

AUS DEM INSTITUT
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ULTRASTRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN BEI PECTUS EXCAVATUM UND
PECTUS CARINATUM – EIN SCHLÜSSEL ZUR KLÄRUNG DER PATHOGENESE?

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Brendle

2018

AUS DEM INSTITUT
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ULTRASTRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN BEI PECTUS EXCAVATUM UND
PECTUS CARINATUM – EIN SCHLÜSSEL ZUR KLÄRUNG DER PATHOGENESE?

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Brendle

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Grässel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
2. Literaturdiskussion	12
2.1 Pectus carinatum	12
2.2 Pectus excavatum.....	12
2.3 Epidemiologie von Pectus excavatum und Pectus carinatum	13
2.4 Klinik von Pectus excavatum und Pectus carinatum	14
2.5 Grundlegende Informationen zum hyalinen Knorpel	15
2.5.1 Histologie des hyalinen Knorpels	15
2.5.1.1 Zonale Gliederung	16
a. Superfizielle Zone	16
b. Mittlere Zone	16
c. Tiefe Zone und kalzifizierte Zone	17
2.5.1.2 Chondrozyten	17
2.5.1.3 Regionale Gliederung.....	17
a. Chondron	18
b. Perizelluläre Matrix und perizelluläre Kapsel.....	18
c. Territoriale Matrix	18
d. Interterritoriale Matrix	19
2.5.2 Besonderheiten des Rippenknorpels	19
2.6 Pathogenese von Pectus excavatum und Pectus carinatum	20
2.6.1 Knorpel-extrinsische Hypothesen zur Pathogenese	20
2.6.1.1 Pectus excavatum	20
2.6.1.2 Pectus carinatum	21
2.6.2 Knorpel-intrinsische Hypothesen zur Pathogenese	22
2.6.2.1 Pectus excavatum	22
a. Wachstumsstörung.....	22
b. Gestörte Reifung	23
c. Vorzeitige Alterung	23

d. Biomechanische Instabilität.....	24
e. Metabolisch-genetische Veränderungen.....	24
2.6.2.2 Pectus carinatum.....	25
a. Wachstumsstörung.....	25
b. Metabolische Störung.....	25
c. Genetisch bedingte Veränderung.....	25
2.6.3 Weitere Hypothesen und Ansätze	26
2.7 Histologie	26
2.7.1 Pectus excavatum	26
2.7.2 Pectus carinatum	29
2.7.3 Pectus excavatum und Pectus carinatum im Vergleich	29
2.8 Fragestellung	30
3. Material und Methoden.....	31
3.1 Material	31
3.1.1 Probenmaterial	31
3.1.2 Geräte und Materialien	33
3.2 Methoden	36
3.2.1 Gewebepräparation	36
3.2.1.1 Befilmung der Kupfergrids	38
3.2.2 Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop.....	38
3.2.2.1 Beispielbilder der Auswertungsparameter	39
3.2.3 Statistische Analyse.....	45
3.2.3.1 Deskriptive Statistik	46
3.2.3.2 Statistische Tests	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Ergebnisse der deskriptiven Statistik	48
4.1.1 Das Patientenkollektiv.....	48
4.1.2 Beschreibung der Ergebnisse für Parameter 1–6	49
a. Intrazelluläre Kollagenfasern.....	50
b. Intrazelluläre Lipidvakuolen.....	51
c. Zellkern.....	52
d. Einzelzelle	53
e. Zellform länglich-schmal.....	54

f. Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum	55
4.1.3 Beschreibung der Ergebnisse nach Paaren 1–6.....	56
4.1.3.1 Pectus carinatum (z + p) und Pectus excavatum (z + p)	56
4.1.3.2 Pectus carinatum peripher und Pectus excavatum peripher	57
4.1.3.3 Pectus carinatum zentral und Pectus excavatum zentral	57
4.1.3.4 Pectus carinatum zentral und peripher	58
4.1.3.5 Pectus excavatum zentral und peripher	59
4.1.3.6 zentral (PC + PE) und peripher (PC + PE)	59
4.2 Ergebnisse der statistischen Tests.....	60
4.2.1 Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests	60
4.2.1.1 Pectus carinatum (z + p) und Pectus excavatum (z + p)	60
4.2.1.2 Pectus carinatum peripher und Pectus excavatum peripher	61
4.2.1.3 Pectus carinatum zentral und Pectus excavatum zentral	61
4.2.2 Ergebnisse des Wilcoxon-Tests.....	62
4.2.2.1 Pectus carinatum zentral und peripher	62
4.2.2.2 Pectus excavatum zentral und peripher	63
4.2.2.3 zentral (PC + PE) und peripher (PC + PE)	63
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider statistischer Tests.....	64
5. Diskussion	65
6. Zusammenfassung.....	79
7. Quellenverzeichnis.....	80
8. Anhang	87
8.1 Statistische Tests	87
8.1.1 Mann-Whitney-U-Test: PC (z + p) vs. PE (z + p)	87
8.1.2 Mann-Whitney-U-Test: PCp vs. PEp.....	87
8.1.3 Mann-Whitney-U-Test: PCz vs. PEz.....	87
8.1.4 Wilcoxon-Test: PCz vs. PCp.....	88
8.1.5 Wilcoxon-Test: PEz vs. PEp	89
8.1.6 Wilcoxon-Test: z (PC + PE) vs. p (PC + PE)	89
Danksagung	
Lebenslauf.....	

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BDMA	Benzylidimethylamine
CZ	kalzifizierte Zone
DDSA	Dodecyl Succinic Anhydrid
dilatER	dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum
DZ	tiefe Zone
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZ	Einzelzelle
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
IMBEI	Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
izKF	intrazelluläre Kollagenfasern
izLV	intrazelluläre Lipidvakuolen
ls	länglich-schmal
m	männlich
M	molare Masse
MNA	Methyl Nadic Anhydrid
MZ	mittlere Zone
n	Anzahl
nm	Nanometer
p	peripher
PatientInnen	Patienten und Patientinnen
PC	Pectus carinatum
PCM	perizelluläre Matrix
PE	Pectus excavatum
PG	Proteoglycane
SMPS	saure Mukopolysaccharide

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SZ	superfizielle Zone
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF-α	Tumor-Necrosis-Factor-α
w	weiblich
z	zentral
ZK	Zellkern
µm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenkollektiv	32
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Zubehör.....	33
Tabelle 3: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	33
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	35
Tabelle 5: Auswertungsparameter.....	39
Tabelle 6: Gruppen und Untergruppen	46
Tabelle 7: Paare 1–6 und Hypothesen	48
Tabelle 8: Auszählung des Parameters Intrazelluläre Kollagenfasern.....	50
Tabelle 9: Auszählung des Parameters Intrazelluläre Lipidvakuolen.....	51
Tabelle 10: Auszählung des Parameters Zellkern	52
Tabelle 11: Auszählung des Parameters Einzelzelle	53
Tabelle 12: Auszählung des Parameters Zellform länglich-schmal	54
Tabelle 13: Auszählung des Parameters Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum	55
Tabelle 14: Häufigkeit der Parameter 1–6 in PC- und PE-Knorpelproben.....	56
Tabelle 15: Häufigkeit der Parameter 1–6 in peripheren PC- und PE-Knorpelproben	57
Tabelle 16: Häufigkeit der Parameter 1–6 in zentralen PC- und PE-Knorpelproben	58
Tabelle 17: Häufigkeit der Parameter 1–6 in PC-Knorpelproben.....	58
Tabelle 18: Häufigkeit der Parameter 1–6 in PE-Knorpelproben	59
Tabelle 19: Häufigkeit der Parameter 1–6 in zentralen und peripheren Knorpelproben	60
Tabelle 20: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich PC – PE	61
Tabelle 21: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich PCz – PEz	62
Tabelle 22: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich PCz – PCp	62
Tabelle 23: Fast signifikante Unterschiede im Paarvergleich PCz – PCp.....	62
Tabelle 24: Fast signifikante Unterschiede im Paarvergleich PEz – PEp	63
Tabelle 25: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich z – p	63
Tabelle 26: Fast signifikante Unterschiede im Paarvergleich z – p.....	64

Abbildungsverzeichnis

– Skizzen, Bilder und Diagramme –

Skizze 1: Zentral und peripher in Semidünnschnitten.....	32
Bild 1: PE, Vergrößerung x2000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	39
Bild 2: PC, Vergrößerung x2000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	39
Bild 3: PE, Vergrößerung x8000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	40
Bild 4: PC, Vergrößerung x8000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	40
Bild 5: PE, Vergrößerung x2000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	40
Bild 6: PC, Vergrößerung x2000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	40
Bild 7: PE, Vergrößerung x8000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	42
Bild 8: PC, Vergrößerung x8000, Intrazelluläre Kollagenfasern.....	42
Bild 9: PE, Vergrößerung x2000, Intrazelluläre Lipidvakuolen.....	42
Bild 10: PC, Vergrößerung x2000, Intrazelluläre Lipidvakuolen.....	42
Bild 11: PE, Vergrößerung x4000, Zellkern	42
Bild 12: PC, Vergrößerung x2000, Zellkern	42
Bild 13: PE, Vergrößerung x2000, Einzelzelle	42
Bild 14: PC, Vergrößerung x2000, Einzelzelle	42
Bild 15: PE, Vergrößerung x400, Zelle als Teil eines mehrzelligen Chondrons.....	43
Bild 16: PC, Vergrößerung x400, Zelle als Teil eines mehrzelligen Chondrons.....	43
Bild 17: PE, Vergrößerung x800, Zelle als Teil eines mehrzelligen Chondrons.....	43
Bild 18: PC, Vergrößerung x2000, Zelle als Teil eines mehrzelligen Chondrons.....	43
Bild 19: PE, Vergrößerung x2000, Zellform länglich-schmal.....	44
Bild 20: PC, Vergrößerung x2000, Zellform länglich-schmal	44
Bild 21: PE, Vergrößerung x1000, Zellform rundlich-oval.....	44
Bild 22: PC, Vergrößerung x1000, Zellform rundlich-oval.....	44
Bild 23: PE, Vergrößerung x8000, Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum	45
Bild 24: PC, Vergrößerung x8000, Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum	45
Diagramm 1: Mittlere Häufigkeit des Parameters Intrazelluläre Kollagenfasern.....	47

Diagramm 2: Geschlechterverteilung in den Gruppen PE und PC	49
Diagramm 3: Intrazelluläre Kollagenfasern.....	50
Diagramm 4: Intrazelluläre Lipidvakuolen.....	51
Diagramm 5: Zellkern	52
Diagramm 6: Einzelzelle	53
Diagramm 7: Zellform länglich-schmal	54
Diagramm 8: Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum	55

1. Einleitung

Pectus excavatum und Pectus carinatum sind die häufigsten Deformitäten der vorderen Brustwand. Die Begriffe stammen aus dem Lateinischen und setzen sich aus *pectus* (Brust) und *excavare* (aushöhlen, hohl machen) sowie *carina* (Kiel/Schiffskiel) zusammen. Die deutschen Bezeichnungen Trichterbrust und Kielbrust kennzeichnen das Erscheinungsbild der vorderen Brustwand der PatientInnen. Bei Pectus excavatum erscheint die Brust ausgehöhlt oder trichterförmig eingezogen, bei Pectus carinatum kielförmig vorgewölbt.

In einer Vielzahl von Untersuchungen zur Ätiologie der Deformitäten konnten die Ursachen und Pathomechanismen von Pectus excavatum und Pectus carinatum bisher nicht geklärt werden. Folglich existieren keine kausalen Therapiemethoden für die Deformitäten, die sich insbesondere psychisch beeinträchtigend auf die Betroffenen auswirken.

Die vorliegende Arbeit vermittelt zunächst einen grundlegenden Überblick über das Erscheinungsbild, die Epidemiologie und die Klinik von Pectus excavatum und Pectus carinatum. Anschließend vermittelt sie einen Überblick über die Forschung zur Histologie, insbesondere der zellulären Merkmale des sternocostalen Knorpels und zu Fragen bezüglich Ätiologie und Pathogenese der Deformitäten.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die erstmalige vergleichende Analyse der Ultrastruktur des Rippenknorpels von Pectus excavatum und Pectus carinatum. Der Fokus liegt auf den zellulären Merkmalen.

Die vergleichende Analyse erfolgt unter der Frage, ob ultrastrukturelle Befunde zur Klärung der Pathogenese beitragen. Weiterhin geht es um die Frage, ob es sich bei Pectus excavatum und Pectus carinatum um das gleiche Krankheitsbild – bei dem sich lediglich die Richtung der Deformität unterscheidet – oder um zwei grundsätzlich verschiedene Entitäten mit unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese handelt.

2. Literaturdiskussion

Pectus excavatum und Pectus carinatum sind die häufigsten Deformitäten der vorderen Brustwand. Im Deutschen sind sie unter den Bezeichnungen Trichterbrust beziehungsweise Kielbrust bekannt.

2.1 Pectus carinatum

Pectus carinatum (PC) ist eine Sammelbezeichnung für Brustwanddeformitäten mit folgenden Charakteristika: Protrusion des Sternums sowie Protrusion des sternocostalen Knorpels und/oder der angrenzenden Rippen (1, 2). Es gibt verschiedene Einteilungen der Deformität. Desmarais unterscheidet nach der Lage des Protrusionszentrums zwei PC-Varianten, die chondrogladioläre Variante (*keel chest*) und die chondromanubriale Form (*pouter pigeon breast*) (1). Sie können symmetrisch oder asymmetrisch (mit begleitender Rotation des Sternums) ausgeprägt sein (1, 2). Mit 95 % kommt die chondrogladioläre Form am häufigsten vor. Das chondromanubriale Pectus carinatum kann im Rahmen von Syndromen, wie beispielsweise dem Turner- und dem Noonan-Syndrom, auftreten (1, 2). Fokin nennt als dritte Variante das laterale PC, eine stets asymmetrische Deformität. Hier ist der Rippenknorpel einseitig vorgewölbt und das Sternum oftmals zur Gegenseite hin rotiert (2).

2.2 Pectus excavatum

Bei Pectus excavatum (PE) liegt eine trichterförmige Einsenkung der vorderen Brustwand vor, die auf einer dorsalen Abweichung des Sternums beruht (3). Bei 99 % der PatientInnen sind mittlere und untere Anteile des Sternums in die Deformität einbezogen sowie in der Regel Rippen- und Rippenknorpel. Dies betrifft vor allem die dritte beziehungsweise vierte bis siebte Rippe (3–6). Pectus excavatum kommt in vielen verschiedenen Varianten, symmetrischen und asymmetrischen, vor (7). Charakteristisch für asymmetrische Formen sind eine rechtsseitig betonte Depression und Rotation des Sternums (2). Es gibt verschiedene Möglichkeiten die PE-Deformität einzuteilen. Im Folgenden werden zwei vorgestellt. Fokin unterscheidet

anhand der Form der Impression zwei PE-Varianten: Einerseits die Tassen-Form (*cup-shaped*) mit tiefer, gut definierter und lokalisierter Impression, andererseits die Untertassen-Form (*saucer type* oder *flat chest*) mit flacherer, weiter ausgedehnter Einsenkung der vorderen Brustwand (2). Das tassenförmige PE ist am häufigsten und die Impression ist in 80 % der Fälle rechtsseitig lokalisiert (6). Mazhar et al. untergliedern die PE-Deformität anhand ihrer CT-Morphologie in vier Gruppen – A, B1, B2 und C (8):

- A keine Absenkung des Manubrium sterni, posteriore Winkelbildung des Corpus sterni
- B1 horizontale Einsenkung des Manubrium- und des Corpus sterni ohne Winkelbildung
- B2 Depression des Manubrium sterni und posteriore Winkelbildung im Bereich des Corpus sterni
- C komplexe Deformität mit asymmetrisch verdrehtem Manubrium- und Corpus sterni und begleitender asymmetrischer Distorsion und Depression des Brustkorbs

2.3 Epidemiologie von Pectus excavatum und Pectus carinatum

Pectus excavatum und Pectus carinatum repräsentieren 95–97 % aller Brustwanddeformitäten. PE stellt mit einem Anteil von circa 90 % den Großteil der Deformitäten dar (3). PC ist die zweithäufigste Brustwanddeformität, wobei mit 5–20 % sehr variable Angaben zur Prävalenz vorliegen (2). Die Inzidenz von PE liegt bei 1–8 pro 1000, während Prävalenzen bei Geburt zwischen 1/400 und 1/300 beschrieben sind (3, 9). Im Vergleich dazu kommt PC 2–4 mal seltener vor (1). Beide Deformitäten betreffen bevorzugt das männliche Geschlecht mit einem Verhältnis m : w zwischen 2 : 1 und 9 : 1 bei Pectus excavatum und 4 : 1 bei Pectus carinatum (1, 10).

Es liegen verschiedene Ansichten darüber vor, ob die Deformitäten angeboren sind oder nicht. Fokin und Koumbourlis beschreiben PE und PC als kongenital (2, 11). Dagegen meint Cobben, dass die Verformung oftmals nicht angeboren ist, sondern erst in der frühen Kindheit in Erscheinung tritt (12). Coelho bezeichnet PC als erworben (13). Obermeyer definiert Brustwanddeformitäten, die zwischen Geburt und Ju-

gendarter sichtbar werden, als kongenital und solche, die infolge einer Operation der Brustwand entstehen, als erworben (14). Während des (prä-)pubertären Wachstumsschubs wird die Deformität prägnanter. Einzelne Autoren sehen dies bei 1/3 der PE-PatientInnen gegeben, andere in den meisten Fällen (4, 5, 15, 16). Asymmetrische Deformitäten nehmen, insbesondere zwischen dem 10. und 12. Lebensjahr, zu (17).

2.4 Klinik von Pectus excavatum und Pectus carinatum

PatientInnen mit Pectus excavatum zeigen einen typischen asthenischen Habitus (2). Sie sind groß und dünn, haben oft Haltungsstörungen, herabhängende Schultern und schlackernde Arme (18). Die Gliedmaßen und Finger sind lang. Weitere Merkmale sind die Laxizität von Gelenken, Plattfüße sowie ein gothischer Gaumen. Die PatientInnen ziehen sich leicht Verletzungen zu und haben gleichzeitig eine schlechte Wundheilung (7). Beide Brustwanddeformitäten, Pectus excavatum und Pectus carinatum, sind mit Skoliose assoziiert (11, 16). Jeweils circa 20 % der PatientInnen haben eine Skoliose sowie eine Hypokyphose (16). Ein möglicher Grund hierfür sind die veränderten Druckverhältnisse zwischen Rippen und Wirbelsäule, die zu einer Verschiebung der Wirbelkörper führen (18).

Das häufigste körperliche Symptom ist Belastungsintoleranz. Daneben berichten PatientInnen von rascher Ermüdbarkeit und Dyspnoe.

Lungenfunktionstests zeigten bei Pectus excavatum subklinische obstruktive, seltener restriktive Abweichungen der Lungenfunktion. Das Lungenvolumen liegt im unteren Normalbereich (11). Die Zugkraft inspiratorischer Atemhilfsmuskeln ist vermindert (19). Kardiale Symptome sind Tachykardie, Palpitationen und Arrhythmien (7, 18).

Bedingt durch den verminderten anteroposterioren Thorax-Durchmesser kann eine diastolische Herzinsuffizienz vorliegen. Infolgedessen ist eine Steigerung des Herz-Zeit-Volumens über das Schlagvolumen nur eingeschränkt möglich (18). Kinder mit Trichterbrust haben eine beeinträchtigte Myokardkontraktion und Nachlast (20). Anatomisch-strukturell ist das Herz nach links verschoben und rotiert; zudem sind in der Literatur Mitralklappenprolapse im Zusammenhang mit PE und PC beschrieben (2, 7).

Belastungsintoleranz, kardiale Palpitationen und gelegentliche respiratorische Symptome wie Dyspnoe und Tachypnoe liegen auch bei PatientInnen mit Pectus carinatum vor. Jedoch ist die kardiopulmonale Beeinträchtigung bei PC geringer (1). Nach Koumbourlis et al. haben die meisten PatientInnen mit Pectus excavatum und Pectus carinatum keine physischen Symptome; in der Regel werden sie lediglich unter Belastung symptomatisch (18).

Im Vordergrund steht die psychische Belastung durch die Deformität. Das Körperbild der PatientInnen ist erheblich gestört (21). Insbesondere PatientInnen mit Pectus carinatum sind mit dem eigenen Aussehen unzufrieden. Scham wegen der Deformität, geringes Selbstbewusstsein und Gehänsel führen zum Meiden sportlicher und sozialer Aktivitäten (2, 21–23). Betroffene empfinden ihre seelische Lebensqualität als vermindert (21). Psychologische und kosmetisch-ästhetische Aspekte sollten in die Entscheidungsfindung einer operativen Korrektur einfließen; sie stellen neben physischen Beeinträchtigungen eine wichtige OP-Indikation dar (1, 3, 22).

2.5 Grundlegende Informationen zum hyalinen Knorpel

Die Pathogenese und Histologie des Rippenknorpels bei PE und PC bauen auf einem grundlegenden Verständnis der Histomorphologie des hyalinen Rippenknorpels auf. Um Veränderungen des Rippenknorpels bei PE und PC besser erkennen und einschätzen zu können, befasst sich der folgende Abschnitt vorbereitend mit der Histologie des gesunden hyalinen Knorpels.

2.5.1 Histologie des hyalinen Knorpels

Hyaliner Knorpel überzieht die Enden artikulierender Knochen. Er bildet die Grundlage für den Rippen- und Gelenkknorpel (24, 25). Hyaliner Knorpel ist ein aneurales, avaskuläres Gewebe, das im Wesentlichen aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und Extrazellulärer Matrix (ECM) besteht. Ernährung und Stoffaustausch erfolgen über Diffusion, was den Knorpel für degenerative Prozesse prädisponiert (26). Funktionell ermöglicht er eine reibungsarme, schmerzfreie Artikulation und sorgt für eine gleichmäßige Kraftübertragung und -verteilung auf den subchondralen Knochen (26–28).

Es ist ein zellarmes Gewebe; in adultem Knorpel liegt der Volumenanteil der Chondrozyten bei 2 % bis 5 % (24, 29–31).

Im Folgenden werden die zonale Gliederung und die Hauptbestandteile des hyalinen Knorpels, Chondrozyten und ECM, beschrieben. Die Charakterisierung der ECM erfolgt im Abschnitt 2.5.1.3 „Regionale Gliederung“.

2.5.1.1 Zonale Gliederung

Die Morphologie des hyalinen Knorpels variiert je nach Lokalisation, das heißt von Gelenk zu Gelenk, und Alter. Unabhängig davon ist hyaliner Knorpel klar in verschiedene Zonen unterteilt: die oberflächliche, mittlere, tiefe und kalzifizierte Zone (SZ, MZ, DZ, CZ) (32). Jede dieser Zonen enthält Zellen und Kollagenfasern typischer Anordnung und Struktur.

a. Superfizielle Zone

Charakteristisch für die superfizielle Zone (SZ) sind flache, scheibenförmige Zellen, uniforme, dicht gepackte Kollagenfasern sowie ein geringer Proteoglycangehalt. Die Chondrozyten sind in Lakunen eingebettet und wie die Kollagenfasern parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet (27). Schweiförmige Ausziehungen der Lakunen stellen als sogenannte *interconnecting tracs* Verbindungen zwischen Chondrozyten her (33). Hier konzentrieren sich die Proteoglycane der SZ. Eine schmale, zellfreie Schicht, die Lamina splendens, bildet den Abschluss zur Knorpeloberfläche (34).

b. Mittlere Zone

Die mittlere Knorpelzone (MZ) befindet sich zwischen oberflächlicher und tiefer Schicht. Ihre Übergangsposition spiegelt sich in der ECM wider: Die Kollagenfasern verlaufen weder parallel zur Oberfläche (siehe SZ) noch radial (siehe DZ), sondern schräg. Sie überkreuzen sich und sind weniger dicht aneinandergelagert. Die Chondrozyten sind oval-rundlich bis kugelig und liegen häufig paarweise vor (27). Im Vergleich zur superfiziellem Zone sind die Zellen der mittleren und tiefen Zone metabolisch aktiver, mit gut ausgeprägtem Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparaten.

c. Tiefe Zone und kalzifizierte Zone

Chondrozyten der tiefen Zone bilden säulenartige, mehrzellige Chondrone. Eine wellenförmige Grenzlinie, die Tidemark, markiert den Übergang zur kalzifizierten Zone. Die kalzifizierte Zone liegt dem subchondralen Knochen am nächsten und zeichnet sich durch die Kalzifikation der ECM aus. Runde, hypertrophe Chondrozyten sind von nicht-kalzifizierten Lakunen umgeben (27).

