

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**„Sehnenregeneration von Rotatorenmanschettendefekten
mit autologen Tenozyten und einem biodegradablen
Kollagen-Scaffold im Schafmodell“**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lena Kempfert

aus Augsburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke
Prof. Dr. Martin K. Angele
Priv. Doz. Dr. Volker Braunstein
Prof. Dr. Andreas Frick

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med Björn Peter Roßbach
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2016

Eidesstattliche Versicherung

Kempfert, Lena

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **„Sehnenregeneration von Rotatorenmanschettendefekten mit autologe Tenozyten und einem biodegradablen Kollagen-Scaffold im Schafmodell“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Aufgabenstellung	5
2 Kenntnisstand zu Rotatorenmanschettendefekten und ihren Lösungsansätzen	8
2.1 Allgemeines.....	8
2.2 Rotatorenmanschettenruptur.....	8
2.2.1 Sehnen	8
2.2.1.1 Allgemeines.....	8
2.2.1.2 Zelluläre Bestandteile.....	9
2.2.1.3 Extrazelluläre Matrix.....	9
2.2.2 Sehnendefekt und Heilung.....	10
2.2.3 Sehnenrupturen	11
2.2.4 Rotatorenmanschettenrupturen	12
2.3 „Critical-size“ Defekt.....	12
2.4 Supraspinatussehne.....	13
2.5 Operationsmethoden.....	13
2.5.1 Tissue Engineering der Sehne.....	15
2.5.1.1 Trägermatrizen	15
2.5.1.2 Scaffold	15
2.5.1.3 Tenozyten.....	17
2.6 Großtiermodell Schaf	18
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Übersicht	19
3.1.1 Vorversuche	19
3.2 Hauptversuch	21
3.3 Auswertungsmethoden.....	22
3.4 Präoperative Maßnahmen.....	23
3.4.1 Trägermatrizen.....	23
3.4.2 Verwendete Zellen	24
3.5 Implantatbesiedelung	25

3.6 Operationen.....	26
3.6.1 Versuchstiere	26
3.6.2 Operatives Vorgehen	27
3.7 Versuchsdurchführung und Gewinnung von Proben.....	29
3.7.1 Gewinnung und Vorbereitung der Schafschultern	29
3.7.2 Makroskopische Beurteilung	29
3.7.3 Biomechanische Testungen.....	30
3.7.4 Probenvorbereitung für die histologische Auswertung.....	31
4 Biomechanische Versuchsergebnisse	34
4.1 Makroskopische Beurteilung	34
4.2 Zugversuche und Ableitung von (mechanischen) Kenngrößen	36
4.3 Statistische Auswertung der Versuchsdaten und der Kenngrößen.....	39
4.3.1 Allgemeines.....	39
4.3.2 Reißkraft.....	39
4.3.3 Dehnungsweg	40
4.3.4 Bruchdehnung.....	41
4.3.5 Bruchspannung.....	42
4.3.6 E-Modul.....	43
4.3.7 Zusammenstellung der Mittelwerte der Versuche.....	45
5 Histologische Auswertung	47
5.1 Mikroskopische Beurteilung	47
5.1.1 Allgemeines.....	47
5.1.2 Übersichtsfärbungen	47
5.1.2.1 HE Färbung	47
5.1.2.2 Picrosirius Red Färbung.....	48
5.1.2.3 Safranin O Färbung.....	49
5.1.3 Dokumentationssystem.....	50
5.1.4 Immunhistologische Auswertung	51
5.1.4.1 Kollagen I	51
5.1.4.2 Kollagen II	51
5.1.4.3 Fibronectin.....	51

5.1.4.4	Tenascin C	52
5.1.4.5	Osteopontin	52
5.1.5	Beurteilungscode für die Immunhistologie	52
5.1.6	Methode zur qualitativen Darstellung	53
5.2	Qualitative Beurteilung der Sehne	55
5.2.1	Allgemeines	55
5.2.2	HE Färbung	55
5.2.2.1	Faserstruktur/Faserverlauf	55
5.2.2.2	Zellmorphologie	58
5.2.2.3	Entzündung	60
5.2.3	Safranin O Färbung	64
5.2.4	Picrosirius Red	66
5.2.5	Immunhistologie Kollagen I	70
5.2.6	Kollagen II	72
5.2.7	Fibronektin	73
5.2.8	Tenascin C	77
5.2.9	Osteopontin	78
5.3	Sehnen-Knorpel-Knochen Übergang (Teile IV - VII)	80
5.3.1	Safranin O Färbung (Teile V-VII)	80
5.3.2	Kollagen II (Teil V-VII)	82
5.3.3	Kollagen I (Teil V-VII)	84
5.3.4	Fibronektin (Teil V-VII)	86
5.3.5	Osteopontin (Teil V-VII)	87
5.3.6	Tenascin C (Teil V-VII)	88
5.3.7	HE- und Picrosirius Red Färbung (Teil V-VII)	90
6	Diskussion und Bewertung der Untersuchungsergebnisse	91
6.1	Allgemeines	91
6.2	Methodenevaluierung	91
6.2.1	Allgemeines	91
6.2.2	Gewählter Forschungsansatz	91
6.2.2.1	„critical-size“ Defekt	91
6.2.2.2	Versuchstier	92

6.2.2.3 Heilungszeitraum.....	93
9 Literaturverzeichnis.....	108
10 Abbildungsverzeichnis	122
Tabellenverzeichnis	124

Verzeichnis der Anhänge

Anhang A: Arbeitsprotokolle

Anhang B: Histologische Grafiken

Anhang C: Verwendete Substanzen und Nährmedien

Anhang D: Abkürzungsverzeichnis

Anhang E: Publikationen und Preise

Anhang F: Laudatio

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Innerhalb der Orthopädie stellen Schulterpathologien weiterhin eine große Herausforderung für den Orthopäden dar. Ein häufiges Krankheitsbild stellen Rotatorenmanchettenrupturen (RMR) dar, die in dieser Arbeit weitergehend untersucht werden sollen. Die Prävalenz der RMR ist in der Allgemeinbevölkerung mit ca. 5- 39% angegeben [77, 171]. Die Inzidenz der RMR steigt mit dem Lebensalter der Patienten an und ist vor allem erhöht nach dem 50. bis 60. Lebensjahr [153, 198]. Eine weitere von der RMR betroffene Patientengruppe sind junge, sportliche Patienten mit übermäßiger Belastung [178, 65]. Die Hauptursachen der RMR sind:

- degenerativer Verschleiß und Verschleiß durch Impingement [166, 207, 114],
- Trauma [49, 81, 186]
- Minderdurchblutung des Sehnenansatzes [67, 160, 181]
- Schulterluxationen [184, 99]

Auch wird eine Partial- oder Totalruptur unterschieden. Hierbei wird eine Totalruptur als Kontinuitätsunterbrechung der Sehne verstanden [139]. Davon können eine, zwei oder drei Sehnen betroffen sein. Die dabei am häufigsten geschädigte Sehne ist die Supraspinatussehne [128], da ihre exponierte Lage zwischen Oberarmkopf und Schulterdach die Sehne besonders anfällig für Verletzungen und Überlastungen macht.

Die Versorgung der Ruptur ist in den häufigsten Fällen operativ, da eine spontane Heilung der Sehne nicht vorkommt und Muskelatrophie, fettige Infiltration und Funktionsausfall die Folge sind [128]. Auch nimmt die Defektgröße bei primärer Nichtversorgung zu, so dass eine spätere Rekonstruktion umso schwieriger wird [60].

Die entscheidendste Einflussgröße für das Outcome der RMR ist aber die Rupturgröße und stellt den limitierenden Faktor für das Operationsergebnis dar [51]. Besonders die Supraspinatussehne ist hierbei erheblich betroffen und eine massive RMR bedarf weiterer Ersatzmaterialien zur suffizienten Versorgung [128, 23]. Hierbei wird vor allem

der Gebrauch von Trägermatrizen und Stammzellen diskutiert, wobei Langzeitergebnisse allerdings noch fehlen und hohe Komplikationsraten vorbeschrieben sind [21, 133, 8, 26, 120].

Aus diesem Grunde stellt eine weitreichende Totalruptur der Surpraspinatussehne auch heute noch eine große Herausforderung für die operative Versorgung der RMR in der Orthopädie dar. Daher ist die Entwicklung einer neuen Versorgungsmethode zur Vermeidung einer Reruptur und zum Erlangen einer guten klinischen postoperativer Funktion ein interessantes und weitreichendes Feld für neue Forschungsansätze.

In der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation der LMU München (Campus Großhadern) wurden hierzu in der Vergangenheit bereits Forschungsprojekte durchgeführt und gute Ergebnisse in der Rekonstruktion von Sehnendefekten mit verschiedenen Trägermatrizen und Stammzellen erzielt [176]. Da diese Untersuchungen jedoch am Kleintiermodell (Ratte) durchgeführt worden sind, stellt eine Übertragung auf Versuche an Großtieren eine sinnvolle und interessante Weiterführung des Forschungsprojekts dar. Vor allem die hohe Selbstheilungsrate und Ossifizierungstendenz im Kleintier können eine direkte Übertragung auf den Menschen schwierig bis unmöglich machen, woraus sich die Notwendigkeit für weitere Studien im Großtier ergibt. Daraus sind zusätzliche Erkenntnisse zu erwarten, sowie die Überprüfung der im Kleintier gewonnenen Ergebnisse, mit besonderer Beachtung einer Ossifikation der Sehne im Großtier und die Länge der Defektheilungszeit.

Da die Untersuchung verschiedener Trägermatrizen in der Vergangenheit gezeigt hat, dass hierbei das Kollagen-Scaffold die besten Ergebnisse liefert [85, 86, 126, 138], soll in der folgenden Arbeit gezielt untersucht werden, in wieweit die Implantation eines Kollagen-Scaffolds eine verbesserte regenerierte Sehnenstruktur in einem Sehnendefekt bewirkt. Dazu sind die Unterschiede zwischen einer gesunden Sehne, einem unversorgten Sehnendefekt und einem Sehnendefekt, welcher mit einem Kollagen-Scaffold rekonstruiert wird, herauszuarbeiten. Hierzu wurden folgende Hypothesen formuliert:

Hypothese 1:

Die Implantation eines Kollagen-Scaffolds in einen „critical-size“-Defekt stellt eine (signifikante) Verbesserung, sowohl in der biomechanischen, als auch in der histologischen Untersuchung, dar.

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits verschiedene Zellarten, vor allem mesenchymale Stammzellen und Knochenmarkszellen untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede und ein Nachweis für eine Differenzierung zu Tenozyten stellte sich als schwierig heraus [9, 10, 61, 111, 146, 172, 176, 228]. Da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass Tenozyten die Kollagenproduktion fördern, die Entzündungsreaktion hemmen und eine schnellere Heilung gewährleisten [38, 209, 169], stellt die Verwendung von differenzierten autologen Tenozyten einen neuen und vielversprechenden Ansatz zur Sehnenregeneration dar und soll im Folgenden untersucht werden. Die zweite Hypothese lautet daher:

Hypothese 2:

Die Besiedelung von autologen Tenozyten auf einem Kollagen-Scaffold erbringt einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Versorgung mit unbesiedeltem Scaffold.

Um die Fragestellungen und Hypothesen dieser Arbeit wissenschaftlich zu untersuchen, wurden folgende Methoden angewendet:

- biomechanische Testung der Sehnenregenerate im Zugversuch
- histologische Untersuchung mit Übersichtsfärbungen
- immunhistologische Methoden zum Nachweis der Expression von Faktoren

Die Anwendung dieser Methoden lässt eine umfassende und weitreichende Untersuchung der Fragestellungen und des Themenbereiches erwarten.

2 Kenntnisstand zu Rotatorenmanschettendefekten und ihren Lösungsansätzen

2.1 Allgemeines

Zur Problemstellung Rotatorenmanschettenruptur wird nachfolgend zunächst der Kenntnisstand aus der Literatur zusammengestellt. Dabei wird sich beschränkt auf folgende Themen:

- Sehnenaufbau und -heilung
- Sehndefekte bezogen auf Rotatorenmanschettendefekt, insbesondere Supraspinatusdefekte
- Übersicht verschiedener Rekonstruktionsmethoden
- Tissue Engineering, mit Bezug auf Scaffolds und Tenozyten
- Wahl des geeigneten Tiermodells

2.2 Rotatorenmanschettenruptur

2.2.1 Sehnen

2.2.1.1 Allgemeines

Sehnen bestehen aus straffem Bindegewebe. Ihre Aufgabe ist die gelenkübergreifende Übertragung der vom Muskel ausgeübten Kraft auf den Knochen mit dem Ziel eine Bewegung zu generieren [180, 110]. Dabei besitzen Sehnen eine in Zugrichtung angeordnete Struktur, die bei der Beanspruchung hilft eine direkte Kraftübertragung zu ermöglichen und zu dosieren [97]. Die kleinsten Strukturen stellen dabei die Fibrillen dar, wobei mehrere Fibrillen ein Faserbündel bilden und mehrere Faserbündel vom Endotendineum umhüllt sind [197]. Um eine feste Verankerung im Knochen zu ge-

währleisten und so keine Schwachstelle zu ermöglichen, strahlen spezielle Kollagenfasern, sogenannte Sharpey Fasern, über ein Knorpelbett in den Knochen ein [96]. Als äußerste Struktur wird die Sehne vom Epitendineum umhüllt [19, 119, 180]. Die Reißfestigkeit einer Sehne ist deutlich höher als die eines Muskels und kann eine Beanspruchung von etwa 40-50 N/mm² aufnehmen[148]. Daher kann eine gesunde Sehne mit einer Zugkraft über 3.000 N belastet werden, ohne dass sie beschädigt wird [148]. Um diese Beanspruchung aufzunehmen, besitzt die Sehne einen speziellen Aufbau und wird aus Interzellulärsubstanz und zellulären Bestandteilen gebildet [231].

2.2.1.2 Zelluläre Bestandteile

Die Zellen der Sehnen sind Tenoblasten oder Tenozyten und stellen damit eine spezialisierte Gruppe von Fibroblasten dar, die von der extrazellulären Matrix umgeben sind [20, 154]. Im Reifungsvorgang der Sehne wandeln sich die Kollagen produzierenden Tenoblasten in Tenozyten um [47, 115]. Diese sind flacher und länger als die Tenoblasten und richten sich parallel der Kollagenfibrillen aus [47]. Hierbei sind sie durch „gap junctions“ verbunden, die eine intrazelluläre Kommunikation ermöglichen [154]. Durch die Verminderung der Zellorganellen während der Reifung der Tenozyten, wird auch die Produktion der extrazellulären Matrix geringer. Trotzdem spielen die Tenozyten vor allem im Erhalt der Sehnenstruktur und in der Regeneration wieder eine entscheidende Rolle [109, 106]. Da die reife Sehne einen anaeroben Stoffwechsel unterhält um längere Zugbelastungen ohne Ischämievorgänge auszuhalten, bedeutet dies aber eine langsame und schlechte Selbstheilungsfähigkeit [6, 129, 214].

2.2.1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) spielt eine bedeutende Rolle in der Funktionspezifität der Sehne und ihren Eigenschaften. Diese ist nicht nur für den Erhalt und die mechanische Belastbarkeit verantwortlich, auch zeigt die EZM wichtige Funktionen in der Wundheilung [188, 87]. Der Hauptbestandteil des Trockengewebes der EZM ist mit 70% das Kollagen [113, 2]. Das Kollagen nimmt hierbei eine Schlüsselstelle in der

Reißfestigkeit der Sehne ein und stellt sich als straff organisierte wellenförmige Struktur dar [148, 80, 199]. Andere Kollagene sind in weit geringeren Anteilen vorhanden, wobei Kollagen III für Reperaturmechanismen eine größere Rolle spielt. Hierbei tritt Kollagen III besonders in der frühen Phase der Heilung auf und geht zurück wenn vermehrt Kollagen I gebildet wird [107]. Dabei ist Kollagen III eher durch locker strukturierte Fibrillen gekennzeichnet [137]. Als weitere Sehnenbestandteile kommen noch Elastin [168], die Proteoglycane Decorin und Aggrecan [227] und adhäsive Glykoproteine wie Fibronectin und Tenascin C vor. Diese spielen eine Rolle in der Adhäsion und Migration von Zellen. Auch sind die Glykoproteine in Abschnitten der Wundheilung beteiligt, wie z.B. die Kollagen III-Organisation [168, 196]. Hierbei kommt Tenascin C nach Järvinen et al. [108] nicht in der Sehne direkt, sondern im Sehnen-Knochen Übergang vor und wird vor allem in der Embryogenese sowie in den Heilungsprozessen vermehrt exprimiert. Auch stellt die mechanische Reizung ein Stimulierungsfaktor von Tenascin C dar [46].

Im Alter nimmt das Eigengewicht der Sehne zu. Nach Ingelmark et al. [105] kann dieser Vorgang damit begründet werden, dass der Wassergehalt der Sehne abnimmt, wogegen der Gehalt an EZM zunimmt und sich somit die Sehne verbreitert. Auch hat dieses zur Folge, dass der EZM/Tenozyten-Quotient abnimmt was eine schlechtere Selbstheilung impliziert und die Elastizität der Sehne verringert.

2.2.2 Sehnendefekt und Heilung

Sehnenverletzungen können zum einen im Rahmen von Sportunfällen in Form von Überlastungsrupturen oder zum anderen als chronischen Sehnenschäden in Sinne von degenerativen Prozessen auftreten [197, 183]. Somit liegt bei Sehnenverletzungen ein vorangegangener pathologischer Prozess zugrunde, welcher die Sehnen bereits vorschädigt [117]. Die degenerativen Veränderungen führen dabei zu einer biomechanischen Minderung der Zugfestigkeit und Schwächung der Muskel-Sehnen-Knochen Einheit, so dass bei zusätzlicher Beanspruchung eine Ruptur eintreten kann [116, 3]. Im Defektareal kommt es hierbei anschließend zu einer bindegewebigen Defektheilung [107]. Dieses resultiert auch nach längerer Heilungsphase nur in einem

bindegewebigen Narbengewebe, welches den funktionellen und mechanischen Ansprüchen eines Sehngewebes nicht genügt. Zusätzlich ist bei mangelnder Kontinuität des Sehnenverlaufs die Heilung behindert, wobei es zu Vernarbungen der Sehnenstümpfe mit dem umliegenden Bindegewebe kommt [174, 107].

Die autologe Heilung durch intrinsische und extrinsische Faktoren verläuft dabei in den folgenden drei Schritten [197]:

- In den ersten zwei Wochen sind die Prozesse gekennzeichnet durch eine Entzündungsreaktion und Phagozytose des nekrotischen Gewebes [28].
- Nach zwei Wochen beginnt daraufhin die Regenerationsphase [196], in welcher durch Chemotaxis Tenozyten und Fibroblasten einwandern und vorwiegend Kollagen III, aber auch Proteoglykane und andere Kollagene produzieren und somit eine Stabilisierung des Defektbereiches bewirken [62, 78, 88, 175].
- Nach sechs bis acht Wochen beginnt daraufhin die Umformungsphase in dem das bisher zellreiche Gewebe zellärmer wird und nun nur noch vermehrt Kollagen I produziert. Dieses richtet sich dann im Verlauf längs der Zugrichtung aus [137]. Als letztes folgt die Reifungsphase, die von der 10. Woche bis zu einem Jahr dauern kann [196, 197]. In diesem Zeitraum sollen sich die Kollagenfasern parallel anordnen und auch noch die letzten Nekroseareale beseitigt werden [118].

2.2.3 Sehnenrupturen

In der Orthopädie ist die Sehnenruptur ein häufiges und bedeutendes Krankheitsbild. Dabei finden operative Behandlungsmöglichkeiten je nach Art und Lokalisation der Ruptur [143, 98, 89] teilweise gute Erfolge, wobei Partialrupturen von Totalrupturen zu unterscheiden sind. Hierbei hat die Partialruptur insgesamt eine bessere Prognose, da hier der Defektbereich lokalisiert ist und somit eine geringere Funktionseinbuse die Folge ist [77]. Bei kleineren Sehnenrupturen zeigt die Adaption und Naht der Sehnenstümpfe sehr gute Ergebnisse [203, 206]. Bei großen und schwerwiegenden Rupturen reicht aber oft die Naht nicht aus und es müssen zusätzlich weitere Behandlungs- und Operationsmethoden diskutiert werden.

2.2.4 Rotatorenmanschettenrupturen

Als häufige Sehnenruptur stellt sich die Rotatorenmanschettenruptur (RMR) dar, bei der auch mehrere Sehnen der funktionellen Einheit aus M. supraspinatus, M. infraspinatus, M. subscapularis und M. teres minor beteiligt sein können [26]. Die Prävalenz wird hierbei mit 5-39 % angegeben [77]. Insgesamt sind Männer und der dominante Arm häufiger betroffen [218]. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter der Patienten, vor allem nach dem 5. bis 6. Lebensjahrzehnt [153, 198, 224]. Zusätzlich nimmt auch das Ausmaß der Ruptur im Alter zu.

Die RMR betrifft zum einen junge, sportliche Menschen mit erhöhter Belastung der Rotatorenmanschette (RM) durch z.B. Wurf- und Überkopfsportarten [4]. Zum anderen sind ältere Patienten aufgrund von Sehnendegenerationen betroffen.

Als Ursachen werden degenerativer Verschleiß und Verschleiß durch Impingement [166, 207, 114], Trauma [49, 81, 186], Minderdurchblutung des Sehnenansatzes [67, 160, 181] und Schulterluxationen [184, 99] genannt. Insgesamt ist die RMR aber multifaktoriell bedingt.

2.3 „Critical-size“-Defekt

Bei der RMR wird eine Partialruptur der Sehne von einer Totalruptur unterschieden [139], wobei vor allem die Totalruptur eine weitaus schlechtere Prognose aufzeigt. Bei der Totalruptur bezeichnet der Begriff „critical-size“-Defekt eine durch Totalexzision eines größeren Sehnenabschnitts entstandene Sehnenlücke von kritischer Länge. Hierbei muss der Defekt die kleinste Größe haben, wobei aber immer noch angenommen werden kann, dass hier keine eigenständige Heilung ohne Intervention möglich ist [202, 191]. Demzufolge hat die Reparatur eines „critical-size“-Defektes zusätzlich eine höhere Anforderung an die Rekonstruktion.

2.4 Supraspinatussehne

Besonders die Supraspinatussehne ist am häufigsten betroffen [128], da ihre exponierte Lage zwischen Oberarmkopf und Schulterdach sie besonders anfällig für Verletzungen, Überlastungen, Abrieb und Impingement macht und eine repetitive Einklemmung zwischen Acromion und dem Caput humeri zu einer schnelleren Sehnen Degeneration führt [166, 165].

Auch wird in der Literatur eine hypovaskuläre Zone im Ansatzbereich der Supraspinatussehne beschrieben, die zu Zellarmut, Nekrosen und Mikrorupturen führt, welche die Sehne anfällig für komplette Rupturen macht [48, 140, 37, 23, 135, 121, 181].

2.5 Operationsmethoden

Das Mittel der Wahl stellt bei massiver RMR die operative Versorgung dar. Ziel hierbei muss sein, das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Zugkräften der RMR und damit wieder ein optimiertes Rotationszentrum herzustellen [60]. Von besonderer Bedeutung ist hierbei auch der Operationszeitpunkt, da sich die besten Resultate bei einer Versorgung in den ersten sechs Wochen zeigen [14]. Bei längerem Zuwarten erhöht sich der Grad der Muskelatrophie sowie eine Zunahme der fettigen Infiltration. Der stark limitierende Faktor für das postoperative Outcome ist aber die Rupturgröße [51]. Die Operationstechniken sind vielfältig und abhängig von dem Ausmaß und Retraktionsgrad der Ruptur, der Muskelatrophie und dem Patientenalter sowie dessen Funktionsanspruch [60]. Dabei ist besonders darauf zu achten, dass die Kontinuität der Sehne wieder hergestellt wird [161]. Vor allem aber auch der Retraktionsabstand der Sehnenstümpfe hat einen großen Einfluss auf das Outcome der Operation [94, 50], da weit retrahierte Sehnen trotz aufwendiger Mobilisation nicht mehr am Tuberculum majus ohne Sehnenersatzmaterialien befestigt werden können.

Die Möglichkeiten zur Versorgung der RMR sind dabei eine offene Operationstechnik, eine mini-open oder arthroskopische Operation [132]. Die mini-open ist der offenen Rekonstruktion bei kleineren Rupturen (<3 cm) überlegen [12, 136], sie ist aber bei

massiven RMR aufgrund der geringen Übersicht über das Defektareal und der damit verbundenen Einschränkung der Sehnenmobilisation nicht das Mittel der Wahl. Auch die arthroskopische RM-Rekonstruktion hat zwar durch geringere Weichteilschäden und weniger Wundheilungsstörungen Vorteile [1], aber auch hier ergeben sich hohe Rerupturraten bei Defekten über 3 cm. Daher zeigt sich die offene Operationsmethode für massive RMR im größten Teil der Versorgungen den anderen als überlegen.

Ein Problem ist hierbei jedoch, dass bei großen Defekten die Primärnaht nicht ausreichend ist um den Defekt komplett zu verschließen. Daher kommen insbesondere bei massiven RMR mit den derzeit gebräuchlichen Operationsmethoden auch heutzutage noch hohe Rerupturraten von 21-94% vor [21, 133, 8].

Hieraus ergab sich die Überlegung, dass bei massiven RMR, bei der eine komplette Naht der Sehne nicht mehr möglich ist, eine Rekonstruktion mit Sehnentransfers, synthetischen oder biologischen Grafts [26, 120] sowie allogenen und autogenen Transplantaten überlegen sein könnte [29, 127, 69].

Zur Defektdeckung können bei Transferoperationen sogenannte Muskelflaps vom M. deltoideus, latissimus dorsi etc. als Deckung verwendet werden [26, 120]. Auch allogene Transplantate aus der Patella- oder Achillessehne kommen zum Einsatz, wobei die Ergebnisse zur autologen Übertragung hier gleichwertig erscheinen [29, 127, 69]. Zusätzlich können noch dermale Allografts, dermale Xenografts und Xenografts aus Dünndarmmukosa (z.B. small intestinal submucosa) verwendet werden, wobei sich die Ergebnisse dabei aber sehr unterschiedlich zeigen [26, 1, 158, 164]. Die einzige Zulassung in den USA hat das dermale Allograft „Graftjacket“ [221, 201, 27, 63, 155].

Trotz verschiedener Rekonstruktionsmethoden hat sich im langfristigen Verlauf die optimale Therapiemethode mit geringer Komplikationsrate und vollständiger Ausheilung eines ursprünglichen Sehndefektes bislang aber noch nicht gezeigt [26, 101, 30]

2.5.1 Tissue Engineering der Sehne

2.5.1.1 Trägermatrizen

Ein weiterer Ansatz zur verbesserten Sehnenregeneration stellt das Tissue Engineering dar, mit dessen Hilfe an der künstlichen Herstellung von hochdifferenziertem Gewebe in-vitro gearbeitet wird. Hierdurch ergeben sich neue innovative Therapiemöglichkeiten zur Rekonstruktion von Sehndefekten [138].

Zu diesem Zweck wird in experimentellen Ansätzen versucht künstliches Gewebe für die Sehnenrekonstruktion verfügbar zu machen. Die künstlich hergestellten Materialien sollen das geschädigte Gewebe ersetzen und möglichst die Eigenschaften der Sehne imitieren. Auch sollen die Nachteile der Allo- und Autografts, wie z.B. Induktion einer Entzündungsreaktion und unzureichende Vaskularisierung nach Rekonstruktion, verringert und eine hohe Zugbelastung erreicht werden [103, 74, 130].

