sich durch ihre positive Reaktivität auszeichnet und den Fibroblasten nur morphologisch ähnelt. Diese Tatsache belegt hinreichend die bereits von anderen Autoren diskutierte Charakterisierung der  $\alpha$ SMA-positiven Zellen als Myofibroblasten (Skalli et al., 1986; Tomasek et al., 1986; Darby et al., 1990; Tomasek et al., 1999).

Unseren Ergebnissen zufolge ist die Verteilung der Myofibroblasten beim M. Dupuytren von den Abschnitten, in denen die Proliferation erfolgt, und dem Stadium der Erkrankung abhängig (Gabbiani et al., 1972; Chiu und McFarlane, 1978; Iwasaki et al., 1984; Tomasek et al., 1986; Schurch et al., 1990).

Die Myofibroblasten sind im Proliferationsstadium im Bereich des Knotens lokalisiert. Auch im Involutionsstadium ist der Zellreichtum innerhalb des Knotens noch erhalten. In beiden Stadien ist eine Abnahme des Myofibroblastengehaltes vom Gewebeknoten über den Gewebsstrang bis zur Aponeurose deutlich.

In Übereinstimmung mit Rayan (1999a/b) und Dave et al. (2001) repräsentieren die Myofibroblasten in der Knotenregion nahezu ausschließlich die eigentliche proliferierende Zellkomponente. Während der Rückbildung des Knotens nimmt die zelluläre Masse der Myofibroblasten ab und wird durch kollagenreiches Bindegewebe ersetzt. Der Endzustand wird als Gewebsstrang definiert (Tomasek und Rayan, 1995; Lubahn, 1999; Rayan, 1999a/b). Vergleichsweise bleibt die normale Aponeurose unverändert und behält ihre ursprüngliche morphologische Struktur bei.

Im zellarmen Residualstadium nimmt die Anzahl der Myofibroblasten zusehends ab, so dass von der einst führenden Myofibroblastenpopulation nur äußerst wenige Zellen beobachtet werden. Die Anzahl der Myofibroblasten dieses Stadiums entspricht annähernd dem Myofibroblastengehalt einer normalen Aponeurose.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Myofibroblasten zeitlich begrenzt und stadienabhängig im Gewebe des M. Dupuytren anzutreffen sind. Sie erscheinen im Proliferationsstadium, sind im Involutionsstadium schon mit geringerer Anzahl präsent und verschwinden im nachfolgenden Residualstadium nahezu vollständig.

Durch die immunhistochemische Darstellung der Myofibroblasten im Gewebsschnitt läßt sich die Proliferationsaktivität von der Knotenbildung bis zur vollständigen Regression der Zellproliferation verfolgen.

Unseren Befunden zufolge ordnen sich die Myofibroblasten vorzugsweise in größeren Gruppen an, die von schmalen Säumen herkömmlicher Fibroblasten und Bindegewebsfasern getrennt werden. Eine Befunderhebung, die in der bisherigen Literatur keinen Niederschlag gefunden hat. Unserer Meinung nach ist dieser Sachverhalt für das Verständnis der Interaktionen zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten von großer Bedeutung.

Die Ursache des Erscheinens und des allmählichen Verschwindens der Myofibroblasten konnte allerdings bislang nicht geklärt werden.

Zu Beginn des pathologischen Prozesses der Fibromatose steht offenbar ein entzündlicher Stimulus mit konsekutiver Umstrukturierung der Aponeurose. Die veränderte molekularbiologische Konstellation ruft offensichtlich eine Induktion einer Myofibroblastenproliferation hervor. Möglicherweise bedingen die Fibrinolyse-Aktivität und die veränderte Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren eine initial verstärkte

Proliferation und Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Merlo et al., 1986; Grinnell, 1994; Halliday und Tomasek, 1995; Tomasek et al., 1999).

Jedenfalls belegen unsere immunhistochemischen Befunde eine transitorische Entwicklung des proliferativen Prozesses aus normalen Bindegewebszellen und eine Umwandlung dieser Zellen in Myofibroblasten.

Die Ursache der Regression und des Verschwindens der Myofibroblasten ist offensichtlich Ausdruck eines umkehrbaren biologischen Prozesses, der von der Zusammensetzung bestimmter Gewebsmediatoren beherrscht wird. Überraschenderweise fällt diese Entwicklung mit dem Gipfel der Proliferation der Myofibroblasten zusammen. Denkbar ist, dass die Myofibroblastendichte eine Umkehrbarkeit des Proliferationsmechanismus bewirkt und den programmierten Zelltod auslöst (Tomasek et al., 1999). Es besteht Grund zur Annahme, dass ein Teil der Myofibroblasten sich erneut in ruhende Fibroblasten umwandelt. Letztere nehmen alsbald die Kollagenproduktion wieder auf und ersetzen die ehemalige Zelldichte durch den hohen Kollagengehalt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Myofibroblasten in der Frühphase des M. Dupuytren maßgeblich am pathologischen Prozeß mitwirken. Im Verlauf der verschiedenen Stadien der Erkrankung steuern zusätzliche Faktoren die Regression bis hin zur Narbenbildung.