2.5.1.2 Chondrozyten

Chondrozyten, die Zellen im hyalinen Knorpel, sind postmitotisch und verantwortlich für Synthese und Umsatz der ECM-Bestandteile (Matrix-Turnover), wie beispielsweise Kollagene, Proteoglycane und Glycoproteine (26, 35). Hyaliner Knorpel ist ein bradytropes Gewebe. Die Energiebereitstellung erfolgt im Wesentlichen über Glycolyse (26). Die Ausstattung mit Zellorganellen orientiert sich an den Stoffwechselgegebenheiten und der Funktion der Chondrozyten. Sie enthalten unter anderem Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und eine geringe Anzahl an Mitochondrien (26). Darüber hinaus enthalten sie Glycogendepots, Lipidtropfen und besitzen ein primäres Zilium (26).

Eine weitere Aufgabe der Chondrozyten – neben Matrix-Turnover – besteht im Knochenwachstum. Im Bereich der Epiphysenfugen vollzieht sich im Rahmen der endochondralen Ossifikation eine Umwandlung von Knorpel in Knochen. Diese Phase ist durch Zellhypertrophie und ECM-Kalzifikation gekennzeichnet. Chondrozyten weisen Zellfortsätze auf, die in die umgebende perizelluläre Matrix hineinragen. In mittleren und tiefen Knorpelschichten sind die Chondrozyten von einer perizellulären Kapsel (siehe 2.5.1.3, b) umgeben (32).

2.5.1.3 Regionale Gliederung

Im Zentrum dieser Gliederung steht das Chondron. Vom Chondron ausgehend wird die extrazelluläre Knorpelmatrix von zellnah nach zellfern in perizelluläre, territoriale und interterritoriale Matrix unterteilt.

a. Chondron

Das Chondron bildet die kleinste strukturelle, metabolische und mechanische Funktionseinheit des Knorpels (32). Chondrone bestehen aus Chondrozyten, einer perizellulären Matrix und einer dicht gewebten, filzartigen perizellulären Kapsel (32, 36). Nach zellfern hin schließen sich die territoriale und die interterritoriale Matrix an. Neben einzelnen Chondronen gibt es doppelte und multiple Chondrone, die aus zwei beziehungsweise mehreren Zellen aufgebaut sind. Sobald das Chondron von mehr als einem Chondrozyt gebildet wird, sind die einzelnen Zellen durch kapsuläre Scheiden voneinander getrennt (37).

b. Perizelluläre Matrix und perizelluläre Kapsel

Charakteristisch für die perizelluläre Matrix (PCM) sind ihre feine Textur und Struktur (32). Sie umgibt die Chondrozyten als filamentäres Netzwerk, das hauptsächlich aus Kollagen VI, XI und Perlecan besteht (27, 38). Über verschiedene Zellrezeptoren kommuniziert die PCM direkt oder indirekt mit der Knorpelzelle, um biochemische und biomechanische Signale zu übermitteln (38, 39). In mittleren und tiefen Knorpelschichten werden Chondrozyten und PCM von einer perizellulären Kapsel korhartig eingefasst. Sie grenzt den Komplex aus Zelle und PCM klar gegen die territoriale Matrix ab. Die perizelluläre Kapsel besteht aus feinen Filamenten und Fibrillen, die zwei fenestrierte Schichten bilden. Während die innere Schicht locker gewoben ist und Makroporen aufweist, ist die äußere Schicht mit Mikroporen versehen und kompakt (32). Ihre Form ist abhängig von der Hydratation der PCM-Proteoglycane (36). Unter Kompression kommt es durch Druckerhöhung und Verformung des Chondrons zum Flüssigkeitsstrom über den Poren. Mit dem Flüssigkeitsstrom können beispielsweise Matrixvesikel innerhalb der ECM transportiert werden (32). Über die mit dem Flüssigkeitsstrom über den Knorpel verbreiteten Matrixvesikel können die Chondrozyten auch die entfernt gelegene Knorpelmatrix beeinflussen (40).

c. Territoriale Matrix

Die territoriale Matrix schließt sich der perizellulären Kapsel nach außen direkt an (40). Zellnah orientieren sich die Kollagenfibrillen an der Zellform, während sie weiter entfernt ein Geflecht mit unterschiedlichen Kreuzungswinkeln bilden (41). In Zwischenräumen des Kollagennetzes befinden sich Proteoglycanaggregate (40). Ge-

meinsam erleichtern das Kollagengeflecht und das chondroitinsulfatreiche Proteoglycan-Gel die Deformierung des Knorpels und bieten Schutz bei Knorpelbelastung (40, 41). Im Übergangsbereich zur interterritorialen Matrix nimmt der Faserdurchmesser zu. Außerdem wechselt die korbähnliche Anordnung zu einer eher parallelen Ausrichtung der Fasern (40, 41).

d. Interterritoriale Matrix

Die interterritoriale Matrix bildet den Hauptteil der Knorpel-ECM (31). Sie weist die meisten Proteoglycane und Kollagenfibrillen auf. Darüber hinaus sind Dichte und Durchmesser der Fibrillen hier am größten (31, 40). Das Kollagennetz wird von Kollagen Typ II, IX, XI und XVI gebildet. Der Faserverlauf variiert in Abhängigkeit von der Knorpelzone. In der SZ sind die Fibrillen in Bezug zur Knorpeloberfläche parallel ausgerichtet, in der MZ eher schräg und in der DZ senkrecht (41). Die dichte Anordnung der Kollagenfasern und der hohe Gehalt an Keratansulfat gewährleisten eine hohe Widerstandskraft gegenüber Druckbelastung (40).

Die interterritoriale Matrix enthält große Mengen eines amorphen elektronendichten Materials, das elektronenmikroskopisch getupft-granulär erscheint. Es ummantelt bestimmte Kollagenfasern, die daraufhin fragmentiert oder längs gespalten erscheinen. Seine Konzentration steigt mit zunehmender Knorpeltiefe und ist in der interterritorialen Matrix am größten. Teilweise scheint es mit Matrixvesikeln assoziiert zu sein oder aus ihnen auszuströmen, um benachbarte Kollagenfasern zu umgeben (32).

2.5.2 Besonderheiten des Rippenknorpels

Hyaline Gelenkknorpel unterschiedlicher Lokalisation können nicht gleichgesetzt werden. Hyaliner Knorpel ist abhängig von der mechanischen Belastung und von ihrer Dauer. Im Unterschied zu Gelenkknorpel ist der Rippenknorpel, nach Tocchioni et al., von einem Perichondrium umgeben, das für die Sauerstoffversorgung sowie den Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten sorgt. Rippenknorpel unterliegt keiner großen und schnell variierenden Belastung und er ist nicht in Zonen beziehungsweise Schichten organisiert, die in Abhängigkeit der Verteilung von Last entstehen. Eine perizelluläre Kapsel konnten Tocchioni et al. in keinem ihrer unter-

suchten Rippenknorpel-Präparate feststellen. Den Übergang zwischen perizellulärer, territorialer und interterritorialer Matrix beschreiben sie als fließend und weich (42).

2.6 Pathogenese von Pectus excavatum und Pectus carinatum

Ätiologie und Pathogenese von isoliert auftretendem Pectus excavatum und Pectus carinatum sind unbekannt (1, 43–45). Es existiert eine Vielzahl von Hypothesen zur Krankheitsentstehung. Führende Hypothesen sind eine zugrunde liegende Entwicklungsstörung, ein übermäßiges Wachstum des sternocostalen Knorpels und ein gestörter Knorpelmetabolismus, der zu biomechanischer Instabilität und überschießendem Knorpelwachstum führt (3).

Im Folgenden werden Knorpel-extrinsische und Knorpel-intrinsische Pathogenese-Modelle für Pectus excavatum und Pectus carinatum separat aufgeführt. Unter „Knorpel-intrinsisch“ werden dabei Hypothesen beschrieben, die entweder ausgehend von histologischen Veränderungen formuliert wurden oder mit histologischen Veränderungen einhergehen können. „Knorpel-extrinsisch“ meint, dass die Ursache, beziehungsweise der pathogenetische Mechanismus, außerhalb des Knorpels zu finden ist. Da sich die Forschung hinsichtlich der Ursachen und Pathogenese von Brustwanddeformitäten bisher auf PE konzentrierte, liegen deutlich weniger Untersuchungen und Publikationen zur Pathogenese der Pectus-carinatum-Deformität vor (1, 13).

2.6.1 Knorpel-extrinsische Hypothesen zur Pathogenese

2.6.1.1 Pectus excavatum

Der große Atemhilfsmuskel der vorderen Brustwand, M. pectoralis major, ist bei PE-PatientInnen kranialer lokalisiert als bei Normalpersonen. Aufgrund dessen wirkt er dem negativen intrathorakalen Druck weniger suffizient entgegen und es resultiert eine trichterförmige Einsenkung der Brustwand (46, 47). Außerdem sehen Park et al. – ausgehend von computertomographisch gemessenen, verlängerten Rippen – einen Zusammenhang zwischen asymmetrischem PE und übermäßigem Rippenwachstum (48).

Ältere Hypothesen zur Pathogenese von PE umfassen unterschiedliche Ansätze:

Die erste Hypothese zur Pathogenese des Pectus excavatum formulierte Bauhinus bereits Anfang des 17. Jahrhunderts. Er sah eine während der embryologischen Entwicklung bestehende Hypertension des Zwerchfells als wichtigen Einflussfaktor an (49). Ein anderes zwerchfellbezogenes Pathogenese-Modell geht von einer Retraktion des Sternums und des Processus xiphoideus aufgrund einer Imbalance der anterioren und posterioren Zwerchfellanteile aus (3). Ende des 19. Jahrhunderts, beziehungsweise Anfang des 20. Jahrhunderts, wurde die Hypothese intrauterinen Druckes infolge einer abnormalen Position des Embryos diskutiert (50, 51). Eggel führte 1870 die PE-Deformität auf eine Weichheit und außergewöhnliche Flexibilität des Sternums zurück und vermutete eine Störung der Ernährung oder der Entwicklung (52). Hagemann formulierte 1888 die Hypothese, dass die PE-Ursache im übermäßigen Wachstum der Rippen liegt (53). 1939 fanden Brown et al. ein verdicktes Ligamentum substernale, das ihrer Ansicht nach zu einer mechanisch bedingten Retraktion des Sternums führen könnte (54). Nach einer weiteren Hypothese ist die Verformung bei PE als erworbene, haltungsbedingte Berufserkrankung anzusehen, zum Beispiel bei Schustern (3). Auch Erkrankungen wie Syphilis, Rachitis und eine Dysfunktion des Lungenparenchyms wurden als Ursachen für PE in Betracht gezogen (3).

Manche dieser Hypothesen, wie beispielsweise diejenige von Langer und Zuckerkandel über intrauterinen Druck des Unterkiefers auf das Brustbein, sind inzwischen obsolet (3, 12, 51). Mit Hinblick auf die führenden Hypothesen (siehe 2.6) sind Eggels und Hagemanns Modelle zur Pathogenese von Pectus excavatum weiterhin aktuell.

2.6.1.2 Pectus carinatum

Wachstum und Ossifikation des Sternums spielen eine Rolle in der Ausbildung der Kielbrustdeformität, insbesondere der superioren Variante (55). Currarino et al. führen die chondromanubriale Form des Pectus carinatum auf eine gestörte Ossifikation des Sternums zurück (56).

Park et al. fanden bei erwachsenen PC-PatientInnen verkürzte Rippen, während sie bei Kindern mit PC verlängerte Rippen feststellten. Ein gestörtes Rippenwachstum

könnte demnach zur Entwicklung der PC-Deformität beitragen oder dieser zugrunde liegen (57, 58). Zusätzliche Hypothesen zur Pathogenese sind übermäßiges Wachstum des Rippenknorpels, abnormale Entwicklung des Zwerchfells, Verformung des Sternums sowie eine Bindegewebserkrankung (59).

2.6.2 Knorpel-intrinsische Hypothesen zur Pathogenese

Insbesondere für die Pathogenese von Pectus excavatum existiert eine Vielzahl von Hypothesen. Zur besseren Übersicht werden die Knorpel-intrinsischen Pathogenese-Modelle zu Pectus excavatum inhaltlich unter den Überbegriffen „Wachstumsstörung“, „Gestörte Reifung“, „Vorzeitige Alterung“, „Biomechanische Instabilität“ und „Metabolisch-genetische Veränderungen“ vorgestellt. Bei Pectus carinatum erfolgt eine Unterteilung in „Wachstumsstörung“, „Metabolische Störung“ sowie „Genetisch-bedingt“. Histologische Untersuchungsergebnisse, die in folgenden Abschnitten genannt werden, sind unter 2.7 ausführlich beschrieben.

2.6.2.1 Pectus excavatum

a. Wachstumsstörung

Sweet et al. diskutierten, dass bei Pectus excavatum der Rippenknorpel verlängert sein könnte und dass daraus die trichterförmige Einsenkung der Brustwand resultiert (60). In den vergangenen Jahren befassten sich zahlreiche Studien mit der Länge der Rippen, des Rippenknorpels und mit dem relativen Längenverhältnis des Knorpels zur Rippe (Costal Index). Inzwischen wird überschießendes Wachstum des sternocostalen Knorpels als Ursache für PE abgelehnt (48, 61, 62).

Die Costal Indices sind bei PE unverändert, das heißt, die relative Länge des Knorpels im Verhältnis zur Rippenlänge ist normal (48, 62). Auf der Seite mit der tieferen Impression, wo der Rippenknorpel – Sweets Hypothese nach – am längsten sein müsste, konnte sogar eine Verkürzung einzelner Rippen und Rippenknorpel gezeigt werden (61). Auch bei asymmetrischem PE ist es nicht der sternocostale Knorpel, der übermäßig lang ist; signifikant länger als bei Kontrollpersonen sind hier die Rippen (48). Außerdem fehlt das histomorphologische Korrelat übermäßigen Wachstums (44, 45).

Dennoch sind eine Wachstumsstörung und global überschießendes Wachstum, das sowohl Chondrozyten als auch die ECM einbezieht, aus histologischer Sicht nicht sicher ausgeschlossen (44).

Eine weitere Hypothese zur möglichen Wachstumsstörung berücksichtigt die Embryologie der Rippen und des Sternums. Während die Rippen dem paraxialen Mesoderm entstammen, entwickelt sich das Sternum aus dem Seitenplatten-Mesoderm. Der unterschiedliche embryonale Ursprung könnte zu einer Wachstumsstörung führen, die sich in Form eines Pectus excavatum manifestiert (12).

b. Gestörte Reifung

Die Hypothese einer gestörten Reifung des sternocostalen Knorpels geht auf histologische Untersuchungen zurück. Die Rundheit der Zellen charakterisiert Knorpelreife und nimmt normalerweise mit steigendem Alter zu (44). Dasselbe gilt für die Sulfatierung von Proteoglycanen (63). Die altersunabhängige Rundheit der Zellen und die geringe Proteoglycan-Sulfatierung bei Pectus excavatum deuten auf eine gestörte Reifung und Zellteilung sowie Unreife des Knorpels hin (44).

c. Vorzeitige Alterung

Einige histomorphologische und biochemische Untersuchungen zeigen eine vorzeitige Alterung des Rippenknorpels (64–66). Die Hypothese wird durch mehrere Autoren unterstützt (2, 64, 65). Nach Tsvetkova et al. könnten der erhöhte Kollagenanteil, der erhöhte Gehalt an nicht extrahierbarem Kollagen und der verminderte Gehalt an immobilisiertem Wasser für eine vorzeitige Alterung sprechen. Diese Ergebnisse zeigen sich in gleicher Weise für isoliertes Pectus excavatum und für PE mit zusätzlichem Ehlers-Danlos-Syndrom (64). Histologisch-degenerative Veränderungen werden auf eine Stoffwechselstörung der Chondrozyten zurückgeführt, die mit verminderter Knorpelstabilität einhergeht, welche wiederum die Deformierung der Brustwand begünstigt. Die degenerativen Veränderungen sind nicht PE-spezifisch; sie gleichen denjenigen von Knorpel-Gesunden (65). Jedoch treten die physiologischen Altersveränderungen bei PE um 6 bis mehr als 10 Jahre früher auf (65, 66). Die katabole Stoffwechselleistung ist im PE-Knorpel erhöht (65).

d. Biomechanische Instabilität

Der Rippenknorpel von PE-PatientInnen weist defizitäre biomechanische Eigenschaften auf. Er ist weniger elastisch und weniger stabil in Bezug auf Zug, Druck und Biegebeanspruchung. Daraus wurde die Hypothese entwickelt, dass Pectus excavatum sekundär bei veränderten biomechanischen Eigenschaften des Rippenknorpels auftritt (45). Die biomechanischen Knorpel-eigenschaften beruhen auf dem Zusammenspiel der Matrixkomponenten, der Kollagene und Proteoglycane (28, 45). Verantwortlich für die veränderte Biomechanik sehen Feng et al. die Störung der Kollagen-Verteilung und Anordnung, insbesondere von Kollagen Typ II.

Des Weiteren lässt der geringere Gehalt an immobilisiertem Wasser (vergleiche 2.6.2.1, c) Rückschlüsse auf eine reduzierte Wasserbindungskapazität zu. Eine geringe Sulfatierung von Proteoglycanen (vergleiche 2.6.2.1, b) geht mit verminderter Wasserbindungskapazität einher. Diese bewirkt modifizierte biomechanische Eigenschaften des Knorpels (45, 64). Geisbe et al. führen die Instabilität auf kataplastische Veränderungen zurück (vergleiche 2.6.2.1, c). Eine trichterförmige Deformierung der Brustwand ist bei Knorpelinstabilität im Sinne reduzierter Knorpelsubstanz durch physiologische Atemmechanik möglich (65).

Insgesamt zeigt sich ein Zusammenhang zwischen metabolischen Störungen des Kollagen- beziehungsweise des Mukopolysaccharid-Stoffwechsels und der Entstehung der Pectus excavatum (3, 45, 65).

e. Metabolisch-genetische Veränderungen

Der Rippenknorpel von PE-PatientInnen weist erniedrigte Zink- sowie erhöhte Magnesium- und Calciumkonzentrationen auf (67). Diese metabolischen Veränderungen im engeren Sinne führen zur Arbeitshypothese vom Auftreten des Pectus excavatum im Zusammenhang mit abnormen Spurenelement-Konzentrationen (67). Zinkmangel könnte in der Pathogenese von Brustwanddeformitäten eine entscheidende Rolle spielen, da zinkabhängige Enzyme und Zinkfingerproteine an der Chondrogenese beteiligt sind (68, 69). Außerdem führt Zinkmangel zu Skelettfehlbildungen und zu einer Aktivitätsminderung in reifen Chondrozyten (67, 70, 71).

Molekulargenetische Untersuchungen zeigten für verschiedene Bestandteile des PE-Knorpels eine veränderte Gen-Expression, wobei die gefundenen Genmutationen

insbesondere mit metabolischen Erkrankungen assoziiert sind. Beispielsweise waren Kollagengene heraufreguliert, während TNF α -Isoformen mit hemmendem Einfluss auf die Kollagen-Gen-Expression herabreguliert waren (2).

Das hereditäre und mit anderen Fehlbildungen kombinierte Auftreten des Pectus excavatum spricht für eine anlagebedingte Stoffwechselstörung (65). Verschiedene monogenetische Syndrome und Chromosomenaberrationen können mit PE assoziiert sein, ebenso wie verschiedene Genmutationen. Beispielsweise ist bei der Facioscapulohumeralen Muskeldystrophie – eine Erkrankung, die auf einer Genmutation beruht – die PE-Inzidenz sehr hoch (57, 72).

2.6.2.2 Pectus carinatum

a. Wachstumsstörung

Als Ursache für die chondrogladioläre Variante des Pectus carinatum wird ein abnormales Wachstum des sternocostalen Knorpels angenommen (73). Untersuchungen des sternocostalen Knorpels bei PC zeigten, dass der Rippenknorpel bei PatientInnen mit Pectus carinatum im Vergleich zum Rippenknorpel gesunder Kontrollpersonen verlängert ist. Dennoch liegt die Hauptursache der Deformität nicht im übermäßigen Knorpelwachstum, da sich die Knorpellänge zwischen links und rechts bei asymmetrischem PC nicht signifikant unterscheidet (59). Zusätzlich umfasst die Hypothese der Wachstumsstörung die Rippen, wie bereits unter 2.6.1.2 beschrieben.

b. Metabolische Störung

Brochhausen et al. fanden in Kielbrust-Chondrozyten kristalline Einschlüsse. Höchstwahrscheinlich sind sie Ausdruck einer metabolischen Störung, wobei unklar bleibt, welcher Art diese Störung ist. Denkbar ist, dass die kristallinen Einschlüsse im Rahmen degenerativer Prozesse auftreten (68).

c. Genetisch bedingte Veränderung

Es gibt verschiedene Hinweise für einen genetischen Hintergrund bei der PC-Deformität. Wie bereits unter 2.4 beschrieben, ist PC häufig mit Skoliose assoziiert und einige genetische Erkrankungen, wie beispielsweise das Marfan- und das Noonan-Syndrom, manifestieren sich mit einer Kielbrust (1, 16, 74). Außerdem liegt in ei-

nem Viertel der PC-Fälle eine positive Familienanamnese vor, was für eine genetische Prädisposition bei der Entwicklung der PC-Deformität spricht (1).

2.6.3 Weitere Hypothesen und Ansätze

Die Hypothesen von Entwicklungsstörung und übermäßigem Knorpelwachstum eröffnen die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Deformität und der embryonalen Entwicklung von Rippen und sternocostaler Region gibt. Ein Beispiel ist eine Reifungsunterbrechung in der parasternalen Region (3). In der vorliegenden Arbeit wird Rippenknorpel von jugendlichen und erwachsenen PatientInnen untersucht, nicht von Feten, weshalb auf Embryologie-basierte Hypothesen nicht näher eingegangen wird.

Aufgrund des histologischen Schwerpunkts wird in dieser Dissertation auf genetische Untersuchungen nicht näher eingegangen.

2.7 Histologie

Bei der ersten Pectus-excavatum-Operation 1911 entnahm Meyer sternocostalen Knorpel und untersuchte ihn anschließend histologisch. Dabei stellte er eine unspezifische Degeneration des Knorpels fest, die er jedoch nicht in Zusammenhang mit der Pathogenese von PE brachte (3). Bis heute wurde der Rippenknorpel von PC- und PE-PatientInnen immer wieder anhand verschiedener histologischer Verfahren und Färbemethoden untersucht. Nachfolgend werden die Ergebnisse für PE und PC aufgeführt.

2.7.1 Pectus excavatum

Geisbe et al. beschrieben physiologische, jedoch vorzeitige Alterungsveränderungen beim Rippenknorpel von PE-PatientInnen (siehe 2.6.2.1, c). Diese umfassen eine körnige Trübung der Knorpelgrundsubstanz, Demaskierung parallel gerichteter Fasern mit Schwund der Kittsubstanz, Asbestfaserung sowie Ausbildung von Fasermarkräumen. Die Veränderungen beschreibt Geisbe als nicht PE-spezifisch. Jedoch korreliert der Schweregrad regressiver Veränderungen mit demjenigen der Deformi-

tät. Die Veränderungen führen Geisbe et al. auf eine Stoffwechselstörung der Chondrozyten zurück, die mit verminderter Knorpelstabilität und der Ausbildung einer Trichterbrust einhergeht (65).

Histologische Untersuchungen von Rupprecht et al. bestätigen das Vorliegen degenerativer Veränderungen. Sie präsentieren sich in Form von degenerativ veränderten Chondrozyten mit Lipidvakuolen und osmiophilen Ablagerungen. Elektronenmikroskopisch weist der sternocostale Knorpel unabhängig vom Alter der PE-PatientInnen dilatierte Zisternen des ER, große Golgi-Apparate und geschwollene Mitochondrien sowie intrazellulär herdförmige Glycogenablagerungen auf. Zusätzlich zeigen sich Veränderungen der Extrazellulärmatrix mit verbreiterten und auffallend parallel orientierten Kollagenfibrillen. Hinzu kommt sogenanntes *long spacing Kollagen* mit einem verbreiterten Abstand der Querbänderung (67). 1989 fanden Rupprecht et al. Gefäße im PE-Knorpel, auch in nicht deformierten Anteilen. Mit zunehmendem Alter zeigte sich ein außergewöhnlicher Anstieg der Chondrozytenzahl innerhalb eines Chondrons (75).