Dabei stützt sich das Tissue Engineering auf drei Säulen [11]:

- die Trägermatrix (Scaffold)
- Zellen mit dem Potential zur Proliferation (Stammzellen oder Tenozyten)
- gegebenenfalls Wachstumsfaktoren, die Zellen stimulieren können

2.5.1.2 Scaffold

Die Beschaffenheit des Scaffolds ist ein wichtiger Faktor für den Erfolg beim Tissue Engineering. Daher wurden in der Vergangenheit Materialien unterschiedlicher Komposition untersucht und die Eigenschaften der idealen Trägermatrix definiert. Das Scaffold besitzt dabei die Aufgaben den Defekt auszufüllen, zu überbrücken und zusätzlich die Wundheilung und Zellmigration zu fördern [54]. Liu et al. [138] hat die Funktion einer idealisierten Trägermatrix noch genauer festgelegt, wobei das Scaffold Biodegradabilität, Biokompatibilität, Biofunktionalität, Prozessibilität und gute mechanische Eigenschaften besitzen sollte.

Bei den Scaffolds werden nach der Art der Herstellung jeweils biologische von synthetischen Matrizen unterschieden. Für die synthetische Herstellung wird vor allem Polyester, Polymilchsäuren und Polycyclohexandiolacetat verwendet [40]. Biologische Scaffolds können aus menschlicher und tierischer Dermis, menschlicher Dura mater, Submukosa des Schweinedarms oder isoliertem Kollagen I hergestellt werden [59].

Biologische Scaffolds werden, um keine Immunreaktion hervorzurufen, einem aufwendigem Sterilisationsprozess unterzogen, welcher das Ziel hat nur die EZM und vor allem Kollagene zurück zu lassen und damit die Struktur sowie die mechanischen Eigenschaften und Vorzüge der biologischen Matrix zu erhalten [8].

Synthetische Scaffolds haben den Vorteil, dass dort keine Mikroorganismen vorhanden sind und sich daher die Aufbereitung wesentlich kostengünstiger darstellt. Dabei werden sie durch thermische und chemische Prozesse in die gewünschte Mikrostruktur gebracht [7]. Sowohl bei synthetischen als auch bei biologischen Scaffolds können eine gute Stabilität und mechanische Belastbarkeit durch Quervernetzung von Fibrillen erreicht werden [7, 58, 57, 55]. Die synthetischen Scaffolds wurden vor allem in den 90 Jahren verwendet. Diese weisen zwar eine überlegene mechanische Belastbarkeit auf, aber die Komplikationsrate durch körperfremdes Gewebe im Sinne einer immunen Entzündungsreaktion ist sehr hoch [40].

Bei den Bioscaffolds zeigten sich in der Vergangenheit in vielen Studien Abstoßungsreaktionen, wobei das Kollagen-Scaffold dabei als einziges kaum Nebenwirkungen zeigte [42, 217, 104]. Auch bietet es sich als Grundsubstanz des Tissue Engineerings besonders gut an, da es der Hauptbestandteil des EZM der Sehne ist. Es kann aus humanen oder bovinen Sehnen gewonnen und zu Bioscaffolds verarbeitet werden [59, 45]. Durch diese Voraussetzungen sind Kollagen-Scaffolds biokompatibel, Zellen können leicht an ihnen adhären und ihre Proliferation kann stimuliert werden [138]. Aufgrund dieser Eigenschaften werden heute schon unterschiedliche Kollagen-Scaffolds in der Klinik für Bänder- und Sehnenchirurgie eingesetzt [31, 85]. Ferner ist bereits belegt, dass Kollagen-Scaffolds ein Grundgerüst bilden, in welches Tenozyten einwandern, proliferieren und neues Kollagen bilden können [85, 86]. Zusätzlich zeigen Studien, dass Kollagen-Scaffolds die mechanische Belastbarkeit erhöhen und dabei auch

zu einer Stabilisierung des Defekts in den ersten Wundheilungsphase beitragen [126]. Somit ist die Wahl eines biodegradablen Kollagen-Scaffolds als sinnvoll für weitere Untersuchungen zu bewerten.

2.5.1.3 Tenozyten

Auch biologische Faktoren scheinen eine wichtige Rolle im Heilungsverlauf von Sehndefekten zu spielen. Studien zeigten eine hohe Apoptoserate (34%) in Tenozyten von chronisch beanspruchtem Sehngewebe [43, 229].

Daher wird angenommen, dass zelluläre Unregelmäßigkeiten das Heilungsvermögen der Sehne beeinträchtigen [211]. Um geeignete Zelltypen zur Implantation auszuwählen sollten diese folgende Kriterien erfüllen: einerseits sollten sie aus autologem Gewebe gewonnen werden können, um eine host-versus-graft Reaktion zu vermeiden. Andererseits sollten sie wachstums- und lebensfähig *in vitro* und *in vivo* sein [216]. Unter Beachtung dieser Kriterien sind Stammzellen und Tenozyten besonders für weitere Untersuchungen geeignet.

Die Verwendung von Tenozyten hat hierbei den Vorteil, dass sie EZM der Sehne produzieren können. Bei mesenchymalen Stammzellen ist hingegen das Risiko gegeben, dass eine Differenzierung in sehnenfremdes Gewebe stattfindet. Des Weiteren nimmt die Verfügbarkeit von Stammzellen im Alter ab und zeigt damit keine geeignete Therapie bei Sehndefekten aufgrund Altersdegeneration [169]. Auch konnte bei Pietschmann et al. [114] gezeigt werden, dass Tenozyten gegenüber Stammzellen zu einer weitaus höhere Kraftregeneration und Beanspruchung im stimulierten Gewebe führen. Da kein spezifisches Gen oder Protein für Tenozyten vorhanden ist, ist es kaum möglich Tenozyten zelluläre Prozesse direkt zuzuweisen. Pauly et al. [172] charakterisieren das Expressionsmuster von Tenozyten anhand PCR gegenüber Chondrozyten und Osteoblasten. Dabei wurde eine geringere Kollagen III-, Decorin-, Tenascin C, und eine hohe Kollagen I-Expression nachgewiesen. So kann auch ohne Marker ein Vorhandensein von Tenozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten Schulze-Tanzil et al. [193] dass eine Kultivierung von autologen Tenozyten in der Zellkultur

möglich ist. Eine Implantation von autologen Tenozyten in Sehndefekte der RM oder der Achillessehne von Kaninchen ergab in Studien einen schnelleren Abbau des Kollagen-Scaffolds, eine höhere Kollagen I-Produktion und eine geringere Entzündungsreaktion [42, 35]. Zusätzlich ähnelte das Gewebe der Struktur einer gesunden Sehne und die mechanische Belastbarkeit verbesserte sich [41]. Auch wird beschrieben, dass Tenozyten die Eigenschaften eines Kollagen-Scaffold verbessern und dessen Degeneration reduziert [209]. Somit kann mit Tenozyten zusätzlich zu einem Kollagen-Scaffold eine schnellere Regeneration und höheres Sehnenremodelling erreicht werden [169, 189].

Da diese Untersuchungen bisher aber nur in Kleintieren mit gewissem Selbstheilungspotential und kleinen anatomischen Strukturen durchgeführt wurden ist die Übertragung auf das Großtiermodell hieraus resultierend.

2.6 Großtiermodell Schaf

Tiermodelle helfen Pathologien zu verstehen, neue Techniken wie Scaffolds und Zellimplantationen zu untersuchen und Heilungsverläufe zu erforschen [66]. Schafe sind dabei gute Versuchstiere für Großtiermodelle, auf Grund ihrer Verfügbarkeit, einfachen Handhabung und Akzeptanz in der Gesellschaft [212]. Für die Erforschung der RMR und vor allem der Supraspinatusruptur ist die Infraspinatussehne des Schafes von großer Bedeutung, da diese große Ähnlichkeit zu der menschlichen Supraspinatussehne aufweist [84, 212].

3 Material und Methoden

3.1 Übersicht

3.1.1 Vorversuche

In den Vorversuchen sollte einerseits die Besiedlungsmöglichkeit des Kollagen-Scaffolds nachgewiesen und andererseits die Verteilungstendenzen der Zellen im Scaffold sichtbar gemacht werden. Dafür wurden folgende Untersuchungsschritte ausgeführt:

- 1) Entnahme einer Gewebeprobe aus der Supraspinatussehne von Schafen
- 2) Enzymatischer Verdau, Kultivierung, Zählung und Besiedelung auf dem zu testenden Kollagen-Scaffold
- 3) Anfertigung von Kryoschnitten aus der Innen-, Außenseite und Mitte
- 4) Anfärbung mit Toluidinblau
- 5) Untersuchung und fotografische Dokumentierung unter dem Elektronenmikroskop

In diesen Versuchen zeigte sich, dass Tenozyten eine gute Adhäsion im Scaffold zeigen und tief in das Kollagengeflecht eindringen. Des Weiteren bleiben die Zellen auch nach dem Schneiden und Färben im Kollagenvlies haften. Daher kann angenommen werden, dass ein in einen Sehndefekt implantiertes Vlies ein gutes Gerüst zur Zelladhäsion sowie Zellproliferation für die Tenozyten darstellt.

In Abb. 1 ist das Scaffold im Elektronenmikroskop unter Toluidinblaufärbung abgebildet. Es ist zu erkennen, dass sowohl an der Membran- wie auch an der Schwammseite die Zellen einwandern und bis ins Kollagengeflecht vordringen.

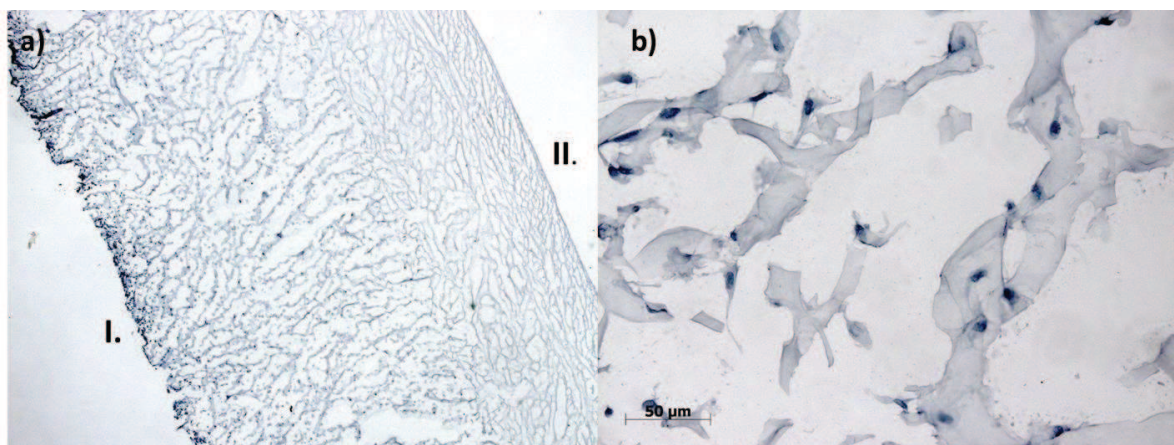


Abb. 1. Darstellung der Scaffoldbesiedlung, Toluidinblau Färbung mit 200-facher und 400-facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop fotografiert:
a) I. Besiedlung der Schwammseite, II. Seite der Membran
b) Darstellung der einzelnen Zellen im Schwamm mit 400-facher Vergrößerung

Als weiterer Vorversuch wurde die Kryoschnidetechnik mit der Paraffintechnik für Sehngewebe verglichen und sich daraufhin für Paraffinschnitte entschieden, da in diesem die Faserstruktur der Sehne besser erhalten blieb und diese Schnitte weniger Artefakte aufwiesen.

Zur Besiedlung des Scaffolds mit den Tenozyten wurden sich für das folgende Modell nach Abb. 2 entschieden:

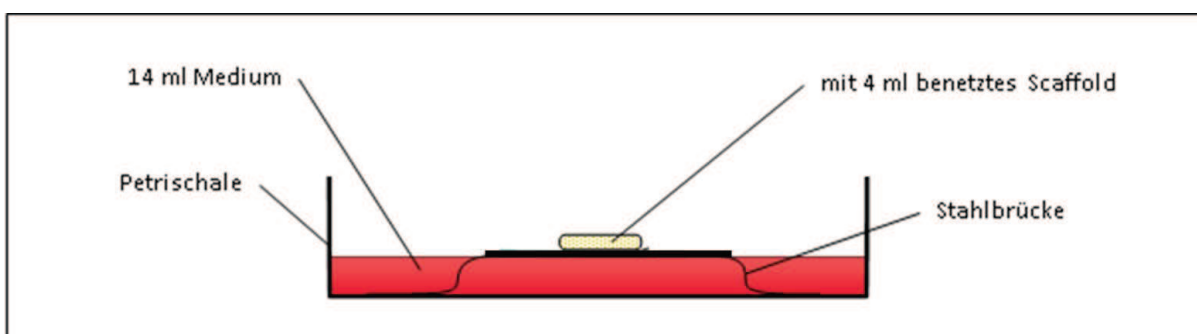


Abb. 2. Besiedlungsmethode [176]

Dabei wird das Scaffold mit der Schwammseite nach oben auf einer Stahlbrücke platziert. Sowohl auf als auch unter das Scaffold wird Medium hineingegeben. Insgesamt waren in 18 ml Medium 10×10^6 Tenozyten vorhanden.

3.2 Hauptversuch

Für die Hauptversuche standen 24 ausgewachsene weibliche Merinoschafe zur Verfügung. Diese wurden in drei Gruppen mit je acht Schafen aufgeteilt. In allen Gruppen wurde ein „critical-size“-Defekt in die Infraspinatussehne der Schafe gesetzt.

Dabei unterschied sich die Operationmethode für die einzelnen Gruppen wie folgt:

1. Gruppe → Defektsetzung = *Defektgruppe (Defekt)*
2. Gruppe → Defektsetzung + Implantation Kollagen-Scaffold = *Scaffoldgruppe (SC)*
3. Gruppe
 1. Teil: → Patellasehnenbiopsie → Kultivierung der Tenozyten,
 2. Teil: → Defektsetzung → Besiedlung des Scaffolds → Implantation des besiedelten Kollagen-Scaffolds = *Tenozytengruppe (SC+TZ)*
4. Gruppe → Für die Kontrolle wurde die kontralateralen Infraspinatussehnen der Versuchstiere verwendet = *Kontrollgruppe (Nativ)*

Postoperativ folgte eine Heilungsphase von 12 Wochen.

In der nachfolgenden Abb. 3 sind die drei Operationsmethoden von Defekt-, SC- und SC+TZ Gruppe schematisch und jeweils darunter mit intraoperativem Beispiel dargestellt. Für die Implantation des Scaffolds wurde dieses genau in der Mitte gefaltet, die basale Verstärkungsmembran kam somit artikulär- als auch bursaseitig zu liegen.

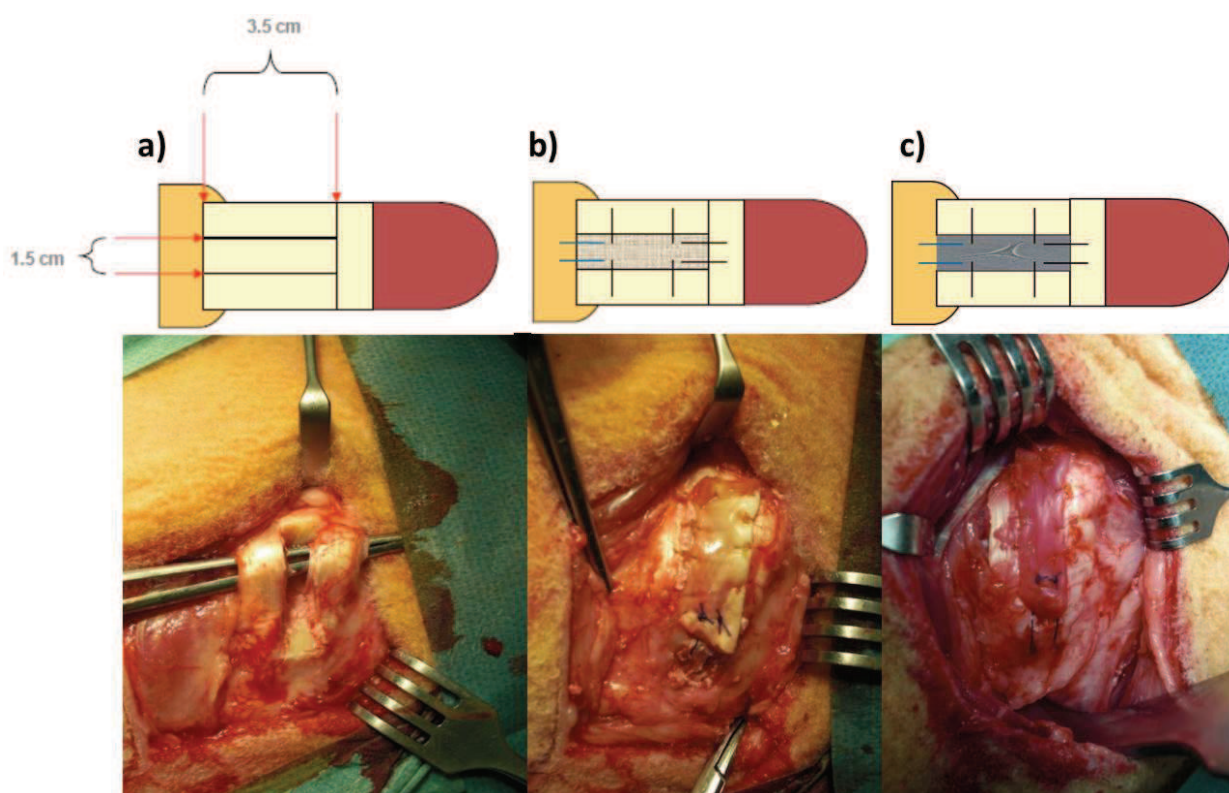


Abb. 3. Verwendete Operationsmethoden; a) Defekt, b) SC, c) SC+TZ

3.3 Auswertungsmethoden

Nach der Regeneratsentnahme wurden folgende Auswertungsmethoden durchgeführt:

- Makroskopische Beurteilung aller Regenerate
- Biomechanische Testung [n = 6 je Gruppe]
- Histologische und immunhistologische Auswertung
 - Auswertung der Ursprungssehne [n = 2 je Gruppe]
 - Auswertung der biomechanisch getesteten Sehnen [n = 6 je Gruppe]

Die operativen Maßnahmen sowie die perioperativen tierpflegerischen Tätigkeiten fanden im Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität statt. Die biomechanischen und histologischen Auswertungen

wurden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, vorgenommen. Eine detaillierte Aufstellung der verwendeten Materialien und Versuchsobjekte sowie Herstellerangaben findet sich im Anhang C.

3.4 Präoperative Maßnahmen

3.4.1 Trägermatrizen

Das verwendete Kollagen-Scaffold (Fa. JOTEC GmbH, Hechingen, Deutschland) setzt sich laut Herstellerangaben aus zwei verschiedenen Teilen zusammen. Einerseits aus einer 0,4 mm dicken abdeckenden Membran und andererseits aus einem 2 mm dicken Schwamm mit säulenartig angeordneten, untereinander verbundenen 90-130 µm großen Poren (siehe Abb. 4). Die Membran besteht aus Kollagen I, dieses wurde aus Rinderperikard gewonnen. Die Membran ist dabei über einen Lyophilisationsprozess mit dem Schwamm verbunden und hält die Verbindung somit stabil. Der Schwamm besteht ebenfalls aus Kollagen I und ist hierbei aus Rinderhaut isoliert worden. Durch ein spezielles Aufbereitungsverfahren wurden die Komponenten von nicht-kollagenen Bestandteilen gereinigt.

Die säulenartig ausgerichteten Poren des Schwamms haben die Aufgabe das Einwachsen der Zellen in den Defekt zu begünstigen und eine Leitlinie zu bilden. Die reißfeste und nässe stabile Membran soll sowohl das Eindringen unspezifischer Bindegewebszellen in den Defektbereich, als auch die ungezielte Verbreitung der implantierten Zellen über die entsprechende Seite verhindern. Die mechanische Stabilität der Membran soll zusätzlich den Schwamm und die darin enthaltenen Zellen vor Scherbeanspruchungen schützen.

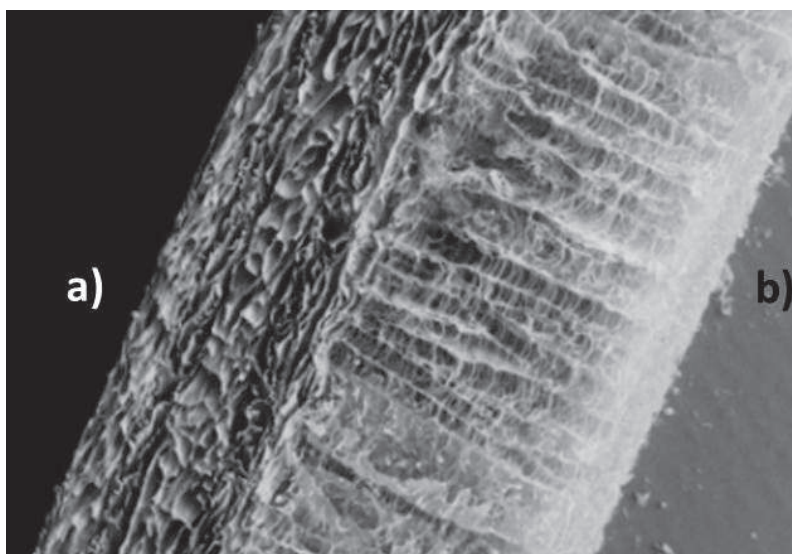


Abb. 4. Rasterelektronenmikroskopisches Bild des Scaffolds: Foto: JOTEC GmbH, Hechingen,
a) Membran,
b) Schwamm

3.4.2 Verwendete Zellen

Zur Gewinnung der autologen Tenozyten wurden in einer vorangegangenen Operation eine Biopsie der Patellasehne der Tiere der Gruppe 3 entnommen. Nach Entnahme erfolgte die Isolierung der Tenozyten durch einen enzymatischen Gewebeverdau nach einem modifizierten Protokoll nach Cao et al. [34, 36]. Die präparierten Sehnenstücke wurden im Folgenden in Kollagenase I (0,1 %) bei 37°C, 5 % CO² und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank für 15 h inkubiert. Sobald die Sehnenstücke sichtbar zersetzt waren, wurde der Verdau beendet und die Zellsuspension über einen Zellfilter (100 µm) filtriert. Anschließend wurde die gereinigte Suspension bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach erneutem Waschen der Zellpellets wurde dieses in 5 ml Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Tenozyten trypsinisiert um sie in Passage 1 auf das Scaffold zu geben.

3.5 Implantatbesiedelung

Die Implantatbesiedelung folgte einem modifizierten Protokoll von Shakibaei et al. [195], welche vormals für eine *3D-high density* Kultur etabliert worden war. Shakibaei et al. hatten mit dieser Methode eine Simulation für mesenchymale Stammzellen generiert, die durch eine Aufhängekonstruktion an der Luft-Medium-Grenze durch freie Diffusion ernährt worden waren und durch ihre hohe Dichte einen chondrogenen Stimulus erfahren hatten. Dasselbe Modell wurde bereits für Tenozyten [193] verwendet, ebenfalls um einer *in-vivo* Situation näher zu kommen. Durch das von Shakibaei etablierte 3D-Modell konnten sich die Zellen auf der Trägermatrix fixieren, ohne dass sie vom Medium weggespült wurden. Des Weiteren war eine Ernährung der Zellen in der Zeit bis zur Operation durch Diffusion aus dem Medium möglich.

Daher wurde für die Besiedelung des Scaffolds der Boden der Petrischale mit 14 ml Medium bedeckt und darüber ein leicht erhöhtes Gitternetz gelegt (siehe Abb. 5). Auf das Gitter wurde dann das 3,5×3 cm große Vlies platziert und darauf 4 ml Medium gegeben. Insgesamt erhielten 10 ml Medium 10×10^6 Zellen.

Die Kollagenmatrizen wurden dabei mit der Membranseite nach unten gelegt, um die Zellen in die Poren der schwammartigen Seite zu bringen. Um einen Mittelweg zu finden, in dem sich die Zellen effizient an der Trägermatrix adhären konnten, ohne einen relevanten Differenzierungsstimulus zu erfahren, wurde eine präoperative Adhäsionszeit von 48 h gewählt, in der die Trägermatrize im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde.

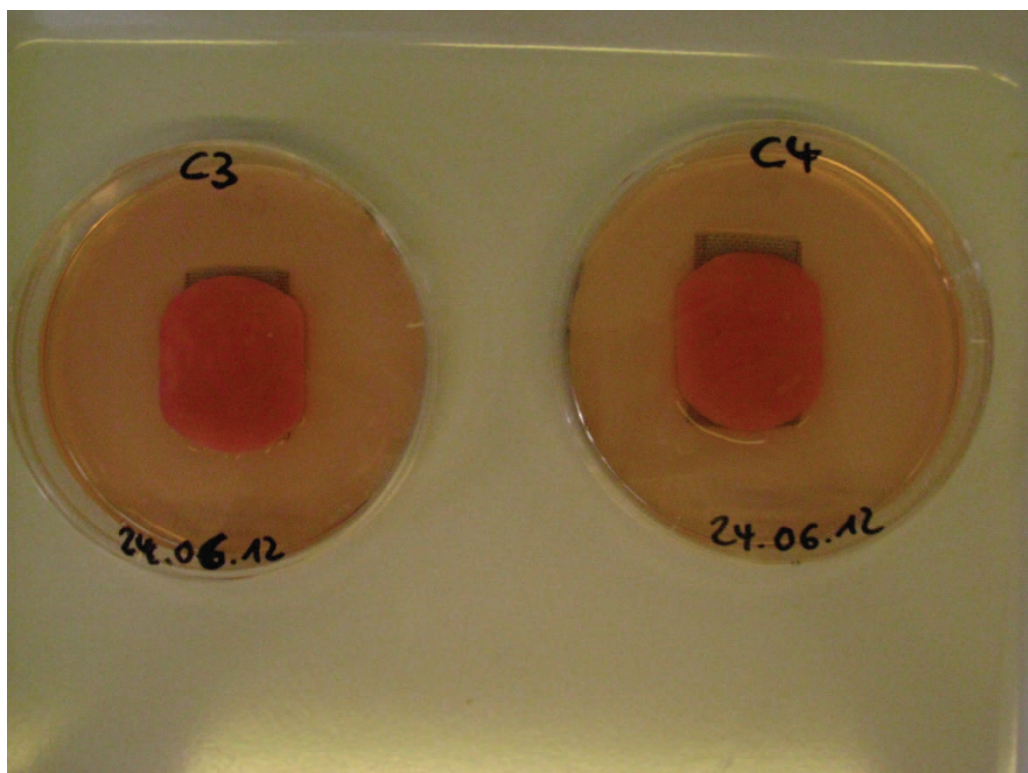


Abb. 5. *In vitro*-Scaffoldbesiedlung

3.6 Operationen

3.6.1 Versuchstiere

Das Versuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) der Regierung von Oberbayern genehmigt (TVA-Nr. 55.2-1.54-2531-07-10). Alle Eingriffe wurden gemäß des Tierschutzgesetzes (TierSchG) sowie den Behandlungsstandards des Tierversuchslabores am Institut für Chirurgische Forschung durchgeführt. Als Versuchstiere wurden 24 weibliche Merinolandschafe im Alter von durchschnittlich 3,5 Jahren und einem Durchschnittsgewicht von 75-80 kg verwendet.