Um diese Befunde zu überprüfen und zu untermauern, wurden Untersuchungen an Zellkulturen herangezogen. Die Tatsache, dass Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie beispielsweise das TGF- $\beta$ , beim M. Dupuytren einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung dieser pathologischen Veränderungen nehmen, hat dazu veranlasst, dass in unserer Versuchsordnung bei der Zellkultur auf eine zusätzliche Beigabe dieser Faktoren zum Medium verzichtet wurde. Damit wurde das Heranzüchten einer uniformen Zellreihe verhindert und ein repräsentatives natürliches Heranwachsen der verschiedenen Zellkomponenten erreicht (Badalamente et al., 1992; Lappi et al., 1992; Desmoulière et al., 1993; Vaughan und Tomasek, 1998; Kloen, 1999; Simmons et al., 1999; Yi et al., 1999).

## **4.2. Vergleich der Methoden: „Auswachsen“ und Kollagenaseabbau**

Um die zelluläre Interaktion im Gewebe detailliert zu verfolgen, wurden zwei prinzipielle Methoden angewandt und miteinander verglichen. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Methode des Kollagenaseabbaus besser zum Gewebsansatz geeignet ist als die Methode des „Auswachsens“, da der Anteil der Myofibroblasten in Kulturen mit enzymatischer Vorbehandlung deutlich höher als in Kulturen nach Aufarbeitung mit der mechanischen Desintegration liegt.

Ein weiterer Vorteil der Methode des Kollagenaseabbaus ist, dass die im Gewebe enthaltenen Zellpopulationen durch die enzymatische Behandlung möglichst rasch aus dem Gewebsverband isoliert werden können; im Durchschnitt 19,7 Tage früher als bei der Methode des „Auswachsens“. Durch die frühzeitige Isolierung der Myofibroblasten wird ihre Anzahl authentisch ermittelt, da der Zeitpunkt ihrer Umwandlung in Fibroblasten in den zeitlich späteren Sequenzen der Untersuchungen nicht abgewartet wird.

## **4.3. Passagieren von Kulturen**

In Passage 1 ist die größte Myofibroblastenanzahl nachweisbar. Danach nimmt die Zelldichte der Myofibroblasten von einer Passage zur nächsten weiter ab (Desmoulière et al., 1992).

Daraus ist zu folgern, dass sich die Myofibroblastenzahl in der Kultur instabil verhält, während die Fibroblasten in der Kultur durch den Prozeß des Passagierens angereichert werden.

Einerseits wird damit klargestellt, dass sich die Anzahl der beiden Zellarten auf Kulturebene indirekt proportional verhält. Andererseits wird der Einfluß der Zelldichte auf das Differenzierungsverhalten der Fibroblasten in Myofibroblasten und umgekehrt deutlich.

#### **4.4. Vergleich unterschiedlicher Serumbeigaben zum Medium beim M. Dupuytren**

Der Zusatz von Serum zu einer Kultur kann den Myofibroblastenanteil erheblich gegenüber Kulturen mit serumfreiem Medium steigern.

Entsprechend unseren Ergebnissen kann der Anteil der Myofibroblasten bis zu einem gewissen Sättigungsgrad signifikant erhöht werden. Parallel zu den Ergebnissen von Untersuchungen an Gewebeproben in der Kultur von Sklerodermiepatienten (Wang, 1995; Kirk und Mayes, 1999) können unsere Befunde einen ähnlichen Stand der Myofibroblastenproliferationen in der Kultur bei ständiger Erhöhung des Serumanteils belegen.

Da in serumfreien Kulturen die Myofibroblastenpopulationen zytomorphologische Veränderungen erfahren, die als Apoptosezeichen gedeutet werden, ist ein solcher Serumzusatz für die Kultur unabdingbar.

Gleichzeitig stellt diese Tatsache einen weiteren Beweis für das instabile biologische Verhalten der Myofibroblasten im Vergleich zu den Fibroblasten dar (Wang, 1995; Kirk und Mayes, 1999).

Im Weiteren lassen unsere Befunde darauf schließen, dass eine molekulare Interaktion zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten auch unter physiologischen Bedingungen im Gewebsverband und in der Kultur besteht, die eine zelluläre Differenzierung der Myofibroblasten herbeiführt.