Fokin et al. fanden in PE-Präparaten fokale Nekrosen und mukoide Matrixdegeneration sowie eine höhere Zellularität und variablere Zellverteilung als in gesundem Knorpel. Außerdem imponierten größere Gefäßanordnungen. Dies könnte eine gesteigerte Wachstumsaktivität bei verminderter struktureller Integrität des Knorpels darstellen, der bei PE zusätzlicher mechanischer Belastung unterliegt. Fokin erwähnt außerdem Ergebnisse von Urmonas und Kondrashin aus dem Jahr 1983, die im PE-Knorpel Vakuolisierung, Polymorphismus und Kernpyknose feststellten. In oberflächlichen Knorpelschichten waren zahlreiche Chondrozyten anzutreffen, während in tiefen Zonen Chondroblasten vorlagen (2).

Anders als die vorhergehenden Arbeitsgruppen stellten Feng et al. lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen PE-Knorpel und gesundem Knorpel fest. Bei elektronenmikroskopischer und immunhistochemischer Untersuchung zeigen sich Unterschiede in der Verteilung und Anordnung von Kollagen II (Vergleiche 2.6.2.1, d). In tiefen Knorpelzonen sind Verteilung und Anordnung der Fibrillen ungleichmäßig beziehungsweise unregelmäßig und stellenweise sehr rarefiziert. Bei Mitochondrien, ER, Golgi-Apparaten und Proteoglycanen liegen keine Unterschiede zwischen PatientInnen und Kontrollpersonen vor (45).

Kuritsyn beschreibt große zellfreie Areale und demaskierte Fasern, die bei Pectus excavatum 6–7 Jahre früher auftreten als bei normalem Rippenknorpel. Sie seien Korrelat einer beschleunigten Involution des Knorpels. Außerdem sind Fibronectin und Kollagen V erhöht; zudem weisen Chondrozyten mehr Prokollagen III und IV auf (66).

David et al. fokussierten sich in ihren Untersuchungen auf die Zelldichte und Fläche, die sich bei PE und Kontrollen nicht signifikant unterschieden. Die Rundheit der Zellen variierte nicht. Mit zunehmendem Alter nehmen bei gesundem Knorpel Zelldichte und Fläche ab und die Rundheit der Zellen zu. Bei Pectus excavatum waren diese Parameter altersunabhängig (44).

In der Alcian-Blau-Safranin-Färbung präsentieren sich 80 % der PE-Präparate alcianophil und 20 % safraninophil. Die Färbung des Kontrollknorpels zeigt das entgegengesetzte Verhältnis. Alcianophil bedeutet eine schwache Sulfatierung, safraninophil eine starke Sulfatierung. Die Kollagenfärbung Masson-Trichrom des PE-Knorpels entsprach bei den Autoren der eines reifen hyalinen Knorpels ohne wesentliche Unterschiede zur Kontrollgruppe (44).

Tocchioni et al. charakterisierten den PE-Knorpel anhand lichtmikroskopischer, immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen. Weder lagen in Ihrem Kollektiv signifikante Unterschiede zwischen sternocostalem PE- und Kontroll-Knorpel vor, noch ließen sich PE-spezifische Merkmale herausarbeiten. Die Befunde von David et al. wurden von der Arbeitsgruppe um Tocchioni nicht bestätigt. Die Ergebnisse der Alcianblau-Safranin-O-Färbung ließen keine Schlüsse auf die Ätiologie oder Pathogenese dieser Deformität zu. Die Forschergruppe schlussfolgert, dass Knorpel-intrinsische Prozesse wie Knorpelmetabolismus, strukturelle Veränderungen mit Kondensation des Kollagennetzes und Abnahme der Zelldichte nicht die Ursache der Deformität sind. Die Autoren stellen vielmehr die Hypothese auf, dass diese Veränderungen den deformierten Knorpel ebenso wie gesunden Knorpel stabilisieren. Bei Pectus excavatum wird die trichterartige Form der vorderen Brustwand stabilisiert. Tocchioni et al. gehen letztlich davon aus, dass PE auf einer dynamischen Krafteinwirkung beruht (42).

2.7.2 Pectus carinatum

Beim Knorpel des Pectus carinatum konnte eine leichte Degeneration der Extrazellulärmatrix mit demaskierten Fasern beobachtet werden (68). Darüber hinaus fehlte den Kollagenfasern die charakteristische Querstreifung und sie waren verdickt. Außerdem zeigte sich ein Verlust an Proteoglycanen. Elektronenmikroskopisch fielen vereinzelt Chondrozyten mit kristallinen Einschlüssen auf (68).

Stacey et al. untersuchten den sternocostalen Knorpel eines PC-Patienten mit dem Ziel der Charakterisierung des Rippenknorpels. Auffallend waren dort die Kollagen-Nanostraws (*straw*, engl. = Strohhalm, Trinkhalm) aus Kollagen Typ II, die signifikant breiter als einzelne Kollagenfasern waren und durch eine Vielzahl von Proteinen quervernetzt sein könnten. Funktionell könnten sie für den Flüssigkeitstransport im sternocostalen Knorpel verantwortlich sein (25).

2.7.3 Pectus excavatum und Pectus carinatum im Vergleich

Wie oben dargelegt liegen für beide Brustwanddeformitäten, PE und PC, histologische Daten verschiedener Publikationen vor. Dennoch gibt es, nach ausführlicher Recherche der aktuellen Literatur, als einzige Arbeit, die Pectus excavatum und Pectus carinatum histologisch vergleichend analysiert, die Bachelorarbeit von Maria Christina Verez Sola. Die Ergebnisse ihrer Bachelorarbeit decken sich weitgehend mit den Ergebnissen publizierter Untersuchungen, sodass von einer gewissen Evidenz der Bachelorarbeit auszugehen ist. Beispielsweise wurde eine Asbestfaserung bei PE bereits durch Geisbe et al. beschrieben (65, 68). Weiterhin stellte Verez Sola endothelialisierte Räume bei PE und PC fest, was mit Ergebnissen von Rupprecht et al. und Fokin et al. vereinbar ist; sie beschrieben Gefäße im PE-Knorpel (2, 75). Auch die Vakuolisierung, die Verez Sola fand, ist bereits vorbeschrieben durch Urmonas und Kondrashin, deren Ergebnisse Fokin et al. in ihrer Publikation erwähnen (2).

In den Untersuchungen von Verez Sola fanden sich sowohl bei PE als auch bei PC Asbestfaserung, mukoide Matrixdegeneration und Gefäßneubildungen. Die Alcian-Blau-Färbung zeigte Unterschiede im Vergleich mit gesundem Knorpel: Sowohl bei

PE als auch bei PC war der Gehalt an sauren Mukopolysacchariden (SMPS) geringer und sie waren unregelmäßiger verteilt. Der Gehalt an Proteoglycanen (PG) war in der Arbeit von Verez Sola dagegen nicht vermindert; die Safranin-O-Färbung war, bis auf Areale mit Asbestfaserung und mukoider Matrixdegeneration, gleichmäßig intensiv (76).

Hinsichtlich der Morphologie, Vitalität und Anordnung von Zellen stellte Verez Sola signifikante Unterschiede zwischen PE und PC fest. In den von Verez Sola untersuchten PC-Präparaten war die Gesamtzellzahl und die Anzahl an vitalen Zellen signifikant höher als in PE-Präparaten, was als hohe Stoffwechselaktivität im PC-Knorpel interpretiert wurde (76). In Peripherie und Übergangszone fand Verez Sola bei PC mehr Zellgruppierungen als bei PE. Zusätzlich fand sie, insbesondere in der peripheren Zone bei PC, deutlich mehr Einzelzellen. Daraus leitete sie ein Ungleichgewicht im Gewebe ab.

Gleichzeitig stellte sie im Übergangsbereich und im Zentrum mehr avitale und vakuolierte Zellen fest. Verez Sola zufolge findet sich im vitalen Knorpel keine Vakuolisierung. Entsprechen der Ergebnisse der Bachelorarbeit von Verez Sola war das Ausmaß an Asbestfaserung bei PC-Proben größer als bei PE. Dies spräche für eine Degeneration, da Asbestfaserung ein histomorphologisches Korrelat physiologischer Alterung darstelle (76).

Zusammenfassend beschrieb Verez Sola eine Unterscheidung des PC-Knorpels vom PE-Knorpel durch höhere Stoffwechselaktivität bei gleichzeitig vermehrter Degeneration bei Pectus carinatum.

2.8 Fragestellung

Die Annahme eines verlängerten sternocostalen Knorpels stellt bei Pectus carinatum die Grundlage der operativen Korrektur dar (59, 77). Bei Pectus excavatum kann es, unabhängig vom operativen Ansatz, zur Rekurrenz der Deformität kommen (78). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass Kenntnis über die Pathogenese der Erkrankungen PE und PC beziehungsweise das fehlende Wissen über die Ursache und Krankheitsentstehung von therapeutischer Relevanz sind.

Histologische Veränderungen können den Deformitäten zugrunde liegende Pathomechanismen offenlegen (68). Allerdings sind Forschungsergebnisse zur Pathogenese der Deformitäten uneinheitlich (3).

Beim Vergleich der Histomorphologie von Pectus excavatum und Pectus carinatum auf lichtmikroskopischer Ebene fand Verez Sola sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten; möglicherweise liegen Pectus excavatum und Pectus carinatum dieselben Pathomechanismen zugrunde. Bereits 1981 stellten Pena et al. die Frage, ob es sich bei PE und PC um dasselbe Krankheitsbild handelt: „Pectus carinatum and pectus excavatum: are they the same disease?“ (79).

Die ausführliche Literaturrecherche ergab, dass die Ultrastruktur von PE und PC bisher nie vergleichend analysiert wurde.

Eine vergleichende Analyse der Ultrastruktur von PE und PC erfolgt in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Frage, ob sich aus den Befunden die Pathogenese der Brustwanddeformitäten besser erschließt und die Befunde für eine gemeinsame Pathogenese sprechen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Die untersuchten Knorpelproben entstammen korrekiven Operationen der Brustwanddeformitäten Pectus excavatum und Pectus carinatum. Zum Zeitpunkt der Operation waren die PE-PatientInnen ($w = 3, m = 7$) zwischen 15 und 28 Jahre alt. Die Eingriffe wurden in der Klinik für Kinderchirurgie der Universitätsklinik Mainz ($n = 1$), im Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg ($n = 6$) und im Trichterbrustzentrum der Universität Erlangen ($n = 3$) durchgeführt. Die PC-PatientInnen ($w = 3, m = 7$) waren zum Zeitpunkt der Knorpelentnahme zwischen 16 und 26 Jahre alt. Die Operationen erfolgten in Erlangen ($n = 3$), in Straßburg ($n = 6$) und am Johanniter-Krankenhaus

im Fläming Treuenbrietzen ($n = 1$). In Tabelle 1 wird das Patientenkollektiv tabellarisch nach Geschlecht, Alter und Operationsort aufgeführt.

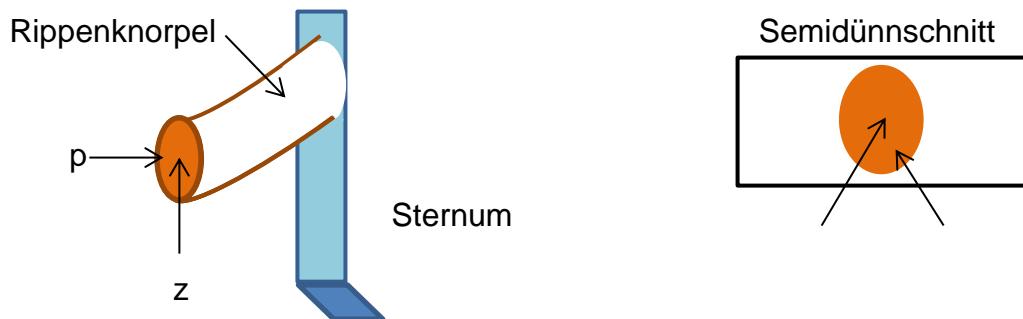
Für jede Brustwanddeformität wurden 10 Präparate aus peripheren Knorpelanteilen und 10 Präparate aus zentralen Knorpelanteilen untersucht. Insgesamt lagen 20 Trichterbrustpräparate und 20 Kielbrustpräparate vor, sodass die Gesamtstichprobe 40 Knorpelpräparate umfasste. Bei den Präparaten handelte es sich um Ultradünn schnitte für die ultrastrukturelle Untersuchung des Knorpels mithilfe der Transmissi onselektronenmikroskopie (TEM).

In Skizze 1 wird die Definition von zentral und peripher bildhaft dargestellt. Zentral und peripher beschreiben die Region des Semidünn schnitts, aus der die entsprechenden Ultradünn schnitte angefertigt wurden.

Tabelle 1: Patientenkollektiv

PC						
weiblich	männlich	Alter in Jahren (Häufigkeit)	Erlangen	Straßburg	Mainz	Treuenbrietzen
3	7	16 (3) 17 (4) 18 (2) 26 (1)	3	6	0	1
PE						
3	7	15 (1) 17 (1) 18 (3) 20 (4) 28 (1)	3	6	1	0

Skizze 1: Zentral und peripher in Semidünn schnitten



3.1.2 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Technische Daten	Hersteller/Lieferant
Heizplatte	Stuart Digital Hotplate SD300	Bibby Scientific Ltd. Stone, England
Wärmeschrank	U10	Memmert Schwabach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Kühl-Gefrierkombination KGT.3546	Liebherr-International AG Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop	Olympus CH20	Olympus Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA®-Werke GmbH & Co. KG Staufen, Deutschland
pH-Meter	WTW Series InoLab® pH 720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH Weilheim, Deutschland
Pinzette fein, gebogene Spitze	DUMONT Pinzette, INOX, Typ 7, Biologie	Plano GmbH Wetzlar, Germany
Präzisionswaage	Sartorius LC 6205	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Rüttler	Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland
Knifemaker	7800 Knifemaker	LKB Produkter A13 Bromma, Sweden
Ultramikrotome	Reichert-Jung Ultracut Reichert-Jung Ultracut E Leica Ultracut R	Alle: Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland
Transmissions-Elektronenmikroskop	Jeol JEM-1400	Jeol (Germany) GmbH Eching b. München, Deutschland

Tabelle 3: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Deckgläser 18 x 18 mm	0101030	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königstein, Deutschland

Material	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Ultra Diamantmesser 45° 2,5 mm	16DIA.DU4525	Agar Scientific Ltd. Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland
Faltenpapier (Papierfilter)	1001090	Whatman GmbH Dassel, Deutschland
Hartgelatine-Leerkapseln Größe 3	14060	Küpper-Primax GmbH Troisdorf-Spich, Deutschland
Glasmesser	G3516	Agar Scientific Ltd. Stansted, England
Kupfergrids 100 mesh	G2100C	Plano GmbH Wetzlar, Deutschland
Ungepuderte Untersuchungshandschuhe aus Nitril	SU-INT-M	Emergo Europe Den Haag, Niederlande
Rotilabo® Magnetstäbchen-Set	C267.1	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Becherglas 100 ml	C112.1	Schott AG Mainz, Deutschland/ Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Becherglas 250 ml	C114.1	Schott AG Mainz, Deutschland/ Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Messzylinder 100 ml 100 : 1	2210180	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Germany
Messzylinder 25 ml 25 : 0,5	2210170	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Germany
Objektträger	4530679	Gerhard Menzel GmbH Braunschweig, Deutschland
Zellstoff	849405	Kurt Müller GmbH Pulheim-Braunweiler, Deutschland
Rasierklingen Apollo Eversharp Blades	T586A	Plano GmbH Wetzlar, Germany
Heavy Duty Industrial Blades .012 HD	T5016	Plano GmbH Wetzlar, Germany

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Leitungswasser		
Agar 100 Resin	R1043	Agar Scientific Ltd. Stansted, England
Aqua bidest.		Medizintechnik der Uni- versitätsmedizin Mainz, Deutschland
Aqua dest. Spülösung steril	53434124	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Entellan	1.07961.0500	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	32205-2.51	Sigma – Aldrich Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphos- phat	1048730250	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Natronlauge 1N	1091371000	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxyd	A74050001	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Polyvinylformaldehyd Formvar® 1595E	12164	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Propylenoxid	33715	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Stickstoff, flüssiger	bezogen über das zentrale Gaslabor der Universi- tätsmedizin Mainz, Deutschland	Linde AG Gases Division Germany Pullach, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat	35803	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Methylenblau	1159430025	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumtetraborat- Decahydrat	1063080500	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Azure II		angesetzt am Institut für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
BDMA (Benzyldimethyla- mine)	R1060	Agar Scientific Ltd Stansted, England
Blei(II)-nitrat	1073980100	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Dichlorethan	1009551000	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

Reagenz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Dinatriumhydrogenphosphat	1065860500	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
DDSA (Dodecetyl Succinic Anhydrid)	R1051	Agar Scientific Ltd. Stansted, England
Formalin 4 % gepuffert		Routinelabor des Instituts für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %	23114	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
MNA (Methyl Nadic Anhydrid)	R1081	Agar Scientific Ltd. Stansted, England
Uranylacetat	77870	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Gewebepräparation

Unmittelbar nach der operativen Gewebeentnahme wurden die Rippenknorpel-Proben in gepuffertem Formalin fixiert und an das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz gesendet. Die Gewebepräparation erfolgte durch die Medizinisch-technischen AssistentInnen des Instituts für Pathologie in Mainz. Anhand einer makroskopischen Beurteilung wurden geeignete Gewebeanteile herausgesucht und anschließend isoliert. Unter Zugabe von EDTA wurden die Proben bei 37 Grad Celsius im Brutschrank entkalkt. Es folgten eine standardisierte Entwässerung und die Einbettung in Paraffin. Aus den Paraffinblöcken wurden daraufhin 2 µm dicke Schnitte hergestellt und diese auf Objektträger gezogen.

Anschließend erfolgte die weitere Präparation für die Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop. Dazu wurden aus den oben beschriebenen Schnitten Proben mit einer Größe von 0,1 x 0,1 x 0,1 cm angefertigt. Zunächst wurden die Proben in 2,5 %igem Glutaraldehyd oder in 4 %igem gepufferten Formalin über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert und fixiert. Anschließend erfolgte das Auswaschen in 0,1 M

Phosphatpuffer für zweimal 15 Minuten, ebenfalls bei 4 Grad Celsius. Es folgte eine Nachfixierung mit 1 %igem Osmiumtetroxid. Danach wurden die Präparate ein zweites Mal für zweimal 15 Minuten bei 4 Grad Celsius in Phosphatpuffer 0,1 M ausgewaschen. Mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe folgte die Entwässerung bei Raumtemperatur. Hierbei durchliefen die Proben jeweils zweimal 15 Minuten Lösungen von 50 %-, 70 %-, 90 %- und schließlich 100 %igem Ethanol. Zweimal Waschen über 15 Minuten in 1,2 Propylenoxyd schlossen sich an. Nun wurden die Proben 60 Minuten in Propylenoxyd-Agar-100-Resin Gemisch im Verhältnis 2 : 1 getaucht. Es folgte eine 60-minütige Inkubation in Propylenoxyd-Agar-100-Resin-Gemisch im Verhältnis 1 : 2. Über Nacht verblieben die Proben bei 4 Grad Celsius im Agar 100 Resin Gemisch. Am Folgetag schlossen sich zwei weitere Schritte an: das Ausbetten in mit Agar-100-Resin-Gemisch gefüllten Gelatinekapseln und die Polymerisation der Blöcke für 24 Stunden bei 60 Grad Celsius. Zuerst wurden die fertigen Blöcke mit Rasierklingen getrimmt. Mithilfe von Glasmessern wurden Semidünnnschnitte einer Dicke von circa 1 μ m hergestellt. Die Semidünnnschnitte dienten dazu, geeignete Schnittregionen für nachfolgend hergestellte Ultradünnnschnitte zu finden.

Zunächst wurden die Semidünnnschnitte auf unbeschichtete Glasobjektträger aufgezogen und bei 100 Grad Celsius auf einer Heizplatte getrocknet. Für die Anfärbung folgte, wieder bei 100 Grad Celsius, eine einminütige Inkubation mit Färbelösung nach Richardson. Sie wurde danach mit Aqua dest. abgespült, die Schnitte mit Entelan eingedeckt.

Nach Auswählen der entsprechenden Schnittregionen für die Herstellung von Ultradünnnschnitten wurden die Blöcke erneut mithilfe von Rasierklingen getrimmt, sodass mit Diamantmessern circa 90 nm dicke Ultradünnnschnitte angefertigt werden konnten. Sie wurden auf befilmte Kupfergrids übertragen.

Die mit Ultradünnnschnitten beladenen Kupfergrids wurden für 10 Minuten auf 1 %ige alkoholische Uranylacetatlösung gelegt und daraufhin mit Aqua bidest. abgewaschen, bevor sie auf Bleicitrat nach Reynolds übertragen wurden. Es folgte ein erneuter Waschgang mit Aqua bidest., das anschließend mit Filterpapier abgezogen wurde.

Für jede Probe wurden mehrere Kupfergrids mit Ultradünnnschnitten versehen und in beschriftete Schalen gegeben. Nach der Einschleusung ins Transemissions-

Elektronenmikroskop JEM 1400 folgten die Betrachtung der Ultrastruktur sowie eine Fotodokumentation.

3.2.1.1 Befilmung der Kupfergrids

Der gereinigte Objektträger wird in ein Ablaufgefäß mit Befilmungslösung gestellt. Nachdem diese abgelaufen ist, verbleibt auf dem Objektträger ein Film. Bei Verdunstung des Lösungsmittels entsteht aus dem Film eine Kunststofffolie. Sie löst sich ab, wenn der Objektträger in ein mit Wasser gefülltes Gefäß gegeben wird. Beim Ablösen erscheint eine silbergraue Farbe. Die Folie wird anschließend mit Kupfergrids belegt. Gemeinsam werden Kunststofffilm und Kupfergrid mit einem Filterpapier aufgenommen und an der Luft getrocknet. Durch die netzartige Struktur unterteilen die Kupfergrids ein Präparat in mehrere Quadranten und erleichtern damit die Orientierung bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung.

3.2.2 Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop

Aus jedem der 40 Präparate wurden 10 Zellen in sieben verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und fotografiert, sodass insgesamt 2 800 Fotos von 400 Zellen analysiert wurden. Jede Zelle wurde mithilfe der Fotos auf 8 Auswertungsparameter hin untersucht. Die Auswertungsparameter sind in Tabelle 5 aufgeführt. Beispielbilder für jeden Parameter werden unter 3.2.2.1 gezeigt. Die Auswertungsparameter 4 und 4b, sowie 5 und 5b sind alternativ, sodass für jedes Präparat 6 von 8 verschiedenen Parametern zur Anwendung kamen.

Um einen Überblick über einen gesamten Quadranten des Kupfergrids zu erhalten, wurde zu Beginn 200-fach vergrößert. Es folgten die Vergrößerungen 400, 800, 1 000, 2 000, 4 000 und 8 000. Die 8 000-fache Vergrößerung diente in erster Linie zur Darstellung subzellulärer Strukturen, wie beispielsweise Endoplasmatisches Retikulum, Proteoglycane oder Granula innerhalb der Zelle. Beim Vorliegen von breiten intrazellulären Kollagenfasern wurden diese zusätzlich bei 12 000-facher oder 20 000-facher Vergrößerung fotografiert. Voraussetzung war, dass der Ausschnitt des Präparats scharf eingestellt werden konnte.

Für jedes Präparat wurde der Anteil von Zellen mit dem jeweiligen Parameter ermittelt: Zum Beispiel wiesen 2 von 10 Zellen (2/10) das Merkmal Intrazelluläre Kollagenfasern auf. Die Ergebnisse der Auszählung wurden in Excel Tabellen dokumentiert. Sie dienten als Grundlage für die statistische Auswertung mit SPSS.