Die Haltung der Schafe im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums erfolgte in einem Stall von 12 m² Größe zu je 8 Versuchstieren. Während der Unterbringungszeit im Walter-Brendel-Zentrum hatten die Schafe keinen Kontakt zu anderen Tieren. Die Schafe wurden auf Stroheinstreu gehalten, was in kurzen Zeitabständen erneuert

wurde. Die Fütterung erfolgte mit speziellem Schaffutter ad libitum (Heu und oder Silage des Herkunftsbetriebes sowie handelsübliche Pellets). Frisches Leitungswasser war über automatische Tränken (wie im Herkunftsbetrieb) jederzeit verfügbar. Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

Die Tiere konnten sich vor und nach der Operation im Stall frei bewegen. Die Räumlichkeiten für die Stallhaltung wurden mit Standardparametern klimatisiert ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, 45-60 % relative Luftfeuchte, 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus). Alle Räume waren speziell für die Tierhaltung (gem. § 11 Abs. 1 Satz 2 Nr. 3 TierSchG) zugelassen und die artgerechte Pflege wurde von ausgebildetem Tierpflegepersonal (gem. § 11 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 TierSchG) gewährleistet. Für die Nutzung der gesamten Anlage galten generell eine personenlimitierte Zutrittskontrolle und hohe Hygienestandards, die das Anlegen spezieller Schutzkleidung bei Betreten der Haltungs- und Operationsräume vorschreiben.

In der Schafzucht von Familie Schleich wurden die Tiere in Gruppen in einem separaten Versuchstierstall gehalten und mit Futter aus eigener Herstellung versorgt. Die externe Haltung in Brunenthal erfolgte erst nach einer postoperativen Beobachtungszeit von ca. sieben Tagen im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums, sofern die Tiere ein gutes Allgemeinbefinden aufwiesen und transportfähig waren. In Brunenthal erfolgte eine engmaschige Überwachung durch den Schafhalter sowie die laboreigene Tierärztin.

3.6.2 Operatives Vorgehen

Alle Operationen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Stoffabdeckungen, die Kittel und das chirurgische Instrumentarium wurde präoperativ nach Standardsterilisationsprogramm (bei 134°C und 2 bar) sterilisiert. Die Zuteilung der Tiere zu den unterschiedlichen Gruppen erfolgte nach einem im Vorfeld festgelegten Randomisierungsschema. Die Schafe wurden 24 h vor der Operation nüchtern gehalten.

Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Vor den Operationen wurden die Versuchstiere zunächst mit Diazepam (0,4 mg/kg i.v.) sediert. Bei Bedarf wurde 1-2 ml Propofol gegeben, falls die Intubation sich als schwierig herausstellte. Die Tiere wurden Intubiert und eine Pansensonde gelegt. Die Narkose erfolgte durch Ketamin (4,0 mg/kg KG) und wurde mit 2% Isofluran aufrechterhalten. Zusätzlich wurde den Tieren Sauerstoff per Intubationsmaske kontinuierlich zugeführt. Im Anschluss an die Narkose wurden die Rasur der rechten Schulter und die Desinfektion in Linksseitenlage vorgenommen. Nach steriler Abdeckung begann die Operation mit einem ca. 8 cm langen Hautschnitt an der ventrolateralen Seite des M.deltoides des rechten Vorderlaufes. Unter Blutstillung erfolgte die stumpfe Freilegung der Rotatorenmanschette und Identifizierung der Sehne des M.infraspinatus. In der ersten Gruppe wurde ein „critical-size“-Defekt mit Ausdehnung von 3,5x1,5 cm (Länge mal Breite) gesetzt. In der zweiten und dritten Gruppe wurde das Kollagen-Scaffold (besiedelt vs. unbesiedelt) implantiert. Danach erfolgte ein schichtweißer Wundverschluss. Die Operationsdauer betrug ca. 30 Minuten pro Tier. Die Tiere erhielten präoperativ Cefuroxim (750 mg + 100 ml NaCl/Tier) i.v., als Analgetikum Metamizol (25 mg/kg) und Ringerlösung als Dauertropf.

Nach Beendigung der Inhalationsnarkose wurde die Pansensonde entfernt. Etwaige Ansammlungen von Speichel oder Pansensaft in der Maulhöhle wurden sorgfältig abgesaugt und das Tier in Brustlage verbracht. Die Extubation erfolgt erst nach vollständigem Wiedereinsetzen des Schluckreflexes. Bis zur sicheren Stehfähigkeit wurden die Tiere überwacht. Die Tiere erhielten direkt postoperativ Buprenorphin (0,01 mg/kg KGW s.c.), und Ketoprofen (3 mg/kg KGW s.c.) einmal täglich über drei Tage (im Einklang mit GV-SOLAS, Ausschuss für Anästhesiologie: Schmerztherapie bei Versuchstieren, Juni 2010).

Es erfolgte postoperativ keine Immobilisierung der operierten Gliedmaße. Die Fadenentfernung wurde am 12. postoperativen Tag durchgeführt. Die Tiere wurden bezüglich Ihrer Beweglichkeit und ihres sozialen Verhaltens in den folgenden Wochen täglich beobachtet.

3.7 Versuchsdurchführung und Gewinnung von Proben

3.7.1 Gewinnung und Vorbereitung der Schafschultern

12 Wochen postoperativ wurden die Tiere im Pathologischen Institut der Tiermedizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität mit einer Kombinationsinjektion aus Propofol, Pentobarbital (Nacoren) (80 mg/kg KGW i.v.) und 40 ml Kaliumchlorid euthanasiert. Die Schultern wurden direkt im Pathologischen Institut vom Rumpf abgetrennt und unter indirekter Eiskühlung ins Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie gebracht.

Im Labor wurden die Schafschultern umgehend freipräpariert, so dass der Humerus mit ansetzender Infraspinatussehne und Muskel beurteilt werden konnte, siehe Abb. 6. Zur besseren Beurteilung der Sehne wurde der Muskel mit einem Skalpell vorsichtig von der Sehne abpräpariert. Ferner wurde im Anschluss daran auch die dazugehörige kontralaterale gesunde Schulter zum direkten Vergleich freipräpariert.

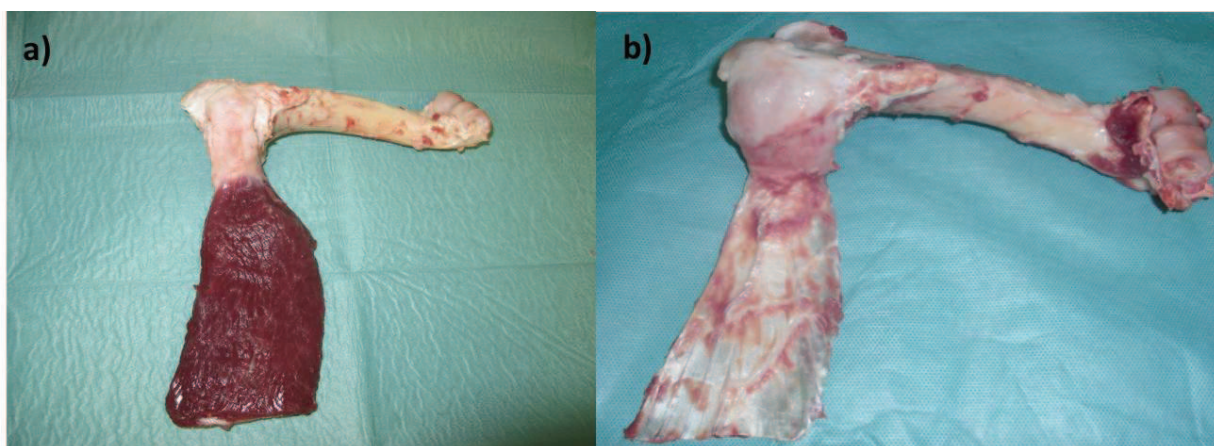


Abb. 6. a) Humerus-Sehne-M.infraspinatus, b) Freipäparierte Sehne mit Humerus

3.7.2 Makroskopische Beurteilung

Die entnommenen Regenerate wurden makroskopisch bezüglich ihrer Farbe, palpablen Härte und des äußeren Erscheinungsbildes qualitativ examiniert. Des Weiteren

wurden Länge und Querschnittsfläche sowie der Übergang zwischen Regenerat und nativer Sehne beurteilt. Zwei Präparate der jeweiligen Gruppen wurden direkt, ohne biomechanische Testung zur histologischen Auswertung gegeben. Die verbliebenen sechs Präparate wurde biomechanisch getestet und diese danach für die histologische Beurteilung des Rupturmechanismus vorgesehen.

3.7.3 Biomechanische Testungen

Alle Sehnenregenerate wurden direkt nach der Präparation den biomechanischen Testungen unterzogen, um die Ergebnisse durch Austrocknung nicht zu beeinflussen. Zusätzlich wurden pro Tag nur zwei Schafe euthanisiert, präpariert und biomechanisch getestet, um die Liegezeit so kurz wie möglich halten zu können. Für die Einspannung in den Längenänderungsaufnehmer wurde eine speziell angefertigte Halterung verwendet, mit der sich der Knochen fixieren ließ, siehe Abb. 7 und 8.

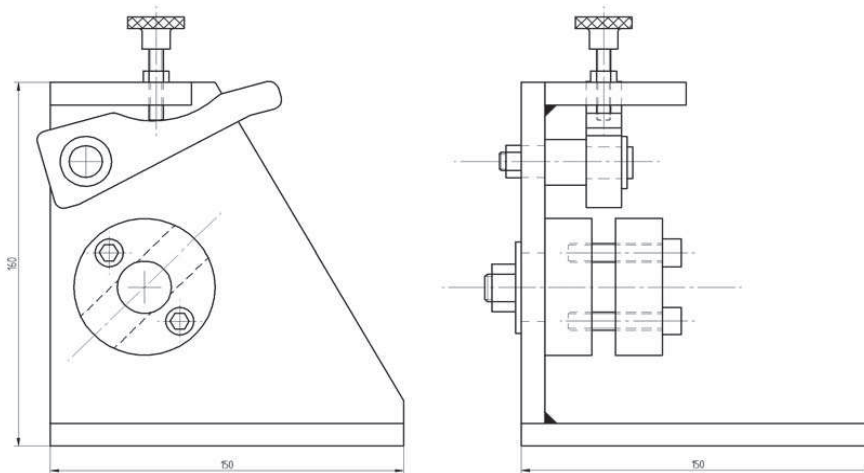


Abb. 7. Schematische Darstellung der Halterung [76]

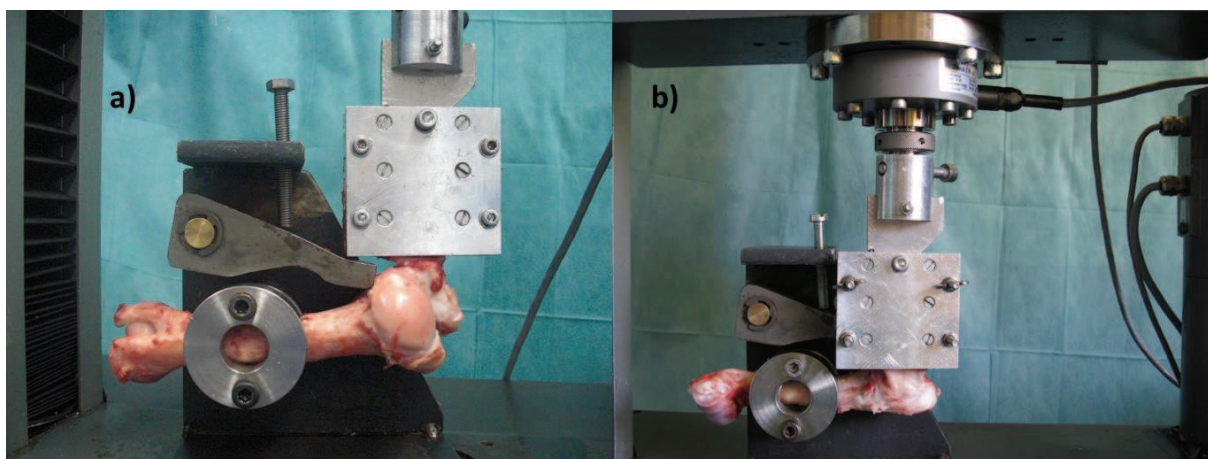


Abb. 8. a) Versuchsaufbau, b) Versuchsaufbau mit Zugkraftmesseinrichtung

Die Versuche zur Festigkeitsbestimmung der Sehnen wurden mit der Universalprüfmaschine Nr. Z010/Tn“A der Fa. Zwick (Ulm, Deutschland) durchgeführt. Diese besitzt laut Herstellerangaben einen Messbereich von 20 N bis 10 kN und eine Messungenauigkeit von 0,21 %. Jede Probe wurde mit einer Vorlast von 10 N zur Präkonditionierung und einer linearen Zuggeschwindigkeit von 500 mm/min weggesteuert gedehnt und bis zum Versagen getestet. Die Daten wurden mit der zugehörigen Software (testXpert V5.0) aufgezeichnet und mit der GraphPad Prism-Software statistisch ausgewertet. Es wurden sowohl die Reißkraft als auch die Längenausdehnung gemessen. Als weitere biomechanische Werte wurden aus diesen Daten die Bruchspannung (Zugversagensspannung), die Bruchdehnung (Zugdehnung) und der Elastizitätsmodul (E-Modul) der jeweiligen Sehne errechnet, siehe Abschnitt 4.2.

3.7.4 Probenvorbereitung für die histologische Auswertung

Für die histologischen Auswertungen wurden die Proben in PBS fixiert und in Streifen geschnitten sowie mit einem Faden die Ausrichtung markiert. Dabei wurden die Präparate in zwei Gruppen aufgeteilt, da der Humerusknochen noch decalcifiziert werden musste. Insgesamt war das Präparat in sechs bis sieben Teile zu schneiden, um das Einbetten zu ermöglichen.

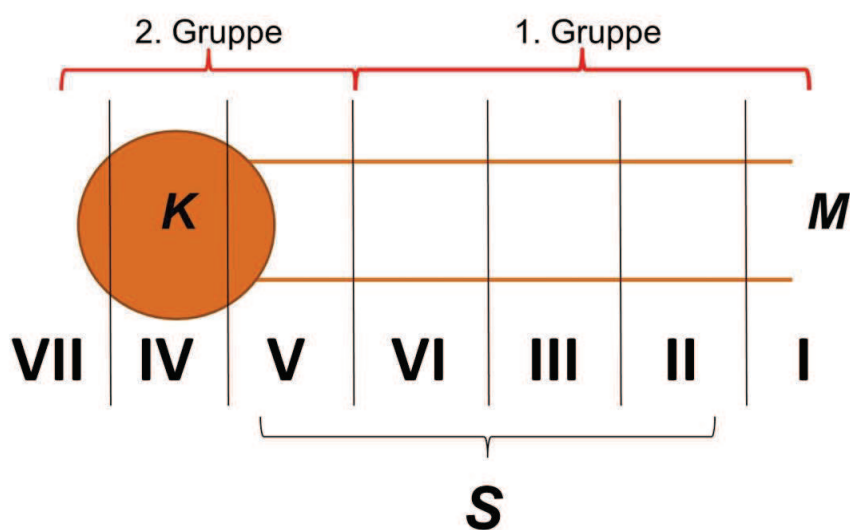


Abb. 9. Aufteilung der histologisch zu testenden Gruppen (Sehne = S, Knochen = K, Muskel = M)

Die Schnitte des Muskel-Sehnenübergangs und der Sehne wurden in Paraffin eingebettet und 5 µm Paraffinschnitte mit dem Mikrotom Leica RM 2255 (Nussloch, Deutschland) angefertigt (siehe Anhang A). Insgesamt wurden Schnitt II, V, VI und VII quer geschnitten. Damit sollte erreicht werden, dass einerseits die Sehne im Querverlauf begutachtet werden konnte und andererseits alle Teile an der Sehnen-Knorpel-Knochen-Grenze in einem Schnitt erfasst werden konnten. Von diesen wurden zunächst histologische Färbungen mit Hematoxylin/Eosin (HE), Picrosirius Red und Saffranin O (siehe Anhang A 1-10) zur Übersicht angefertigt. Zur weiteren Beurteilung wurden immunhistologische Färbungen nach Kollagen I, II, Tenascin C, Fibronectin und Osteopontin angefertigt (siehe Anhang A, Protokoll 11-15). Auch sollte ursprünglich eine Kollagen III-Färbung durchgeführt werden. Nach zahlreichen Versuchen wurde dies jedoch verworfen, da dieses nur mit Verwendung von Hitze möglich war, aber hierdurch die Präparate fast vollständig zerstört wurden und somit nicht mehr adäquat beurteilt werden konnten.

Der Sehnen-Knochen-Übergang wurde sechs Monate mit 20 % Citronensäure/EDTA (siehe Anhang A Protokoll 7) unter zweiwöchigem Entkalkerwechsel entkalkt. Anschließend konnte auch die zweite Gruppe geschnitten und gefärbt werden.

In Abb. 10 ist die Größe und das Aussehen der nativen abgetrennten Sehne und die geschnittene Sehne nach biomechanischer Testung abgebildet.

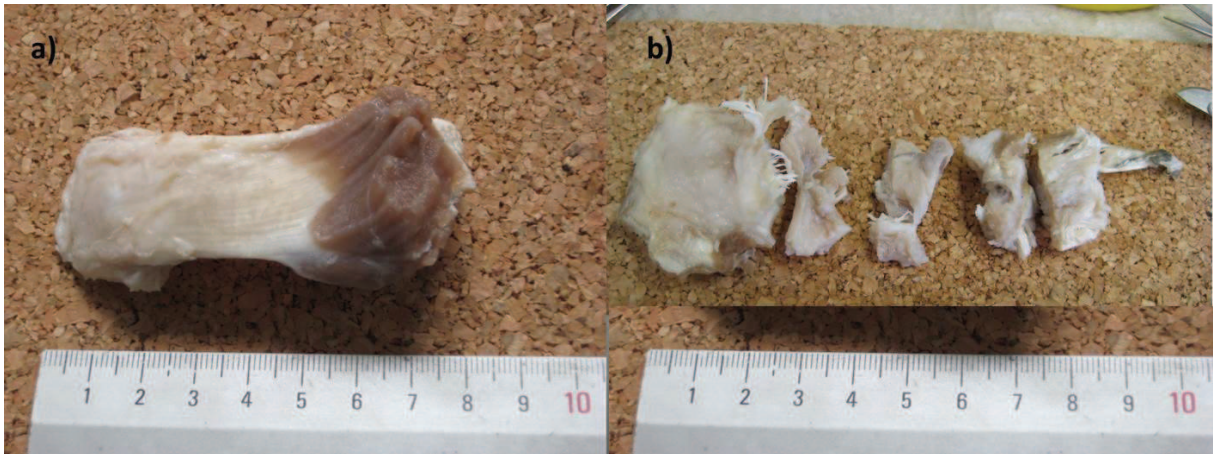


Abb. 10. a) C1 Nativ (abgetrennte Sehne), b) B8 SC nach Biomechanik (geschnitten)

4 Biomechanische Versuchsergebnisse

4.1 Makroskopische Beurteilung

In dem vorangegangenen Kapitel wurde die Operationsmethode (Abschnitt 3.6) und die Probengewinnung (Abschnitt 3.7) mit Aufbereitung und Isolation der Knochen-Sehnen-Muskel Sequenz (3.7.1) sowie die Grundlagen der biomechanischen Testung (3.7.3) beschrieben. Im Folgenden sind die makroskopische Beurteilung, die biomechanische Testung und die zugehörigen Ergebnisse zusammengestellt.

Bei der makroskopischen Beurteilung konnte in allen Regeneraten bereits nach Ablösung der Dermis erkannt werden, welche Schultern einer Operation unterzogen wurden. Bei den operierten Schultern, gleich welcher Gruppenzugehörigkeit, ließen sich die verschiedenen Faszien- und Muskelschichten schlechter voneinander lösen und eine leichte Verfettung war zu erkennen. Direkt an der Infraspinatussehne war in der Defektgruppe eine deutliche Verbreiterung und Verkürzung der Sehne gegenüber der Kontrollgruppe vorhanden (Abb. 11), wobei die Verbreiterung verschiedene Ursachen hat:

- a) Das umgebende inhomogene Gewebe war mit der Sehne verwachsen.
- b) Die äußeren Zügel der Sehne waren lateral mit dem Humerus verwachsen.
- c) Die Sehne war nicht mehr eindeutig abgrenzbar.

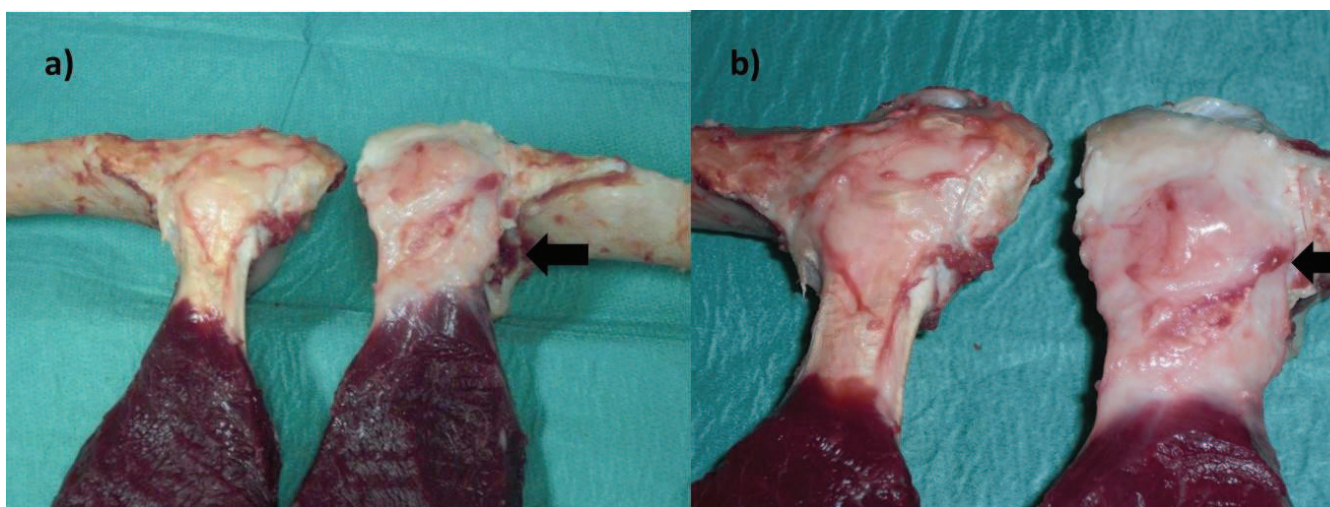


Abb. 11. Makroskopisches Begutachtung nach Präparation,
a) Links: Nativgruppe; rechts: Defektgruppe; 12 Wochen postoperativ (Pfeil = Sehne der Defektgruppe) b) Links: Nativgruppe; rechts: Defektgruppe in Naheinstellung

Bei näherer makroskopischer Betrachtung der Defektheilung konnte festgestellt werden, dass in allen drei Gruppen der Defekt noch sichtbar und klar von der bestehenden Sehne abzugrenzen war. Bezüglich der Defektgruppe konnten gegenüber der Scaffoldgruppe keine Unterschiede identifiziert werden.

Bei der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten war jedoch die Verbreiterung nur gering ausgeprägt und die Sehnen behielten eine deutlich schlankere Form. Auch konnte in der dritten Gruppe ein homogenerer und ausgerichteter Faserverlauf im Defektbereich makroskopisch beobachtet werden. Farblich war hier der Defektbereich heller im Vergleich zur Defektgruppe und zu der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold.

Palpatorisch fühlte sich der ehemalige Defektbereich in der dritten Gruppe härter und gerichteter an. Hier war der Unterschied zwischen Defektbereich und den Seitenrändern der Sehne geringer als in der Scaffold- und Defektgruppe, da in diesen Gruppen das Gewebe im Defektbereich der operierten Sehnen palpatorisch sehr weich war und sich in einer hellrosa Farbe darstellte. In Abb. 12 wird diese Beobachtung bildlich veranschaulicht.

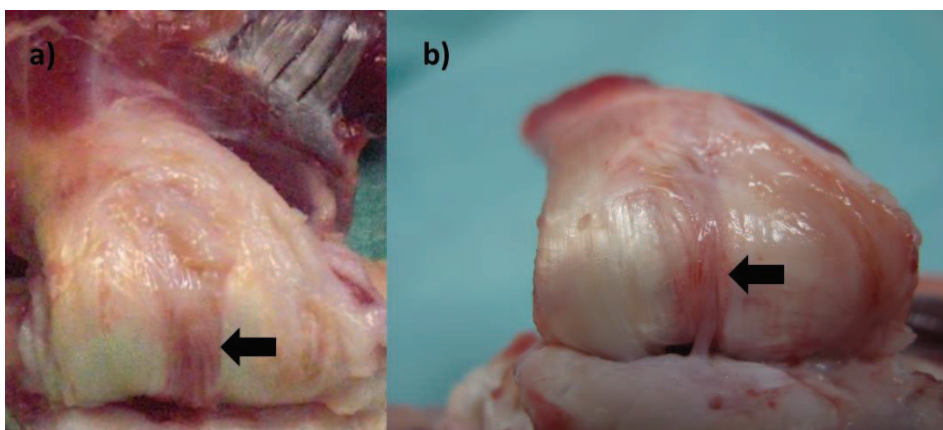


Abb. 12. a) Defektgruppe, b)Tenozytengruppe, (Pfeil = ehemaliger Defektbereich)

4.2 Zugversuche und Ableitung von (mechanischen) Kenngrößen

Wie bereits im Abschnitt 3.7.3 erläutert wurden in den biomechanischen Testungen jeweils die Reißkraft und die Längenausdehnung der untersuchten Sehnen gemessen. Abb. 13 zeigt dazu beispielhaft als Ergebnisplot eine Versuchskurve mit der gemessenen Zugkraft (N) und dem Dehnungsweg (mm). Dabei zeigt die rote Klammer den Bereich der Werte an mit dem die Bruchdehnung, Bruchspannung und E-Modul berechnet wurden. Der blaue Punkt zeigt hierbei den Spitzenwert der Reißkraft auf.