#### **4.5. Zelldichte der Myofibroblasten einer Kultur bei Teilung der Gewebeprobe**

Bei der Aufarbeitung der Gewebeproben, um Zellkulturen anzusetzen, wurden aufgrund der von uns beobachteten inhomogenen Verteilung der Myofibroblasten im Gewebsverband zwei verschiedene Versuchsordnungen durchgeführt.

Das Aufteilen der Gewebeproben in 6 ausgesuchte Areale, aus denen jeweils eine Kultur angesetzt wurde, zeigt beim direkten Vergleich mit einer höheren Fragmentierung der Gewebeproben in 24 Areale, dass die Myofibroblastenanteile in einigen Kulturen der 24 Kultur-Serie weitaus höher liegen. Daraus resultiert, dass sich die dichte Proliferation von Myofibroblasten beim M. Dupuytren umso mehr in der Kultur niederschlägt, je größer die

Anzahl und je kleiner die Größenordnung der untersuchten Gewebeproben ist. Je größer die für die Kultur verwendeten Gewebesteilchen sind, desto höher ist verständlicherweise auch die Wahrscheinlichkeit, zusätzlich einen Bereich mit einer geringeren Zelldichte an Myofibroblasten zu treffen.

Um Myofibroblasten zu isolieren und zu selektionieren, ist es folglich relevant, aus dem Gewebeknoten mit M. Dupuytren eine möglichst große Kulturanzahl anzusetzen. Damit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, ein Gebiet mit einer hohen Myofibroblastenanzahl zu kultivieren, um dann in einem späteren Schritt die am pathologischen Prozeß beteiligten Zellen zu isolieren und ihre Funktion zu untersuchen.

Mit unserer Methode haben wir eine optimale Anreicherung und Isolation der Myofibroblasten erreicht. Einige Literaturhinweise (Desmoulière et al., 1992; Tomasek und Rayan, 1995) geben weitaus geringere Myofibroblastenzahlen in den Kulturen an. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine solche präzise Aufteilung der Gewebeprobe in größere Kulturserien bisher nicht erfolgt ist.

#### **4.6. Biologisches Verhalten der Myofibroblasten und der Fibroblasten im Gewebsverband bzw. in der Zellkultur**

Grundsätzlich weisen unsere Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass die bereits bekannte morphologische Verwandtschaft zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten keine weiteren Erkenntnisse darüber ermöglicht, ob funktionelle Gemeinsamkeiten dieser beiden Zellarten bestehen. Mit der Anwendung des spezifischen Antikörpers SMAK konnte die für die Myofibroblasten charakteristische  $\alpha$ SMA-Expression erfasst und dadurch die Myofibroblasten im Gewebsverband und in der Kultur von den Fibroblasten unterschieden werden. Diese Voraussetzung gestattet eine genaue Bestimmung der jeweiligen Zellart und ihrer Dichte in der Kultur.

Diese Tatsache trägt zur Erklärung der Pathogenese der umkehrbaren Umwandlung der Fibroblasten in Myofibroblasten und die spätere Regression der Myofibroblasten in kollagenbildende Fibroblasten wesentlich bei. Dies erklärt auch die Knotenbildung im Proliferationsstadium des M. Dupuytren und die spätere Strangbildung nach Regression dieses Knotens in einen bindegewebigen Gewebsstrang, der letztlich die Kontraktur im fixierten Zustand stabilisiert.

## 5. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild des Morbus Dupuytren wird im histomorphologischen Sprachgebrauch als Fibromatosis palmaris charakterisiert und ist klinisch durch eine Beugekontraktur der Hand nach einer fibrotischen Umwandlung der Palmaraponeurose gekennzeichnet.

Bis heute ist die Pathogenese des M. Dupuytren weitgehend ungeklärt.

Das Verhalten der am pathologischen Prozess beteiligten Zellen bestimmt den Stadienverlauf dieser Erkrankung. Da bereits ein Teil der proliferierenden Zellen in der Literatur als Myofibroblasten angesprochen wird, erhebt sich die Frage nach der Herkunft dieser Zellen und der damit zusammenhängenden pathophysiologischen Mechanismen.

Für die Untersuchung des biologischen Verhaltens der einzelnen Zellarten und ihrer Beziehung zueinander wurden Gewebeproben von Patienten mit M. Dupuytren histomorphologisch und immunhistochemisch am Gewebsverband sowie in der Zellkultur aufgearbeitet und vergleichenden Untersuchungen mit der unveränderten Aponeurose unterzogen.

Durch die Expression des spezifischen  $\alpha$ SMA konnte eine Differenzierung zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten sowohl im Gewebsverband als auch in der Kultur erreicht werden. In der Zellkultur wurden die jeweiligen Zellkomponenten voneinander getrennt und nach spezifischen zellulären Merkmalen untersucht.

Hierbei konnte nach einer maximalen Proliferation der Myofibroblasten eine erneute Regression dieser Zellpopulation in Fibroblasten festgestellt werden.