Tabelle 5: Auswertungsparameter

	Parameter
1	Intrazelluläre Kollagenfasern
2	Intrazelluläre Lipidvakuole
3	Zellkern
4	Einzelzelle
4b	Zelle als Teil eines mehrzelligen Chondrons aus mindestens zwei Zellen
5	Zellform länglich-schmal
5b	Zellform rundlich-oval
6	Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum

Fett markiert: Auswertungsparameter 1–6 = Parameter, die zur Anwendung kamen.

3.2.2.1 Beispielbilder der Auswertungsparameter

Parameter 1: Intrazelluläre Kollagenfasern

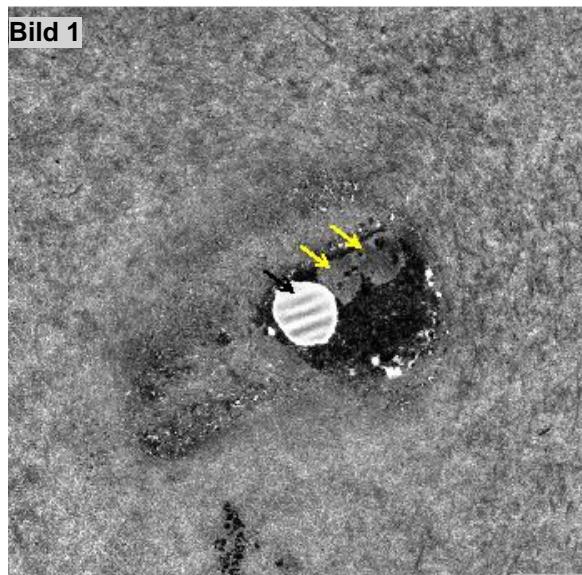


Bild 1: PE, Vergrößerung x2000 –
intrazelluläre Kollagenfasern (gelbe Pfeile), intra-
zelluläre Lipidvakuolen (schwarzer Pfeil)

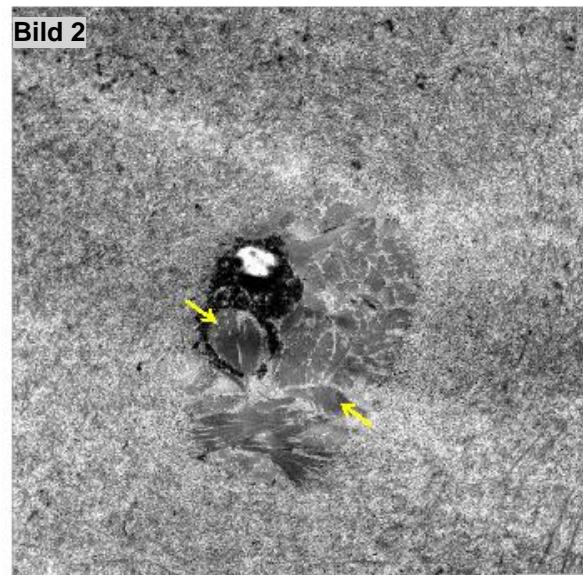


Bild 2: PC, Vergrößerung x2000 –
intrazelluläre Kollagenfasern (gelbe Pfeile)

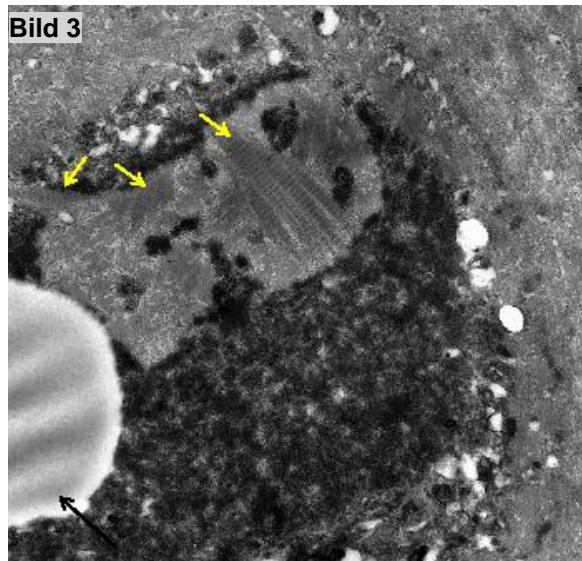


Bild 3: PE, Vergrößerung x8000 –
dieselbe Zelle wie in Bild 1, intrazelluläre Kol-
lagenfasern (gelbe Pfeile), intrazelluläre Lipidva-
kuole (schwarzer Pfeil)

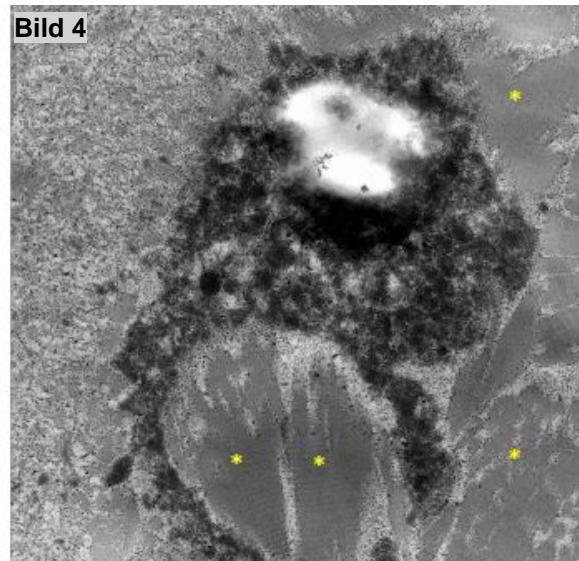


Bild 4: PC, Vergrößerung x8000 –
dieselbe Zelle wie in Bild 2, intrazelluläre Kol-
lagenfasern (gelbe Sterne)



Bild 5: PE, Vergrößerung x2000 –
ovale Gruppierung höchstwahrscheinlich intrazel-
lulärer Kollagenfasern, dazwischen zelluläres
(Rest-) Material (gelbe Sterne)

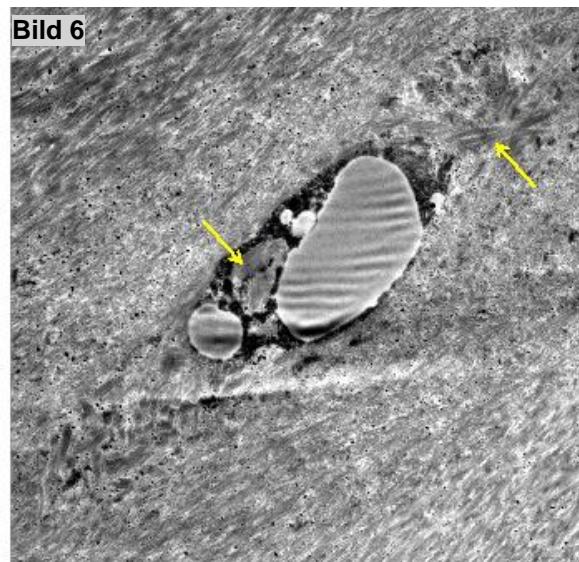


Bild 6: PC, Vergrößerung x2000 –
Intrazelluläre Kollagenfasern (gelbe Pfeile)

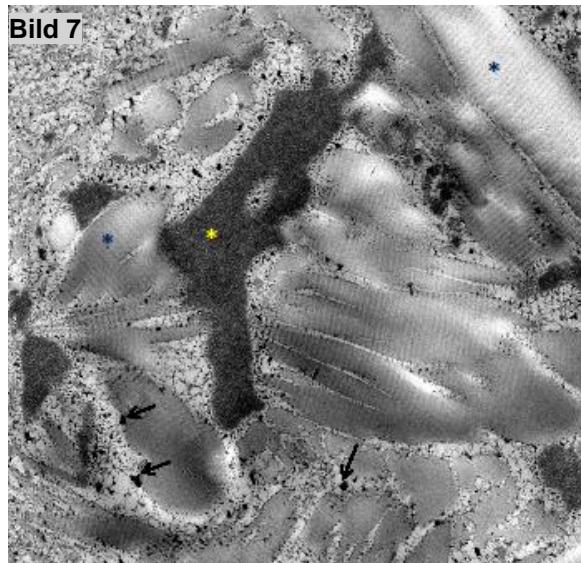


Bild 7: PE, Vergrößerung x8000 –
dieselbe Zelle wie in Bild 5, intrazelluläre Kollagenfasern (beispielhaft markiert, blaue Sterne) mit Querbänderung. Zelluläres amorphes Material (gelber Stern), Proteoglycane (Pfeile)

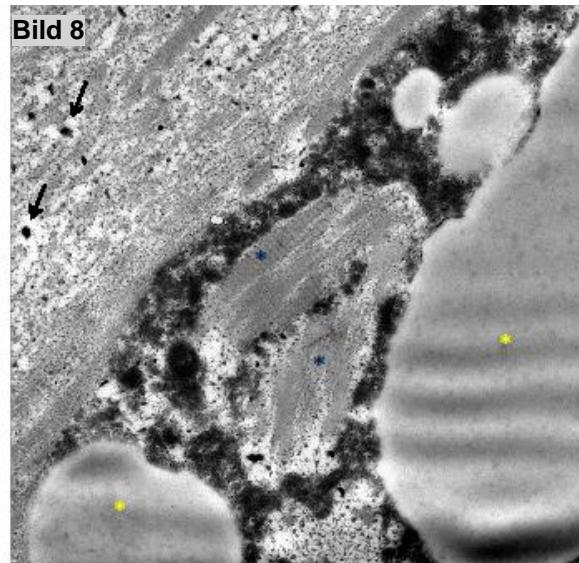


Bild 8: PC, Vergrößerung x8000 –
dieselbe Zelle wie Bild 6, intrazelluläre Kollagenfasern (blaue Sterne), intrazelluläre Lipidvakuolen (Sterne), Proteoglycane (Pfeile)

Parameter 2: Intrazelluläre Lipidvakuolen

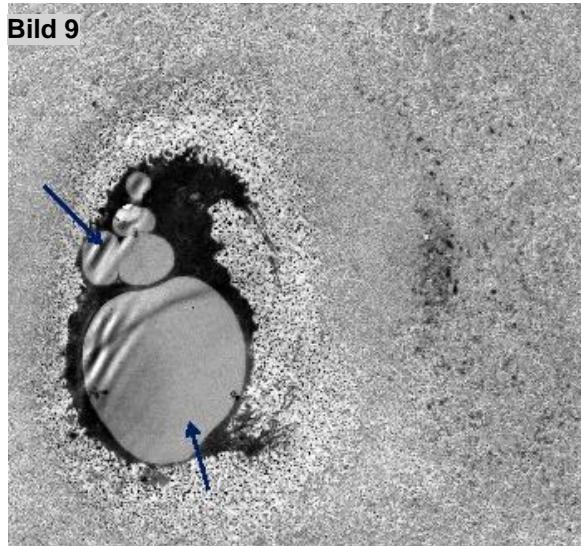


Bild 9: PE, Vergrößerung x2000 –
rundlich-ovale Zelle mit mehreren intrazellulären Lipidvakuolen (blaue Pfeile)

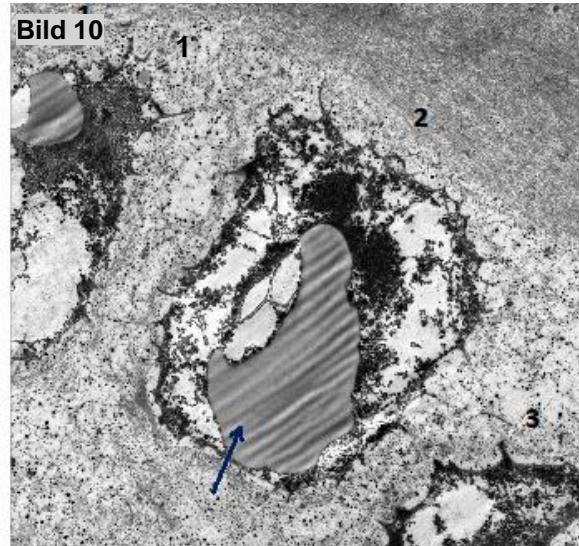


Bild 10: PC, Vergrößerung x2000 –
intrazelluläre Lipidvakuole (blauer Pfeil), Zelle ist Teil eines mehrzelligen Chondrons (Chondrozyt 1, 2 und 3)

Parameter 3: Zellkern

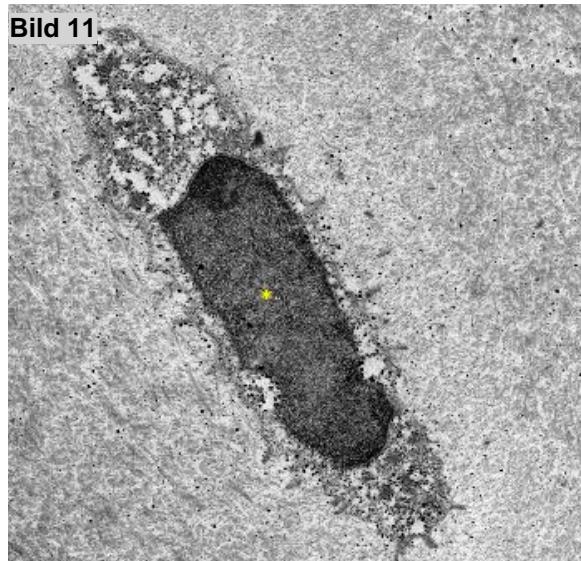


Bild 11: PE, Vergrößerung x4000 –
Zellkern (gelber Stern)

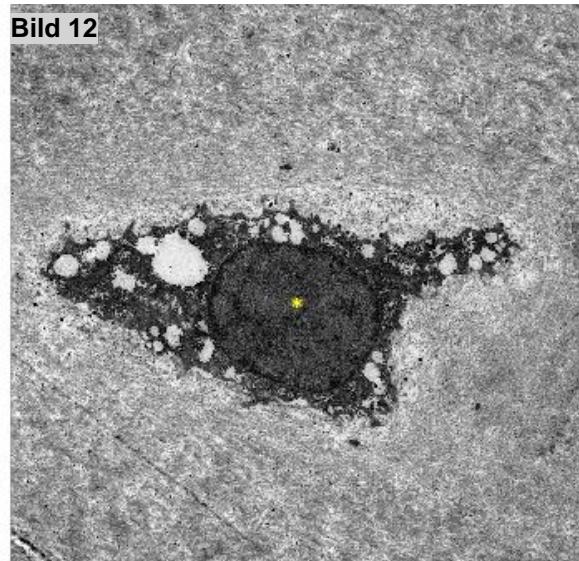


Bild 12: PC, Vergrößerung x2000 –
Zellkern (gelber Stern)

Parameter 4: Einzelzelle

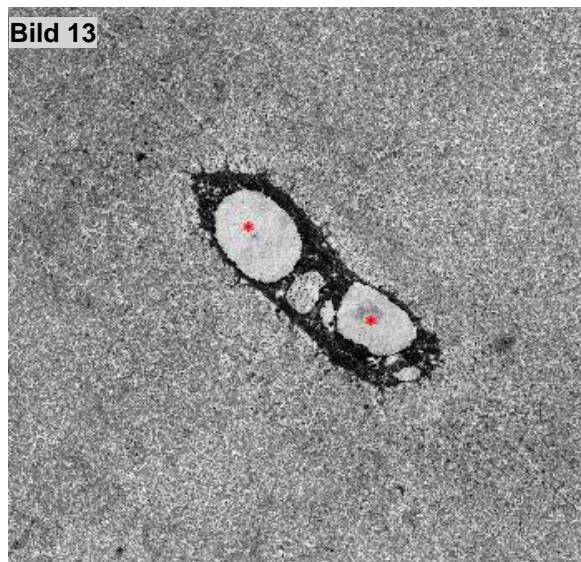


Bild 13: PE, Vergrößerung x2000 –
länglich-schmale Einzelzelle mit intrazellulären,
leer erscheinenden Lakunen (rote Sterne)

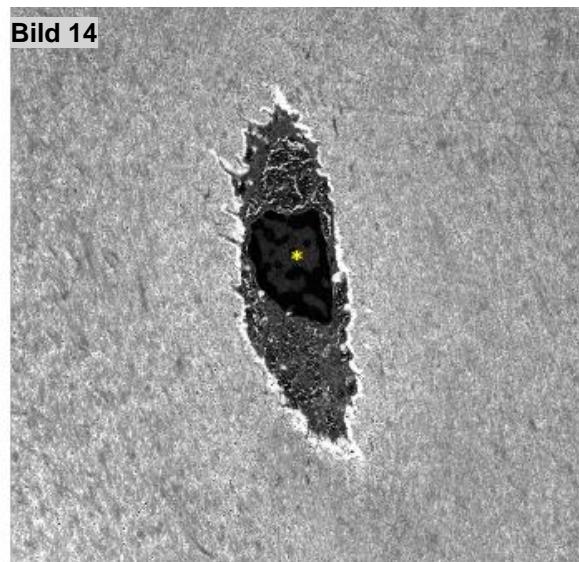


Bild 14: PC, Vergrößerung x2000 –
Einzelzelle mit Zellkern (gelber Stern)

Parameter 4b: Zelle als Teil eines mehrzelligen Chondrons

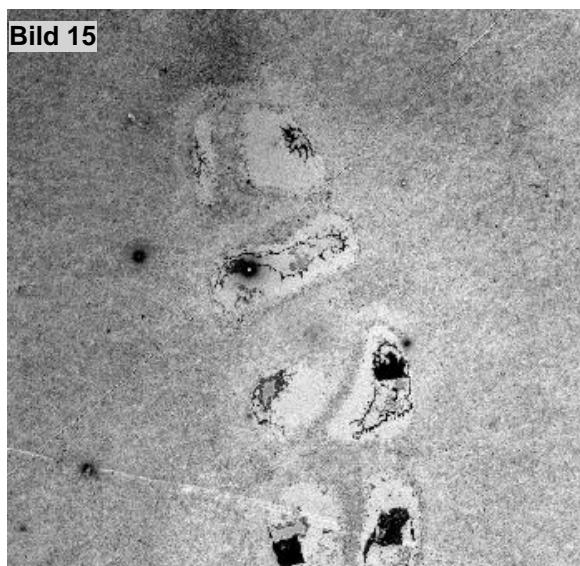


Bild 15: PE, Vergrößerung x400 –
mehrzelliges Chondron

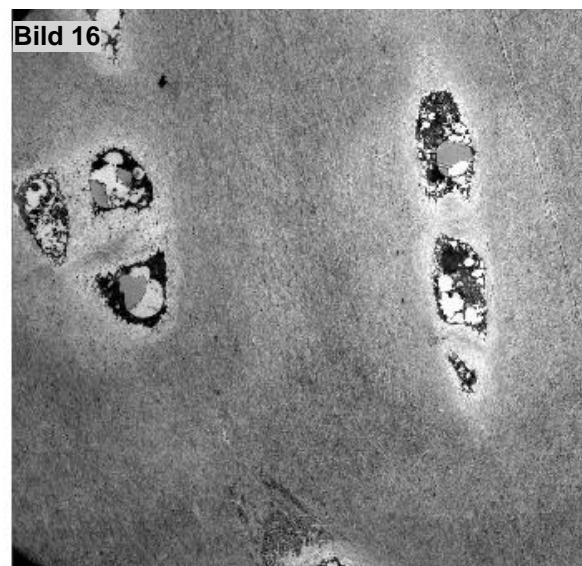


Bild 16: PC, Vergrößerung x400 –
zwei mehrzellige Chondrone aus jeweils drei
Zellen (Chondrozyten)

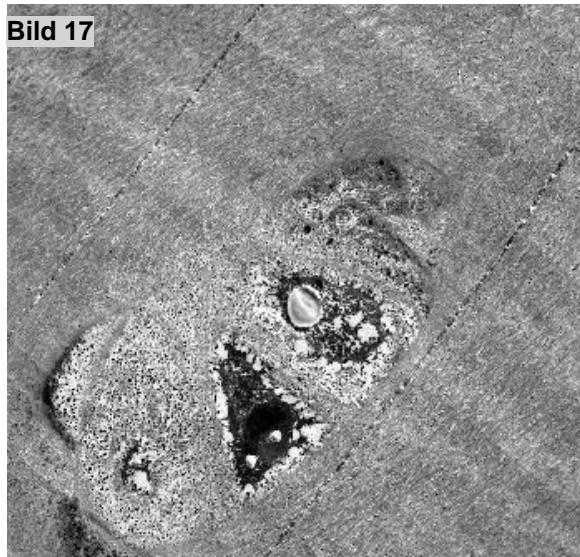


Bild 17: PE, Vergrößerung x800 –
mehrzelliges Chondron

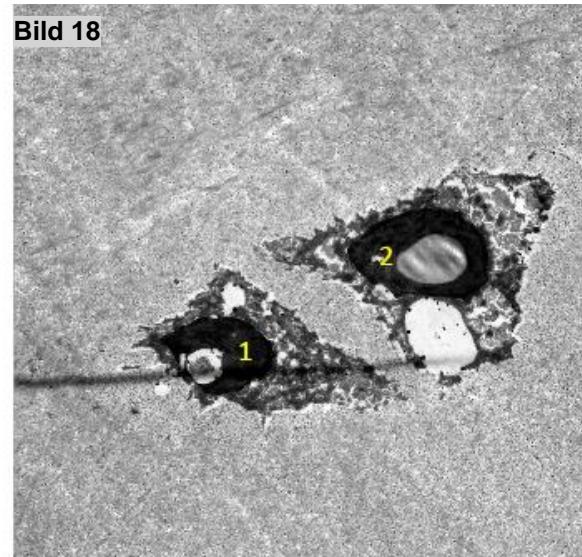


Bild 18: PC, Vergrößerung x2000 –
Chondron bestehend aus zwei Chondrozyten,
jeweils mit Zellkern 1 und 2

Parameter 5: Zellform länglich-schmal

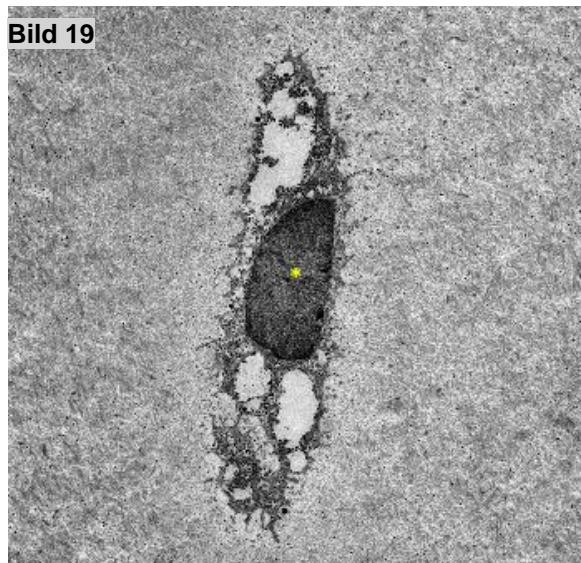


Bild 19: PE, Vergrößerung x2000 – länglich-schmale Einzelzelle mit Zellkern (gelber Stern)

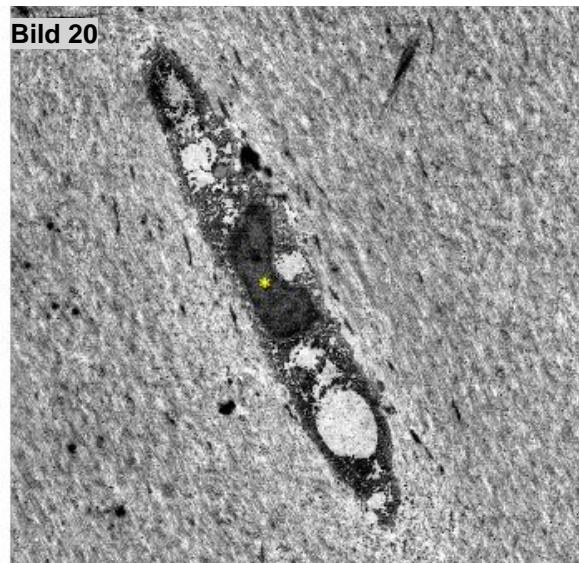


Bild 20: PC, Vergrößerung x2000 – länglich-schmale Einzelzelle mit Zellkern (gelber Stern)