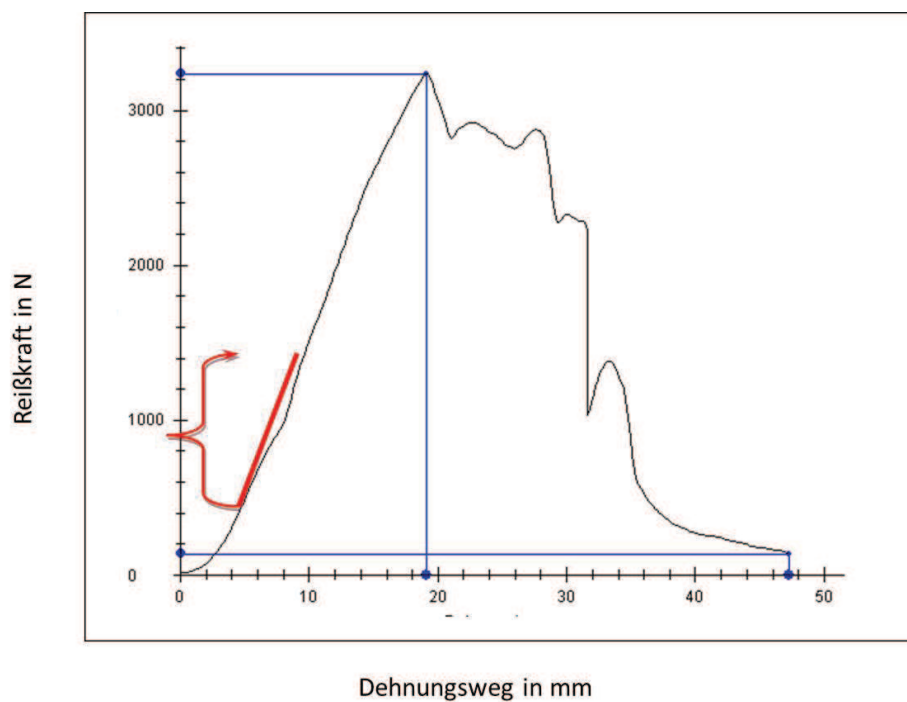


Abb. 13. Beispiel einer Ergebniskurve aus den Sehnen-Zugversuchen

Um für die hier vorliegende Fragestellung im Hinblick auf das Schädigungs- und Regenerationsverhalten der Sehnen weitere quantitative Vergleichsparameter zu erhalten, wurden aus den Versuchskurven ergänzend auf der Grundlage des Hookeschen Gesetzes (eindimensionale Elastizitätstheorie) noch weiteren mechanische Kenngrößen abgeleitet, die wie folgt definiert und in Abb. 14 dargestellt sind.

a) *Bruchdehnung*

Die Bruchdehnung normiert den Zugdehnungsweg auf die Ausgangslänge der Sehne und wird hier in Prozent angegeben.

b) *Bruchspannung*

Die Bruchspannung beschreibt die Zugkraft dividiert durch die Ausgangsquerschnittsfläche der Sehnen in N/mm^2 .

c) E-Modul (Steifigkeit)

Der E-Modul in N/mm^2 ist der Quotient aus Spannungen in N/mm^2 geteilt durch Dehnungen als Dezimalwert. Dabei orientiert sich der E-Modul nicht, wie die Bruchdehnung und Bruchspannung am Maximum, sondern an einen Bereich im Vorbruchzustand in dem eine gleichmäßige Steigung der Versuchskurven vorhanden ist, siehe beispielhaft Abb. 13 und 14 (rote Markierungen). Nach Sichtung aller Versuchskurven wurde dieser Bereich zwischen 500 und 1500 N festgelegt, da

- alle Versuche diesen Bereich enthielten und
- die Versuchskurven in dem Bereich nahezu gradlinig verlaufen.

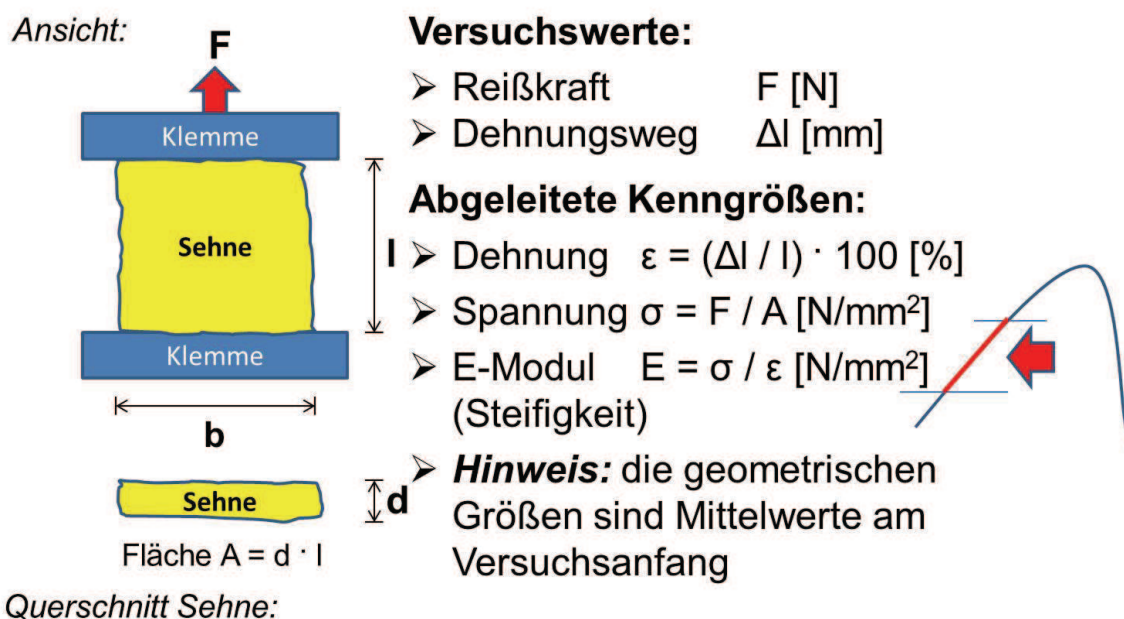


Abb. 14. Zusammenstellung der Formeln für die abgeleiteten Kenngrößen

Für die Ausgangsfläche A und die Ausgangslänge l wurden gemessene Mittelwerte festgelegt. Die Ausgangsfläche betrug dabei im Mittel $A = 150 \text{ mm}^2$ (25 mm x 6 mm) und die Ausgangslänge $l = 25 \text{ mm}$.

4.3 Statistische Auswertung der Versuchsdaten und der Kenngrößen

4.3.1 Allgemeines

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism, Version 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die Berechnung der Unterschiede zwischen den biomechanischen Werten wurde mittels Wilcoxon-U-Test durchgeführt. Dabei wurden vorher die Gruppen bestimmt, die gegeneinander getestet werden sollten. Hier wurde die Nativgruppe gegen die Defektgruppe ausgewählt und mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ getestet. Wenn dieses signifikant war, konnten weitere Gruppen ebenfalls mit diesem Signifikanzniveau untersucht werden. Bei dem Wilcoxon-U-Test handelt es sich um einen nicht parametrischen Test für unabhängige Variablen.

Die Darstellung der somit aus der Auswertung zusammengefassten Daten erfolgt mittels Column Diagrammen mit Mean 95 % CL.

4.3.2 Reißkraft

Die Reißkraft ist definiert als maximale Zugkraft die aufgebracht werden muss, um ein Reißen der Sehnen zu bewirken und ist der Peakwert aus der beispielhaften Versuchskurve nach Abb. 13. Folgende Ergebnisse sind aus den Versuchen abzuleiten, siehe auch Abb. 14 und 15 sowie Tabelle 1 in Abschnitt 4.3.7:

- Für die Nativgruppe musste die höchste Zugkraft aufgebracht werden.
- Die geringste Festigkeit wies dagegen erwartungsgemäß die Defektgruppe auf.
- Die SC Gruppe zeigte gegenüber der Defektgruppe nur einen geringen Unterschied.
- Die SC+TZ Gruppe zeigte deutlich höhere Werte und näherte sich der Nativgruppe an.

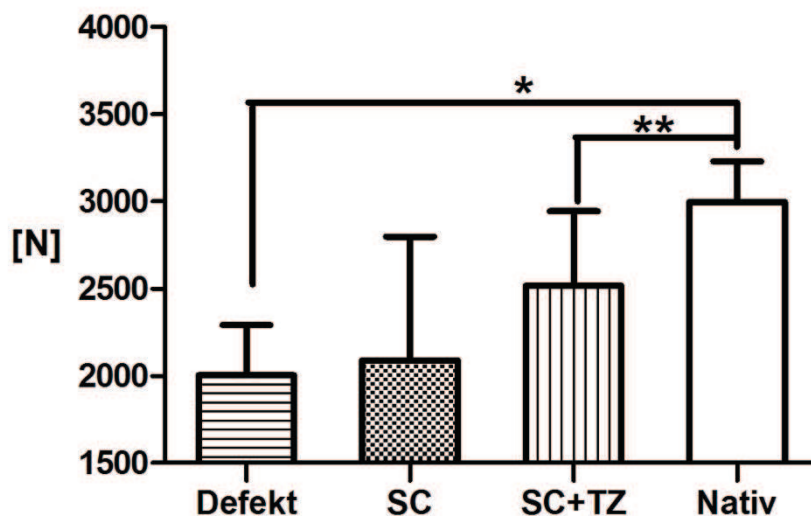


Abb. 15. Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede der Reißkraft zwischen den Sehnggruppen, $p^*=0,0313$ signifikant, $p^{**}>0,05$ nicht signifikant

Abbildung 15 zeigt, dass der Interquartilabstand sehr groß ist, also die Werte insgesamt eine große Streuung besitzen. Das repräsentiert auch, dass die Sehne ein sehr inhomogenes Gewebe ist und die hier vorliegende geringe empirische Fallzahl begünstigt das nicht immer signifikante Ergebnis. Statistisch kann gezeigt werden, dass die Sehnen der Defektgruppe signifikant schlechter waren als die nativen Sehnen, die Sehnen der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten waren jedoch nicht signifikant schlechter als gesunde Sehnen. Die Werte der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten zeigten eine deutliche Tendenz hin zu den Werten der nativen Sehnen.

4.3.3 Dehnungsweg

Der Dehnungsweg ist die maximale Längenänderung bis zum Zugversagen (Bruch) der Sehne. Hierbei zeigte sich, dass bei der Nativgruppe die höchste Längenänderung vor dem Ausreißen der Sehne gemessen wurde und die Defektgruppe die geringste Längenänderung aufweist, siehe Abb. 16. Dies deutet auf ein sprödes Gewebe der Defektgruppe hin. Die Nativgruppe ist dagegen elastischer und reißfester.

Bezüglich der Längenausdehnung konnte zwar keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden, aber auch hier zeigt sich, dass die Werte der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten denen der nativen Sehne am nächsten kommen.

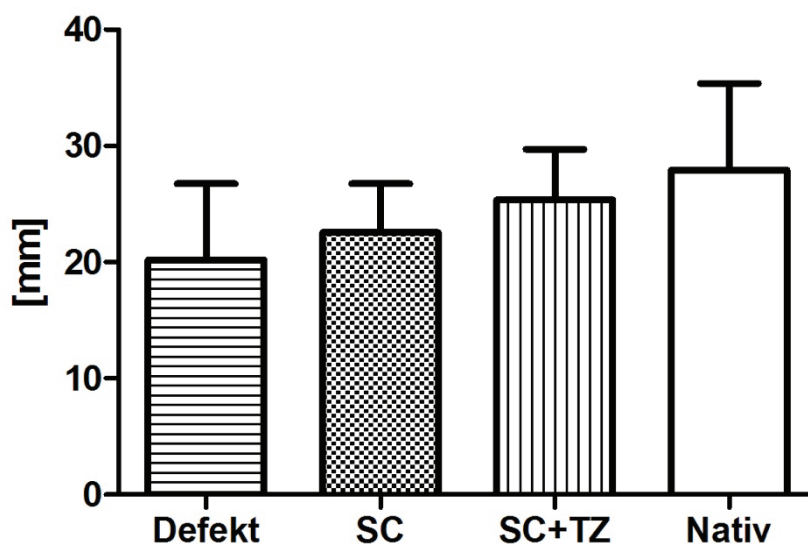


Abb. 16. Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede im den Dehnungsweg der Sehnen in allen Gruppen, $p > 0,05$

4.3.4 Bruchdehnung

Die Dehnung beschreibt die Änderung der Sehnenlänge bezogen auf die Ausgangslänge. Im Hinblick auf die Bruchdehnung beim Zugversagen folgt aus den Werten der Dehnungswege nach Abschnitt 4.3.3, dass bei den untersuchten Proben die geringsten prozentualen Werte bei der Defektgruppe zu beobachten ist, wogegen die Nativgruppe deutlich größere Bruchdehnungen erreichte, siehe Abb. 17. Dies verdeutlicht erneut, dass nicht operierte Sehnen die Fähigkeit besitzen, sich zu dehnen und elastisch zu verhalten. Diese Fähigkeit wird bei den operierten Sehnen vermutlich verringert durch:

- eine geringere Sehnenfläche
- Entzündungsprozesse
- Verwachsungen

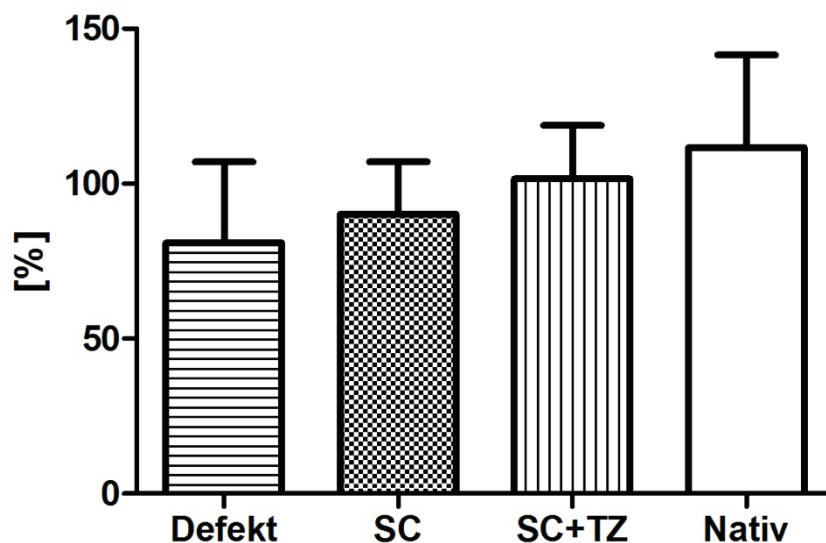


Abb. 17. Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede in der Bruchdehnung aller Gruppen, $p > 0,05$

In der Gruppe mit unbesiedeltem Scaffold war diese Eigenschaft kaum besser ausgebildet. Daraus kann geschlossen werden, dass das Scaffold alleine noch keine größere Sehnenfläche hervorbringt oder den Entzündungsprozess inhibiert.

Bei der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten waren dagegen bessere Ergebnisse zu verzeichnen. Dieses könnte darauf hindeuten, dass die Tenozyten, wie auch schon makroskopisch beobachtet, eine Synthese von Sehngewebe starten und daher die Sehnenfläche wieder zugenommen hat. Dies wurde in der histologischen Auswertung weiter untersucht, siehe Abschnitt 5, da auch diese Ergebnisse bei dem gewählten Signifikanzniveau zunächst statistisch nicht signifikant sind.

4.3.5 Bruchspannung

Bei der Bruchspannung und damit der Festigkeit der Sehnen konnte wiederholt ein signifikant schlechteres Ergebnis der Defektgruppe im Vergleich zur Nativgruppe beo-

bachtet werden, siehe Abb. 18. Dieses zeigt, dass die Nativgruppe mehr Kraft pro Fläche aufnehmen kann und diese Fähigkeit in der Defektgruppe stark beeinträchtigt ist. Bei der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold ist ein großer Interquartilabstand aufgefallen und daher sehr stark streuende Werte, so dass eine abschließende rein empirische Beurteilung zunächst schwierig ist.

Die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten bestätigt abermals die Tendenz hin zu den Werten nativer Sehnen, da sich die Werte im Vergleich zu denen der Defektgruppe nicht signifikant von denen der gesunden Sehnen unterscheiden.

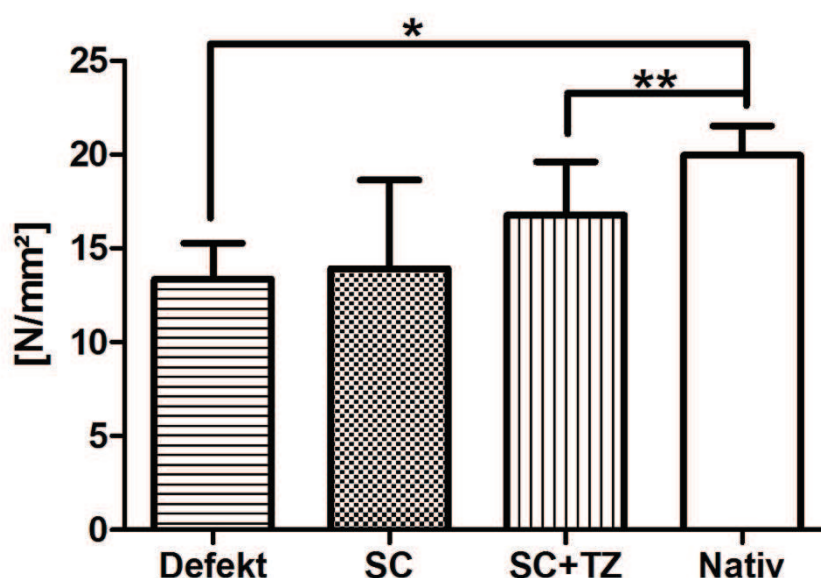


Abb. 18. Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede in der Bruchspannung, $p^*=0,0313$, $p^{**}>0,05$

4.3.6 E-Modul

In der Analyse des E-Modul als Steifigkeitsparameter der Sehnen war u.a. auch interessant, in welcher vergleichenden Größenordnung zu anderen Materialien sich die Infraspinatussehnen der Schafe einordnen lassen. Dazu folgender exemplarischer Vergleich:

- Beton $E = 30.000 \text{ N/mm}^2$

- Stahl $E = 210.000 \text{ N/mm}^2$
- Gummi $E = 5 \text{ N/mm}^2$

Demgegenüber liegen die Werte der Sehne nach Abb. 19 eher im unteren Steifigkeitsbereich bei ca. $E = 11\text{-}32 \text{ N/mm}^2$ und damit relativ weich, elastisch und dehnbar. Es wäre dabei aber auch zu hinterfragen, welche biomechanischen Eigenschaften eine perfekte und funktionsgerechte Sehne aufweisen sollte, mehr weich und elastisch oder steif und spröde?

Die Nativsehne, welche optimale Werte repräsentiert, wies einen eher kleineren E-Modul mit einem Mittelwert von etwa $E = 15 \text{ N/mm}^2$ auf.

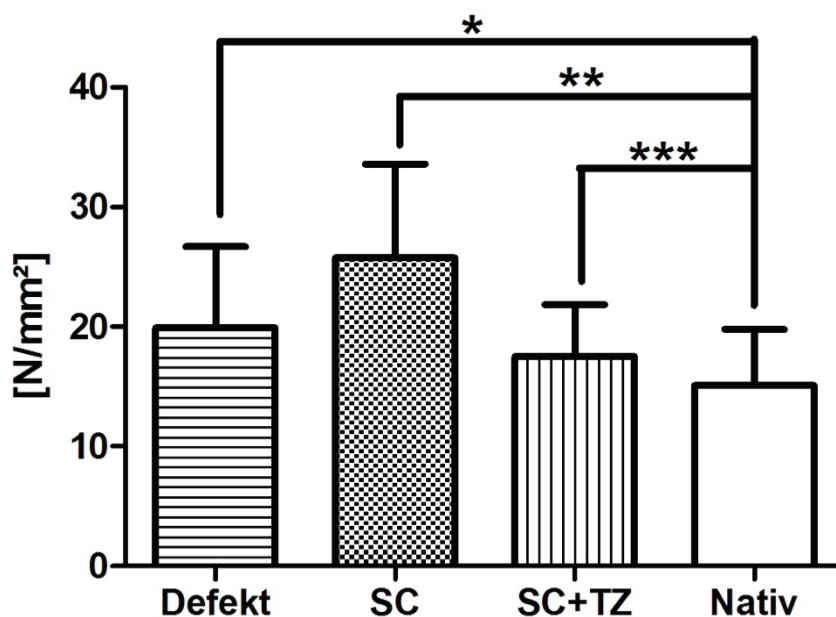


Abb. 19. Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede im E-Modul für alle Gruppen, $p^*=0,0313$, $p^{**}=0,0313$, $p^{***}=0,4375$ ns.

Interessant ist hierbei, dass nach Abb. 19 die schlechtesten Werte die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold zeigte und nicht die Defektgruppe, wie es bei den anderen Kenngrößen der Fall war. Hier ist zu diskutieren, ob der Einbau eines Scaffolds die Steifigkeit erhöht und vor allem wodurch. Erklärungsansätze könnten sein:

- Kollagen I des Scaffolds erhöht nur die Steifigkeit ohne die elastischen Eigenschaften der Sehne zu verbessern.
- Das Scaffold stimuliert den Entzündungsprozess.
- Auftreten von Ossifikationen.

Dieses ist in der histologischen Auswertung weiter erläutert (siehe Abschnitt 6).

Nach Abb. 19 und Tabelle 1 zeigt die Gruppe mit Tenozyten und Scaffold hierbei interessanterweise, eine geringere Streuung als die Defektgruppe und die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold, mit einem Mittelwert von 18 N/mm^2 . Ferner zeigen hier die unbehandelte Scaffold- und Defektgruppe beide einen signifikanten Unterschied zur Nativgruppe. Nur bei der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten kann kein signifikanter Unterschied zur Nativgruppe beobachtet werden. Dieses bedeutet auch, dass autologen Tenozyten entscheidend die Elastizität der Sehne beeinflussen und im Gegensatz zu allen anderen Parametern verbessern.

4.3.7 Zusammenstellung der Mittelwerte der Versuche

In der Tabelle 1 sind nochmals in Ergänzung zu den Darstellungen in den Abschnitten 4.3.2 bis 4.3.6 die biomechanischen Kenngrößen der untersuchten Sehnen als Mittelwerte zusammengefasst. Auch daran lassen sich die vorstehenden Bewertungen in einem direkten quantitativen Vergleich zusammenfassend ablesen.

Tabelle 1. Zusammenstellung der Mittelwerte der Versuchsergebnisse für alle Gruppen

	Reißkraft [N]	Dehnungs- weg [mm]	Bruchdeh- nung [%]	Bruchspan- nung [N/mm ²]	E-Modul [N/mm ²]
Defekt	2004	20	81	13	20
SC	2088	23	90	14	26
SC+TZ	2516	25	102	17	18
Nativ	2995	28	112	20	15

Abschließend ist festzustellen, dass die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten in der biomechanischen Auswertung deutlich bessere Werte in allen Parametern erreicht im Vergleich zur unbehandelten Scaffoldgruppe und zur Defektgruppe. Die Werte nähern sich hierbei den nativen Sehnen sehr an. Ferner wird aus den Ergebnissen deutlich, dass das unbehandelte Scaffold alleine keinen Unterschied bewirkt.

In der folgenden histologischen Auswertung im Kapitel 5 wird diese Tendenz weiter untersucht.

5 Histologische Auswertung

5.1 Mikroskopische Beurteilung

5.1.1 Allgemeines

Nachdem in Kapitel 3, Abschnitt 3.7.4 die Probenvorbereitung mit der Aufteilung in sechs bis sieben Untersuchungsabschnitte und der Trennung von zu decalzifizierendem Knochen-Sehnen Übergang und reinem Sehnenewebe beschrieben wurde, wird nun im Folgendem auf die Auswertungsmethoden der Histologie, die Färbungen und vor allem die daraus gezogenen Erkenntnisse und Ergebnisse eingegangen.

5.1.2 Übersichtsfärbungen

5.1.2.1 HE Färbung

Die HE Färbung (Protokoll 8, siehe Anhang A) wurde zur Übersichtsbeurteilung angefertigt. Zunächst wurden die histologischen Schnitte bezüglich der Qualität des neu gebildeten Gewebes begutachtet und Unterschiede zwischen den Gruppen festgehalten. Die histologische Bewertung der Sehnen orientierte sich an der für Sehnenbeurteilung schon häufig verwendeten und etablierten semiquantitativen Beurteilungsskala nach Longo et. al. [141]. Hierbei werden sieben Einzelfaktoren festgelegt, die die Sehne von verschiedenen Gesichtspunkten in ihrem gesamten Ausmaß beurteilt.

Diese Faktoren sind:

- Faserstruktur
- Fasernanordnung
- Rundung des Zellkerns
- Regionale Zellhäufung
- Vaskularisierung

- Kollagenfärbbarkeit
- Hyalinisierung.

Die Sehne wurde hierzu in eine vierstufige Skala eingeteilt.

0 = gesunde Sehne

1 = leichte Veränderungen

2 = mittelgradige Veränderungen

3 = starke Abweichungen vom Gesunden

Hierbei wurde entschieden, nur die ersten fünf Faktoren zu verwenden, da sich gezeigt hat, dass diese die wichtigsten Merkmale waren, die die Sehnen aufzeigten. Auch wurde nach Longo et al. [141] der Faktor der Hyalinisierung als schwer reproduzierbar bezeichnet und beschrieben. Des Weiteren wurden durch die zusätzlichen Färbungen, vor allem durch Kollagen I und II, viele noch spezifischere Beurteilungsinformationen gewonnen, als hier die HE Färbung darstellen könnte.

Auch wurde entschieden die Entzündungsreaktion als eigenen Punkt einzufügen. Diese wurde nach einem Punktesystem mit folgender Graduierung ausgewertet:

0 = keine Entzündungszeichen

1 = leichte Entzündungszeichen

2 = mäßige Entzündungszeichen

3 = maximal entzündetes Gewebe

Bei dem Punktesystem wurde jeder Beurteilungszahl eine bestimmte Menge an Zellen zugeordnet, wie noch näher in Abschnitt 5.2.2.3 erläutert wird.

5.1.2.2 Picosirius Red Färbung

Eine genaue Differenzierung zwischen Narbengewebe und neu geformten Kollagen I Fibrillen wurde durch die Picosirius Red Färbung (Protokoll 9, siehe Anhang A) unter

polarisierendem Licht erreicht. Narbengewebe ist hierbei geprägt durch dünne, unstrukturierte Kollagen III Fasern. Durch die Polarisations-Mikroskopie wird ermöglicht zwischen Kollagen I und III Fasern zu unterscheiden, da diese unterschiedliche Doppelbrechungsverhalten und Farben in der Picrosirius Red Färbung hervorrufen. Kollagen I Fasern zeigen sich dabei als dicke, stark lichtbrechende, rote oder gelbe Fasern, während Kollagen III sich als dünne, grünliche Fasern darstellt. Typ II Kollagenfasern bilden dagegen keine Fasern und wirken kaum doppelbrechend, daher wurde hierbei zur nähereren Qualifizierung die Immunhistologie gegen Kollagen II angefertigt [163, 112].

5.1.2.3 Safranin O Färbung

Die Safranin O Lichtgrün Färbung (Protokoll 10, siehe Anhang A) wurde verwendet, um in der zweiten Gruppe die Sehnen-Knorpel-Knochen Grenze weiter zu untersuchen. Hierbei stellt die Safranin O Lichtgrün-Kombination den Knorpel besonders gut dar und macht die Eigenschaften des Knorpels sichtbar. Da diese Färbung den Proteoglykangehalt des Gewebes anzeigt und die Färbeintensität zu diesem proportional ist, zeigen sich folgende Farbmöglichkeiten:

- rot = normaler Proteoglykangehalt
- hellorange = leicht reduzierter Proteoglykangehalt
- weiß = stark reduzierter Proteoglykangehalt
- blau/blaugrün = fehlender Proteoglykangehalt

Zum Vergleich wurde auch die erste Gruppe mit Safranin O gefärbt, um die unterschiedliche Anfärbung der Sehne gegenüber der Sehne-Knorpel-Knochen Grenze zu beurteilen.