Unsere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass die entzündliche Modifikation der Aponeurose mit der veränderten Fibrinolyseaktivität bzw. der Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren und Zytokine am Beginn des pathologischen Prozesses steht und die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten fördert. Danach kommt es zu einer inhomogenen Proliferation der Myofibroblasten im Gewebsverband, die für die Knotenbildung verantwortlich ist. Die Abnahme der Myofibroblastenzahl zum Ende der Erkrankung wird zumindest teilweise durch die bereits in der Kultur beobachtete Rückdifferenzierung in Fibroblasten vollzogen.

Die Erkrankung des M. Dupuytren stellt einen selbstlimitierenden pathologischen Prozess dar, der seinen Anfang im Stadium der Myofibroblastenproliferation und der Knotenbildung nimmt und in der Vernarbung des Residualstadiums sein Ende findet.

## 6. Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. 1.Aufl., 569-584, Wiley-VCH, Weinheim, 1999

An HS, Southworth SR, Jackson WT, Russ B: Cigarette smoking and Dupuytren's contracture of the hand. J Hand Surg [Am] 13:872-874, 1988

Badalamente MA, Hurst LC, Grandia SK, Sampson SP: Platelet-derived growth factor in Dupuytren's disease. J Hand Surg [Am] 17:317-323, 1992

Badalamente MA, Stern L, Hurst LC: The pathogenesis of Dupuytren's contracture: Contractile mechanisms of the myofibroblasts. J Hand Surg [Am] 8:235-243, 1983

Badid C, Mounier N, Costa AMA, Desmoulière A: Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: Interest of their assessment in nephropathies. Histol Histopathol 15:269-280, 2000

Boyer MI, Gelberman RH: Complications of the operative treatment of Dupuytren's disease. Hand Clinics 15:161-166, 1999

Burge P: Genetics of Dupuytren's disease. Hand Clinics 15:63-71, 1999

Chiu HF, McFarlane RM: Pathogenesis of Dupuytren's contracture: A correlative clinical-pathological study. J Hand Surg [Am] 3:1-10, 1978

Chomel AF: Essai sur le rheumatisme. Paris thesis no 63:441-519, 1813

Critchley EM, Vakil SD, Hayward HW, Owen VM: Dupuytren's disease in epilepsy: Result of prolonged administration of anticonvulsants. J Neurol Neurosurg Psychiatry 39:498-503, 1976

Darby I, Skalli O, Gabbiani G:  $\alpha$ -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63:21-29, 1990

Dave SA, Banducci DR, Graham WP, III, Allison GM, Ehrlich HP: Differences in  $\alpha$  Smooth Muscle Actin Expression between Fibroblasts Derived from Dupuytren's Nodules or Cords. *Exp Mol Pathol* 71:147-155, 2001

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G: Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122:103-111, 1993

Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Abdiu A, Walz T, Macieira-Coelho A, Gabbiani G:  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Is Expressed in a Subpopulation of Cultured and Cloned Fibroblasts and Is Modulated by  $\gamma$ -Interferon. *Exp Cell Res* 201:64-73, 1992

Douglas CR: Epidemiology of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:53-62, 1999

Dupuytren G: De la retraction des doigts par suite d'une affection de l'aponevrose palmaire. Description de la maladie. Operation chirurgicale qui convient dans de cas. – Compte rendu de la clinique chirurgicale de l'Hôtel Dieu par MM, les docteurs Alexandre Paillard et Marx. *Journal Universel et Hebdomadaire de Medecine Pratiques et des Institutions Medicales* 5:352/ 5:349-365, 1831 (reprinted in *Medical Classics* 4:127-141, 1939-1940)

Early PF: Population studies in Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* 44:602-613, 1962

Elliot D: The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:1-19, 1999

Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G: Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 135:719-734, 1972

Gabbiani G, Majno G: Dupuytren's contracture: Fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66:131-146, 1972

Goyrand G: De la rétraction permanente des doigts. *Gazette Médicale de Paris*. 2s 3:481-486, 1835. *In: Elliot D: The early history of Dupuytren's disease. Hand Clinics* 15:1-19, 1999

Grapow M: Die Anatomie und physiologische Bedeutung der Palmaraponeurose. *Archiv für Anatomie und Physiologie Leipzig. Anatomische Abteilung* 2-3:143-158, 1887. *In: Rayan GM: Palmar fascial complex anatomy and Pathology in Dupuytren's disease. Hand Clinics* 15:73-86, 1999

Grinnell F: Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124:401-404, 1994

Guérin J: Comments on Dupuytren's disease. *Gazette Médicale de Paris*. 2s 1:111-113, 1833

Halliday NL, Tomasek JJ: Mechanical properties of the extracellular matrix influence fibronectin fibril assembly in vitro. *Exp Cell Res* 217:109-117, 1995