Parameter 5b: Zellform rundlich-oval

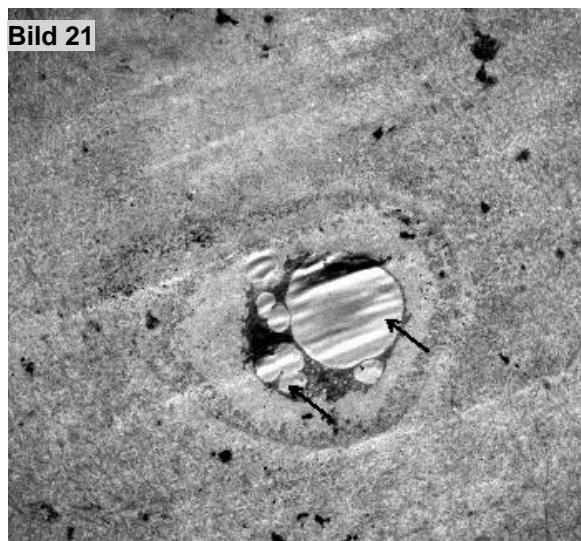


Bild 21: PE, Vergrößerung x1000 – rundlich-ovale Einzelzelle mit mehreren intrazellulären Lipidvakuolen (Pfeile)

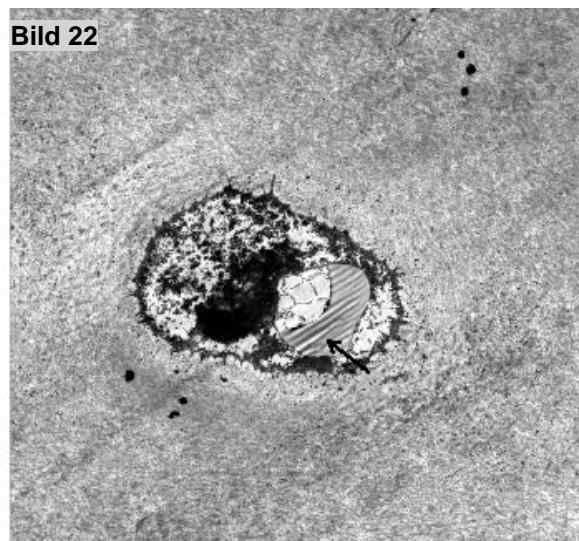


Bild 22: PC, Vergrößerung x1000 – rundlich-ovale Einzelzelle mit intrazellulärer Lipidvakuole (Pfeil)

Parameter 6: Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum

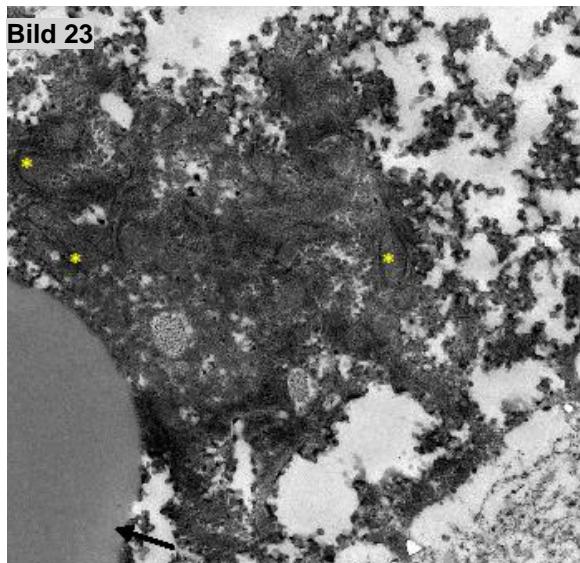


Bild 23: PE, Vergrößerung x8000 – dilatierte Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums (beispielhaft markiert siehe gelbe Sterne). Links unten im Bild Anschnitt einer intrazellulären Lipidvakuole (Pfeil)

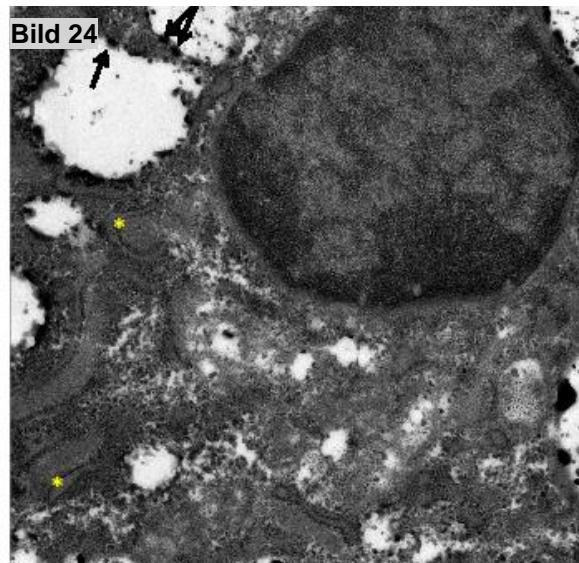


Bild 24: PC, Vergrößerung x8000 – dilatierte Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums (beispielhaft markiert, gelbe Sterne), Zellkern (rechts oben im Bild), Proteoglycane (schwarze Pfeile links oben)

3.2.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde die Statistik- und Analysesoftware IBM® SPSS® Statistics Version 23 für Windows verwendet. Die Beratung zur statistischen Analyse und Auswertung erfolgte durch Herr Dr. Wollschläger vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Zur Auswertung wurde die Gesamtstichprobe in zwei Gruppen, Pectus excavatum (PE) und Pectus carinatum (PC), aufgeteilt. Diese wurden weiter in jeweils zwei Untergruppen, zentral und peripher, untergliedert. Zentrale PC- und PE-Präparate sowie periphere PC- und PE-Präparate wurden zu den Gruppen zentral beziehungsweise peripher zusammengefasst, sodass insgesamt vier Gruppen und vier Untergruppen vorlagen. In Tabelle 6 sind alle Gruppen und Untergruppen aufgelistet.

Tabelle 6: Gruppen und Untergruppen

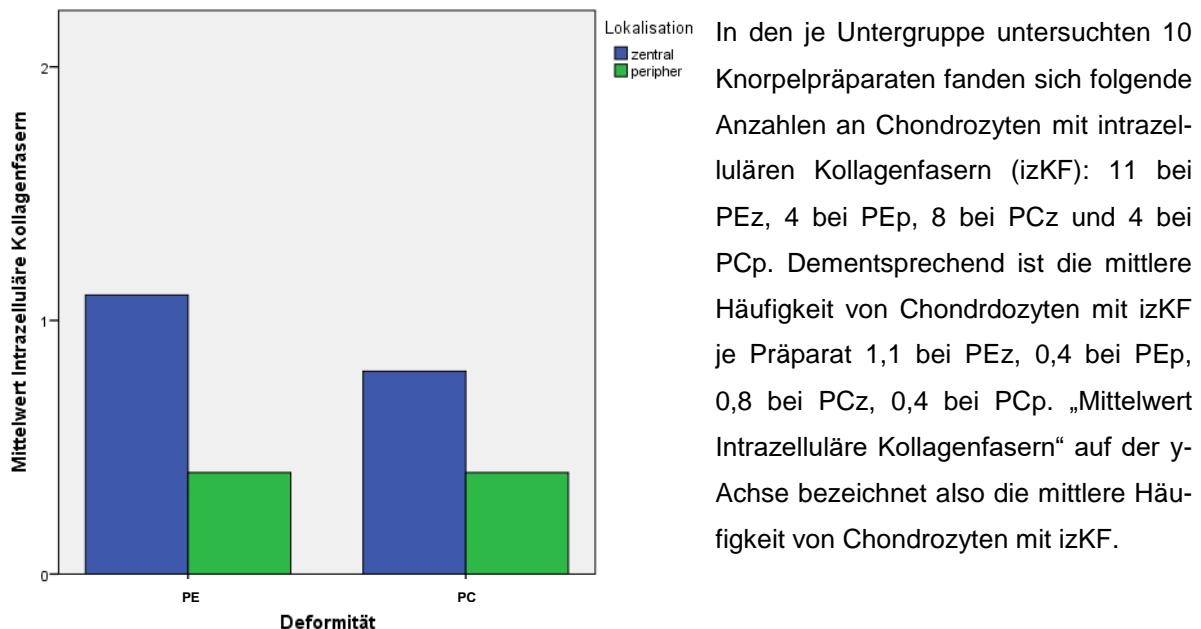
	Bezeichnung	Abkürzung
Gruppen	Pectus carinatum	PC
	Pectus excavatum	PE
	zentral	z
	peripher	p
Untergruppen	Pectus carinatum zentral	PCz
	Pectus carinatum peripher	PCp
	Pectus excavatum zentral	PEz
	Pectus excavatum peripher	PEp

3.2.3.1 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik umfasst die Alters- und Geschlechtsverteilung in den Gruppen PE und PC, die Anzahl von Präparaten sowie die Anzahl und den prozentualen Anteil von Chondrozyten mit dem jeweiligen Auswertungsparameter in allen Gruppen und Untergruppen. Neben dem mittleren Alter der PE- und PC-PatientInnen wird das Häufigkeitsverhältnis von Männern zu Frauen dargestellt.

Die Geschlechterverteilung wird anhand gruppierter Balkendiagramme visualisiert. Die Darstellung der Verteilung der Auswertungsparameter erfolgt ebenfalls über gruppierte Balkendiagramme, die auf den ersten Blick einen direkten Vergleich der mittleren Häufigkeiten eines Parameters in den vier Untergruppen ermöglichen. Die Skalierung der y-Achse gibt – für die je Untergruppe untersuchten 10 Präparate – den Mittelwert der Chondrozyten mit dem jeweiligen Parameter an. Hierzu folgendes Beispiel-Diagramm (Diagramm 1) mit nebenstehender Erläuterung:

Diagramm 1: Mittlere Häufigkeit des Parameters Intrazelluläre Kollagenfasern



3.2.3.2 Statistische Tests

Zur Durchführung der statistischen Tests wurden aus Gruppen und Untergruppen Paare gebildet. Anschließend wurden für jedes Paar eine Nullhypothese (H_0) und eine Alternativhypothese (H_1) formuliert. Insgesamt wurden für 6 Paare jeweils 6 Auswertungsparameter (vergleiche Tabelle 5, Tabellen 8–15) analysiert. Daraus ergeben sich 36 Paarvergleiche und damit 36 Nullhypotesen sowie 36 Alternativhypotesen. Paare und Hypothesen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Nullhypothese besagt, dass sich ein Paar (A und B) nicht unterscheidet: $A = B$. Im Unterschied dazu besagt die Alternativhypothese, dass ein Unterschied besteht: $A \neq B$. Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn statistische Tests einen signifikanten Unterschied zwischen A und B ergeben. Die Alternativhypothese wird in diesem Fall bestätigt. Liegt kein signifikanter Unterschied vor, wird die Nullhypothese bestätigt und die Alternativhypothese abgelehnt. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests und des Wilcoxon-Tests wurde getestet, ob sich die Häufigkeit der Parameter in den Paarvergleichen signifikant unterscheidet. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 5\%$ festgelegt. Bei einem signifikanten Testergebnis mit $p\text{-Wert} \leq 0,05$ kann ein Unterschied angenommen werden, sodass die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese bestätigt wird.

Liegt kein Unterschied zwischen Pectus excavatum und Pectus carinatum vor, ist davon auszugehen, dass es sich um zwei Ausprägungen einer Krankheitsentität handelt. Besteht dagegen ein Unterschied, lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei PE und PC um zwei verschiedene Krankheiten handelt.

Der Mann-Whitney-U-Test testet die zentrale Tendenz unabhängiger Stichproben und wurde für die Paarvergleiche 1–3 angewandt. Der Wilcoxon-Test prüft die zentrale Tendenz abhängiger Stichproben; er wurde für die Paarvergleiche 4–6 verwendet.

Tabelle 7: Paare 1–6 und Hypothesen

	Paar	H_0	H_1
1	PC (z + p) und PE (z + p)	Es gibt keinen Unterschied zwischen PC und PE	Es gibt einen Unterschied zwischen PC und PE
2	PCp und PEp	Es gibt keinen Unterschied zwischen PCp und PEp	Es gibt einen Unterschied zwischen PCp und PEp
3	PCz und PEz	Es gibt keinen Unterschied zwischen PCz und PEz	Es gibt einen Unterschied zwischen PCz und PEz
4	PCz und PCp	Es gibt keinen Unterschied zwischen PCz und PCp	Es gibt einen Unterschied zwischen PCz und PCp
5	PEz und PEp	Es gibt keinen Unterschied PEz und PEp	Es gibt einen Unterschied zwischen PEz und PEp
6	z (PC + PE) und p (PC + PE)	Es gibt keinen Unterschied zwischen z und p	Es gibt einen Unterschied zwischen z und p

PC = Pectus excavatum, PE = Pectus carinatum, z = zentral, p = peripher

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der deskriptiven Statistik

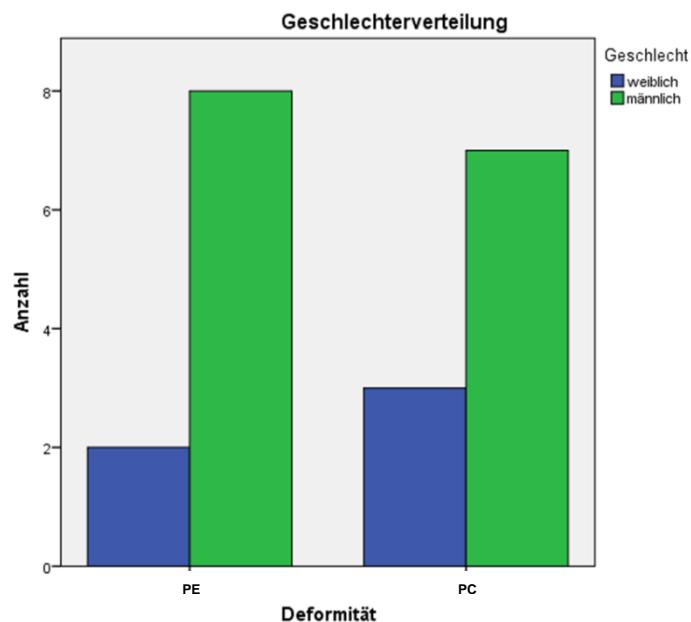
4.1.1 Das Patientenkollektiv

Im Rahmen der Arbeit wurden jeweils 20 Knorpelproben von Pectus excavatum- und Pectus carinatum-PatientInnen untersucht. Das durchschnittliche Alter der PE-PatientInnen betrug 19,4 Jahre, während es bei den PC PatientInnen bei 17,8 Jahren

lag. In beiden Gruppen gab es eine Person, die mit einem deutlich höheren Alter auffiel; im PE-Kollektiv mit 28 Jahren und im PC-Kollektiv mit 26 Jahren.

Sowohl die PC-Gruppe, als auch die PE-Gruppe wiesen ein Geschlechterverhältnis m : w von 2,3 : 1 auf. Damit repräsentiert das Kielbrustkollektiv nicht das epidemiologisch gefundene Geschlechterverhältnis von 4 : 1. Bei PE-PatientInnen lag das Verhältnis m:w mit 2,3 : 1 im sehr weit gefassten Bereich von 2 : 1 bis 9 : 1, der in der Literatur für Pectus excavatum beschrieben ist.

Diagramm 2: Geschlechterverteilung in den Gruppen PE und PC



4.1.2 Beschreibung der Ergebnisse für Parameter 1–6

Der Beschreibung des Ergebnisses eines Parameters sind jeweils ein gruppiertes Balkendiagramm zur mittleren Häufigkeit des Parameters sowie eine Tabelle mit den Auszählungsergebnissen beigefügt.

a. Intrazelluläre Kollagenfasern

Trichterbrust-Chondrozyten besitzen etwas häufiger intrazelluläre Kollagenfasern als Kielbrust-Chondrozyten (PE: 7,5 %, PC: 6 %). Außerdem sind intrazelluläre Kollagenfasern in zentralen Präparaten 2,4-mal häufiger anzutreffen als in peripheren (z: 9,5 %, p: 4 %). Zentrale PE-Präparate weisen mit 11 % der Zellen am meisten Kollagenfasern enthaltende Chondrozyten auf. Insgesamt sind intrazelluläre Kollagenfasern selten.

Diagramm 3: Intrazelluläre Kollagenfasern

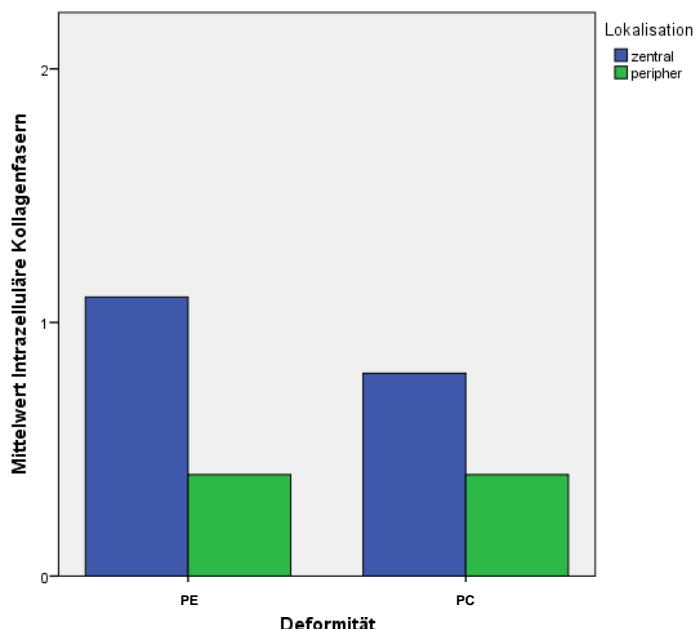


Tabelle 8: Auszählung des Parameters Intrazelluläre Kollagenfasern

Intrazelluläre Kollagenfasern	Anzahl der Präparate von 20 (PC, PE, z, p) bzw. 10 Präparaten (PCz/p, PEz/p)	Anzahl der Zellen von 200 Zellen (PC, PE, z, p) bzw. 100 Zellen (PCz/p, PEz/p)	Zellen [%]
PE	9	15	7,5
PEz	6	11	11
PEp	3	4	4
PC	9	12	6
PCz	5	8	8
PCp	4	4	4
zentral	11	19	9,5
peripher	7	8	4

b. Intrazelluläre Lipidvakuolen

Intrazelluläre Lipidvakuolen finden sie sich häufiger in PC- als in PE-Knorpel und sie sind in zentralen Präparaten häufiger als in peripheren (PC: 67 %, PE: 63,5 %, z: 81,5 %, p: 39 %). Bei separater Betrachtung der Untergruppen zentral und peripher bei PE und PC findet sich in peripheren PC- und PE-Präparaten mit jeweils 49 % der geringste Anteil von Chondrozyten mit Lipidvakuolen. In zentralen PC-Präparaten ist er mit 85 % am größten. Insgesamt stellen intrazelluläre Lipidvakuolen den am häufigsten gefundenen Auswertungsparameter dar.

Diagramm 4: Intrazelluläre Lipidvakuolen

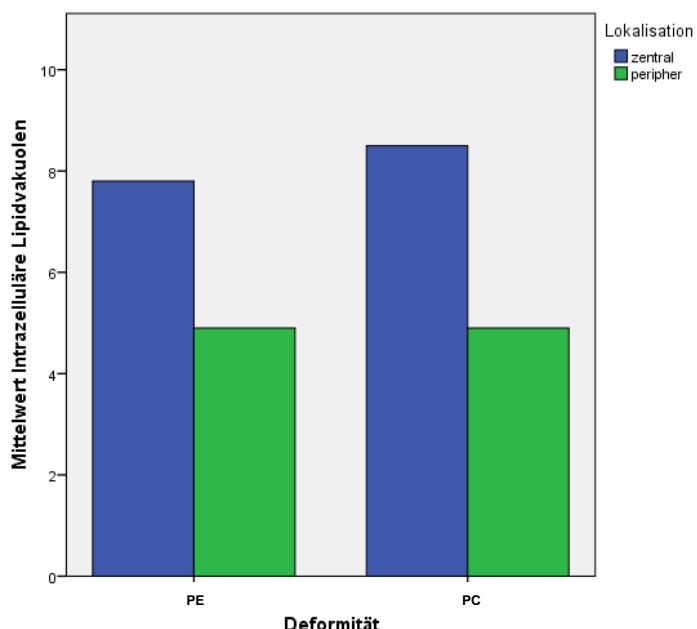


Tabelle 9: Auszählung des Parameters Intrazelluläre Lipidvakuolen

Intrazelluläre Lipidvakuolen	Anzahl der Präparate von 20 (PC, PE, z, p) bzw. 10 Präparaten (PCz/p, PEz/p)	Anzahl der Zellen von 200 Zellen (PC, PE, z, p) bzw. 100 Zellen (PCz/p, PEz/p)	Zellen [%]
PE	19	127	63,5
PEz	10	78	78
PEp	9	49	49
PC	20	134	67
PCz	10	85	85
PCp	10	49	49
zentral	20	163	81,5
peripher	19	78	39

c. Zellkern

In Pectus-carinatum-Präparaten weisen fast doppelt so viele Chondrozyten einen Zellkern auf wie in Pectus-excavatum-Präparaten (PC: 44 %, PE: 23 %). Außerdem dominieren Zellkerne in peripheren Knorpel-Abschnitten (p: 39,5 %, z: 27,5 %), was sowohl für die PC- als auch für die PE-Gruppe gilt (PCp: 49 %, PCz: 39 %, PEp: 30 %, PEz: 16 %). Insgesamt ist in weniger als der Hälfte der untersuchten Chondrozyten der Zellkern angeschnitten.

Diagramm 5: Zellkern

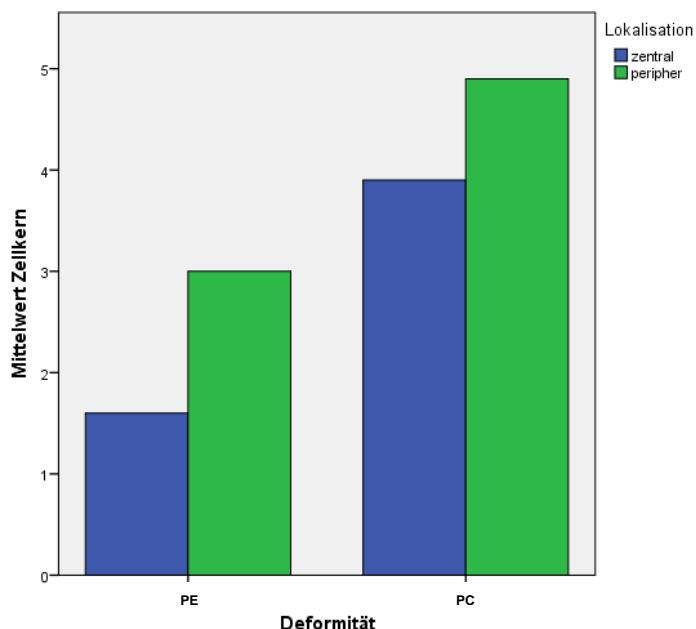


Tabelle 10: Auszählung des Parameters Zellkern

Zellkern	Anzahl der Präparate von 20 (PC, PE, z, p) bzw. 10 Präparaten (PCz/p, PEz/p)	Anzahl der Zellen von 200 Zellen (PC, PE, z, p) bzw. 100 Zellen (PCz/p, PEz/p)	Zellen [%]
PE	14	46	23
PEz	7	16	16
PEp	7	30	30
PC	20	88	44
PCz	10	39	39
PCp	10	49	49
zentral	17	55	27,5
peripher	17	79	39,5

d. Einzelzelle

Insgesamt sind bei PE und PC jeweils fast die Hälfte der Chondrozyten Einzelzellen (PC: 46,5 %, PE: 40 %). Das bedeutet im Umkehrschluss, dass etwas mehr als die Hälfte der Chondrozyten in Form von zwei- oder mehrzelligen Zellgruppen vorliegen. Im PC-Knorpel finden sich geringfügig häufiger Einzelzellen als bei PE (1,2-mal häufiger). Während der Anteil an Einzelzellen bei PE peripher und zentral derselbe ist (PEp: 40 %, PEz: 40 %), unterscheidet er sich innerhalb der PC-Gruppe deutlich (PCp: 59 %, PCz: 34 %).