5.1.3 Dokumentationssystem

Da die erhebliche Größe der einzelnen Schnitte die Beurteilung der Sehne im Ganzen sehr schwierig machte, wurde ein System festgelegt, welches die Sehne in Gesichtsfelder aufteilt. Vorher wurde eine mikroskopische Vergrößerung von 100-fach festgelegt. So wurde jeder Schnitt nach Gesichtsfeldern beurteilt und in folgendes Schema eingetragen:

0	1	2	0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Abb. 20. Gesichtsfeldschema zur mikroskopischen Beurteilung

Hierbei repräsentiert jedes Kästchen ein Gesichtsfeld, wodurch die Sehne engmaschig beurteilt werden kann und das Dokumentationssystem standardisiert ist.

Um die Dokumentation möglichst einfach und übersichtlich zu halten, wurden die für die HE Färbung verwendeten Zahlencodes auch für die Picosirius Red- und Safranin O Färbung angewandt, wie in Tabelle 2 zusammengestellt ist.

Tabelle 2. Zahlencodes für die Übersichtsfärbungen

Code	HE Färbung	Picosirius Red	Safranin O
0	gesundes Gewebe	nur Kollagen I	rot=viele PAG
1	leichte Veränderung	wenig Kollagen III	orange= red. PAG
2	mittlere Veränderung	viel Kollagen III	weiß= stark reduziert
3	starke Veränderung	überwiegend Kollagen III	blau= keine PAG

5.1.4 Immunhistologische Auswertung

5.1.4.1 Kollagen I

Die Kollagen I Färbung (Protokoll 11, siehe Anhang A) wurde vor allem zur Strukturbeurteilung der Sehne herangezogen. Der Hauptanteil der extrazellulären Matrix von Sehnen besteht aus Kollagen I [115, 2, 80], ebenso die Trägermatrix. Demnach wurde erwartet, dass sich die Sehne homogen positiv auf Kollagen I verhält.

5.1.4.2 Kollagen II

Die Kollagen II Färbung (Protokoll 12, siehe Anhang A) wurde zusätzlich zur Picrosirius Red Färbung zur Beurteilung der Kollagenstruktur und der genauen Quantifizierung des Vorhandenseins von Kollagen II verwendet. Da Kollagen II hauptsächlich im hyalinen und elastischen Knorpel vorkommt und kaum in Sehnengewebe [213], konnte auch hierbei, zusätzlich zur Safranin O Färbung, der Knorpel beurteilt werden.

5.1.4.3 Fibronectin

Fibronectin (Protokoll 14, siehe Anhang A) ist ein Glykoprotein, welches im Interstitium Fasern, Zellen und Proteoglykane miteinander verbindet. Das Molekül Fibronectin hat drei Bindungsstellen, für den Fibronectin-Rezeptor, Kollagen I und für Heparin. Fibronectin ist an vielen physiologischen Abläufen, unter anderem in der Gewebereparatur, der Embryogenese, der Hämostase sowie in der Zellmigration und Zelladhäsion beteiligt [168, 196]. Daher wurde eine immunhistologische Färbung gegen Fibronectin hergestellt, um Erkenntnisse darüber zu erlangen, wie weit die Wundheilung fortgeschritten ist.

5.1.4.4 Tenascin C

Tenascin C (Protokoll 13, siehe Anhang A) ist ein Glykoprotein, welches in der extrazellulären Matrix exprimiert wird und bei Wachstum und Verletzung verstärkt vorhanden ist. Auch scheint es mit Fibronectin zu interagieren. Tenascin C ist im Gegensatz zu anderen Tenascinen insbesondere in Sehnen, Knorpel und Knochen vorhanden [46, 108]. Daher sollten hiermit Informationen über die Tenascin C Produktion gesammelt werden.

5.1.4.5 Osteopontin

Eine Osteopontinfärbung (Protokoll 15, siehe Anhang A) wurde angefertigt, um zu untersuchen, ob etwaige Verknöcherungsprozesse in der Wundheilungsphase stattgefunden haben. Dieses ist in dem vorherigen Projekt [176] mit Ratten als Versuchstiere gefunden worden und sollte hier mit den Untersuchungen an Schafen erneut beurteilt werden.

5.1.5 Beurteilungscode für die Immunhistologie

Um die Darstellung für die Auswertung möglichst übersichtlich zu gestalten, wurde auch die Immunhistologie in den HE Färbungscode eingefügt, siehe Tabelle 3.

In der Immunhistofärbung für Tenascin C wurden nur zwei Unterteilungen vorgenommen, da mikroskopisch nicht mehr zu differenzieren waren.

Tabelle 3. Zahlencodes für immunhistologische Färbungen

Code	HE	Kollagen I	Kollagen II	Fibronektin	Tenascin C	Osteopontin
0	Kontrolle	Inhomogen hell	Inhomogen negativ	Zellen hell	negativ	positiv
1	Leichte Veränderung	Homogen hell	negativ	Zellen dunkel		Stärker positiv
2	Mittlere Veränderung.	Homogen dunkel	positiv	Rund Dunkle Zellen	positiv	inhomogen
3	Starke Veränderung	Muskel	Muskel	Muskel	Muskel	Muskel

Hierbei wurde sich an der Kontrollgruppe orientiert und im Vergleich zu dieser die Abstufungen vorgenommen.

5.1.6 Methode zur qualitativen Darstellung

Um die Ergebnisse des Auswertungsverfahrens vergleichen zu können, wurde folgendes System entwickelt:

- 1) Alle Schnitte wurden nach dem vorstehend erklärten System bewertet.
- 2) Die Schnitte von derselben Gruppe und desselben Sehnenabschnitts wurden zusammengefasst. Dabei umfasst die Kontroll- und Defektgruppe drei gleiche Schnitte von unterschiedlichen Schafen und die Scaffold- und Tenozytengruppe zwei Schnitte.
- 3) Farbcodes wurden nach vorhandenen Kombinationsmöglichkeiten des Auswertungsverfahrens hergestellt.

4) Eine graphische Darstellung der Sehnen wurde mithilfe der Farbcodes erstellt und mit unterschiedlichen Gruppen pro Abschnitt verglichen.

Die farbliche Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Computerprogramm Surfer10 (GoldenSoftware, Inc., Golden, USA) visualisiert. Dieses Programm verwendet unterschiedliche Interpolationmethoden, um zwischen Farbzuidungen im Koordinatensystem farbliche Übergänge zu schaffen. Hierbei wurde sich für die Methode des Kringsings entschieden. Abb. 21 zeigt dazu ein Beispiel:



Dabei wurde folgende Farbscala verwendet:

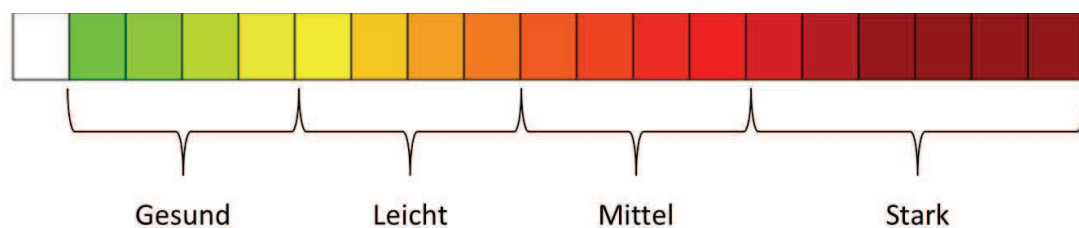


Abb. 21. Beispiel der farblichen Darstellungen der histologischen Ergebnisse in einem Sehnenquerschnitt mit dem jeweiligen Grad der Veränderung des Sehnengewebes

In den grafischen Auswertungen bedeuten die Farben folgende visuelle Feststellungen:

- weiß = Muskel, Fett oder keine Sehnenausdehnung
- grünliche Farben (0) = unveränderte Sehne wie die Nativgruppe, wobei das dunkelste Grün die Nativgruppe darstellt
- gelbliche Farben (1, „Leicht“) = leicht verändertes Sehnengewebe

- orange Töne (2, „Mittel“) = deutlich verändertes Sehnengewebe, zeigt aber noch Formen einer Sehne,
- rote Farben (3, „Stark“) = kein Sehnengewebe mehr zu erkennen

Somit können die mikroskopischen Ergebnisse graphisch sichtbar gemacht und zusammengefasst werden. Auch sind auffällige Tendenzen mit Lokalisation in der Sehne darstellbar und die Gruppen auf einem Blick vergleichbar.

5.2 Qualitative Beurteilung der Sehne

5.2.1 Allgemeines

Im Folgenden ist die qualitative Beurteilung der Gruppen in den jeweilig verschiedenen Färbungen dargestellt. Dabei ist exemplarisch immer nur ein Teilabschnitt der Sehne als Grafik gezeigt. Die zugehörigen vollständigen Grafiken aller Schnitte der weiteren Teile finden sich im Anhang B.

5.2.2 HE Färbung

Die Sehne wurde in der HE Färbung nach Faserstruktur/Faserverlauf, Zellmorphologie und Entzündung beurteilt. Für diese drei Aspekte wurde der Sehnenscore und die Farbauswertung verwendet, wie in Abschnitt 5.1.3 bis 5.1.6 erläutert.

5.2.2.1 Faserstruktur/Faserverlauf

Mit dem Faserverlauf werden vor allem die Interzellulärsubstanz und die Anordnung in Fibrillen beurteilt.

Mit **0** wurden hierbei strukturierte geradlinige Kollagenverbände mit gleichmäßigem längs gerichtetem Faserverlauf bewertet, (siehe Abb.22 a).

Bei **1** zeigte sich eine vermehrte Wellung und die Verbände waren weniger klar abgrenzbar, wobei aber noch eine klare Struktur vorhanden ist, siehe Abb. 22 b).

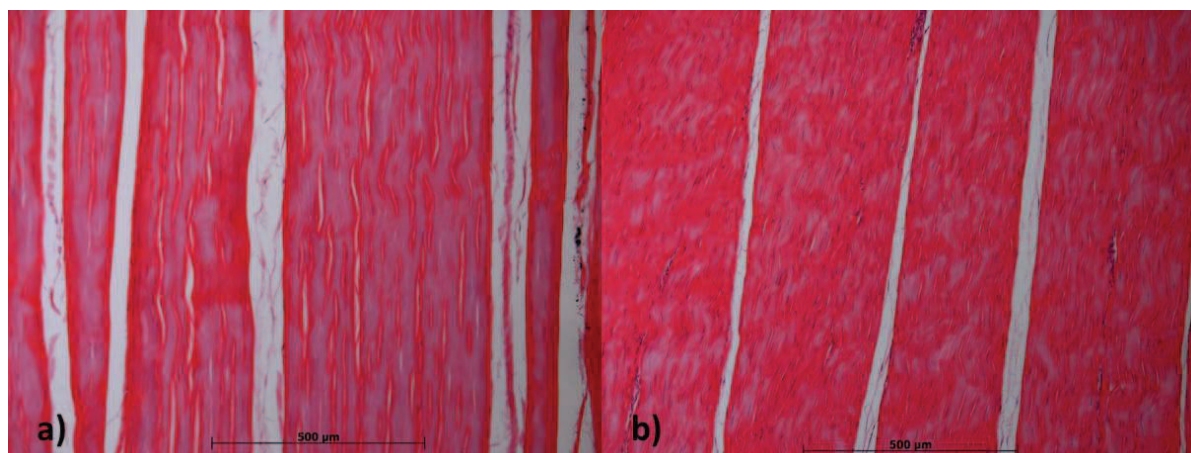


Abb. 22. a) C1 Teil I 0 Nativgruppe, b) A2 Teil III 1 Defektgruppe beide in 100-facher Vergrößerung

Bei **2** dagegen ist die Wellung sehr ausgeprägt und es sind keine Kollagenverbände eindeutig abgrenzbar. Auch ist der Faserverlauf nicht durchgehend geradlinig, siehe Abb.23 a).

3 zeichnet sich vor allem durch einen unstrukturierten Faserverlauf ohne Verbände aus. Das Gewebe ist lockerer angeordnet und ohne Struktur, siehe Abb.23 b).

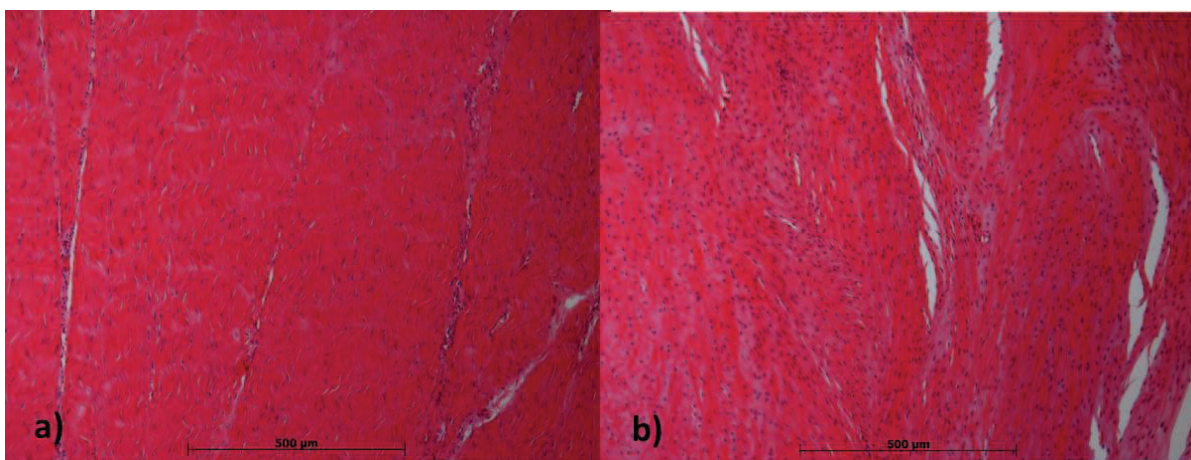


Abb. 23. a) A2 Teil III 2 Defektgruppe, b) A1 Teil III 3 Defektgruppe

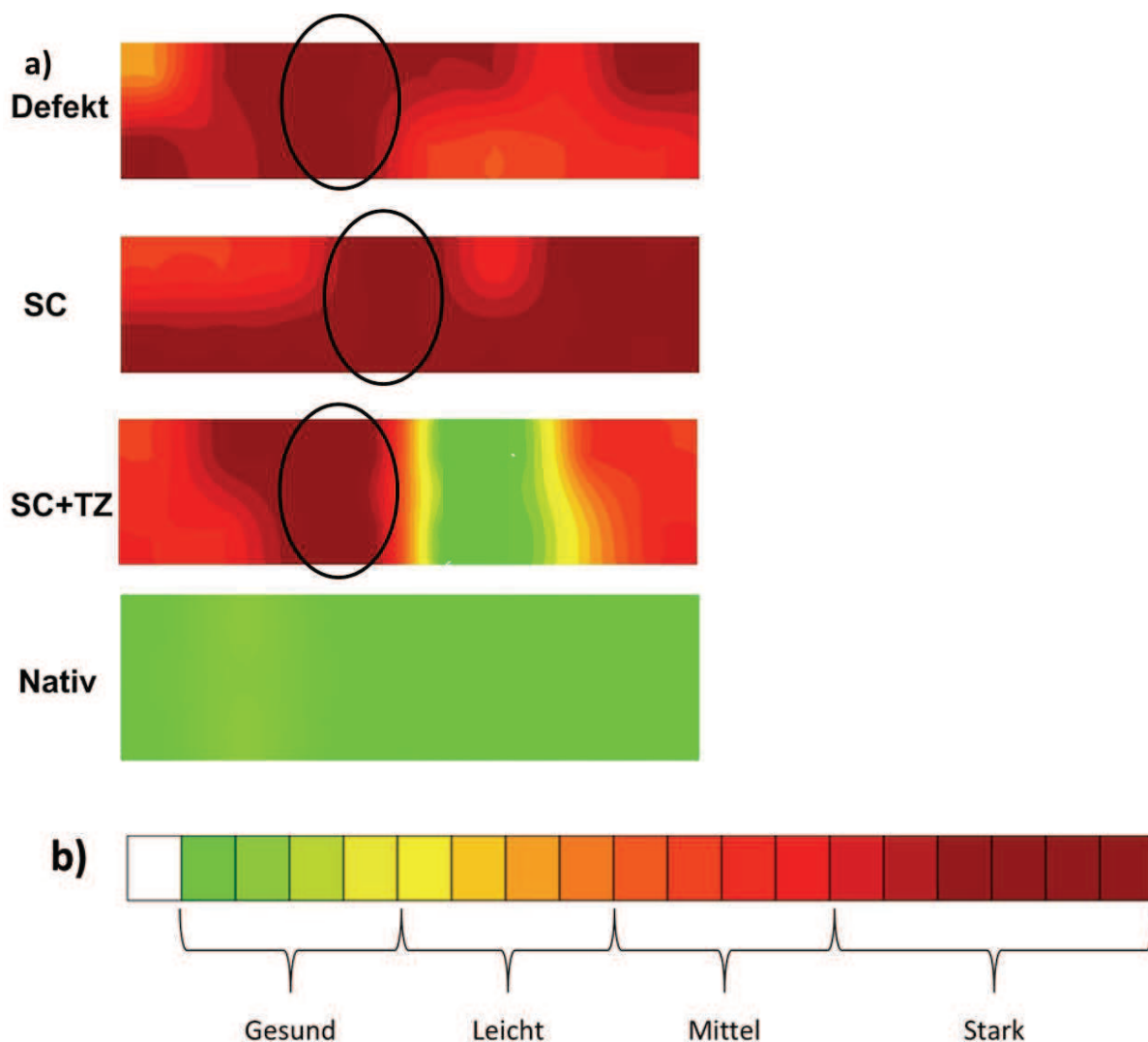


Abb. 24. a) Farbschematische HE Färbung Teil III Faserverlauf, b) Farbskala

Bei dem Vergleich des ehemaligen Defektes in allen Gruppen ergibt sich die schematische Darstellung nach Abb. 24. Die Ellipsen bezeichnen in Abb. 24, wie auch in allen folgenden Bildern, den Defektbereich.

In der Defektgruppe und der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold findet sich leicht verändertes und stark verändertes Gewebe, zu erkennen in Abb.24 a) an der roten und dunkelroten Färbung. Dabei zeigt sich in der letzteren Gruppe fast ausschließlich stark verändertes Gewebe, wohingegen in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten gesundes Gewebe vorhanden war. Dies ist in der Abb. 24 an dem grünen Streifen zu sehen. Auch ist in dieser Gruppe der gesetzte Defekt noch als stark verändertes Gewebe zu

erkennen, wie der dunkelrote Streifen in der Ellipse zeigt. Der Rest der Sehne ist jedoch nicht so stark von den Faserveränderungen betroffen, so dass somit mehr intakte Sehne vorhanden ist als in den beiden anderen Gruppen. Auffällig war auch, dass in den Schnitten der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten vollkommen gesundes Gewebe zu finden ist, was in der Defekt- und in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold nicht vorlag.

5.2.2.2 Zellmorphologie

Die Beurteilung der Zellmorphologie gibt Auskunft über die zellulären Bestandteile des Sehnengewebes. Dabei zeigen sich die Zellen in Abb. 25 a)=0 als schmale länglich schwarze Zellen, die sich gleichmäßig homogen darstellen. Die Zahl der Zellen ist gering und die Interzellulärsubstanz überwiegt deutlich. Diese wurden mit 0 bewertet. Die Zellen in Abb. 25 b)=1 haben eine ovale Form, sind daher eher breit und weniger länglich und ihre Zahl ist erhöht. Bei Abb. 25 c)=2 ist vor allem die Zahl größer und es finden sich runde zwischen den ovalen Zellen. Demgegenüber sind in Abb. 25 d)=3 fast nur noch runde Zellen vorhanden und der Anteil zwischen Zellen und Interzellulärsubstanz ist ausgeglichen. Alle Bilder wurde in einer 400-fachen Vergrößerung fotografiert, um die einzelnen Zellen besser darstellen zu können.

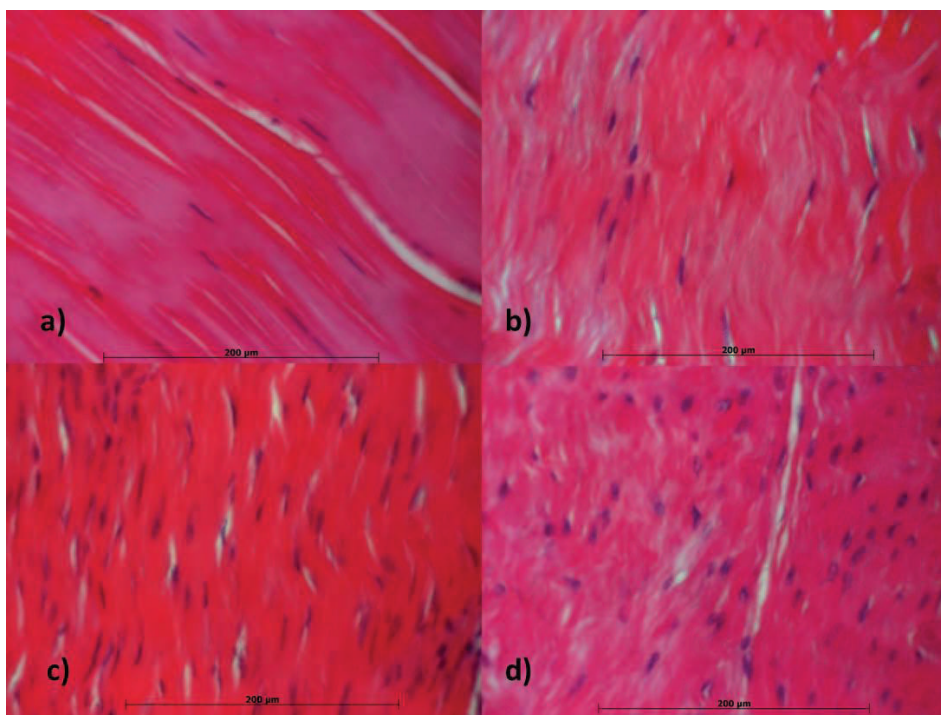


Abb. 25. HE Färbung Zellmorphologie in 400-facher Vergrößerung, a) A2 Teil I Nativgruppe 0, b) A1 Teil I Defektgruppe 1, c) A1 Teil III Defektgruppe 2, d) A4 Teil I Defektgruppe 3

In Abb. 26a) sind ausgewählte Schnitte aus jeder Gruppe dargestellt und zum Vergleich die jeweiligen Schnitte als Präperat in der HE-Färbung (siehe Abb. 26 b). Diese Schnitte wurden eingescannt um eine Beurteilung in ihrer Gesamtheit zu ermöglichen. Dabei kann allerdings in der Vergrößerung keine Aussage gemacht werden, in welchem Bereich der Defekt liegt.

In der zusammenfassenden Gruppenbeurteilung zeigte sich, dass in der Defektgruppe und in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold die Zellen im Bereich der Manipulation und aber auch in den unmanipulierten Seitenrändern stark verändert waren (Abb. 26 a). Dagegen waren in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten die Randbereiche nicht so stark verändert. Der frühere Defektbereich ist aber auch hier deutlich zu erkennen (Ellipse). In den danebenliegenden eingescannten Schnitten ist sichtbar, dass das Gewebe in allen drei Gruppen leicht inhomogen ist, wogegen die Nativgruppe sich gleichmäßiger darstellt, wie dies auch in der Vergrößerung im vorangegangenen Bild (Abb. 25) der Fall ist.

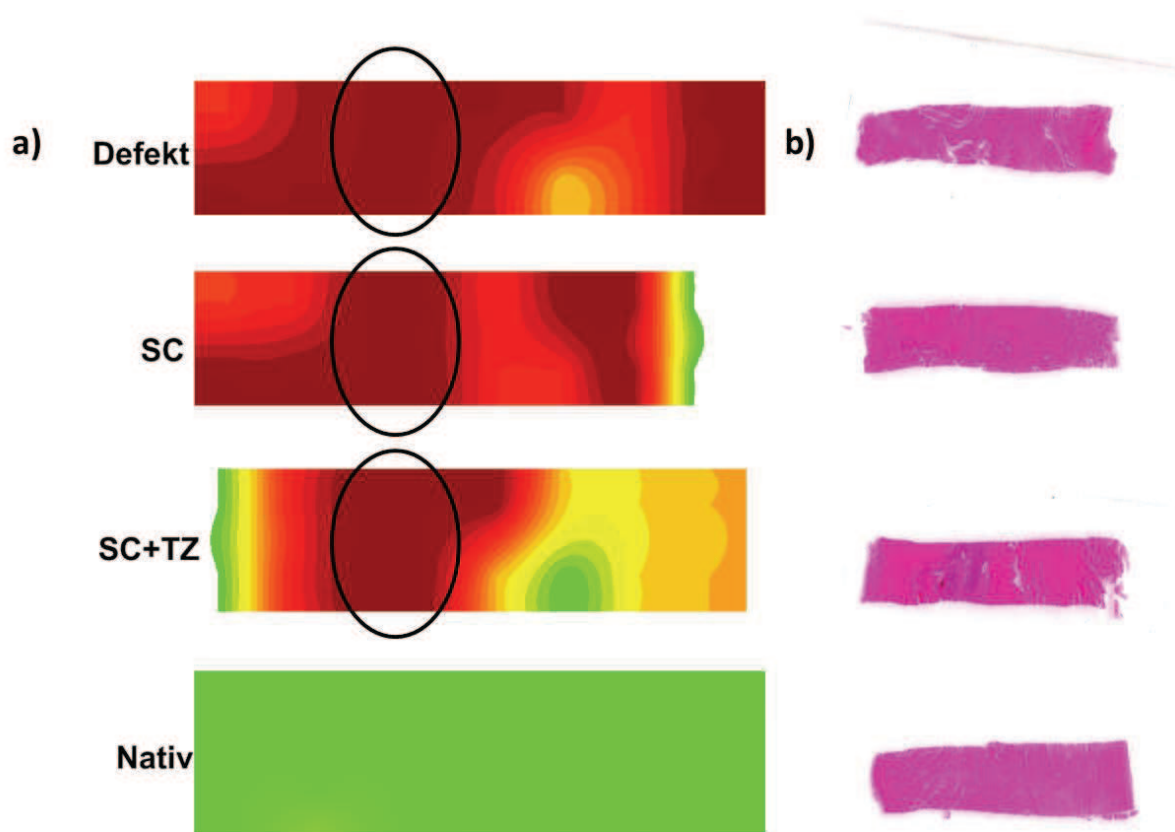


Abb. 26. a) Farbschematische HE-Färbung Teil III Zellmorphologie in allen Gruppen, b) eingescannte HE-Schnitte Teil III

5.2.2.3 Entzündung

Die Entzündung wurde ebenfalls in Zahlen von 0-3 quantifiziert. Um dieses besser zu standardisieren wurde jeder Zahl eine Anzahl von Makrophagen in einem Gesichtsfeld zugeordnet.

- 0 = 0-20 Zellen
- 1 = 20-100
- 2 = 100-1.000
- 3 = >1.000 Zellen

Die Makrophagen sind vor allem zwischen den Faserbündeln zu finden und heben sich durch ihre runde Form und dunkle Anfärbung hervor. Auch sind die Zellen gehäuft lokalisiert. In Abb. 27 a)=0 sind nur vereinzelt Makrophagen sichtbar und können auch ganz fehlen. Diese dringen nicht in die Sehnenfasern ein, sondern lokalisieren sich zwischen den Faserbündeln. Bei Abb. 27 b)=1 dagegen häufen sich die Zellen und dringen in das Gewebe ein. Dabei bleibt das umliegende Gewebe noch weitgehend erhalten. In Abb. 27 c)=2 ist demgegenüber schon ein kompletter Entzündungsherd zu erkennen mit auch umliegend immer wieder stark angehäuften Entzündungspolen. Dieses wird in Bild d)=3 noch gesteigert ersichtlich, da hier kaum mehr Gewebe vorhanden ist und das entzündete Gewebe den Hauptanteil des Gewebes darstellt. Auf den gesamten Schnitt bezogen war zu erkennen, dass eine solch ausgeprägte Entzündung nur im Defektbereich in der Mitte der Sehne auftrat.