Hoch J, Felouzis E, Meyer-Walters O, Nebe B, Notbohm H: Fibronectin-chemotaxis and collagen-gel contraction of the palmar aponeurosis in morbus dupuytren. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 34:292-297, 2002

Hueston JT: Dupuytren's diathesis. *In: McFarlane RM, McGrouther DA, Flint MH (eds): Dupuytren's disease. Edinburgh, Churchill Livingstone, 246-249, 1990*

Hurst LC, Badalamente MA: Nonoperative treatment of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:97-107, 1999

Iwasaki H, Muller H, Stutte HJ, Brennscheidt U: Palmar fibromatosis (Dupuytren's contracture). Ultrastructural and enzyme histochemical studies of 43 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 405:41-53, 1984

---

Jabaley ME: Surgical treatment of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:109-126, 1999

Kirk TZ, Mayes MD: IL-1 Rescues Skleroderma Myofibroblasts from Serum-Starvation-Induced Cell Death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255:129-132, 1999

Kischer CW, Speer DP: Microvascular changes in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg [Am]* 9:58-62, 1984

Kloen P: New insights in the development of Dupuytren's contracture: a review. *Br J Plast Surg* 52:629-635, 1999

Lappi DA, Martineau D, Maher PA, Florkiewicz RZ, Buscaglia M, Gonzalez AM, Farris J, Hamer M, Fox R, Baird A: Basic fibroblast growth factor in cells derived from Dupuytren's contracture: Synthesis, presence and implications for treatment of the disease. *J Hand Surg [Am]* 17:324-332, 1992

Lennox IAC, Murali SR, Porter R: A study of the repeatability of the diagnosis of Dupuytren's contracture and its prevalence in the Grampian region. *J Hand Surg [Br]* 18:258-261, 1993

Ling R: The genetic factor in Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br* 45:709-718, 1963

Lubahn JD: Open-palm technique and soft-tissue coverage in Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:127-136, 1999

Luck JV: Dupuytren's contracture: A New Concept of the Pathogenesis Correlated with Surgical Management. *J Bone and Joint Surg* 41A:4:635-640, 1959

Lund M: Dupuytren's contracture and epilepsy. *Acta Psych Neurol Scand* 16:465-468, 1941

Mailänder P, Reichert B, Schrader M: Operationstechniken zur Behandlung der Dupuytren'schen Kontraktur. Vortrag im Rahmen des 117. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 2.-6. Mai 2000 (nicht publiziert)

Martini AK: Die anatomische Beziehung zwischen Haut und pathologisch veränderter Aponeurose beim Morbus Dupuytren. Vortrag auf dem 24. Symposium der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie vom 24.-26. März 1983, Wien. *Handchir* 17:134-138, 1985

Masur Sk, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S: Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4219-4223, 1996

Matthews P: Familial Dupuytren's contracture with predominantly female expression. *Br J Plast Surg* 32:120-123, 1979

McFarlane R: Patterns of the diseased fascia in the fingers of Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg* 54:31-44, 1974

McFarlane R, Botz J, Cheung H: Epidemiology of surgical patients. *In: McFarlane R, McGrouther D, Flint M (eds): Dupuytren's Disease Biology and Treatment.* Edinburgh, Churchill, Livingstone, 201-238, 1990

McFarlane RM, Ross DC: Dupuytren's disease. *In: Weinzig J (ed): Plastic Surgery Secrets.* Philadelphia, Hanley & Belfus, 554-559, 1998

McGrouther DA: Recurrence and extension. *In: McFarlane RM, McGrouther DA, Flint MH (eds): Dupuytren's Disease.* Edinburgh, Churchill Livingstone, p 383-386, 1990

Merlo G, Ambroggio GP, Castagna B, Mosca A, Oberto E: Fibrin/fibrinogen and fibronolytic activity of the palmar fascia in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg [Br]* 11:55-57, 1986

Mikkelsen OA: The prevalence of Dupuytren's disease in Norway. *Acta Chir Scand* 138:695-700, 1972

- 
- Mikkelsen OA: Dupuytren's disease – the influence of occupational and previous hand injuries. *The Hand* 10:1-8, 1978
- Murrell GAC: The role of the fibroblast in Dupuytren's contracture. *Hand Clin* 7:669-680, 1991
- Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L: Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J* 295:1373-1375, 1987
- Murrell GAC; Francis MJO, Bromley L: Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265:659-665, 1990
- Murrell G, Hueston J: Aetiology of Dupuytren's contracture. *Aust N Z J Surg* 60:247-252, 1990
- Noble J, Arafa M, Royle SG, McGeorge G, Crank S: The association between alcohol, hepatic pathology and Dupuytren's disease. *J Hand Surg [Br]* 17:71-74, 1992
- Okano M: Dupuytren's contracture (palmar fibromatosis) extending over the arm. *Acta Derm Venereol* 72:381-382, 1992
- Pal B, Griffith ID, Anderson J, Dick WC: Association of limited joint mobility with Dupuytren's contracture in diabetes mellitus. *J Rheumatol* 14:582-585, 1987
- Plater F: *Observationum in hominis affectibus*, vol 3. Basel, König & Brandmyller, p 140, 1614. *In*: Elliot D: The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:1-19, 1999
- Rayan G: Rheumatoid arthritis and Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg* 81:50-53, 1988
- Rayan GM: Clinical presentation and types of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:87-96, 1999a