Diagramm 6: Einzelzelle

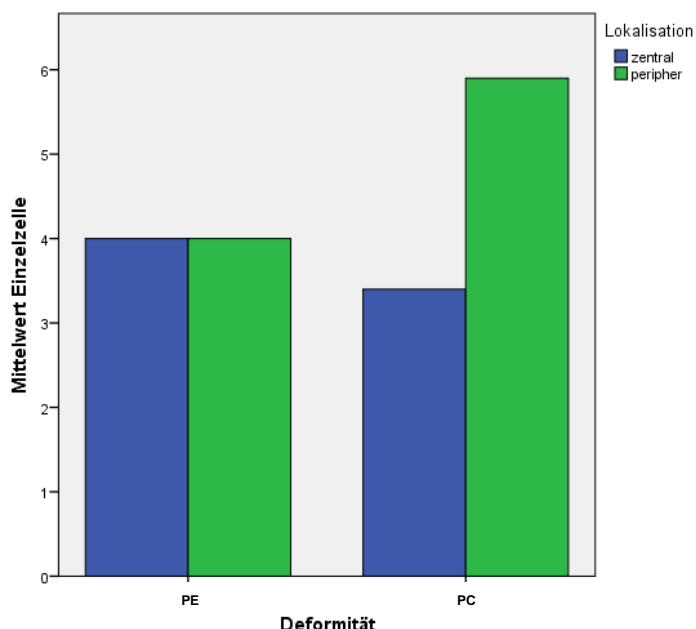


Tabelle 11: Auszählung des Parameters Einzelzelle

Einzelzelle	Anzahl der Präparate von 20 (PC, PE, z, p) bzw. 10 Präparaten (PCz/p, PEz/p)	Anzahl der Zellen von 200 Zellen (PC, PE, z, p) bzw. 100 Zellen (PCz/p, PEz/p)	Zellen [%]
PE	17	80	40
PEz	9	40	40
PEp	8	40	40
PC	20	93	46,5
PCz	10	34	34
PCp	10	59	59
zentral	19	74	37
peripher	18	99	49,5

e. Zellform länglich-schmal

19 % der PC-Zellen und 20 % der PE-Zellen sind länglich schmal. Hinsichtlich der Verteilung zwischen Peripherie und Zentrum besteht ein deutlicher Unterschied: Die Anzahl länglich-schmaler Zellen ist in peripheren Präparaten 2,9-mal größer als in zentralen (p: 29 %, z: 10 %). Periphere PC-Präparate weisen mit 31 % am meisten länglich-schmale Chondrozyten auf, während sie in zentralen PC-Präparaten mit 7 % am seltensten vorkommen. Insgesamt dominieren bei beiden Deformitäten, PC und PE, rundlich-ovale Zellen mit 81 % bei PC und 80 % bei PE.

Diagramm 7: Zellform länglich-schmal

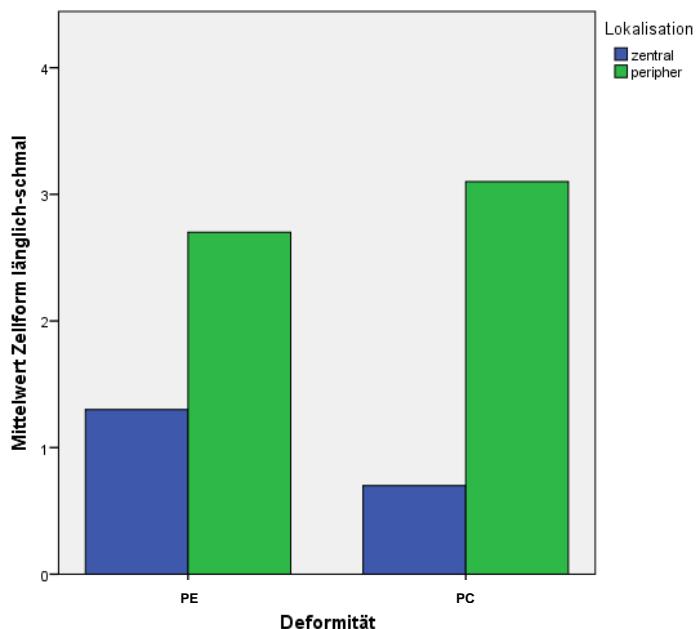


Tabelle 12: Auszählung des Parameters Zellform länglich-schmal

Zellform länglich-schmal	Anzahl der Präparate von 20 (PC, PE, z, p) bzw. 10 Präparaten (PCz/p, PEz/p)	Anzahl der Zellen von 200 Zellen (PC, PE, z, p) bzw. von 100 Zellen (PCz/p, PEz/p)	Zellen [%]
PE	14	40	20
PEz	6	13	13
PEp	8	27	27
PC	14	38	19
PCz	4	7	7
PCp	10	31	31
zentral	10	20	10
peripher	18	58	29

f. Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum

Ein Drittel aller ausgewerteten Zellen zeigt dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum. Jedoch findet sich dilatiertes ER in Chondrozyten des PC-Knorpels circa 1,7-mal häufiger als bei der PE-Deformität (PC: 38 %, PE 22 %). Zwischen peripheren und zentralen Präparaten besteht ein geringfügiger Unterschied (z: 29,5 %, p: 30,5 %). Innerhalb der Kielbrustgruppe finden sich zentral 6 % mehr Zellen mit dilatiertem ER als peripher, während innerhalb der Trichterbrustgruppe peripher 8 % mehr Zellen mit dilatiertem ER vorliegen als zentral.

Diagramm 8: Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum

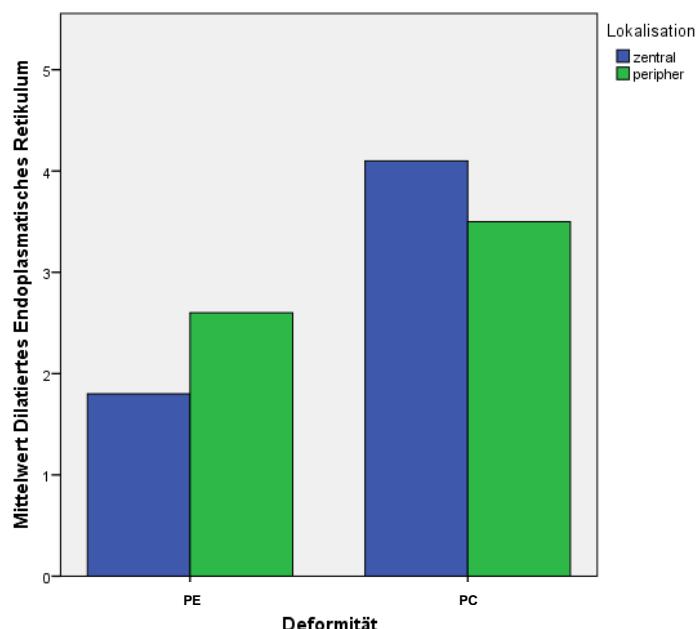


Tabelle 13: Auszählung des Parameters Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum

dilatiertes ER	Anzahl der Präparate von 20 (PC, PE, z, p) bzw. 10 Präparaten (PCz/p, PEz/p)	Anzahl der Zellen von 200 Zellen (PC, PE, z, p) bzw. 100 Zellen (PCz/p, PEz/p)	Zellen [%]
PE	13	44	22
PEz	7	18	18
PEp	6	26	26
PC	17	76	38
PCz	9	41	41
PCp	8	35	35
zentral	16	59	29,5
peripher	14	61	30,5

4.1.3 Beschreibung der Ergebnisse nach Paaren 1–6

Der Beschreibung der Ergebnisse nach den Paaren 1–6 (PC und PE, PCp und PEp, PCz und PEz, PCz und PCp, PEz und PEp, z und p) sind Tabellen mit den Auszählungsergebnissen der Parameter 1–6 beigefügt. In den Tabellen werden folgende Abkürzungen verwendet: izKF = intrazelluläre Kollagenfasern, izLV = intrazelluläre Lipidvakuolen, ZK = Zellkern, EZ = Einzelzelle, Zellform ls = Zellform länglich-schmal, dilatER = dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum.

4.1.3.1 Pectus carinatum (z + p) und Pectus excavatum (z + p)

Der größte Unterschied besteht bei Parameter 3, dem Zellkern. Der Anteil an Chondrozyten mit angeschnittenem Zellkern ist bei PC fast doppelt so hoch wie bei PE (PC: 44 %, PE: 23 %). Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum ist bei PC-Knorpel 1,7-mal häufiger (PC: 38 %, PE: 22 %). Bei den Parametern intrazelluläre Kollagenfasern, intrazelluläre Lipidvakuolen, Einzelzelle und Zellform scheinen die Unterschiede vernachlässigbar zu sein. Intrazelluläre Lipidvakuolen und Einzelzellen sind bei PC-Präparaten geringfügig häufiger, wohingegen PE-Knorpel etwas mehr intrazelluläre Kollagenfasern und länglich-schmale Zellen aufweist.

Tabelle 14: Häufigkeit der Parameter 1–6 in PC- und PE-Knorpelproben

PC und PE	Anzahl der Präparate von 20 Präparaten		Anzahl der Zellen von 200 Zellen		Zellen mit dem Parameter [%]	
	PE	PC	PE	PC	PE	PC
1 izKF	9	9	15	12	7,5	6
2 izLV	19	20	127	134	63,5	67
3 ZK	14	20	46	88	23	44
4 EZ	17	20	80	93	40	46,5
5 Zellform ls	14	14	40	38	20	19
6 dilatER	13	17	44	76	22	38

4.1.3.2 Pectus carinatum peripher und Pectus excavatum peripher

Der größte Unterschied findet sich bei Parameter 3, dem Zellkern. Periphere PC-Chondrozyten weisen 1,6-mal häufiger einen Zellkern auf als periphere PE-Chondrozyten. Dagegen zeigen sich bei beiden Deformitäten jeweils dieselbe Anzahl von Chondrozyten mit intrazellulären Kollagenfasern (4 %) und intrazellulären Lipidvakuolen (49 %). Hinsichtlich der anderen Parameter bestehen geringe Unterschiede, wobei PC-Proben stets den höheren Anteil an Chondrozyten mit dem jeweiligen Parameter aufweisen: 1,5-mal mehr Einzelzellen, 1,4-mal mehr Chondrozyten mit dilatiertem ER sowie 1,2-mal häufiger länglich-schmale Chondrozyten als bei PE.

Tabelle 15: Häufigkeit der Parameter 1–6 in peripheren PC- und PE-Knorpelproben

PCp und PEp	Anzahl der Präparate von 10 Präparaten		Anzahl der Zellen von 100 Zellen		Zellen mit dem Parameter [%]	
	PEp	PCp	PEp	PCp	PEp	PCp
1 izKF	3	4	4	4	4	4
2 izLV	9	10	49	49	49	49
3 ZK	7	10	30	49	30	49
4 EZ	8	10	40	59	40	59
5 Zellform ls	8	10	27	31	27	31
6 dilatER	6	8	26	35	26	35

4.1.3.3 Pectus carinatum zentral und Pectus excavatum zentral

PCz und PEz zeigen bei Parameter 3, dem Zellkern, und Parameter 6, dem dilatierten Endoplasmatisches Retikulum, die deutlichsten Unterschiede. Chondrozyten aus zentralen PC-Proben besitzen 2,4-mal häufiger einen Zellkern und 2,3-mal häufiger dilatiertes ER. Bei PEz-Präparaten sind länglich-schmale Zellen fast doppelt so häufig wie bei PCz. Der Anteil von Einzelzellen, intrazellulären Kollagenfasern und Lipidvakuolen unterscheidet sich kaum zwischen PEz und PCz.

Tabelle 16: Häufigkeit der Parameter 1–6 in zentralen PC- und PE-Knorpelproben

PCz und PEz	Anzahl der Präparate von 10 Präparaten		Anzahl der Zellen von 100 Zellen		Zellen mit dem Parameter [%]	
	PEz	PCz	PEz	PCz	PEz	PCz
1 izKF	6	5	11	8	11	8
2 izLV	10	10	78	85	78	85
3 ZK	7	10	16	39	16	39
4 EZ	9	10	40	34	40	34
5 Zellform ls	6	4	13	7	13	7
6 dilatER	7	9	18	41	18	41

4.1.3.4 Pectus carinatum zentral und peripher

Im Vergleich zentraler und peripherer PC-Präparate fallen insbesondere die Parameter Zellform und intrazellulären Kollagenfasern auf: Bei peripheren Präparaten sind 4,4-mal mehr Zellen von länglich-schmaler Form, jedoch zeigen nur halb so viele Chondrozyten intrazellulären Kollagenfasern. Lipidvakuolen kommen in zentral gelegenen Zellen 1,7-mal häufiger vor. Periphere Präparate weisen 1,7-mal mehr Einzelzellen (und dementsprechend weniger Chondrone aus zwei oder mehr Zellen) auf. Die Anzahl von Zellen mit Zellkern und mit dilatiertem ER unterscheiden sich kaum: Peripher weisen 1,3-mal mehr Zellen einen Zellkern auf als zentral, und dilatiertes ER ist 1,2-mal häufiger in zentralen PC-Präparaten zu finden als in peripheren.

Tabelle 17: Häufigkeit der Parameter 1–6 in PC-Knorpelproben

PCz und PCp	Anzahl der Präparate von 10 Präparaten		Anzahl der Zellen von 100 Zellen		Zellen mit dem Parameter [%]	
	PCz	PCp	PCz	PCp	PCz	PCp
1 izKF	5	4	8	4	8	4
2 izLV	10	10	85	49	85	49
3 ZK	10	10	39	49	39	49
4 EZ	10	10	34	59	34	59
5 Zellform ls	4	10	7	31	7	31
6 dilatER	9	8	41	35	41	35

4.1.3.5 Pectus excavatum zentral und peripher

Zentrale und periphere PE-Proben zeigen bei Parameter 1 die deutlichsten Unterschiede: Intrazelluläre Kollagenfasern finden sich zentral 2,75-mal häufiger als peripher. Dagegen kommen peripher länglich-schmale Chondrozyten und Zellkerne circa doppelt so häufig vor (Zellform ls: $p/z = 2,1/1$; Zellkern: $p/z = 1,9/1$). Intrazelluläre Lipidvakuolen dominieren zentral ($z/p = 1,6/1$), während dilatiertes ER häufiger in peripher Chondrozyten zu finden ist ($p/z = 1,4/1$). Der Anteil von Einzelzellen ist in zentralen und peripheren Präparateanteilen mit jeweils 40 % gleich groß.

Tabelle 18: Häufigkeit der Parameter 1–6 in PE-Knorpelproben

PEz und PEP	Anzahl der Präparate von 10 Präparaten		Anzahl der Zellen von 100 Zellen		Zellen mit dem Parameter [%]	
	PEz	PEp	PEz	PEp	PEz	PEp
1 izKF	6	3	11	4	11	4
2 izLV	10	9	78	49	78	49
3 ZK	7	7	16	30	16	30
4 EZ	9	8	40	40	40	40
5 Zellform ls	6	8	13	27	13	27
6 dilatER	7	6	18	26	18	26

4.1.3.6 zentral (PC + PE) und peripher (PC + PE)

Auffallend ist die unterschiedliche Verteilung länglich-schmaler Zellen in zentralen und peripheren Knorpelproben. Peripher sind länglich-schmale Zellen 2,9-mal häufiger. Folglich dominieren zentral rundlich-ovale Zellen. Auch bei den Parametern intrazelluläre Kollagenfasern und intrazelluläre Lipidvakuolen ergeben sich mit mehr als doppelt so vielen zentralen Chondrozyten, die Kollagenfasern und Lipidvakuolen aufweisen, deutliche Unterschiede (zentral 2,4-mal häufiger Zellen mit intrazellulären Kollagenfasern und 2,1-mal mehr Zellen mit intrazellulären Lipidvakuolen als peripher). Peripher waren 1,3-mal mehr Zellen Einzelzellen, 1,4-mal mehr Zellen wiesen einen Zellkern auf und fast 1,1-mal mehr dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum.

Tabelle 19: Häufigkeit der Parameter 1–6 in zentralen und peripheren Knorpelproben

zentral und peri- pher	Anzahl der Präpa- rate von 20 Präpa- raten		Anzahl der Zellen von 200 Zellen		Zellen mit dem Pa- rameter [%]	
	zentral	peripher	zentral	peripher	zentral	peripher
1 izKF	11	7	19	8	9,5	4
2 izLV	20	19	163	78	81,5	39
3 ZK	17	17	55	79	27,5	39,5
4 EZ	19	18	74	99	37	49,5
5 Zellform ls	10	18	20	58	10	29
6 dilatER	16	14	59	61	29,5	30,5

4.2 Ergebnisse der statistischen Tests

4.2.1 Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests

Der Mann-Whitney-U-Test zeigt signifikante beziehungsweise nicht signifikante Unterschiede zwischen Pectus excavatum und Pectus carinatum an. Der Test wird im Blick auf die Frage durchgeführt, ob es sich bei PE und PC um zwei Ausprägungsformen derselben Erkrankung handelt oder sie zwei unterschiedliche Entitäten darstellen.

4.2.1.1 Pectus carinatum (z + p) und Pectus excavatum (z + p)

Im Hinblick auf die Zellkerne und das dilatierte Endoplasmatische Retikulum liegen die p-Werte mit $p = 0,003$ für Zellkern und $p = 0,030$ für dilatiertes ER unterhalb des Signifikanzniveaus. Die Nullhypotesen werden für Zellkern und dilatiertes ER abgelehnt. Das heißt, dass Pectus carinatum signifikant mehr Zellkerne und dilatiertes ER aufweist. Bei den Parametern intrazelluläre Kollagenfasern, intrazelluläre Lipidvakuolen, Einzelzelle und Zellform länglich-schmal gibt es keinen signifikanten Unterschied: Die p-Werte lagen bei $p = 0,813$ für intrazelluläre Kollagenfasern, $p = 0,898$ für intrazelluläre Lipidvakuolen, $p = 0,494$ für Einzelzelle und $p = 0,737$ für länglich-schmale Zellform. Folglich unterscheiden sich PE und PC hinsichtlich der Häufigkeit

von intrazellulären Kollagenfasern, intrazellulären Lipidvakuolen, Einzelzellen und der Zellform länglich-schmal nicht.

Tabelle 20: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich PC – PE

Paarvergleich	Parameter mit signifikantem Unterschied	p-Wert
PC (z + p) – PE (z + p)	Zellkern	0,003
	Dilatiertes ER	0,030

4.2.1.2 Pectus carinatum peripher und Pectus excavatum peripher

Im Vergleich peripherer PC-Proben mit peripheren PE-Proben (Paarvergleich 2) zeigen sich nach Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests folgende p-Werte: p = 1,000 für intrazelluläre Kollagenfasern, p = 0,896 für intrazelluläre Lipidvakuolen, p = 0,114 für Zellkern, p = 0,203 für Einzelzelle, p = 0,863 für Zellform länglich-schmal, p = 0,389 für dilatiertes ER. Damit wird die Alternativhypothese eines bestehenden Unterschiedes für alle Parameter abgelehnt. Das bedeutet, dass sich periphere Knorpelproben von PE und PC in der Häufigkeit intrazellulärer Kollagenfasern und intrazellulärer Lipidvakuolen sowie von Zellkernen, Einzelzellen, länglich-schmalen Zellen und dilatiertem ER nicht signifikant unterscheiden.

4.2.1.3 Pectus carinatum zentral und Pectus excavatum zentral

Im Vergleich zentraler PC- und PE-Präparate zeigen die Verteilung des Parameters Zellkern mit einem p-Wert von 0,008 sowie die Verteilung des Parameters dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum mit einem p-Wert von 0,027 signifikante Unterschiede. Dagegen liegen die p-Werte für intrazelluläre Kollagenfasern, intrazelluläre Lipidvakuolen, Einzelzelle und Zellform länglich-schmal eindeutig oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,05, womit für diese Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen zentralen Knorpelproben von PE und PC gegeben sind (p = 0,663 für intrazelluläre Kollagenfasern, p = 0,487 für intrazelluläre Lipidvakuolen, p = 0,682 für Einzelzelle, p = 0,419 für Zellform länglich-schmal).

Tabelle 21: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich PCz – PEz

Paarvergleich	Parameter mit signifikantem Unterschied	p-Wert
PCz – PEz	Zellkern	0,008
	Dilatiertes ER	0,027

4.2.2 Ergebnisse des Wilcoxon-Tests

Ziel der Anwendung des Wilcoxon-Tests ist es, zu klären, ob signifikante Unterschiede zwischen Knorpelperipherie und -zentrum bestehen.

4.2.2.1 Pectus carinatum zentral und peripher

Die Anzahl von Chondrozyten mit intrazellulären Lipidvakuolen (Parameter 2) unterscheidet sich in zentralen und peripheren PC-Präparaten signifikant. Der p-Wert liegt bei intrazellulären Lipidvakuolen mit $p = 0,004$ deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus von $p = 0,05$. Für die übrigen Parameter (intrazelluläre Kollagenfasern, Zellkern, Einzelzelle, Zellform länglich-schmal und dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum) liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Die p-Werte sind $p = 0,531$ für intrazelluläre Kollagenfasern, $p = 0,328$ für Zellkern, $p = 0,102$ für Einzelzelle, $p = 0,078$ für Zellform länglich-schmal sowie $p = 0,867$ für dilatiertes ER.

Tabelle 22: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich PCz – PCp

Paarvergleich	Parameter mit signifikantem Unterschied	p-Wert
PCz – PCp	Intrazelluläre Lipidvakuolen	0,004

Tabelle 23: Fast signifikante Unterschiede im Paarvergleich PCz – PCp

Paarvergleich	Parameter mit signifikantem Unterschied	p-Wert
PCz – PCp	Zellform länglich-schmal	0,078

4.2.2.2 Pectus excavatum zentral und peripher

Beim Vergleich zentraler und peripherer PE-Präparate liegen folgende p-Werte vor: p = 0,156 für intrazelluläre Kollagenfasern, p = 0,072 für intrazelluläre Lipidvakuolen, p = 0,063 für Zellkern, p = 1,000 für Einzelzelle, p = 0,133 für Zellform länglich-schmal und p = 0,516 für dilatiertes ER. Anders als beim Vergleich zentraler und peripherer PC-Proben (Paarvergleich 4) liegen zwischen zentralen und peripheren PE-Präparaten keine signifikanten Unterschiede vor.

Tabelle 24: Fast signifikante Unterschiede im Paarvergleich PEz – PEp

Paarvergleich	Parameter mit signifikantem Unterschied	p-Wert
PEz – PEp	Intrazelluläre Lipidvakuolen	0,072
	Zellkern	0,063

4.2.2.3 zentral (PC + PE) und peripher (PC + PE)

Bei drei Parametern weist der Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zwischen zentralen und peripheren Knorpelproben auf: Während intrazelluläre Lipidvakuolen zentral signifikant häufiger vorkommen als peripher (p = 0,000), sind Zellkerne mit p = 0,035 und Zellform länglich-schmal mit p = 0,011 peripher häufiger. Bei den Parametern intrazelluläre Kollagenfasern, Einzelzelle und dilatiertes ER liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen zentral und peripher vor. Die p-Werte sind p = 0,079 für intrazellulären Kollagenfasern, p = 0,194 für Einzelzelle und p = 0,741 für dilatiertes ER.

Tabelle 25: Signifikante Unterschiede im Paarvergleich z – p

Paarvergleich	Parameter mit signifikantem Unterschied	p-Wert
z (PC + PE) - p (PC + PE)	Intrazelluläre Lipidvakuolen	0,000
	Zellkern	0,035
	Zellform länglich-schmal	0,011

Tabelle 26: Fast signifikante Unterschiede im Paarvergleich z – p

Paarvergleich	Parameter mit fast signifikantem Unterschied	p-Wert
z (PC + PE) - p (PC + PE)	Intrazelluläre Kollagenfasern	0,079

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider statistischer Tests

In den folgenden 4 von 6 Paarvergleichen wurden signifikante Unterschiede festgestellt: Pectus excavatum und Pectus carinatum, Pectus carinatum zentral und Pectus excavatum zentral, Pectus carinatum zentral und peripher sowie zentral und peripher (vgl. Tabelle 20–22, 25). 8 von 36 Nullhypotesen wurden verworfen und damit 8 von 36 Alternativhypotesen bestätigt. Das heißt, dass in 8 von 36 Vergleichen signifikante Unterschiede bestehen.