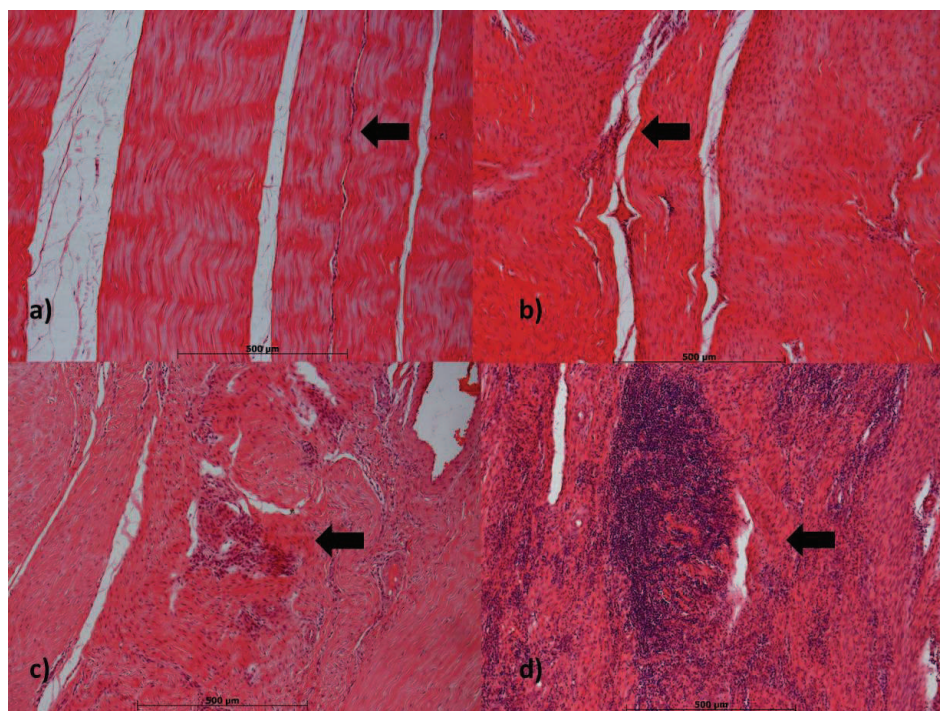


Abb. 27. a) HE-Färbung Entzündung in 200-facher Vergrößerung a) A2 Teil III Defektgruppe 0, b) B1 Teil III SC Gruppe 1, c) A1 Teil I Defektgruppe 2, d) C4 Teil III SC+TZ Gruppe 3

Im farbschematischen Vergleich der vier Gruppen untereinander, was in Abb. 28 dargestellt ist, waren in den Defektgruppen und in den Gruppen mit unbehandeltem Scaffold kaum starke Entzündungen zu erkennen. In der gesamten Sehne waren leichte bis mittlere Entzündungen (gelb und rot) vorhanden, wobei die mittleren Entzündungen gehäuft in der Mitte der Sehne auftraten. Der Übergang zeigte sich fließend.

Dagegen stellt sich in SC+TZ Gruppe eine klare Abgrenzung dar. An den Sehnenrändern fanden sich keine bis leichte Entzündungen (grün und gelb) und diese gingen mit einem scharfen Übergang in einem Streifen starker Entzündung über (Ellipse). In diesem Abschnitt zeigte sich gleichmäßig eine starke Entzündung, welche aber nicht das anliegende Gewebe infiltrierte.

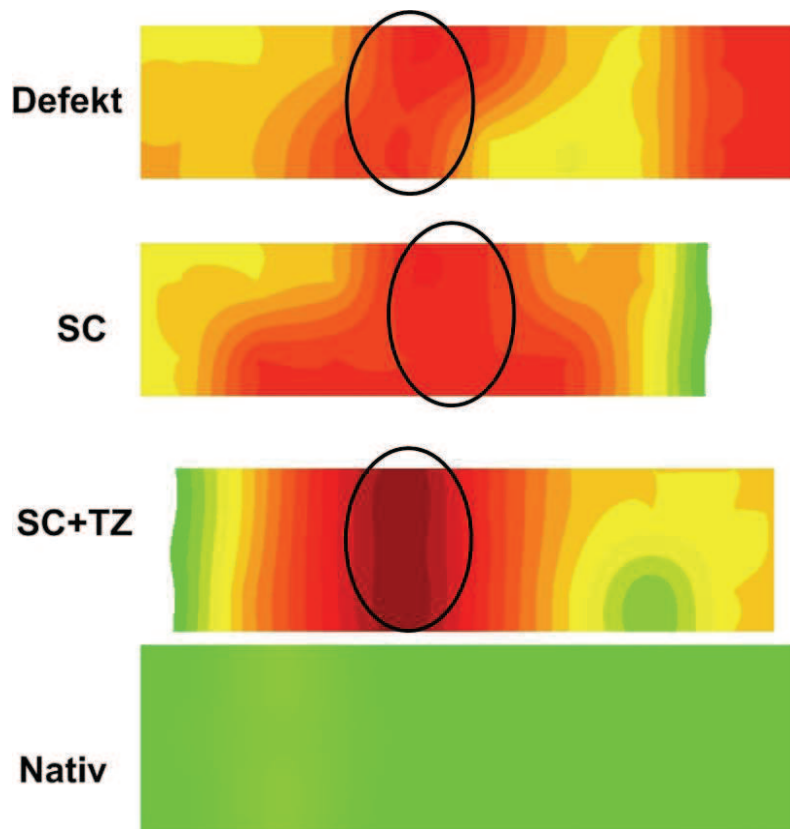


Abb. 28. a) Farbschematische Auswertung der HE Färbung Teil III Entzündungsreaktion in allen Gruppen

In der HE Färbung liegen damit zusammenfassend folgende Erkenntnisse vor:

- Die Defektgruppen und die Gruppen mit unbehandeltem Scaffold waren in der gesamten Sehne von dem Faserverlauf und der Struktur stark verändert.
- Die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten zeigt als einzige, außer der Nativgruppe, noch vollkommen unverändertes Gewebe.
- Die Zellmorphologie war in der Defektgruppe als auch in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold gleichermaßen am stärksten verändert, was auch die Seitenränder betraf.
- In der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten trat die Entzündung nur sehr eingegrenzt auf.

- Insgesamt war der Defekt in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten stärker abzugrenzen, das umliegende Gewebe aber sowohl in Faserverlauf, Zellmorphologie und Entzündung weniger verändert.
- Die Nativgruppe zeigt in allen Beurteilungen eine homogene Struktur.

5.2.3 Safranin O Färbung

Für die Safranin O Färbung ist mit Abb. 29 ein Beispielbild der Färbung gezeigt, um die Färbung zu erklären. Dabei ist die Sehne homogen rot bis orange angefärbt und der Muskel nicht angefärbt und erscheint daher weiß.

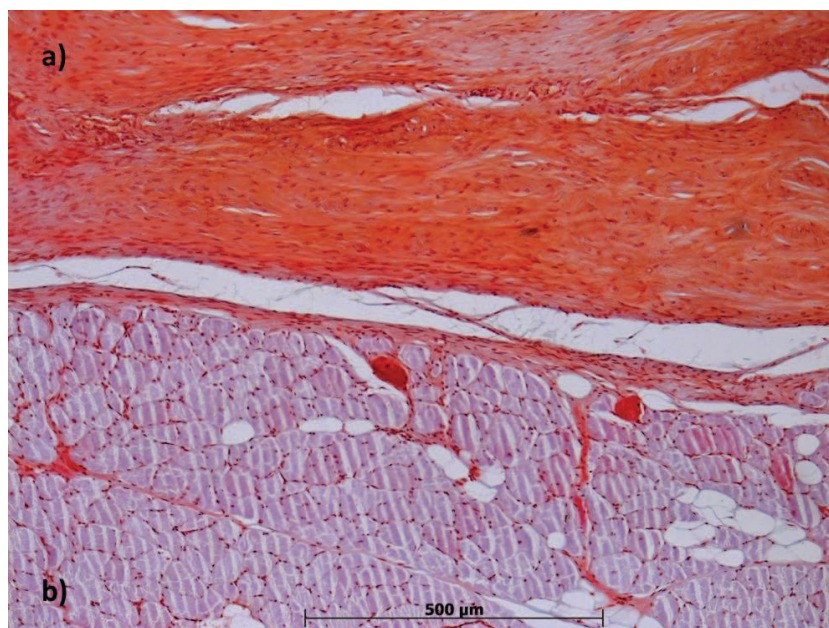


Abb. 29. A4 Teil II Defekt a) orange = Sehne, b) weiße Färbung = Muskel

Bei der Untersuchung der Sehne mit der Safranin O Färbung war in der Übersicht bei allen Sehnen in jeder Gruppe eine homogene Anfärbung vorhanden.

Diese Beobachtung zeigt auf, dass allein am Proteoglykangehalt der Sehne nicht die Defektsetzung unterschieden werden kann und die Veränderung die ganze Sehne betreffen.

Bei der Nativgruppe in Abb. 30 a) war die rötlich-blaue Anfärbung der Sehne zu erkennen, welches das Vorhandensein von vielen Glycosaminoglykane dokumentiert. Die angeschnittenen Muskelabschnitte zeigten sich hierbei blau oder weiß, hatten dementsprechend einen sehr geringen bis fehlenden Proteoglykangehalt (PAG) und machten eine gute Beurteilung möglich.

Die Defektgruppe (Abb. 30 b) war im Vergleich zur Nativgruppe orange angefärbt, was einen mittleren Gehalt an PAG anzeigt.

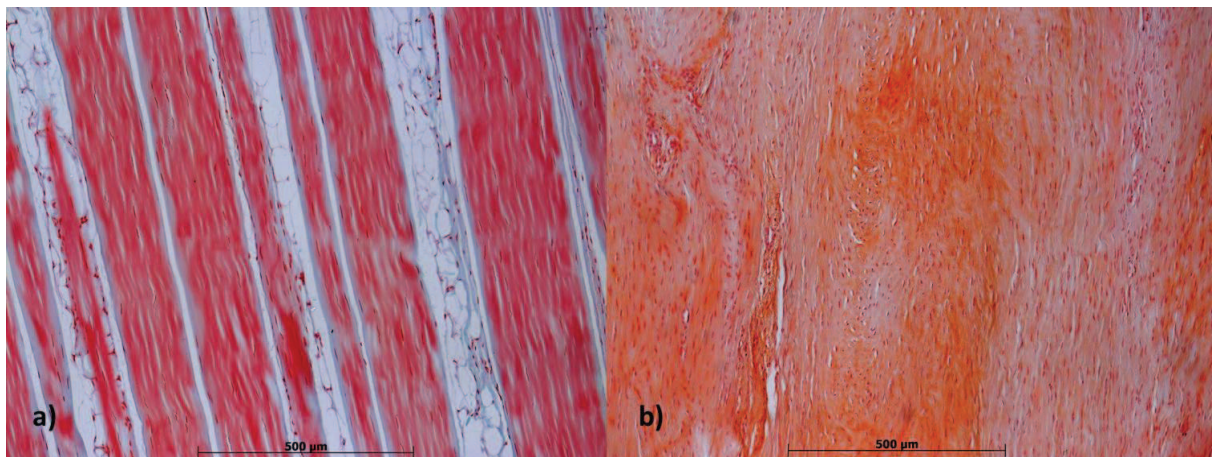


Abb. 30. a) C2b Teil I Nativ, b) A1 Teil I Defekt

Auch die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold wies in der Färbung zur Defektgruppe keine Unterschiede auf und präsentierte sich homogen in oranger Färbung.

Die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten hingegen präsentierte sich hierbei in einer Zwischenform. Hier zeigte sich ein rot-oranger Ton, wie es in Abb. 31b) dargestellt ist.

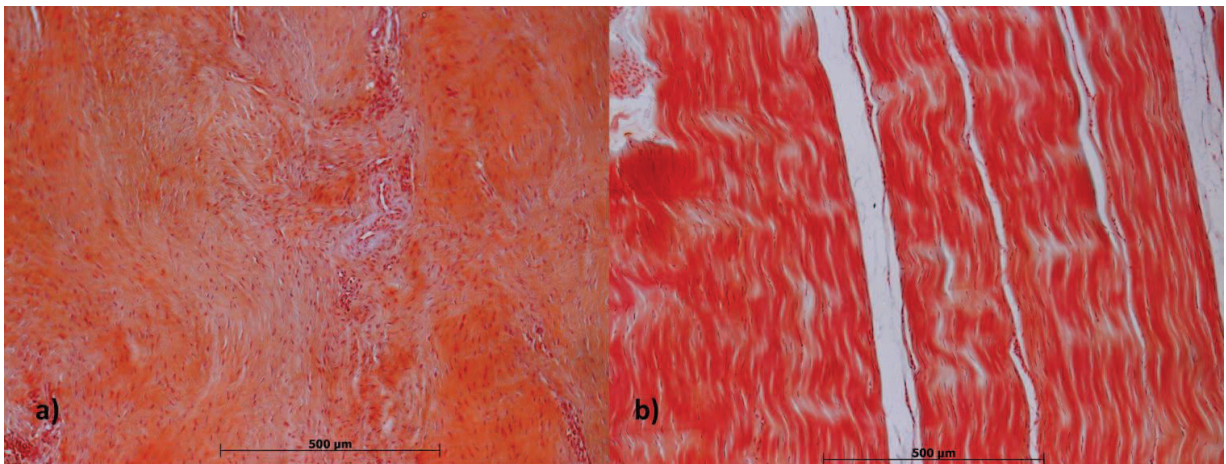


Abb. 31. a) B4 Teil IV SC, b) C2 Teil III SC+TZ

Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Glycosaminoglykanproduktion sowohl in den Defektgruppen als auch in den Gruppen mit unbehandeltem Scaffold nicht vollständig ausgebildet ist. Da die Glykosaminoglykane einen wichtigen Anteil an Auf- und Umbauprozessen in der Sehne haben, stellt dieses Ergebnis eine wichtige Erkenntnis dar.

Daraus kann geschlossen werden, dass autologe Tenozyten die Produktion von PAG anregen.

5.2.4 Picrosirius Red

In der Picrosirius Red Färbung wurden die Schnitte unter polarisierendem Licht beurteilt.

In Abb. 32 a) ist hierbei die gleichmäßige Streifung zwischen gelb und grün, die sich beide lichtbrechend darstellen, zu erkennen. Die gelbe Streifung stellt Kollagen I, die grüne Färbung ein Vorhandensein von Kollagen III dar. Diese charakteristische Streifung zeigt sich in allen Schnitten der Nativgruppe und ist daher mit 0 bezeichnet. Bei Abb.32 b) ist zwar noch die Streifung zu erkennen, die gelben Abschnitte zeigen sich geringer lichtbrechend und die weißen Abschnitte werden von roten Streifen ersetzt.

Eine rote Färbung stellt zwar auch noch Kollagen I dar, da diese aber nicht lichtbrechend sind und in ihrer Struktur ungeordnet erscheinen, muss die Struktur beschädigt sein und ist daher mit 1 bewertet. Dieses Phänomen wird in Abb. 32 c) verstärkt, wobei hier nur noch geringe Anteile an lichtbrechendem Gewebe zu sehen ist. In Abb. 32 d) ist das Bild einheitlich von nicht lichtbrechender roter Anfärbung ohne erkennbare Struktur.

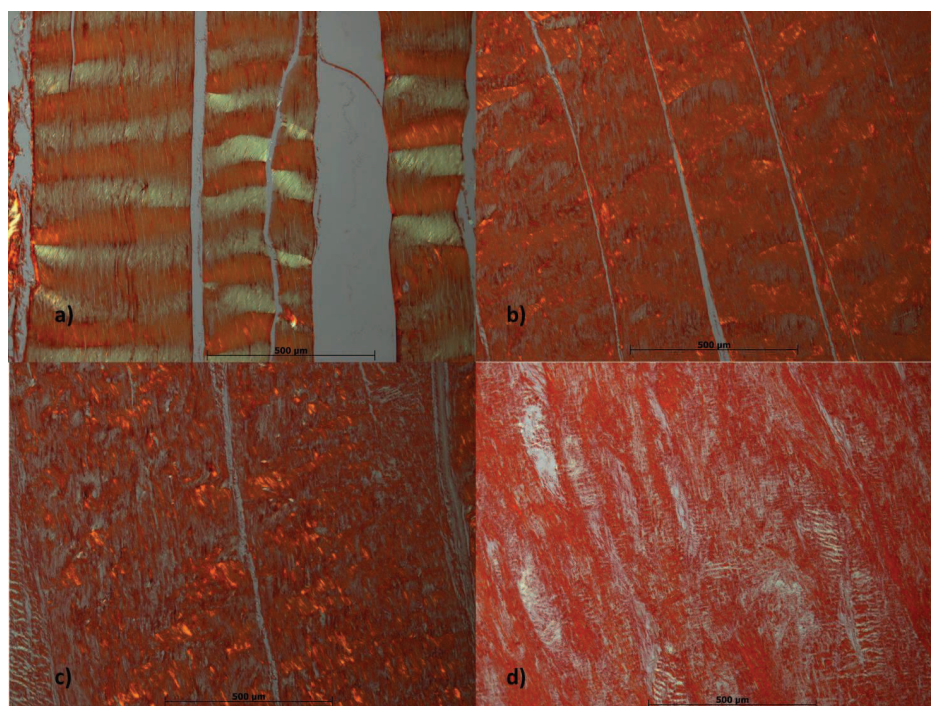


Abb. 32. Picosirius Red Färbung unter polarisierendem Licht,
a) C1 Teil III Nativ **0**, b) c) d) A2 Teil III Defekt **1-3**

Diese Einteilung zieht sich durchgehend durch alle Schnitte und Gruppen. Eine fehlende Polarisierung und Streifung bedeutet hierbei einen Verlust des Kollagen I und einer strukturierten Sehnenordnung. Aufgefallen ist aber, dass in ausgewählten Schnitten eine grüne Anfärbung zu erkennen ist.

Diese zeigte sich in der Defektgruppe und in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold jeweils nur im Schnitt II. Also den quer zur Sehnenstruktur geschnittenen Präparaten.

Hier ist anzunehmen, dass ein geringer Anteil an Kollagen III besonders gut im Querschnitt zu erkennen ist. Diese Grünfärbung war aber in den restlichen Teilen der Gruppen nicht zu erkennen.

Eine besondere Entdeckung war, dass die grüne Färbung durchgehend in allen Teilen der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten vorhanden ist, siehe Abb. 33. Es konzentrierte sich die Grünfärbung darin vor allem auf den Mittelteil der Schnitte. Da die grüne Färbung ein Vorhandensein von Kollagen III darstellt, konnte hiermit eine erhöhte Produktion von Kollagen III durch die Tenozyten in dem Defektbereich nachgewiesen werden.

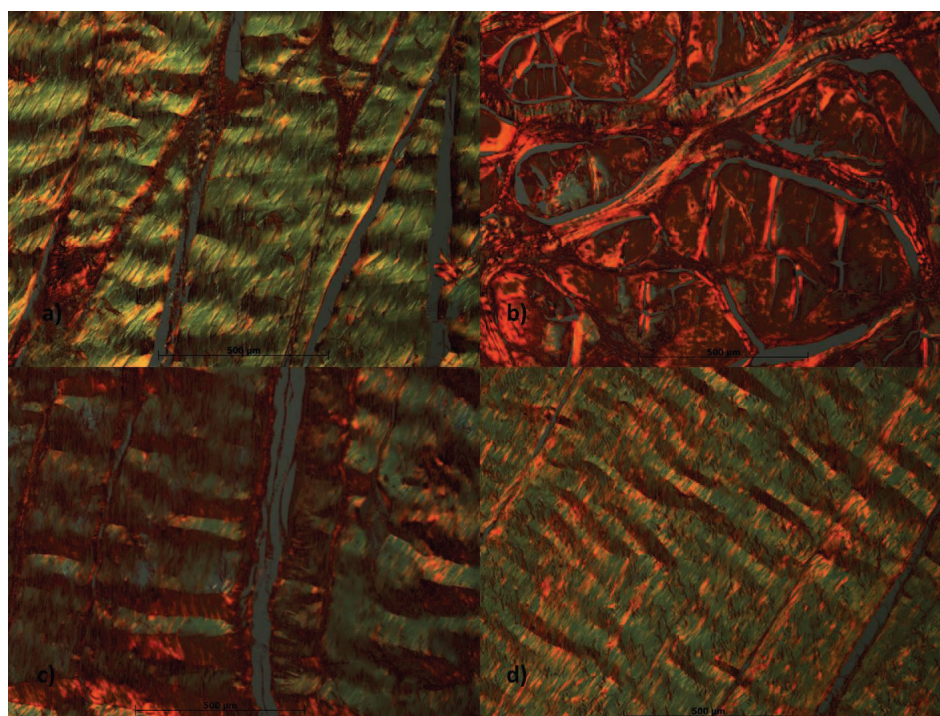


Abb. 33. Picosirius Red Färbung unter polarisierendem Licht, a)-d) C4 Teil I-IV SC+TZ Gruppe grünliche Anfärbung

Im Vergleich aller vier Gruppen fällt auf, dass in der Defektgruppe und vor allem in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold das Gewebe stark verändert ist (Abb. 34 a). Insbesondere in der Defektgruppe ist der Defekt noch stark abzugrenzen. In der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold war viel Gewebe gar nicht mehr polarisierend, wie man auch im zugehörigen makroskopischen Schnitt in Abb. 34 erkennen kann. In der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten waren die Veränderungen hingegen nicht so stark

und es war teilweise noch die streifenförmige Struktur erhalten bzw. sogar noch Nativgewebe vorhanden. Auch makroskopisch (Abb.34 b) kann man hier schon eine Gelbfärbung wie in der Nativgruppe erkennen. Eine komplette homogene Gelbfärbung zeigt makroskopisch die Nativgruppe und dazu im polarisierendem Licht eine homogene grüne Streifenfärbung.

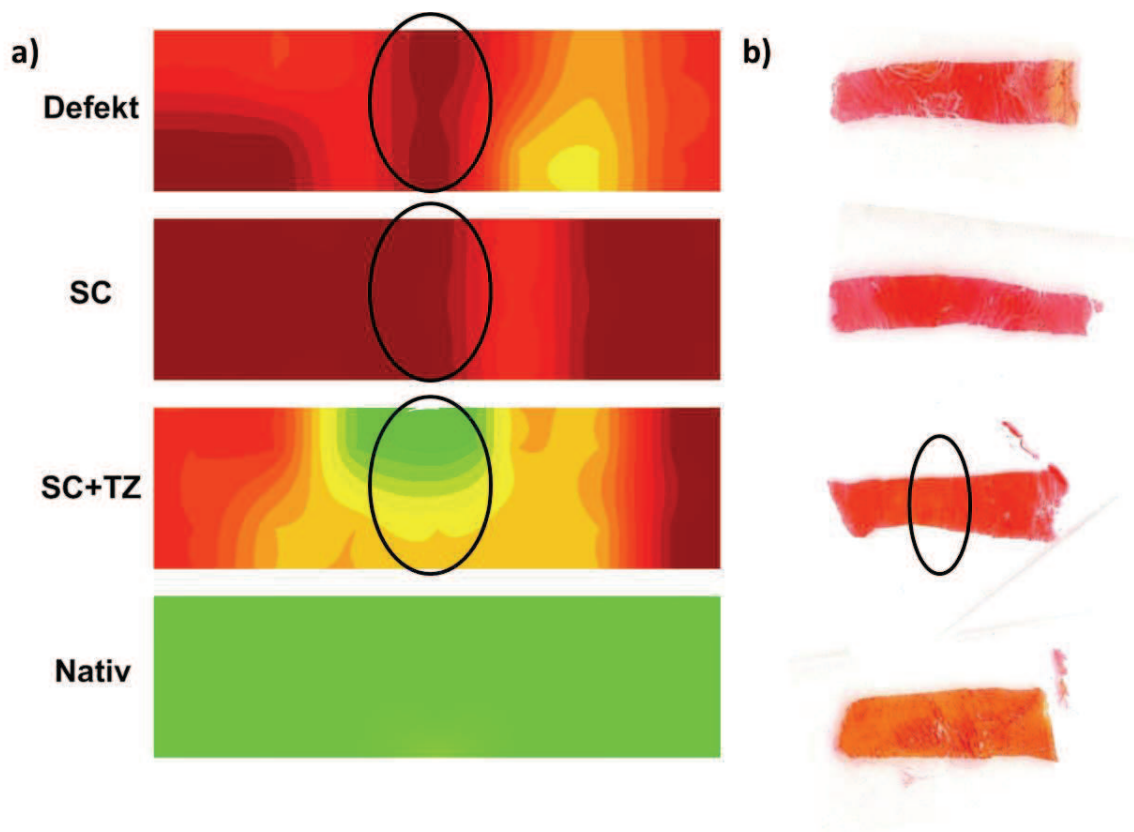


Abb. 34. a) Farbschematische Picosirius Red-Färbung Teil IV, b) eingescannte Picosirius Red Schnitte Teil IV

Zusammenfassend sind in der Safranin O- und in der Picosirius Red Färbung folgende Ergebnisse zu nennen:

- Die Änderung im Proteoglykangehalt der Sehne umfasst immer die komplette Sehne und ist nicht auf den Defekt beschränkt.

- Defektgruppe und die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold haben einen geringen PAG-Gehalt, die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten nähert sich dem PAG-Gehalt der nativen Sehnen sehr an.
- In der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten ist vermehrt Kollagen III vorhanden und die Sehnenstruktur bleibt erhalten.

5.2.5 Immunhistologie Kollagen I

Da in der Sehne, wie auch im Scaffold, Kollagen I vorhanden sein müsste wird hier darauf geachtet, ob Bereiche gar nicht oder sehr stark angefärbt wurden.