Rayan GM: Palmar fascial complex anatomy and Pathology in Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:73-86, 1999b

Ritter MA: The anatomy and function of the palmar fascia. *Hand* 5:263-267, 1973

Rohen JW, Yokochi C, Lütjen-Drecoll E: *Anatomie des Menschen: photographischer Atlas der systematischen und topographischen Anatomie*. 4. Aufl., 400, Schattauer, Stuttgart, 1998

Ronnov-Jessen L, Petersen OW: A function for filamentous  $\alpha$ -smooth muscle actin: Retardation of motility in fibroblasts. *J Cell Biol* 134:67-80, 1996

Ryan GB, Cliff WJ, Gabbiani G, Irle C, Statkov PR, Majno G: Myofibroblasts in an avascular fibrous tissue. *Lab Invest* 29:197-206, 1973

Sanderson PL, Morris MA, Stanley JK, Fahmy NR: Lipids and Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br* 74:923-927, 1992

Schramm U, Kühnel W, Lösch G, Schrader M: Vorkommen und Ultrastruktur elastischer Fasern bei Morbus Dupuytren. *Verh Anat Ges* 79:259-261, 1985

Schurch W, Seemayer TA, Lagace R, Gabbiani G: The intermediate filament cytoskeleton of myofibroblasts: An immunofluorescence and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 403:323-336, 1984

Simmons JG, Pucilowska JB, Lund PK: Autocrine and paracrine actions of intestinal fibroblast-derived insulin-like growth factors. *Am J Physiol* 276 (Gastrointest Liver Physiol 39):G817-827, 1999

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G: A monoclonal antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787-2796, 1986

Skoog T: Dupuytren's contraction with special reference to aetiology and improved surgical treatment, its occurrence in epileptics. Note on knuckle pads. *Acta Chirurgica Scandinavica* 96:104-190, 1948a

Skoog T: Dupuytren's contraction with special reference to aetiology and improved surgical treatment, its occurrence in epileptics. Note on knuckle pads. *Acta Chirurgica Scandinavica* 96:109-134, 1948b

Skoog T: The pathogenesis and etiology of Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg* 31:258-267, 1963

Skoog T: The transverse elements of the palmar aponeurosis in Dupuytren's contracture: Their pathological and surgical significance. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1:51-63, 1967

Tomasek JJ, Rayan GM: Correlation of  $\alpha$ -smooth muscle actin expression and contraction in Dupuytren's disease fibroblasts. *J Hand Surg [Am]* 20A:450-455, 1995

Tomasek JJ, Schultz RJ, Episalla CW, Newman SA: The cytoskeleton and extracellular matrix of the Dupuytren's disease "myofibroblast": An immunofluorescence study of a nonmuscle cell type. *J Hand Surg [Am]* 11:365-371, 1986

Tomasek JJ, Schultz RJ, Haaksma CJ: Extracellular matrix-cytoskeletal connections at the surface of the specialized contractile fibroblast (myofibroblast) in Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg [Am]* 69:1400-1407, 1987

Tomasek JJ, Vaughan MB, Haaksma CJ: Cellular structure and biology of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:21-34, 1999

Tubiana R: Prognosis and treatment of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg [Am]* 37A:1155-1168, 1955

Van Adrichem LN, Hovius SE, van Strik R, van der Meulen JC: Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br J Plast Surg* 45:9-11, 1992

---

Vaughan MB, Tomasek JJ: The effect of TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  on myofibroblast focal adhesion formation and fibronectin fibril assembly. *FASEB J* 12:A47, 1998

Wang E: Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55:2284-2292, 1995

Whaley DC, Elliot D: Dupuytren's disease: A legacy of the North? *J Hand Surg [Br]* 18: 363-367, 1993

Yi IS, Johnson G, Moneim MS: Etiology of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15:43-51, 1999

Zemel NP, Balcomb TV, Stark HH, Ashworth CR, Rickard TA, Anderson DR, Hull DB: Dupuytren's disease in women: Evaluation of long-term results after operation. *J Hand Surg [Am]* 12:1012-1016, 1987