Die Paare Pectus excavatum zentral und peripher sowie Pectus carinatum zentral und peripher und zentral und peripher wiesen bei drei Parametern fast signifikante Unterschiede auf: PEz und PEp bei den Parametern intrazelluläre Lipidvakuolen und Zellkern; PCz und PCp bei der Zellform länglich-schmal sowie zentral und peripher bei intrazellulären Kollagenfasern (vgl. Tabelle 23, 24, 26).

Bei den Paarvergleichen Pectus carinatum peripher und Pectus excavatum peripher (Paarvergleich 2) und Pectus excavatum zentral und Pectus excavatum peripher (Paarvergleich 5) wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Pectus excavatum und Pectus carinatum unterscheiden sich in zwei Parametern signifikant: Zellkern und dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum. Beide Merkmale finden sich in PC-Präparaten häufiger. Bei Betrachtung der Untergruppen PCz, PCp sowie PEz, PEp weisen sowohl periphere als auch zentrale PC-Proben eine größere Anzahl von Zellen mit Zellkern auf. Das Gleiche zeigt sich für Chondrozyten mit dilatiertem Endoplasmatischen Retikulum.

Zentrum und Peripherie der Präparate unterscheiden sich hinsichtlich dreier Parameter signifikant: intrazelluläre Lipidvakuolen, Zellkern und Zellform (Parameter 2, 3 und 4). Zellkerne kommen in peripheren Knorpelschnitten häufiger vor als in zentralen. Dieser Unterschied liegt sowohl bei PC- als auch bei PE-Präparaten vor: In allen drei

Paarvergleichen von zentral versus peripher (z – p, PCz – PCp, PEz – PEp) ist die Anzahl zellkernbesitzender Zellen in der Peripherie größer als im Zentrum. Das Gleiche gilt für intrazelluläre Lipidvakuolen. Die signifikante Häufung länglich-schmaler Zellen in peripheren Knorpelproben ist dagegen ausschließlich auf die PC-Gruppe (peripher fast signifikant mehr) zurückzuführen. Beim PE-Kollektiv ist die Anzahl länglich-schmaler Zellen zentral und peripher gleich.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich vornehmlich mit den zellulären ultrastrukturellen Merkmalen des sternocostalen Knorpels bei Pectus excavatum und Pectus carinatum. Die zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob ultrastrukturelle Veränderungen bei Pectus excavatum und Pectus carinatum einen Schlüssel zur Klärung der Pathogenese darstellen und die Ultrastruktur für eine gemeinsame Pathogenese der Brustwanddeformitäten spricht oder dagegen.

In Pectus-carinatum-Präparaten waren Zellkerne und dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum signifikant häufiger zu finden als in PE-Proben. Das glatte Endoplasmatische Retikulum ist in Zellen mit intensiver Proteinsynthese und -sekretion zumeist etwas dilatiert (80). Eine Dilatation der Zisternen des ER kann Ausdruck gesteigerter metabolischer Aktivität oder des vermehrten intrazellulären Transports, beispielsweise von Proteinen und Lipiden, sein (80). Vor dem Hintergrund dieser Information sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität bei Pectus carinatum. Die signifikant höhere Anzahl an Zellkernen in PC-Präparaten unterstützt indirekt die Hypothese einer höheren Stoffwechselaktivität bei Pectus carinatum, insbesondere in zentralen Knorpelabschnitten. Intakte Zellkerne sind weiterhin ein morphologisches Korrelat für die Vitalität der Zellen. Ob sie allerdings auch ein Zeichen für eine erhöhte proliferative Aktivität darstellen, muss in weiteren Studien belegt werden.

Die signifikanten Unterschiede bei den Ergebnissen zu Zellkern und dilatiertem ER der vorliegenden Arbeit können als Indiz dafür genommen werden, dass den Brustwanddeformitäten PE und PC nicht derselbe Pathomechanismus zugrunde liegt.

Eine höhere Stoffwechselaktivität in PC-Knorpel im Vergleich zum Rippenknorpel von PE-PatientInnen wurde bereits von Verez Sola beschrieben, jedoch basierend auf anderen Auswertungsparametern in der histo-pathologischen Analyse (76). Während Verez Sola mehr vitale Zellen beziehungsweise eine erhöhte Stoffwechselaktivität in der Peripherie und Übergangszone des PC-Knorpels fand, zeigt die ultrastrukturelle Untersuchung der Einzelzellen mit Analyse der Zellorganellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit herangezogen wurden, ein neues präziseres Bild: Es sind die zentralen PC-Knorpelproben, die signifikant mehr dilatiertes ER und Zellkerne aufweisen als die zentralen PE-Proben. Das heißt, die Unterschiede zwischen PE und PC bezüglich der Stoffwechselaktivität dominieren nach Abschluss der ultrastrukturellen Analysen im zentralen, nicht im peripheren Präparatebereich.

Besonders hervorzuheben ist der Befund intrazellulärer Kollagenfasern in den Chondrozyten. Erstmalig werden im Rahmen dieser Arbeit im Rippenknorpel von PE und PC Kollagenfasern beschrieben, die elektronenmikroskopisch innerhalb von Chondrozyten zu erkennen sind. Insgesamt wurden intrazelluläre Kollagenfasern in 6,75 % der untersuchten Chondrozyten gefunden. Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde in PC-Chondrozyten bisher nie intrazelluläres Kollagen nachgewiesen. Tocchioni et al. stellten Kollagen Typ II immunhistochemisch im Zytoplasma von PE-Knorpel und einem der von ihnen untersuchten Kontroll-Knorpel fest, beschrieben intrazelluläre Kollagenfasern jedoch nicht in ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung (42).

Das Endprodukt der intrazellulären Kollagensynthese ist Prokollagen. Prokollagen wird extrazellulär zu Tropokollagen-Molekülen modifiziert, die unter normalen Umständen ebenfalls extrazellulär zu Fibrillen und Fasern verknüpft werden (81). Der Nachweis intrazellulärer Kollagenfasern in dieser Arbeit könnte folglich auf eine Störung der Kollagensynthese beziehungsweise auf eine Störung der Lokalisation der Kollagensynthese hinweisen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen PE und PC lag in der vorliegenden Arbeit beim Parameter intrazelluläre Kollagenfasern nicht vor. Anhand dieses Parameters ergeben sich also keine Hinweise auf eine unterschiedliche Pathogenese der beiden Brustwanddeformitäten. Eine mögliche Störung der Kollagensynthese ist diesen Ergebnissen zufolge für Pectus excavatum und Pectus carinatum gleichermaßen gegeben; sie dominiert in zentralen Knorpelanteilen.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit, das für eine gemeinsame Pathogenese von Pectus excavatum und Pectus carinatum spricht, ist die Verteilung intrazellulärer Lipidvakuolen. Die Anzahl der Zellen mit intrazellulären Lipidvakuolen unterscheidet sich in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant zwischen Pectus excavatum und Pectus carinatum. Intrazelluläre Lipidvakuolen waren ein häufiges Merkmal in den Präparaten des Rippenknorpels beider Entitäten. Sie fanden sich sowohl bei PE als auch bei PC in circa zwei Dritteln der Chondrozyten. Nach neueren Erkenntnissen regulieren Lipidtropfen die Autophagie, einen katabolen Vorgang, bei dem Proteine und Zellorganellen zum Abbau Lysosomen zugeführt werden. Sie tragen zur Bildung von Autophagosomen bei (82, 83). Folglich geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweis auf einen gesteigerten zellulären Katabolismus bei beiden Deformitäten.

Interessant wäre es, in einer Folgestudie zu ermitteln, ob der Zellkern regelhaft bei denjenigen Chondrozyten fehlt, die Lipidvakuolen aufweisen. In einem aufwendigen Prozedere müsste in einer solchen Untersuchung sichergestellt sein, dass alle Ebenen der Zelle in Serienschnitten erfasst werden.

Eine alternative Interpretationsmöglichkeit des hohen Anteils an intrazellulären Lipidvakuolen besteht darin, dass bei PE und PC reifer Rippenknorpel vorliegt: Nach Wolfgang Kühnel sind Lipidtröpfchen charakteristisch für reife Chondrozyten (84). Ob Lipidtropfen als Charakteristikum reifer Chondrozyten diese als kabile Zellen in ihrem reifen Zustand charakterisieren, muss in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden.

Nach inhaltlicher Wertung des Parameters „intrazelluläre Lipidvakuolen“ unterscheiden sich PE und PC den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach nicht signifikant im Maß an Katabolismus beziehungsweise im Maß der Knorpelreife.

Damit unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Arbeit von denjenigen der lichtmikroskopischen Untersuchung, in der Chondrozyten mit Vakuolisierung signifikant häufiger in der Übergangszone des PC-Knorpels gefunden wurden und fast signifikant häufiger in der zentralen Zone mit einem p-Wert von 0,064 (76). Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann darin liegen, dass Vakuolisierungen in der Lichtmikroskopie nicht alleine durch intrazelluläre Lipidvakuolen zustandekommen, sondern beispielsweise auch durch starke Glykogeneinlagerungen, lysosomale Speicherungen oder Artefakte. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass die ultrastrukturelle Analyse der Lichtmikroskopie überlegen sein kann.

Bezüglich der Parameter einer zonalen Gliederung – bezogen auf das Auftreten von Einzelzellen und einer zonalen Anordnung unterschiedlicher Zellformen, wie zum Beispiel chondroider oder elongierter Formen – unterscheiden sich Pectus excavatum und Pectus carinatum in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant. Hätte sich für eine der Deformitäten eine zonale Gliederung des Knorpels klar bestätigt, während sie für die andere Deformität sicher hätte abgelehnt werden können, wäre dies ein Hinweis für unterschiedliche Pathomechanismen bei PE und PC gewesen. Da dies nicht der Fall ist, sprechen diese Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit neben denjenigen zu intrazellulären Lipidvakuolen und intrazellulären Kollagenfasern dafür, dass Pectus excavatum und Pectus carinatum eine ähnliche Pathogenese zugrunde liegt.

Der hyaline Gelenkknorpel weist eine Gliederung in verschiedene Zonen – die oberflächliche, mittlere, tiefe und kalzifizierte Zone – auf (32). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden unter der Annahme diskutiert, dass der Knorpeloberfläche am ehesten die peripheren Präparate entsprechen und den tiefen Knorpelzonen die zentralen Präparate. Ausgehend von einer zonalen Gliederung wären oberflächlich, also peripher, insbesondere länglich-schmale Chondrozyten und Einzelzellen zu erwarten, in tiefen Knorpelzonen, also zentral, rundlich-ovale Chondrozyten sowie eine Anordnung in mehrzellige Chondrone.

Im Vergleich peripherer und zentraler PE-Präparate war die Anzahl an Einzelzellen identisch, was gegen eine zonale Gliederung spricht. In peripheren PE-Knorpelproben zeigten sich – entsprechend der zonalen Gliederung, wie sie für hyalinen Knorpel beschrieben ist – mehr länglich-schmale Zellen als in zentralen PE-Proben. Trotzdem war peripher die absolute Anzahl rundlich-ovaler Chondrozyten größer als die Anzahl länglich-schmaler Chondrozyten, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegen eine zonale Gliederung des PE-Knorpels sprechen.

Der Vergleich peripherer und zentraler PC-Präparate ergab peripher mehr Einzelzellen als Zellgruppen. Zusätzlich waren Einzelzellen peripher häufiger als zentral. Dies sind Hinweise auf eine zonale Gliederung, wie sie für hyalinen Knorpel beschrieben ist. Allerdings waren die Unterschiede zwischen zentralen und peripheren PC-Präparaten bei dem Parameter Einzelzelle nicht signifikant. Länglich-schmale Chondrozyten kamen ebenfalls häufiger peripher vor als zentral. Allerdings waren länglich-schmale Chondrozyten peripher trotzdem seltener als rundlich-ovale, was

gegen eine zonale Gliederung spricht. Insgesamt lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei keiner Deformität sicher auf eine zonale Gliederung schließen.

Ob für Pectus-Deformitäten – nicht einzeln als PE und PC, sondern gemeinsam als Pectus-Deformitäten betrachtet – eine zonale Gliederung überhaupt infrage kommt, ergibt sich aus der Gegenüberstellung aller zentralen und aller peripherer Präparate. Peripher kamen länglich-schmale Chondrozyten signifikant häufiger vor als zentral. Dennoch dominierten peripher rundlich-ovale Chondrozyten gegenüber länglich-schmalen Chondrozyten. Circa die Hälfte der peripheren Chondrozyten lag als Einzelzellen vor, die andere Hälfte war in mehrzelligen Chondronen organisiert. In zentralen Präparaten waren rundlich-ovale Chondrozyten deutlich häufiger als länglich-schmale, und der Großteil der zentralen Chondrozyten war in mehrzelligen Chondronen organisiert. Folglich sprechen die Zellorganisation (Einzelzelle/mehrzeliges Chondron) und die Häufung rundlich-ovaler Chondrozyten in zentralen Präparaten für eine zonale Gliederung, wie sie für gesunden hyalinen Knorpel beschrieben ist, während die Befunde in peripheren Präparaten dagegensprechen.

Auffallend bezüglich der Zellform ist, dass die Anzahl länglich-schmaler Chondrozyten und rundlich-ovaler Chondrozyten sehr unausgeglichen ist: Bei Betrachtung aller untersuchter Präparate liegt das Verhältnis länglich-schmal zu rundlich-oval bei circa 1 : 4. Insgesamt ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine zonale Gliederung bei den Pectus-Deformitäten PE und bei PC fraglich. Das Fehlen einer zonalen Gliederung steht im Einklang mit Aussagen von Tocchioni et al., die eine zonale Gliederung für den Rippenknorpel im Allgemeinen ablehnen (42).

Insgesamt kann die Frage, ob es sich bei PE und PC um zwei Entitäten mit unterschiedlichem Pathomechanismus handelt, anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht einheitlich beantwortet werden. Während der signifikante Unterschied bei Zellkernen und dilatiertem Endoplasmatischen Retikulum dafür spricht, zeigen die Ergebnisse zu den Auswertungsparametern intrazelluläre Kollagenfasern, intrazelluläre Lipidvakuolen, Einzelzelle und Zellform länglich-schmal Gegenteiliges.

Bezüglich der Pathogenese der Brustwanddeformitäten sind, entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere folgende Hypothesen zu diskutieren: erhöhte Stoffwechselaktivität und überschießendes beziehungsweise abnormales Knorpel-

wachstum, Katabolismus beziehungsweise Degeneration sowie Störung der Kollagensynthese.

Übermäßiges Knorpelwachstum wird – Robicseks Darstellung folgend – weithin als Ursache für das PC angenommen (73). Dagegen lehnten Park et al. übermäßiges Knorpelwachstum als Hauptursache der PC-Deformität ab (59). Der Rippenknorpel von PC-PatientInnen zeigte sich im Vergleich zu demjenigen von Kontrollpersonen in Untersuchungen von Park et al. verlängert. Jedoch unterschied sich die Knorpellänge zu beiden Seiten des Sternums bei asymmetrischen Varianten nicht signifikant (59). Da in der vorliegenden Arbeit weniger als 50 % der Zellen Zellkerne und dilatiertes ER aufweisen, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur gegen überschießendes Knorpelwachstum als Hauptursache, sondern legen nahe, dass bei PC überhaupt kein überschießendes Wachstum vorliegt. Einschränkend muss festgehalten werden, dass die Anzahl vitaler Zellen nur einen sehr vagen und indirekten Marker für das Knorpelwachstum darstellt.

Auch für die Pectus-excavatum-Deformität wird übermäßiges Wachstum des Rippenknorpels als möglicher Pathomechanismus diskutiert. Einige Forschergruppen lehnten ein überschießendes Wachstum des sternocostalen Knorpels als Ursache bereits ab (48, 61, 62). Dem Grundverständnis nach ist Stoffwechselaktivität eine Voraussetzung für Wachstum. Die vorliegende Arbeit ergab für PE aber signifikant weniger Chondrozyten mit Parametern, die für Stoffwechselaktivität stehen (Zellkerne und dilatiertes ER) als für Pectus carinatum. Dabei waren Zellkerne und dilatiertes ER bereits bei Pectus carinatum so selten, dass zumindest eine erhöhte Stoffwechselaktivität als Ursache auszuschließen ist. Damit bekräftigt die vorliegende Arbeit, dass offenbar kein überschießendes Knorpelwachstum im PE-Knorpel stattfindet.

Auch Ergebnisse weiterer Arbeiten sprechen gegen übermäßiges Wachstum und damit gegen eine Verlängerung des sternocostalen Knorpels. In Untersuchungen von David et al. beispielsweise wichen zelluläre Parameter, die im Falle übermäßigen Wachstums verändert sein sollten, nicht signifikant vom gesundem Kontrollknorpel ab (44, 45). Ferner sind für PE-Knorpel veränderte Spurenelement-Konzentration mit signifikant erhöhten Konzentrationen für Calcium und Magnesium und signifikant erniedrigtem Zink-Gehalt beschrieben (67). Zinkmangel führt zu einer Aktivitätsminderung von Chondrozyten, was ebenfalls gegen überschießendes Knorpelwachstum spricht (67, 70).

Hinsichtlich des Parameters der intrazellulären Lipidvakuolen kann deren Auftreten in Knorpelzellen als ein Korrelat für Katabolismus beziehungsweise Degeneration gewertet werden. Rupprecht et al. beschrieben Lipidvakuolen im Kontext zellulärer Degeneration (67). Urmonas und Kondrashin stellten mit Vakuolisierung und Kernpyknosen histomorphologische Korrelate eines nahenden Zelluntergangs fest (2). Degeneration und Zelluntergang sind mit dem Fehlen von Zellkernen in einem Großteil der analysierten Chondrozyten in der vorliegenden Arbeit vereinbar, ebenso wie mit dem Eindruck von „Zellauflösung“, der in manchen Präparaten festgestellt wurde. Geisbe et al. fanden bei PE eine Erhöhung von Enzymen mit kataboler Wirkung im Mukopolysaccharid-Stoffwechsel und formulierten die Idee, dass diese Veränderungen auf einer spezifischen Stoffwechselstörung der Chondrozyten basieren könnten (65). Hierzu geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine weiterführende Erkenntnis: Mit dem großen Anteil intrazellulärer Lipidvakuolen, der bei PE und bei PC in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, gibt es deutliche ultrastrukturell sichtbare Hinweise, dass die Stoffwechselstörung tatsächlich von den Chondrozyten selbst ausgeht.

In Kombination mit den Forschungsergebnissen von Geisbe et al., Rupprecht et al. und Urmonas und Kondrashin legen die Befunde dieser Arbeit eine im Zentrum des sternocostalen PE-Knorpels dominierende, katabole beziehungsweise degenerative Stoffwechselstörung nahe, die nicht nur die Matrix, sondern auch die Zellen betrifft. Bei Pectus carinatum fanden Brochhausen et al. kristalline Einschlüsse und werteten sie als Ausdruck einer metabolischen Störung oder eines degenerativen Prozesses (68). Derartige kristalline Einschlüsse wurden in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt. Dennoch passt das Ergebnis dieser Arbeit, dass eine Stoffwechselstörung der Chondrozyten selbst vorliegt, welche im großen Anteil intrazellulärer Lipidvakuolen ihr Korrelat findet, zu den Ergebnissen von Brochhausen et al. (68).

Kollagenbezogene Veränderungen sind für den sternocostalen Knorpel bei Pectus excavatum in der Literatur mehrfach beschrieben. Feng et al. fanden beim Pectus excavatum-Knorpel kollagenbezogene Abweichungen in tiefen Knorpelzonen. Sie beschrieben eine unregelmäßige Verteilung und Anordnung und eine Rarität von Kollagenfibrillen sowie Fehlen von Kollagen II in manchen Knorpelbereichen (45). Mit der erstmaligen Beschreibung intrazellulärer Kollagenfasern führen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Hypothese, dass sich infolge einer gestörten Kollagen-

synthese beziehungsweise einer beeinträchtigten Freisetzung von Kollagenvorstufen aus Chondrozyten die intrazellulären Fasern formieren. Damit liefert diese Arbeit einen neuen Erklärungsansatz für die von Feng beschriebene deutlich geringe Menge an Kollagenfasern in manchen Knorpelarealen.

Im Knorpel von Pectus carinatum fielen Veränderungen in Form von Faserdemaskierung, Verdickung und Verlust der Querstreifung auf (68). Insbesondere der Verlust der charakteristischen Querstreifung unterstützt die Hypothese einer Kollagensynthesestörung bei Pectus carinatum.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich intrazellulärer Kollagenfasern ist, in Zusammenschau mit früheren Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, hinsichtlich der Pathogenese von PE und PC eine Kollagensynthesestörung möglich (45, 68). Als Haupt- oder alleinige Ursache der Pectus-Deformitäten ist sie eher unwahrscheinlich, da intrazelluläre Kollagenfasern lediglich in weniger als 10 % der Chondrozyten vorkamen.

Den bereits beschriebenen Ergebnissen zu einer kollagenbezogenen Störung des sternocostalen Knorpels stehen die Erkenntnisse von David et al. und Tocchioni et al. gegenüber: David et al. beschrieben ein reifes Kollagennetzwerk, und Tocchioni et al. stellten weder auf zellulärer Ebene noch hinsichtlich der extrazellulären Matrix signifikante Unterschiede zwischen PE-Knorpel und Kontroll-Knorpel fest (42, 44).

Die Hypothese einer biomechanischen Instabilität bei den Brustwanddeformitäten PE und PC kann anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Dass eine Stoffwechselstörung der Chondrozyten und eine Kollagenbezogene Störung die biomechanischen Eigenschaften des sternocostalen Knorpels bei PE und bei PC verändern, ist aber denkbar.

Um die histologischen Befunde und Ergebnisse dieser Arbeit in die Reihe der vorausgegangenen Untersuchungen anderer Forschungsgruppen einordnen zu können, werden im Folgenden ihre Limitationen diskutiert. Anschließend werden Ausblicke für zukünftige Untersuchungen gegeben.

Mit jeweils zwanzig untersuchten Knorpelproben von Pectus excavatum und Pectus carinatum sind die Stichproben relativ klein. Sie sind hinsichtlich einer umfangreichen statistischen Auswertung als nicht repräsentativ zu bezeichnen, genügen aber dem Anspruch einer explorativen Arbeit. Durch den explorativen Ansatz der vorliegenden Arbeit kann in der Statistik von einer Bonferroni-Korrektur abgesehen werden. In Be-

zug auf die Anzahl der untersuchten Präparate muss festgehalten werden, dass die Präparate ein seltenes Einsendegut in der Pathologie darstellen und somit eine lange „Sammelperiode“ in Kauf genommen werden muss, um die Kollektive für weitere vergleichende Untersuchungen heranziehen zu können. Um Probenmaterial zu konzentrieren und für zukünftige weiterreichende histologische und ultrastrukturelle Analysen nutzbar zu machen, wurde am Universitätsklinikum Regensburg das Projekt URchin (*Ultrastructural Research on chest wall deformities international*) ins Leben gerufen.

Bei der angewandten Methode der elektronenmikroskopischen Betrachtung muss ein gewisser individueller Interpretationsspielraum bei der Beurteilung der Präparate berücksichtigt werden, wie er in allen morphologischen Analysen vorliegt. Beispielsweise kann das Feststellen von „ungeordnet“, „Degeneration“ und „Rundheit“ vom Betrachter abhängig variieren. Mit dem Ziel einer möglichst objektiven – nicht rein deskriptiven – vergleichenden Analyse von PE und PC, wurden die Auswertungskriterien (intrazelluläre Kollagenfasern, intrazelluläre Lipidvakuolen, Zellkern, Einzelzelle, Zellform länglich-schmal, dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum) stichprobenartig quantitativ erfasst. Eine solche Analyse der extrazellulären Matrix stellte sich im Laufe der Untersuchung als schwierig heraus, weshalb sich die Auswertungsparameter auf Zellen beziehen. In diesem Zusammenhang werden in Zukunft automatisierte, IT gestützte Methoden mit Zugang zu Deep Learning die ultrastrukturelle Auswertung unterstützen.

Weiterhin ist bei der Beurteilung von Zellen zu beachten, dass es sich bei der Transmissionselektronenmikroskopie um ein Schnittbildverfahren handelt und die Zellmorphologie abhängig von der Schnittrichtung des Präparates variiert: Gonzales et al. fanden in Schnitten parallel zur Oberfläche des Knorpels und in Schnitten senkrecht zur Knorpeloberfläche unterschiedliche Zellformen vor (33).