Dabei wurde folgende Einteilung in Abb. 35 von a-d) nach den Beobachtungen gewählt:

0 (Foto a) = positiv, aber mit leicht inhomogener Anfärbung

1 (Foto b) = homogen positiv angefärbt

2 (Foto c) = homogen stark positiv angefärbt

3 (Foto d) = Übergang positiv zu negativ

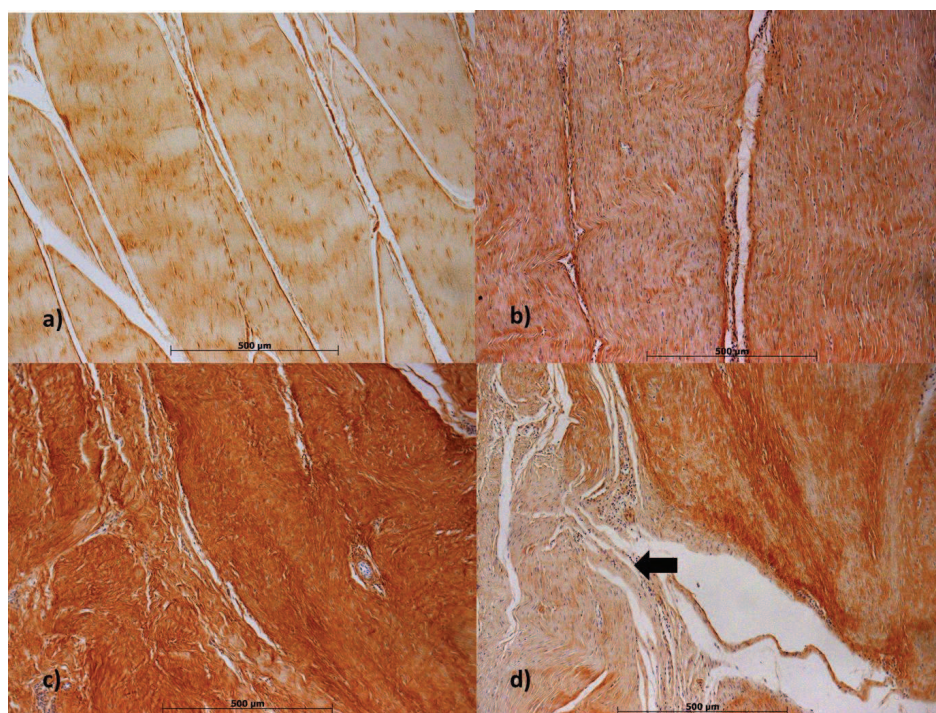


Abb. 35. Kollagen I a) A4 Teil I Nativ 0, b) A1 Teil III Defekt 1, c) A4 Teil I Defekt 2, d) A4 Teil I Defekt 3

Hierbei zeigt sich, dass die Nativgruppe eine regelmäßig inhomogene Anfärbung aufweist (Abb.35 a), wie dieses auch schon in der Picrosirius Red Färbung gefunden wurde. Die veränderten Sehnen zeigen aber diese Inhomogenität nicht mehr, sondern sind unterschiedlich stark homogen angefärbt (Abb.35 b-d). Daraus lässt sich schließen, dass der Anteil des Kollagen I nicht mehr strukturiert in die Sehne eingebaut ist.

Aus der Gruppenbeurteilung nach Abb. 36 kann gefolgert werden, dass in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold vorwiegend leicht verändertes Gewebe vorhanden ist, da die Sehne homogen positiv angefärbt ist (gelbe Färbung). Es zeigen sich in dieser Gruppe zusätzlich zu den homogen positiven Bereichen auch Bereiche, die nicht angefärbt wurden, hier mit rot gekennzeichnet.

Die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten weist interessanterweise auch leicht verändertes Gewebe auf, aber auch ganz deutlich einen Abschnitt in der die Inhomogenität einer nicht veränderten Sehne noch vorhanden ist, was wiederum die grüne Kennzeichnung dokumentiert.

In Abb. 36 b) ist die Farbskala für diese Färbung aufgeführt und unter c) der auffällige, kaum veränderte (grün) Abschnitt in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten dargestellt.

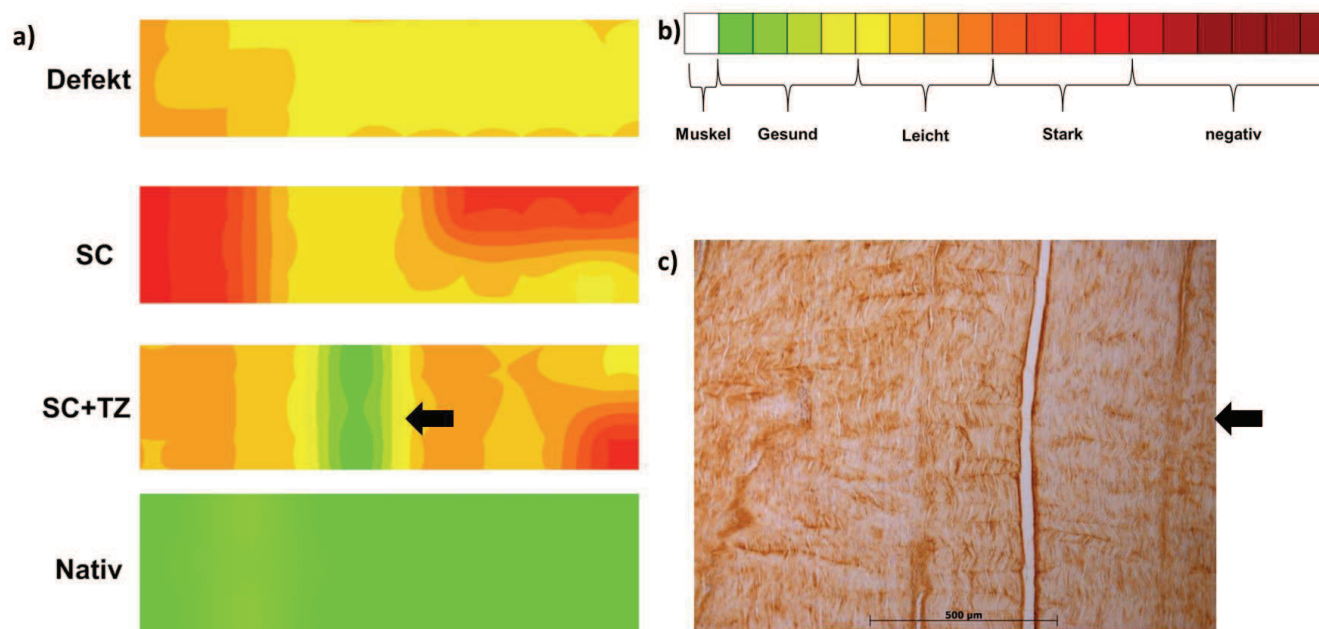


Abb. 36. a) Kollagen I Immunhistofärbung Teil III, b) Farbskala zu Kollagen I, c) C4 Teil III SC+TZ Gruppe inhomogener Abschnitt

5.2.6 Kollagen II

Da Kollagen II normalerweise nicht in Sehngewebe vorkommt, sollte hier in Bezug auf die später dargestellte Sehne-Knorpel-Knochen Grenze eine Negativkontrolle durchgeführt werden. Auch konnte so kontrolliert werden, ob nicht doch atypischerweise in einer Gruppe Kollagen II in der Sehne gefunden werden kann.

Die Nativgruppe, die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold und die Gruppe mit Scaffold und Tenozten zeigten sich in allen Schnitten negativ, siehe Abb.37a-d. In der Defektgruppe fielen positiv angefärbte Bereiche in der Mitte bei Teil II und III der Sehne auf Abb. 37 (e-f). Dies könnte darauf schließen, dass der nicht ausgefüllte Defektbereich teilweise auch mit Kollagen II überdeckt wurde.

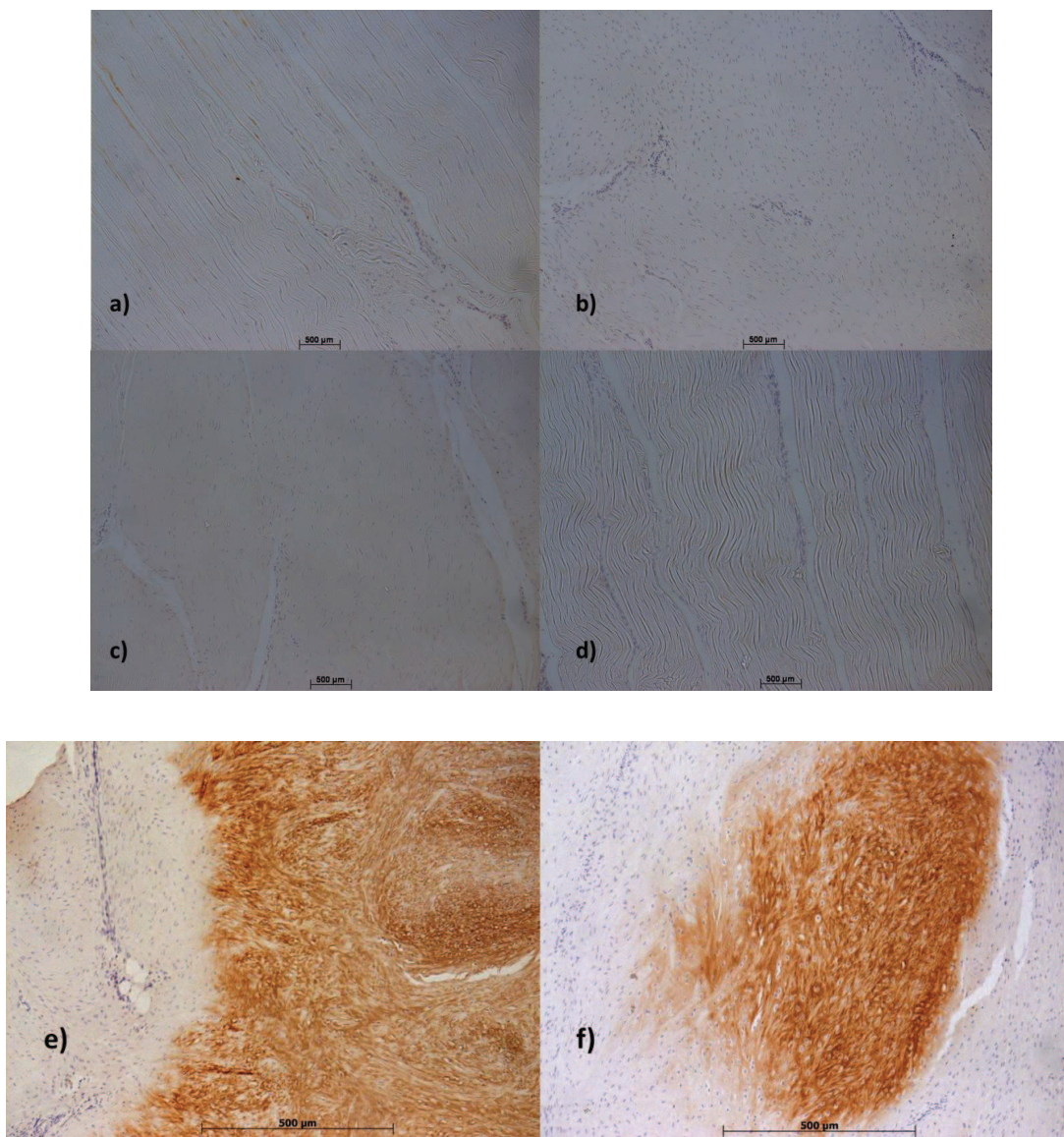
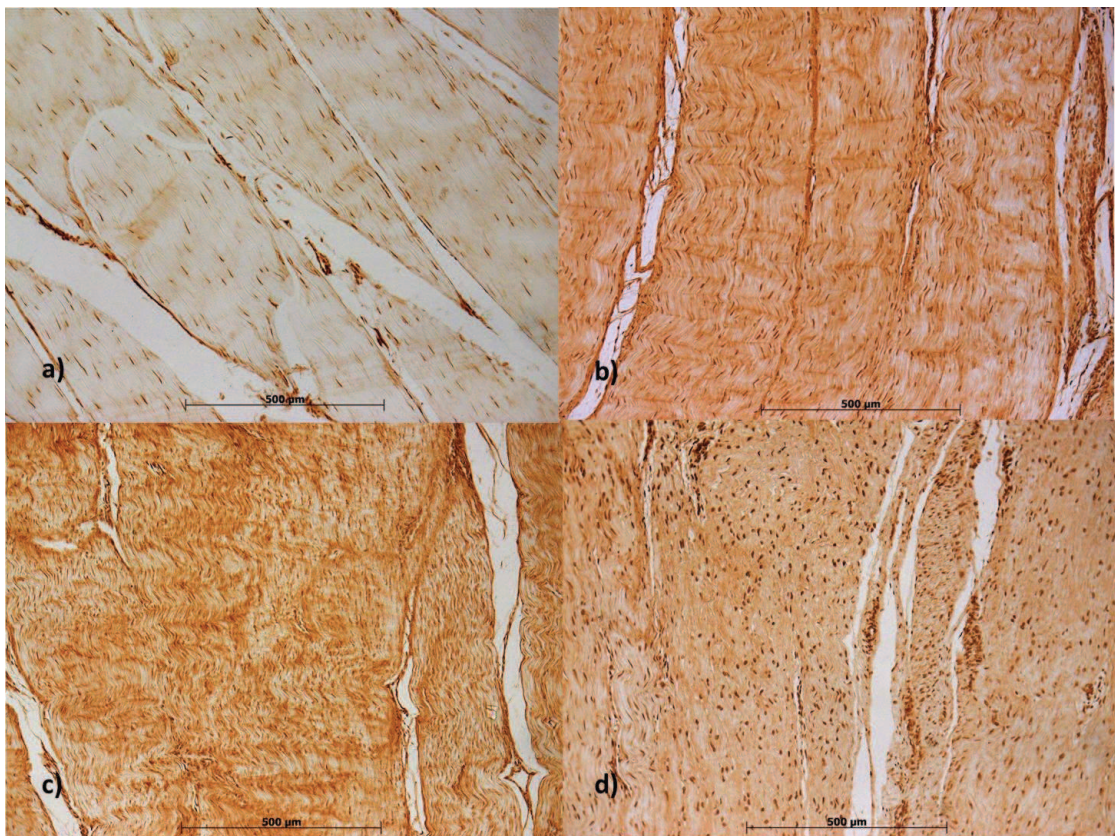


Abb. 37. Kollagen II a-d) in 100-facher Vergrößerung, a) C2b Teil III Nativ, b) A2 Teil III Defekt, c) B4 Teil III SC, d) C2 Teil III SC+TZ, Kollagen II in 200-facher Vergrößerung, e) A1 Teil II Defekt rechter Übergang, f) A1 Teil III Defekt oberer Abschnitt

5.2.7 Fibronektin

Bei der Immunhistologie auf Fibronektin zeigt sich eine stark positive Anfärbung der Zellkerne. In der Nativgruppe (Abb.38 a) stellte sich die Anfärbung erneut leicht inhomogen dar, was sicherlich auch der physiologischen Anreicherung entspricht. In Abb. 38 b) mit 1 bewertet wurde eine noch inhomogene Anreicherung, aber mit stärkerer

Anfärbung. Mit 2 wurde dagegen eine homogene Anreicherung mit stark positiven Zellen gewertet (Abb. 38 c). In dieser Färbung wurden die Unterschiede nur von 0-2 bewertet, da sich nicht weitere abzugrenzende Unterschiede darstellten. In Bild Abb. 38 d) wurde nochmal eine starke Entzündung abgebildet, auf die der Antikörper stark positiv reagiert hat. Da Fibronektin bei Zellmigration, Zelladhäsion und Gewebsaufbau eine wichtige Rolle spielt, kann daraus geschlossen werden, dass bei einer starken Anfärbung umfangreiche Um- und Aufbauprozesse stattfinden.



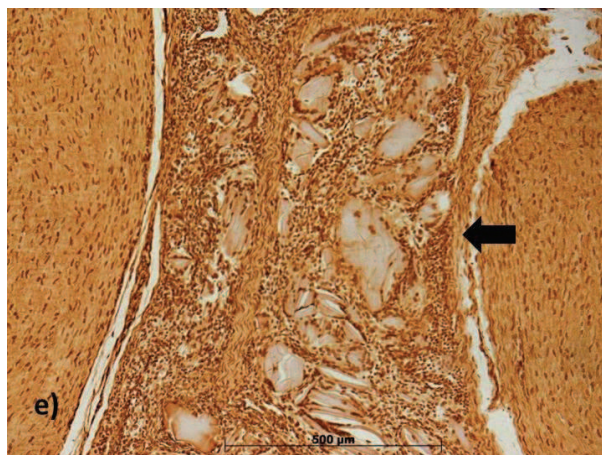


Abb. 38. a) A4 Teil I Nativ **0**, b) C2 Teil III SC+TZ Teil III **1**, c) B1 Teil III SC **1**,
d) A2 Teil III Defekt **2**, e) C2 Teil III SC+TZ Wundgeschehen

Bei Betrachtung der Gruppen nach Abb. 39 in der farbschematischen Darstellung wird ersichtlich, dass in allen drei operierten Gruppen Bereiche vorhanden sind, wo noch eine stärkere Fibronectinexpression auffällt (rote Anfärbung). Auch ist zu erkennen, dass dieser Bereich in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten stark abgegrenzt ist. Außerdem ist innerhalb dieser Gruppe ein Bereich auffällig, in dem die typische inhomogene Anfärbung der Nativgruppe zum Vorschein kommt, welches mit grün und einem Pfeil gekennzeichnet ist. Dieses wird in den beiden anderen Gruppen nicht beobachtet.

Zusätzlich ist in Abb. 39 b) nochmal die Farbskala zur Auswertung der Grafik dargestellt und unter c) das wie in der Nativgruppe aussehende Gewebe aus der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten.

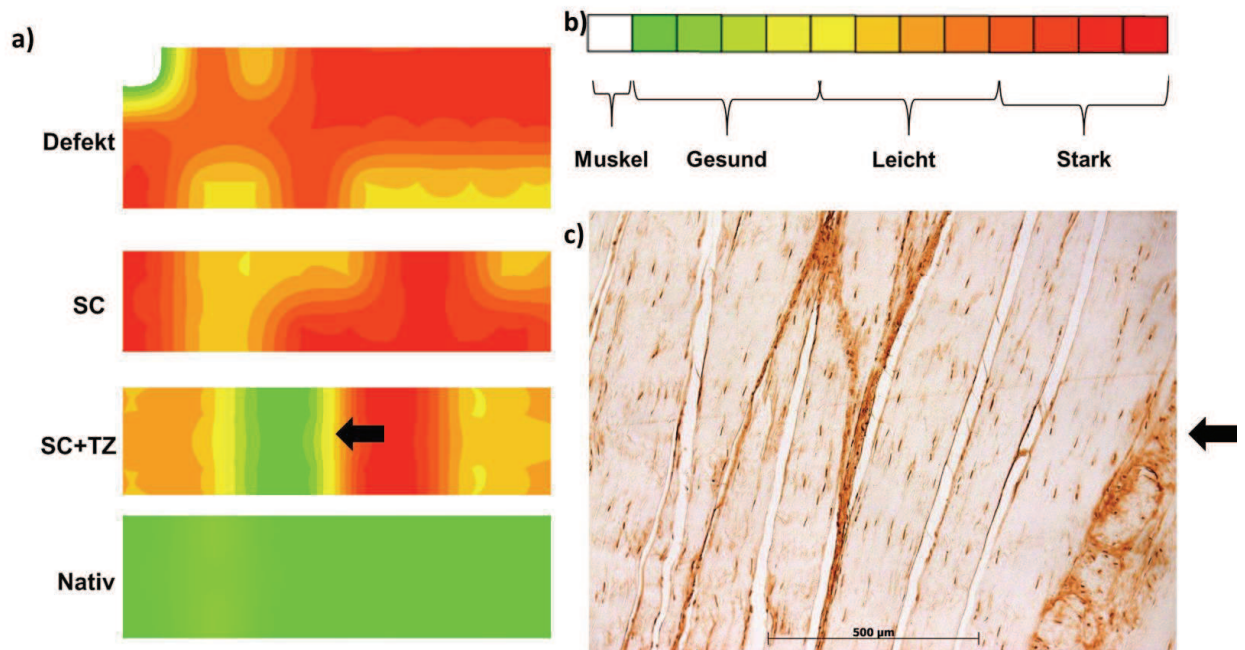


Abb. 39. a) Farbschematische Fibronectin Immunhistofärbung Teil III, b) Farbskala zu Fibronectin
c) C4 Teil III SC+TZ 0

5.2.8 Tenascin C

In der Färbung auf Tenascin C nach Abb. 40a-d) war Sehnengewebe in allen Gruppen negativ, wo hingegen das mitangeschnittene Muskelgewebe positiv angefärbt wurde (Abb.40e)). Hieraus leitet sich ab, dass natives Sehnengewebe kein Tenascin C enthält.

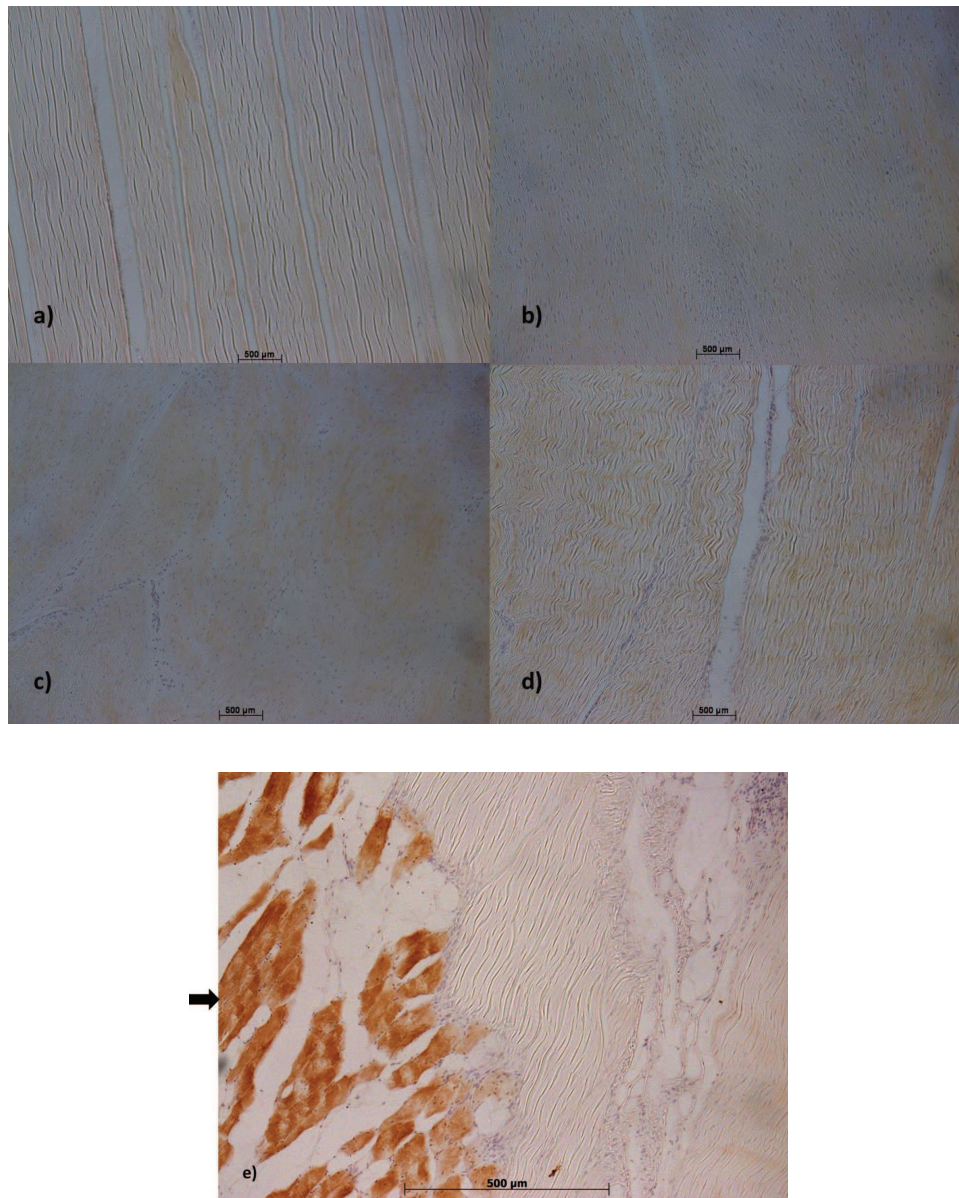


Abb. 40. Tenascin C, a-d) 100-fache Vergrößerung, a) C1 Teil III Nativ, b) A1 Teil III Defekt, c) B1 Teil III SC, d) C2 Teil III SC+TZ
e) Tenascin C, 200-fache Vergrößerung, C2 Teil I SC+TZ Pfeil: Muskel positiv

5.2.9 Osteopontin

In dieser Antikörperreaktion werden erneut drei Anfärbungen unterschieden. 0 in Abb. 41 a) zeigt sich homogen positiv angefärbt. In dieser Färbung stellen sich alle Nativsehnen dar. Die in Abb. 41 b) gezeigte Färbung ist inhomogen und teilweise stärker gefärbt als die Nativsehne und wurde mit 1 beurteilt. Die größte Veränderung zu Abb. 41 a) stellt c) dar, da hier das Gewebe homogen stark angefärbt ist. Dieses wurde mit 2 beurteilt. Auch sind in Abb. 41 d) Luftpfeinschlüsse im Defektgewebe dargestellt, was zeigt, dass der Defekt hier noch nicht vollständig mit neuem Gewebe ausgefüllt ist.

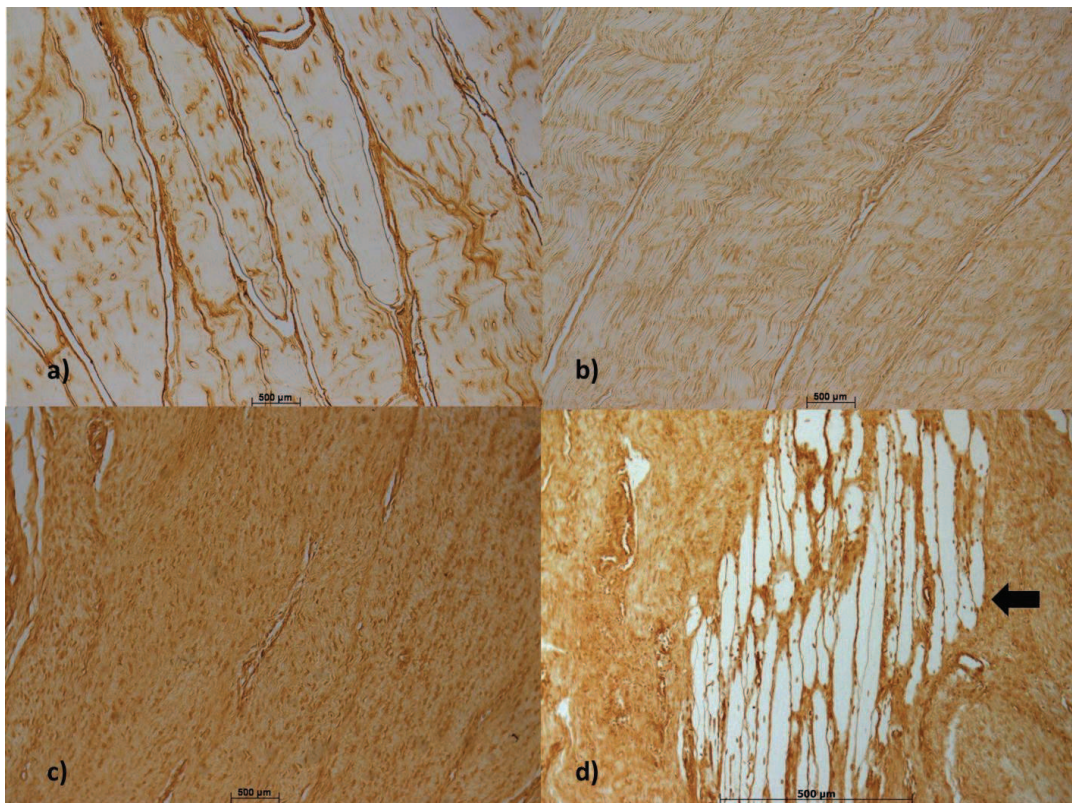


Abb. 41. Osteopontin, a-c) 100-fache Vergrößerung, a) C2b Teil III Nativ **0**, b) C2 Teil III SC+TZ **1**, c) A4 Teil III Defekt **2**, d) A4 Teil I Defekt Luftpfeinschlüsse in 200-facher Vergrößerung

Im Gruppenvergleich mit farbschematischer Darstellung nach Abb. 42 a) zeigt sich in der Defektgruppe und in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold starke Veränderungen des gesamten Gewebes bei der Anfärbung gegenüber der Nativgruppe (orange-

rot). Dagegen ist die Sehne in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten nur leicht verändert (gelb).