## 7. Anhang

### 7.1. Chemikalien und Arbeitsmaterialien

#### Brutschrank:

37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% Luftfeuchte

#### Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM (Gibco)):

supplementiert mit: 50mg/l Na-Ascorbat, 2mM Glutamat, 100U/ml Steptomycin/ Penicillin, 10% fetales Kälberserum (FKS)

#### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

138mmol NaCl, 27mmol KCl, 10mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>; pH-Einstellung: 7,4 mit 85% Phosphorsäure

#### Tris-Puffer (TBS):

60,55g Trishydroxymethylaminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 85,2g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Aqua dest. lösen, pH auf 7,6 einstellen, auf 10l auffüllen

#### Trypsin 0,05%:

10ml Trypsin 2,5% (Biochrom, Berlin Deutschland), 10ml EDTA 1% ( Biochrom, Berlin, Deutschland), in 480ml PBS mischen und steril in 25-50ml-Portionen einfrieren und vor dem Gebrauch im Wasserbad anwärmen, pH 7,2

#### 8-Well-Chamberslides:

Lab-Tek Chamberslide System and Coverglass, Permanox slide, Nalge Nunc International Corp., Naperville

#### Bildanalyse-Software: Pic-Klick, 1998 Quasar softworks, Sven Opitz

## 7.2. Chemikalien für die Immunhistochemie

### Primärantikörper:

Anti-Human-Smooth-Muscle-Aktin (SMAK):

monoklonaler AK von der Maus gegen humanes Aktin, flüssige Form, Verdünnung 1:100 mit Tris-Puffer; DAKO, Hamburg, Deutschland

### Sekundärantikörper:

Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin:

flüssige Form, Verdünnung 1:20 mit einem Gemisch aus 1 Teil Humanserum (zur Reduzierung einer unspezifischen Hintergrundfärbung bei der Verwendung des Maus-Primärantikörpers) (Jackson Immuno Research Laboratories) und 4 Teilen TBS; DAKO, Hamburg, Deutschland

### Tertiärantikörper:

- ABComplex/HRP:

bestehend aus: 1ml Reagenz A (Avidin) in 0,01mol/l Phosphat-Puffer, 0,15mol/l NaCl, 15mmol/l NaN<sub>3</sub>, pH 7,2; 1ml Reagenz B (Biotinulated Horseradish Peroxidase) in 0,01mol/l Phosphat-Puffer, 0,15mol/l NaCl, 15mmol/l NaN<sub>3</sub>, pH 7,2; Dako, Glostrup, Dänemark; eine halbe Stunde vor der Verwendung frisch ansetzen: 1ml TBS mit 9µl Avidin und 9µl Biotinulated Horseradish Peroxidase mischen

- APAAP-Komplex:

Maus, Verdünnung von 1:20 mit TBS; DAKO, Hamburg, Deutschland

### Substrat-Chromogen-Gebrauchslösungen:

- DAB:

1ml DAB mit 15µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kurz vor der Verwendung mischen

- Neufuchsin Substrat-System:

8,7g NaCl, 1,5g Tris-HCl (Trizma-Hydrochloride, SIGMA) und 4,9g Tris-Base (Trizma-Base, SIGMA) in 175ml Aqua dest. lösen; dann nacheinander 62,5ml Propandiol (21g Propandiol auf 1l Aqua dest., Merck, Darmstadt) und 100mg

Levamisole (SIGMA; Levamisole inhibiert die endogene alkalische Phosphataseaktivität und verhindert somit eine Hintergrundfärbung) hinzupipettieren; 500µl Neufuchsin-Salzsäure wurden mit 50mg Na-Nitrit (gelöst in 1250µl Aqua dest., SIGMA) für 1min inkubiert und zur Gesamtlösung gegeben; dann Zugabe des Naphtol-AS-Biphosphates (125mg gelöst in 1500µl N,N-Demethylforamid (Merck, Darmstadt, Deutschland), SIGMA); mit Titrisol-Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) pH-Einstellung von 8,8 ; vor jedem Gebrauch frisch ansetzen und filtrieren

Hämalaun:

saures Hämalaun nach Mayer, Chroma, Münster, Deutschland

Aquatex:

Merck, Darmstadt, Deutschland

Zitronensäure- Monohydrat p.a.:

1g auf 500ml Aqua dest., pH 6,0, Merck, Darmstadt, Deutschland

### **7.3. Fibroblastenisolations-Lösungen**

Hyaluronidase 0,5%:

Zur Herstellung einer Hyaluronidase-Stammlösung 10% 125mg Hyaluronidase (SIGMA, Typ I-S: from bovine testes, lyophilized 330units/mg solid) in 1,25ml PBS lösen. 0,75ml dieser Stammlösung dann mit 14,25ml PBS mischen und steril filtrieren

Trypsin 0,25%:

3ml einer sterilen Trypsin-Stammlösung 2,5% (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 27ml PBS in Lösung bringen und im Wasserbad bei 37°C warm stellen

Kollagenase 0,1% mit Trypsin 0,25%:

aus 125mg Kollagenase (Collagenase Typ 2, worthington biochemical corporation, New Jersey, CLS-2) und 1,25ml PBS eine Kollagenase-Stammlösung 10% herstellen; 0,15ml

dieser Stammlösung dann mit 1,5ml Trypsin-Stammlösung 2,5% und 13,5ml PBS in Lösung bringen, steril filtrieren und im Wasserbad bei 37°C warm stellen

Kollagenase 0,2% mit Medium ohne FKS:

0,4ml Kollagenase-Stammlösung 10% mit 20ml DMEM ohne FKS lösen und steril filtrieren

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Priv.-Doz. Dr. med. P. Moubayed für die ständige Betreuung und unablässige Unterstützung bei der Realisierung der Doktorarbeit. Besonders für die kritische Würdigung und die wertvollen Ratschläge während der Erstellung dieser Promotionsschrift möchte ich mich sehr bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Brinkmann danke ich für die Unterstützung und Beratung auf molekularbiologischer Ebene dieser experimentellen Arbeit, für produktive Ratschläge während der Arbeit und bei praktischen Problemen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. B. Reichert danke ich für die Initiierung und Betreuung der Doktorarbeit, für die aufwendige Gewinnung des Gewebematerials und die Koordination zwischen den einzelnen Instituten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-J. Friedrich danke ich für seine statistischen Hilfestellungen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A.C. Feller und Herrn Prof. Dr. rer. nat. P.K. Müller für den Zugang zu den Institutsräumen der Pathologie bzw. der Molekularbiologie und die großzügige Bereitstellung des Arbeitsmaterials.

Bei Herrn Dr. med. K.-G. Bräutigam möchte ich mich für die Präparation des für die Untersuchungen benötigten Materials bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie und Dermatologie danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Herstellung und der Färbung der histologischen Präparate.

Zudem möchte ich mich bei der Klinik für Dermatologie und dem Institut der Physiologie für die Bereitstellung der Computer zum Fotografieren der Chambersslides, zum Abspeichern und Auszählen der Bilder herzlich bedanken.

Außerdem danke ich allen, die bei der Realisierung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Meiner lieben Familie und meinem Freund danke ich für die Unterstützung während dieser Zeit.

## 9. Publikationsliste

1. Diskontinuierliche Verteilung von Myofibroblasten beim M. Dupuytren. Ursache für diskrepante In-vitro-Analysen? Poster auf dem 43. Symposium der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie, Wien 2002  
Reichert B, Brinckmann J, Otto A, Greve C, Moubayed P, Mailänder P
2. Fibulin 2 beim Morbus Dupuytren. Vortrag auf dem 43. Symposium der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie, Wien 2002  
Reichert B, Reinhardt D P, Greve C, Otto A, Mailänder P

## 10. Lebenslauf

	<b>Persönliche Angaben</b>
Name	Anja Katrin Otto
Geburtsdatum	14.10.1977
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
	<b>Schulbildung</b>
1984 – 1988	Grundschule Tangstedt, Schleswig-Holstein
1988 – 1997	Gymnasium Heidberg, Hamburg
06.1997	Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
	<b>Medizinstudium an der Universität zu Lübeck</b>
10.1997 – 09.1999	Vorklinisches Studium
31.07.1997 – 29.09.1997	Pflegepraktikum: Abteilung Chirurgie in der Paracelsus-Klinik, Henstedt-Ulzburg
10.1999	Physikum
09.2000	erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Famulaturen:
28.02.2000 – 27.03.2000	Innere Medizin in der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel
12.03.2001 – 17.04.2001	Plastische Chirurgie in der Poliklinik der Universität zu Lübeck
30.07.2001 – 20.08.2001	Anästhesiologie in der Universität zu Lübeck
20.08.2001 – 03.09.2001	Neurologie in der Universität zu Lübeck
11.02.2002 – 25.02.2002	Praxisfamulatur Allgemeinmedizin
25.02.2002 – 11.03.2002	Pädiatrie im Klinikum Nord / Heidberg
04.2003	zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Praktisches Jahr:
22.04.2003 – 08.08.2003	Chirurgie in der Asklepiosklinik Bad Oldesloe
11.08.2003 – 28.11.2003	Orthopädie im Klinikum Neustadt
01.12.2003 – 19.03.2004	Innere Medizin in der Rheumaklinik Bad Bramstedt
06.2004	dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
studienbegleitend	Arbeiten als Extrawache / Nachtwache
	Promotion:
06.2000	Aufnahme der Doktorarbeit
03.2002	Ende der praktischen Arbeit