Insgesamt ist die Methode der Elektronenmikroskopie für Untersuchungen zellulärer Veränderungen gut geeignet. Die Analyse der Ultrastruktur liefert Hinweise auf mögliche Pathomechanismen beziehungsweise Ursachen, die den Brustwanddeformitäten zugrunde liegen. Diese Ursachen kann sie aber nicht abschließend klären, da die histomorphologische/ultrastrukturell sichtbare Veränderung die Manifestation der Ursache ist, aber nicht die Ursache selbst. Hierzu sollten in zukünftigen In-vitro-

Analysen zum Beispiel die Effekte biomechanischer Reize auf den Metabolismus von Knorpelzellen weiter untersucht werden.

Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Analyse zellulärer Parameter. Es ist zu erwarten, dass sich das Bild durch eine vergleichende Analyse der extrazellulären Matrix des sternocostalen Knorpels von PE- und PC-PatientInnen abrundet. Anstelle von zellulären Parametern kann die Anzahl und die Größe von unterschiedlichen Matrix-Arealen semiquantitativ erfasst werden. In Anlehnung an die vorliegende Arbeit könnte für eine bestimmte Anzahl an Ultradünnsschnitten erhoben werden, wie häufig Areale mit Kollagenfasern gleicher Morphologie und Verlaufsrichtung vorkommen und wie groß diese sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass degenerative Prozesse als Pathomechanismus zur Ausbildung von PE und PC führen. Diese Dissertation zeigt auch, dass sich die Stoffwechselaktivität des sternocostalen Knorpels bei PE und bei PC signifikant unterscheidet. Eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität kann aber nicht die Pathogenese erklären, da sich zu wenige Zellen finden, die Anzeichen für erhöhten Stoffwechsel liefern. Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll Zellorganellen, die bei degenerativen Prozessen und im Zellstoffwechsel eine Rolle spielen, zum Beispiel Lysosomen und Mitochondrien, in einer Folgestudie zu untersuchen. Interessant wäre es, die Korrelation der Parameter zu berechnen, die auf denselben Prozess, beispielsweise eine Degeneration, hinweisen.

Weiterhin sollten künftige Arbeiten mit dem Ziel der Pathogenese näher zu kommen, den Rippenknorpel von Personen mit PE und PC mit dem Rippenknorpel gesunder Probanden vergleichen.

Für zukünftige, sich an diese explorative Arbeit anschließende Untersuchungen macht es außerdem Sinn größere repräsentative Stichproben zu untersuchen, so dass die Ergebnisse auf die Gesamtheit der PatientInnen mit PE und PC übertragen werden können. Hierbei lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verifizieren oder falsifizieren.

Insgesamt demonstriert die vorliegende Arbeit, dass die vergleichende ultrastrukturelle Analyse einen innovativen Ansatz zur weiteren Klärung der Pathogenese der Knorpelveränderungen bei Brustwanddeformitäten darstellt.

6. Zusammenfassung

Die Ultrastruktur des sternocostalen Knorpels von PatientInnen mit Pectus excavatum und Pectus carinatum wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig vergleichend analysiert. Dies erfolgt hinsichtlich der Fragestellung, ob die ultrastrukturellen Befunde zur Klärung der Pathogenese beitragen. Ferner stellt sich die Frage, ob es sich bei PE und PC um zwei unterschiedliche Entitäten oder verschiedene Ausprägungen desselben Krankheitsbildes handelt.

Intrazelluläre Kollagenfasern werden in dieser Arbeit für beide Deformitäten erstmalig ultrastrukturell beschrieben. Intrazelluläre Kollagenfasern legen eine Lokalisationsstörung der Kollagensynthese, beziehungsweise eine Störung der Kollagensynthese im Allgemeinen nahe. Als Hauptursache für die Deformierung der Brustwand kommt diese jedoch nicht infrage, da mit 6,75 % nur sehr wenige Chondrozyten intrazelluläre Fasern aufweisen.

Die Häufigkeit intrazellulärer Lipidvakuolen und Chondrozyten mit fehlenden Zellkernen weist deutlich auf eine degenerative Störung als dominierenden Pathomechanismus hin.

Gegen einen identischen Pathomechanismus bei Pectus excavatum und Pectus carinatum spricht, dass sich die Parameter Zellkern und Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum im Blick auf ihre Häufigkeit signifikant unterscheiden. Im Vergleich mit Pectus excavatum zeigt sich bei Pectus carinatum eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität.

Nachdem sich aber bei vier von sechs Auswertungsparametern keine signifikanten Unterschiede zwischen Pectus excavatum und Pectus carinatum finden, ist von einer ähnlichen Pathogenese auszugehen.

Eine ähnliche – wenngleich nicht identische – Pathogenese legt nahe, dass es sich bei Pectus excavatum und Pectus carinatum um verschiedene Ausprägungen eines Krankheitsbildes und nicht um unterschiedliche Entitäten handelt.

7. Quellenverzeichnis

1. Desmarais TJ, Keller MS. Pectus carinatum. *Curr Opin Pediatr.* 2013;25(3):375-81.
2. Fokin AA, Steuerwald NM, Ahrens WA, Allen KE. Anatomical, histologic, and genetic characteristics of congenital chest wall deformities. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;21(1):44-57.
3. Brochhausen C, Turial S, Muller FK, Schmitt VH, Coerdt W, Wihlm JM, et al.. Pectus excavatum: history, hypotheses and treatment options. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012;14(6):801-6.
4. Dean C, Etienne D, Hindson D, Matusz P, Tubbs RS, Loukas M. Pectus excavatum (funnel chest): a historical and current prospective. *Surg Radiol Anat.* 2012;34(7):573-9.
5. Jaroszewski D, Notrica D, McMahon L, Steidley DE, Deschamps C. Current management of pectus excavatum: a review and update of therapy and treatment recommendations. *J Am Board Fam Med.* 2010;23(2):230-9.
6. Kelly RE, Jr., Quinn A, Varela P, Redlinger RE, Jr., Nuss D. Dysmorphology of chest wall deformities: frequency distribution of subtypes of typical pectus excavatum and rare subtypes. *Arch Bronconeumol.* 2013;49(5):196-200.
7. Creswick HA, Stacey MW, Kelly RE, Gustin T, Nuss D, Harvey H, et al.. Family study of the inheritance of pectus excavatum. *Journal of Pediatric Surgery.* 2006;41(10):1699-703.
8. Mazhar K, Cliff I, Watson N, Satur C. The ABC of Pectus Excavatum: a novel anatomical classification system. *J Cardiothorac Surg.* 2015;10 Suppl 1:A277.
9. Chung CS, Myrianthopoulos NC. Factors affecting risks of congenital malformations. I. Analysis of epidemiologic factors in congenital malformations. Report from the Collaborative Perinatal Project. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1975;11(10):1-22.
10. Kuru P, Cakiroglu A, Er A, Ozbakir H, Cinel AE, Cangut B, et al. Pectus Excavatum and Pectus Carinatum: Associated Conditions, Family History, and Postoperative Patient Satisfaction. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;49(1):29-34.

11. Koumbourlis AC, Stolar CJ. Lung growth and function in children and adolescents with idiopathic pectus excavatum. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38(4):339-43.
12. Cobben JM, Oostra RJ, van Dijk FS. Pectus excavatum and carinatum. *Eur J Med Genet*. 2014;57(8):414-7.
13. Coelho Mde S, Guimaraes Pde S. Pectus carinatum. *J Bras Pneumol*. 2007;33(4):463-74.
14. Obermeyer RJ, Goretsky MJ. Chest wall deformities in pediatric surgery. *Surg Clin North Am*. 2012;92(3):669-84, ix.
15. Fonkalsrud EW. Current management of pectus excavatum. *World J Surg*. 2003; 27(5): 502-8.
16. Waters P, Welch K, Micheli LJ, Shamberger R, Hall JE. Scoliosis in children with pectus excavatum and pectus carinatum. *J Pediatr Orthop*. 1989;9(5):551-6.
17. Yoshida A, Uemura S, Yamamoto M, Nouso H, Kuyama H, Muta Y. Correlation of asymmetric chest wall deformity and growth in patients with pectus excavatum. *J Pediatr Surg*. 2013;48(4):771-5.
18. Koumbourlis AC. Pectus excavatum: pathophysiology and clinical characteristics. *Paediatr Respir Rev*. 2009;10(1):3-6.
19. Wurtz AJ, Neviere R, Brian E. eComment. Morphologic and functional assessment of pectus excavatum. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;22(1):46.
20. Akyuz Ozkan E, Khosrashahi HE, Serin HI, Metin B, Kilic M, Gecit UA. Cardiac and arterial elastance and myocardial wall stress in children with pectus excavatum. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016.
21. Steinmann C, Krille S, Mueller A, Weber P, Reingruber B, Martin A. Pectus excavatum and pectus carinatum patients suffer from lower quality of life and impaired body image: a control group comparison of psychological characteristics prior to surgical correction. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;40(5):1138-45.
22. Lacquet LK, Morshuis WJ, Folgering HT. Long-term results after correction of anterior chest wall deformities. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1998;39(5):683-8.
23. Roberts J, Hayashi A, Anderson JO, Martin JM, Maxwell LL. Quality of life of patients who have undergone the Nuss procedure for pectus excavatum: Preliminary findings. *J Pediatr Surg*. 2003;38(5):779-83.

24. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001(391 Suppl):S26-33.
25. Stacey M, Dutta D, Cao W, Asmar A, Elsayed-Ali H, Kelly R, Jr., et al. Atomic force microscopy characterization of collagen 'nanostraws' in human costal cartilage. *Micron.* 2013;44:483-7.
26. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(4):401-4.
27. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat.* 1997;191 (Pt 1):1-13.
28. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 1989;3(9):2042-51.
29. Stockwell RA. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1978;12:7-13.
30. Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(7):564-72.
31. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem.* 1992;25(3):155-63.
32. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res.* 1987;5(4):509-22.
33. Gonzalez S, Fragozo-Soriano RJ, Kouri JB. Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage--a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech.* 2007;70(12):1072-8.
34. Fujioka R, Aoyama T, Takakuwa T. The layered structure of the articular surface. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(8):1092-8.
35. Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci.* 1999;4:D671-85.
36. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Morphology of the pericellular capsule in articular cartilage revealed by hyaluronidase digestion. *J Ultrastruct Res.* 1985;91(1):13-23.

37. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure. *J Orthop Res*. 1988;6(3):408-19.
38. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol*. 2014;39:25-32.
39. Zelenski NA, Leddy HA, Sanchez-Adams J, Zhang J, Bonaldo P, Liedtke W, et al. Type VI Collagen Regulates Pericellular Matrix Properties, Chondrocyte Swelling, and Mechanotransduction in Mouse Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(5):1286-94.
40. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat*. 1984;138 (Pt 1):113-38.
41. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*. 1998;47:477-86.
42. Tocchioni F, Ghionzoli M, Calosi L, Guasti D, Romagnoli P, Messineo A. Rib cartilage characterization in patients affected by pectus excavatum. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(12):1813-20.
43. Kotzot D, Schwabegger AH. Etiology of chest wall deformities--a genetic review for the treating physician. *J Pediatr Surg*. 2009;44(10):2004-11.
44. David VL, Izvernariu DA, Popoiu CM, Puiu M, Boia ES. Morphologic, morphometrical and histochemical proprieties of the costal cartilage in children with pectus excavatum. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):625-9.
45. Feng J, Hu T, Liu W, Zhang S, Tang Y, Chen R, et al. The biomechanical, morphologic, and histochemical properties of the costal cartilages in children with pectus excavatum. *J Pediatr Surg*. 2001;36(12):1770-6.
46. Nagasao T, Shimizu Y, Morotomi T, Takano N, Jiang H, Kishi K. Irregular location of major pectoral muscle can be a causative factor of pectus excavatum. *Med Hypotheses*. 2014;82(5):512-7.
47. Tocchioni F, Ghionzoli M, Messineo A, Romagnoli P. Pectus excavatum and heritable disorders of the connective tissue. *Pediatr Rep*. 2013;5(3):e15.
48. Park CH, Kim TH, Haam SJ, Lee S. Asymmetric Pectus Excavatum Is Associated with Overgrowth of Ribs Rather Than Cartilage. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;63(5):427-32.

49. Bauhinus J. *Observatio*. In: Ioannis Schenckii a Grafenberg, ed. Johannes Observatorium medicarum, rararum, novarum, admirabilium, et montrosarum, liber secundus. Frankfurt: De partibus vitalibus, thorace contentis; 1609. 322 p.
50. Williams C. Congenital malformation of the thorax great depression of the sternum. *Trans Path Soc*. 1872;24:50.
51. Langer, Zuckerkandel E. Untersuchungen über den mißbildeten Brustkorb des. Herrn JW Wiener med Zeit. 1880;49:515.
52. Eggel. Eine seltene Mißbildung des Thorax. *Virchows Arch Path Anat*. 1870;49:230.
53. Hagmann. Selten vorkommende Abnormität des Brustkastens. *Jb Kinderheilkunde*. 1888;15:455.
54. Brown AL. Pectus excavatum (funnel chest). *J Thorac Surg*. 1939;9:164-84.
55. Haje SA, Harcke HT, Bowen JR. Growth disturbance of the sternum and pectus deformities: imaging studies and clinical correlation. *Pediatr Radiol*. 1999;29(5):334-41.
56. Currarino G, Silverman FN. Premature obliteration of the sternal sutures and pigeon-breast deformity. *Radiology*. 1958;70(4):532-40.
57. Park CH, Kim TH, Haam SJ, Lee S. Rib overgrowth may be a contributing factor for pectus excavatum: Evaluation of prepubertal patients younger than 10years old. *J Pediatr Surg*. 2015;50(11):1945-8.
58. Park CH, Kim TH, Haam SJ, Jeon I, Lee S. The etiology of pectus carinatum involves overgrowth of costal cartilage and undergrowth of ribs. *J Pediatr Surg*. 2014;49(8):1252-8.
59. Park CH, Kim TH, Haam SJ, Lee S. Does overgrowth of costal cartilage cause pectus carinatum? A three-dimensional computed tomography evaluation of rib length and costal cartilage length in patients with asymmetric pectus carinatum. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;17(5):757-63.
60. Sweet RH. Pectus Excavatum: Report of Two Cases Successfully Operated Upon. *Ann Surg*. 1944;119(6):922-34.
61. Nakaoka T, Uemura S, Yano T, Nakagawa Y, Tanimoto T, Suehiro S. Does overgrowth of costal cartilage cause pectus excavatum? A study on the lengths of ribs and costal cartilages in asymmetric patients. *J Pediatr Surg*. 2009;44(7):1333-6.

62. Nakaoka T, Uemura S, Yoshida T, Tanimoto T, Miyake H. Overgrowth of costal cartilage is not the etiology of pectus excavatum. *J Pediatr Surg.* 2010;45(10):2015-8.
63. Pacifici M, Fellini SA, Holtzer H, De Luca S. Changes in the sulfated proteoglycans synthesized by "aging" chondrocytes. I. Dispersed cultured chondrocytes and in vivo cartilages. *J Biol Chem.* 1981;256(2):1029-37.
64. Tsvetkova TA, Kozlov EA, Rudakov SS, Del'vig AA. [Extractability of collagen from the rib cartilage and skin in funnel chest in children]. *Vopr Med Khim.* 1988;34(1):71-4.
65. Geisbe H, Buddecke E, Flach A, Muller G, Stein U. [88. Biochemical, morphological and physical as well as animal experimental studies on the pathogenesis of funnel chest]. *Langenbecks Arch Chir.* 1967;319:536-41.
66. Kuritsyn VM, Shabanov AM, Shekhonin BV, Rukosuev VS, Rudakov SS. [Pathohistology of costal cartilage and immunomorphologic characteristics of collagen in funnel chest]. *Patol.* 1987;49(1):20-6.
67. Rupprecht H, Hummer HP, Stoss H, Waldherr T. [Pathogenesis of chest wall abnormalities--electron microscopy studies and trace element analysis of rib cartilage]. *Z Kinderchir.* 1987;42(4):228-9.
68. Brochhausen C, Muller FK, Turial S, James Kirkpatrick C. Pectus carinatum--first ultrastructural findings of a potential metabolic lesion. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;41(3):705-6.
69. Yu HB, Kunarso G, Hong FH, Stanton LW. Zfp206, Oct4, and Sox2 are integrated components of a transcriptional regulatory network in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2009;284(45):31327-35.
70. O'Dell BL, Newberne PM, Savage JE. Significance of dietary zinc for the growing chicken. *J Nutr.* 1958;65(4):503-18.
71. Hurley LS, Swenerton H. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;123(3):692-6.
72. Mul K, Padberg GW, Voermans NC. Facioscapulohumeral muscular dystrophy as a genetic cause of pectus excavatum. *Eur J Med Genet.* 2015;58(4):203-4.
73. Robicsek F, Cook JW, Daugherty HK, Selle JG. Pectus carinatum. *Coll Works Cardiopulm Dis.* 1979;22:65-78.

74. Fonkalsrud EW, Beanes S. Surgical management of pectus carinatum: 30 years' experience. *World J Surg.* 2001;25(7):898-903.
75. Rupprecht H, Freiberger N. [Light microscopic studies of the cartilage in funnel chest. A new view of the pathogenesis]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.* 1989;22(5):314-8.
76. Verez Sola MC. Histo-morphologischer Vergleich vom Rippenknorpel bei Kiel- und Trichterbrust [Bachelorarbeit]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2014.
77. Robicsek F, Watts LT. Pectus carinatum. *Thorac Surg Clin.* 2010;20(4):563-74.
78. Sacco Casamassima MG, Papandria D, Goldstein SD, Yang J, McIlroy KH, Abdullah F, et al. Contemporary management of recurrent pectus excavatum. *J Pediatr Surg.* 2015;50(10):1726-33.
79. Pena A, Perez L, Nurko S, Dorenbaum D. Pectus carinatum and pectus excavatum: are they the same disease? *Am Surg.* 1981;47(5):215-8.
80. Cottier H. Pathogenese Ein Handbuch für die ärztliche Fortbildung Band 1. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1980.
81. Schwab W. Struktur, Funktion und pathologische Aspekte des Chondrozyten und Gelenkknorpels [Habilitationsschrift]. Dresden: Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus; 2005.
82. Shpilka T, Welter E, Borovsky N, Amar N, Mari M, Reggiori F, et al. Lipid droplets and their component triglycerides and sterol esters regulate autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2015;34(16):2117-31.
83. Deretic V. Autophagosomes and lipid droplets: no longer just chewing the fat. *EMBO J.* 2015;34(16):2111-3.
84. Kühnel W. Taschenatlas Histologie. Stuttgart New York: Georg Thieme; 2014.

8. Anhang

8.1 Statistische Tests

Die verwendeten p-Werte sind in den folgenden Abbildungen rot umrandet.

8.1.1 Mann-Whitney-U-Test: PC (z + p) vs. PE (z + p)

Statistik für Test^a

	Intrazelluläre Kollagenfasern	Intrazelluläre Lipidvakullen	Zellkern	Einzelzel-le	Zellform länglich-schmal	Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum
Mann-Whitney-U	191,000	195,000	93,500	174,500	187,500	121,000
Wilcoxon-W	401,000	405,000	303,500	384,500	397,500	331,000
Z	-,271	-,137	-,2905	-,698	-,348	-,2168
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,786	,891	,004	,485	,728	,030
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	,820 ^b	,904 ^b	,003 ^b	,495 ^b	,738 ^b	,033 ^b
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,813	,898	,003	,494	,737	,030
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,406	,449	,001	,247	,368	,015
Punktwahrscheinlichkeit	,036	,005	,000	,004	,005	,001

a. Gruppenvariable: Deformität

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

8.1.2 Mann-Whitney-U-Test: PCp vs. PEp

Statistik für Test^a

	Intrazelluläre Kollagenfasern	Intrazelluläre Lipidvakullen	Zellkern	Einzelzel-le	Zellform länglich-schmal	Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum
Mann-Whitney-U	47,000	48,000	29,000	33,000	47,000	38,500
Wilcoxon-W	102,000	103,000	84,000	88,000	102,000	93,500
Z	-,271	-,152	-,1,604	-,1,298	-,233	-,886
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,786	,879	,109	,194	,816	,375
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	,853 ^b	,912 ^b	,123 ^b	,218 ^b	,853 ^b	,393 ^b
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000	,896	,114	,203	,863	,389
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,500	,448	,057	,101	,431	,195
Punktwahrscheinlichkeit	,139	,015	,005	,003	,018	,008

a. Gruppenvariable: Deformität

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

8.1.3 Mann-Whitney-U-Test: PCz vs. PEz

Statistik für Test^a

	Intrazelluläre Kollagenfasern	Intrazelluläre Lipidvakuolen	Zellkern	Einzelzelle	Zellform länglich-schmal	Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum
Mann-Whitney-U	43,000	40,000	15,500	44,000	39,000	21,000
Wilcoxon-W	98,000	95,000	70,500	99,000	94,000	76,000
Z	-,564	-,777	-2,639	-,460	-,897	-2,220
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,573	,437	,008	,645	,370	,026
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	,631 ^b	,481 ^b	,007 ^b	,684 ^b	,436 ^b	,029 ^b
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,663	,487	,008	,682	,419	,027
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,331	,244	,004	,341	,210	,014
Punktwahrscheinlichkeit	,082	,015	,002	,030	,045	,004

a. Gruppenvariable: Deformität

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

8.1.4 Wilcoxon-Test: PCz vs. PCp

Statistik für Test^a

	izKFp – izKFz	izLVp – izLVz	ZKp – ZKz	Einzelzellep – Einzelzellez	Formlsp – Formlsz	dilatERp – dilatERz
Z	-,811 ^b	-2,692 ^b	-1,057 ^c	-1,763 ^c	-1,866 ^c	-,259 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,417	,007	,291	,078	,062	,796
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,531	,004	,328	,102	,078	,867
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,266	,002	,164	,051	,039	,434
Punktwahrscheinlichkeit	,109	,002	,023	,023	,016	,055

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf positiven Rängen.

c. Basiert auf negativen Rängen.

8.1.5 Wilcoxon-Test: PEz vs. PEp

Statistik für Test^a

	izKFp – izKFz	izLVp – izLVz	ZKp – ZKz	Einzelzelle p – Einzelzelle z	Formlsp – Formlsz	dilatERp – dilatERz
Z	-1,725 ^b	-1,842 ^b	-2,060 ^c	,000 ^d	-1,723 ^c	-,773 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,084	,065	,039	1,000	,085	,440
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,156	,072	,063	1,000	,133	,516
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,078	,036	,031	,516	,066	,258
Punktwahrscheinlichkeit	,063	,010	,031	,031	,043	,055

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf positiven Rängen.

c. Basiert auf negativen Rängen.

d. Die Summe der negativen Ränge ist gleich der Summe der positiven Ränge.

8.1.6 Wilcoxon-Test: z (PC + PE) vs. p (PC + PE)

Statistik für Test^a

	izKFp – izKFz	izLVp – izLVz	ZKp – ZKz	Einzelzelle p – Einzelzelle z	Formlsp – Formlsz	dilatERp – dilatERz
Z	-1,786 ^b	-3,302 ^b	-2,085 ^c	-1,332 ^c	-2,501 ^c	-,351 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,074	,001	,037	,183	,012	,726
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,079	,000	,035	,194	,011	,741
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,040	,000	,018	,097	,006	,371
Punktwahrscheinlichkeit	,014	,000	,001	,005	,001	,008

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf positiven Rängen.

c. Basiert auf negativen Rängen.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Brochhausen-Delius für die Betreuung dieser Dissertation, selbst über die Distanz Regensburg – Dresden hinweg, und für die Freiheit, die er mir bei der Gestaltung gegeben hat.

Ebenso bedanke ich mich bei Karin Molter, Rosemarie Delzeit, Sabine Jakubowski und Silke Mitschke für ihre Unterstützung, insbesondere während der praktischen Arbeit am Transmissionselektronenmikroskop.

Auch bei Herr Dr. Wollschläger vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik in Mainz bedanke ich mich für seine statistische Beratung im Rahmen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinen Eltern, die mir sowohl das Studium als auch die vorliegende Arbeit in dieser Form überhaupt erst ermöglichen und mir jederzeit beratend und ausgleichend zur Seite stehen.