In der Übersicht der eingescannten mikroskopischen Schnitte in Abb. 42 b) zeigen sich jedoch kaum Unterschiede zwischen allen operierten Gruppen, da alle Veränderungen erfahren haben und diese sich dunkler darstellen. Die Nativgruppe dagegen kann schon ohne Vergrößerung als heller eingestuft werden, wobei auch bereits makroskopisch eine Struktur zu erkennen ist.

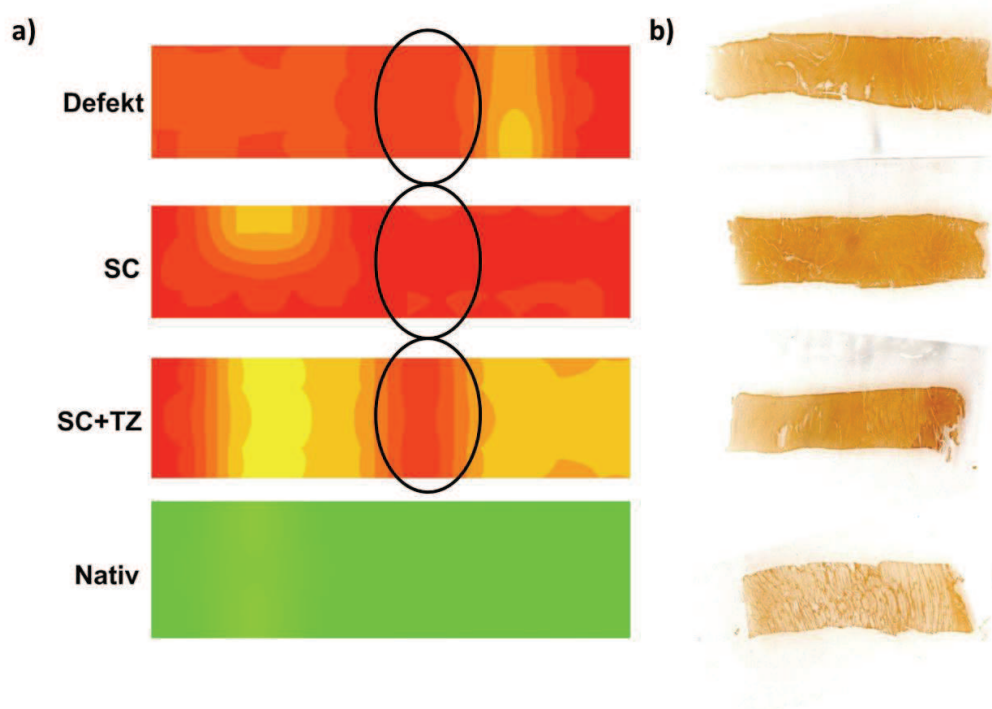


Abb. 42. a) Farbschematische Osteopontin Immunhistofärbung Teil III,
b) eingescannte mikroskopische Schnitte Osteopontin Teil III

Zusammenfassend können aus der immunhistologischen Auswertung folgende Ergebnisse beschrieben werden:

- In der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten ist noch unverändertes Gewebe sowohl in der Kollagen I wie auch in der Fibronectin Färbung vorhanden, wo hingegen in der Gruppe mit Scaffold sogar ein Verlust von Kollagen I zu erkennen war.

- In der Defektgruppe war eine Anfärbung auf Kollagen II im Defektbereich zu beobachten.
- Bei der Defektgruppe sowie in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold zeigte sich eine starke Fibronektinexpression.
- In der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten ist die Sehne in allen immunhistologischen Färbungen deutlich geringer verändert.

5.3 Sehnen-Knorpel-Knochen Übergang (Teile IV - VII)

5.3.1 Safranin O Färbung (Teile V-VII)

Um die Sehnen-Knorpel-Knochen Grenze zu untersuchen ist die Safranin O Färbung besonders gut geeignet. Hierbei sollte untersucht werden, ob der Knorpel durchgehend vorhanden war, oder ob dieser durch den Eingriff oder das Scaffold verändert wurde.

Dafür wurden zunächst alle Schnitte ohne biomechanische Testung untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass in der Defektgruppe bei 50 % der auswertbaren Schnitte der artikulärseitige Knorpel an der Sehnen-Knorpel-Knochen Grenze nicht mehr vorhanden oder beschädigt war. Knorpel zeigt sich in der Safranin O Färbung rot, wo hingegen sich Knochen blau-rosa darstellt. In Abb. 43 wird bei a) der geschädigte Knorpel in der Defektgruppe, bei b) der fehlende Knorpel in der Defektgruppe und bei c) als Vergleich der intakte Knorpel in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten aufgezeigt.

Diese Beobachtung konnte bei keiner anderen Gruppe gemacht werden.

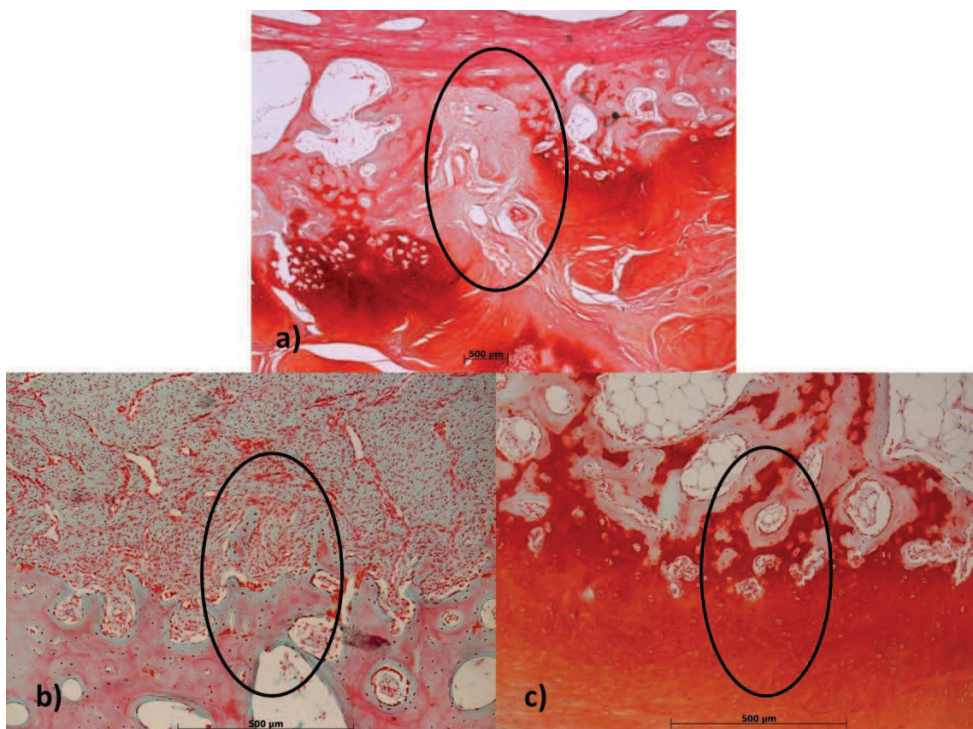


Abb. 43. a) A1 Teil V Defekt Knorpel nicht durchgängig, b) A4 Teil VI Defekt wenig Knorpel vorhanden, c) C2 Teil V SC+TZ Kontrollbild

Bei allen anderen drei Gruppen (unbehandeltes Scaffold, Scaffold und Tenozyten, Native Sehne) zeigten sich ein durchgehender Verlauf von Knochen, Knorpel und Sehne und eine breite Knorpelschicht, wie hier beispielhaft in Abb.44 dargestellt ist.

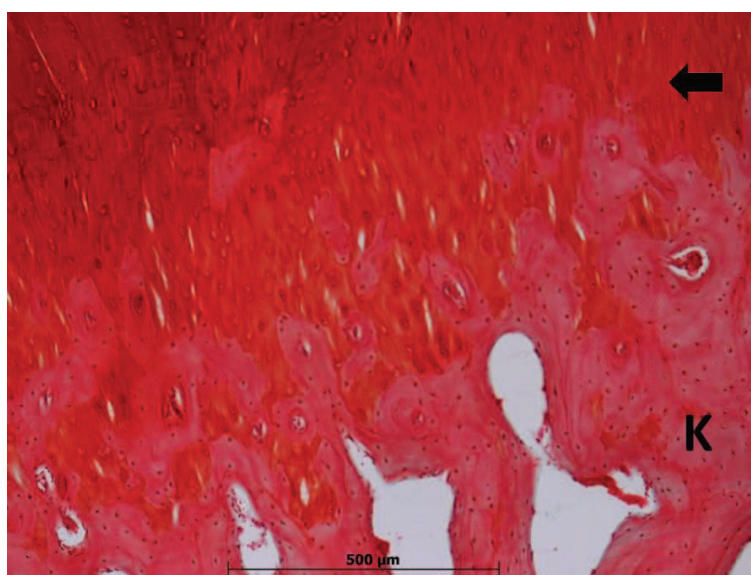


Abb. 44. A4 Teil V Nativ (Knochen = K, Knorpel = Pfeil)

5.3.2 Kollagen II (Teil V-VII)

Zur weiteren Untersuchung der in der Safranin O Färbung gewonnen Erkenntnisse wurden die Sehnen mit der Kollagen II Immunhistofärbung geprüft.

Aus Abb. 45 wird ersichtlich, dass in der Nativgruppe die drei Strukturen Knochenbälkchen, braun angefärbter Knorpel und nicht angefärbte Sehne gut abgrenzbar sind.

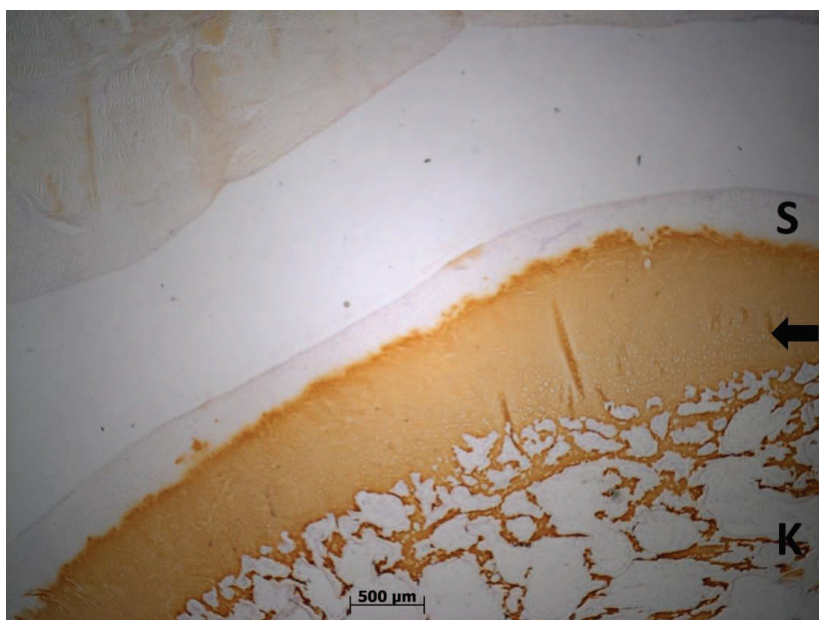


Abb. 45. C1 Teil V Nativ Kollagen II, K = Knochen, → = Knorpel, S = Sehne

Da nur der Knorpel angefärbt ist kann er sehr gut identifiziert und mit Erkenntnissen der Safranin O Färbung verglichen werden.

Dieses wird in der folgenden Abb. 46 im Vergleich mit Safranin O verdeutlicht, wobei a) der Knorpel mit Kollagen II braun angefärbt ist und in b) dasselbe in der Safranin O Färbung rot erscheint.

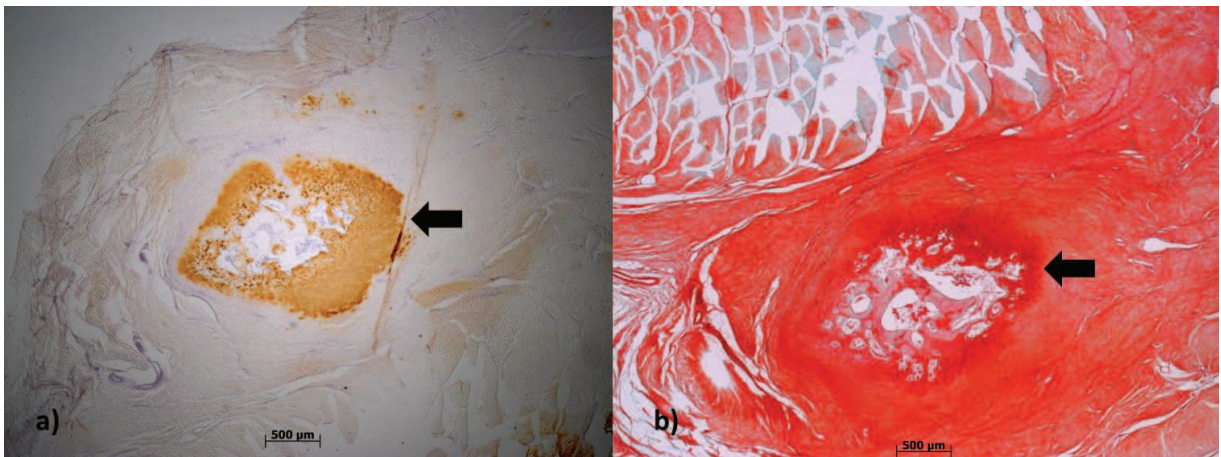


Abb. 46. a) A6 Teil V Kollagen II Defekt, b) A6 Teil V Safranin O Defekt (Knorpel = Pfeil)

In der Betrachtung der einzelnen Gruppen bestätigten sich die Ergebnisse der Safranin O Färbung.

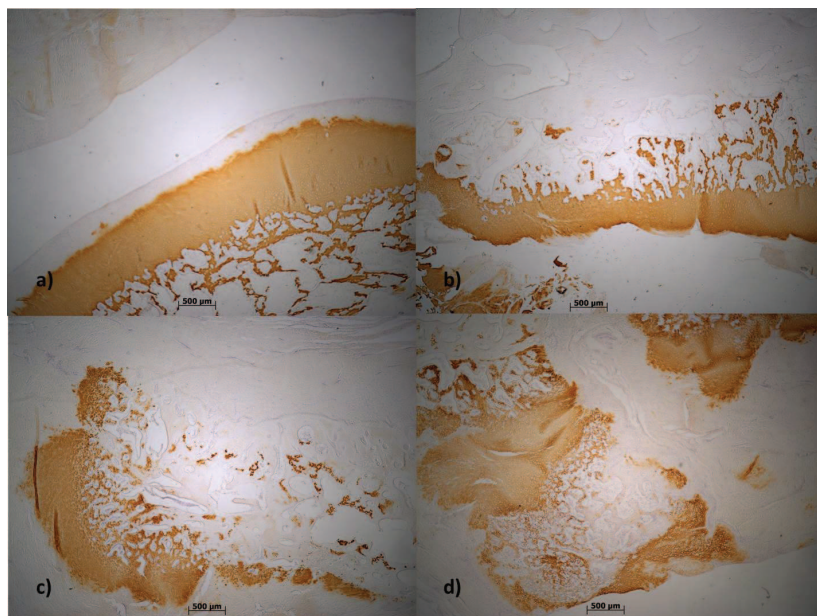


Abb. 47. a) C1 Teil V Nativ, b) C8 Teil V SC+TZ , c) A6 Teil V Defekt, A1 Teil V Defekt

Daraus kann geschlossen werden, dass sich eine reine Defektsetzung negativ auf das Knorpelwachstum auswirkt und sich der Knorpel zurückbildet.

Zusätzlich wurden in dieser Gruppe auch die aus der Biomechanik zerrissenen Präparate angefärbt. Hiermit konnten aber keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden.

5.3.3 Kollagen I (Teil V-VII)

Bei der Kollagen I Färbung sind auch die Ergebnisse der Kollagen II- und Safranin O Färbung bestätigt worden. Die Defektgruppe zeigte unregelmäßige oder nicht vorhandene Knorpelbeläge.

Bei der Untersuchung der rupturierten Präparate war zu erkennen, dass, wenn die Sehne knöchern ausgerissenen war, sie entweder direkt am Knochen oder am Knorpel-Sehnen Übergang ausreißt.

In Abb. 48 ist in den ersten beiden Bildern a) und b) der unvollständige Knorpelsaum der Defektgruppe wiedergegeben und die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold bei c) und die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten bei d) als Kontrolle zum Vergleich aufgeführt. Bei Abb. 48 c) und d) ist ein gleichmäßiger, breiter, undurchbrochener Knorpelsaum in weißlicher Anfärbung zu erkennen.

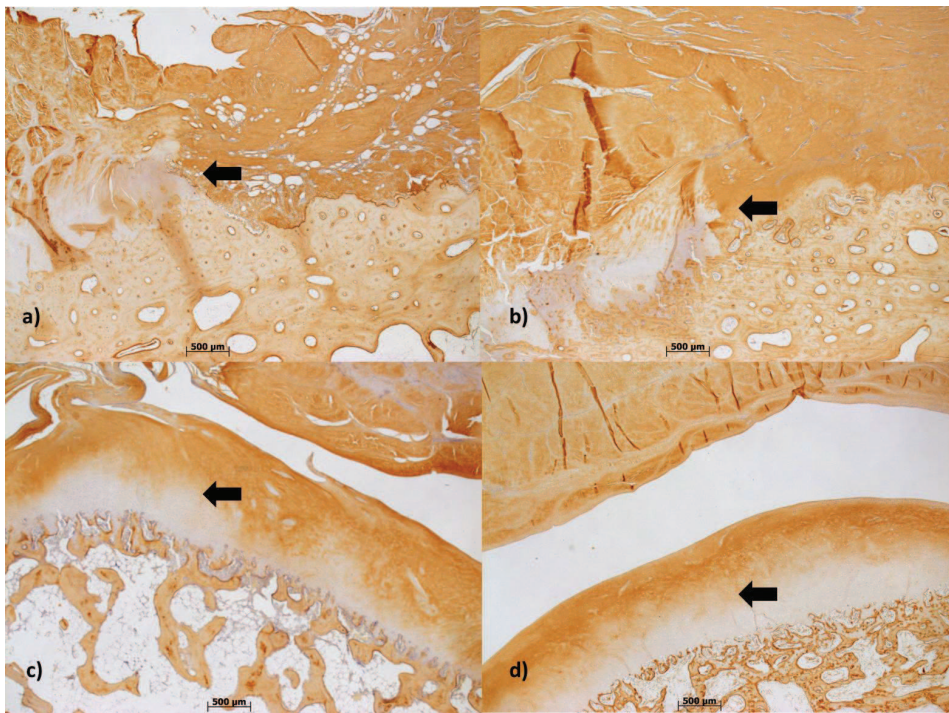


Abb. 48. a) A1 Teil V Defekt, b) A4 Teil VI Defekt, c) B1 Teil IV SC, d) C4 Teil V SC+TZ, (Pfeil = Knorpel) in der Kollagen I Färbung

In Abb. 49 sind Präparate mit Sehnenaustrissen entweder am Knochen oder Knorpel gezeigt. Weitere Aussagen können aber nicht getroffen werden, da die Sehnen auch schon in den biomechanischen Testungen an verschiedenen Stellen im Regenerat rupturierten und die Sehnen durch das Ausreißen makroskopisch in einem sehr schlechten Zustand waren.

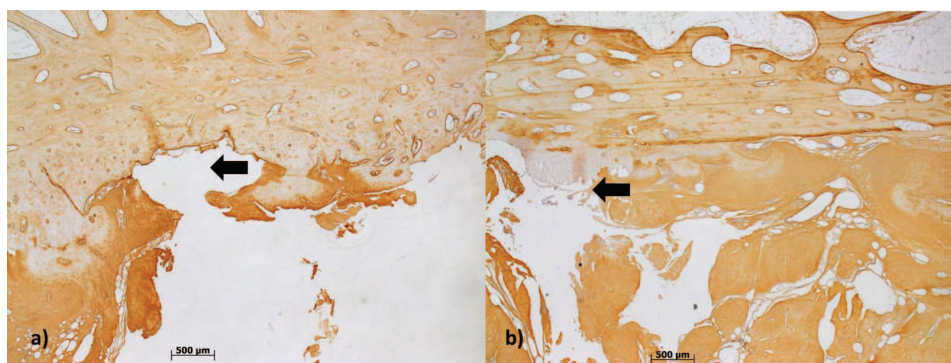


Abb. 49. a) B2 Teil V SC,, b) B3 Teil V in der Kollagen I Färbung (Pfeil = ausgerissene Stellen)

5.3.4 Fibronektin (Teil V-VII)

In der Fibronektin Immunhistofärbung konnte beurteilt werden, inwiefern der Knorpel oder die Sehne mit dem Knochen verbunden ist und in den Knochen reinwächst. Es kann vermutet werden, dass ein fließender Knorpel-Knochen Übergang für eine größere Stabilität spricht. Dieser fließende Übergang ist in Abb. 50 sowohl in allen Präparaten der Nativgruppe als auch in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten zu finden, hier bei Abb. 50 a) und d). Dieser Übergang findet sich auch an den Rändern der Defektgruppe und Gruppe mit unbehandeltem Scaffold, welcher in der Mitte aber durch das bei Kollagen I, II und Safranin O entdeckte fehlende Knorpelgewebe einen glatten Übergang zeigt, siehe Abb. 50 b) und c). Hier grenzt das Sehngewebe direkt an den Knochen und liegt dem Knochen ohne Einstrahlung in den Knochen auf. Dies deutet darauf hin, dass autologe Tenozyten das Knorpelwachstum und die knöcherne Sehnenintegration stimulieren. Außerdem ist vorstellbar, dass ein direkter Knochen-Sehnen Übergang, wie er in der Defektgruppe sowie der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold vorhanden war, eine Schwachstelle darstellt, so dass hier bei mechanischer Beanspruchung ein Sehnenaustriss umso wahrscheinlicher wird.

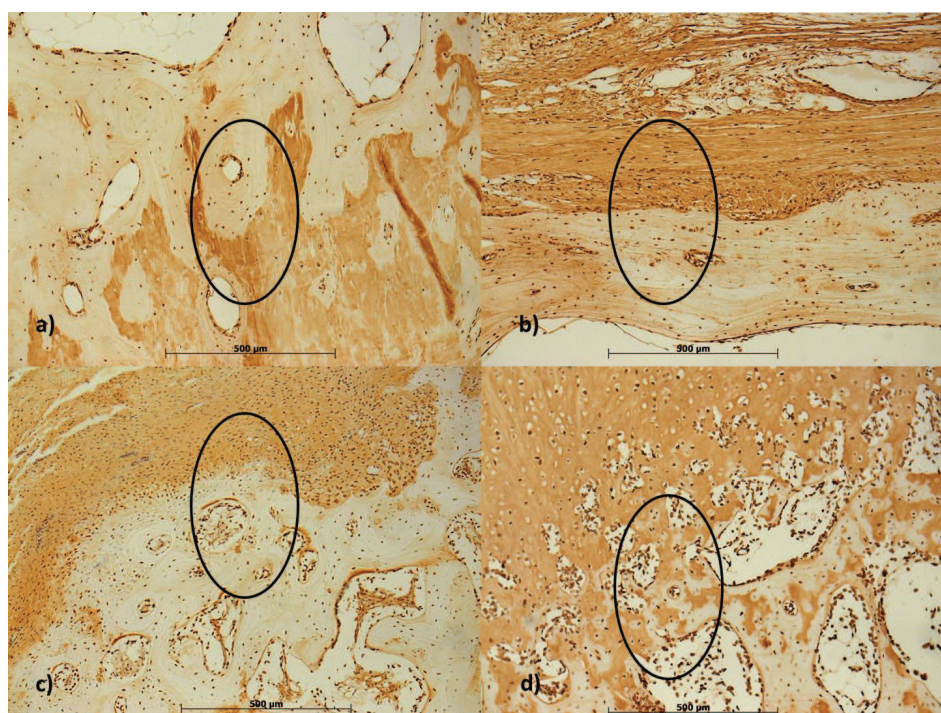


Abb. 50. a) A4 Teil V Nativ, b) A1 Teil IV Defekt, c) B4 Teil VI SC, d) C2 Teil V SC+TZ
Fibronektin Färbung

5.3.5 Osteopontin (Teil V-VII)

In der Osteopontin Immunhistofärbung werden die mit Fibronektin gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Auch hier ist eindeutig eine bessere Verbindung zwischen der Sehne, dem Knorpel und dem Knochen in der Nativgruppe sowie in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten zu beobachten (Abb. 51 a) und d)). Ein direkterer Übergang von Knochen zu Sehne ist in der Defektgruppe und der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold zu sehen (Abb.51 b) und c)). Was hierbei zusätzlich deutlich wurde und besser zu differenzieren war, ist eine scheinbare Hyperplasie der Zellen in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold. In Abb. 52 ist dieses zum Vergleich zwischen Osteopontin (a) und Fibronektin (b) in der Vergrößerung dargestellt. Dies könnte eine Reaktion auf das Scaffold darstellen, welches ohne Tenozyten eine mechanische Reizung hervorruft.

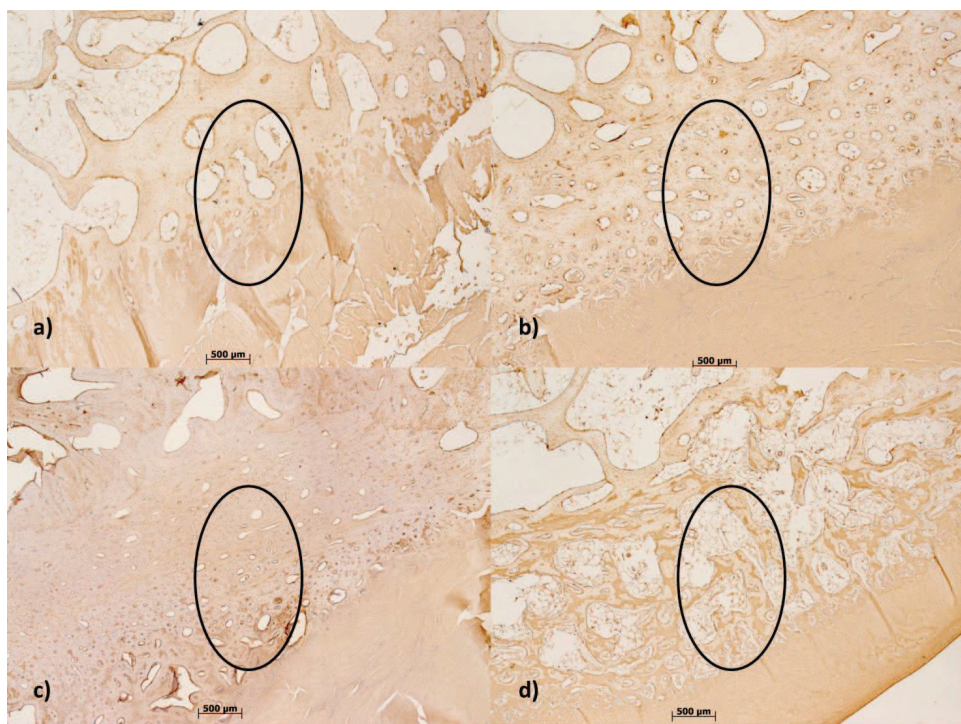


Abb. 51. a) A4 Teil V Nativ, b) A4 Teil VI Defekt, c) B4 Teil VI SC, d) C4 Teil V SC+TZ, Färbung auf Osteopontin

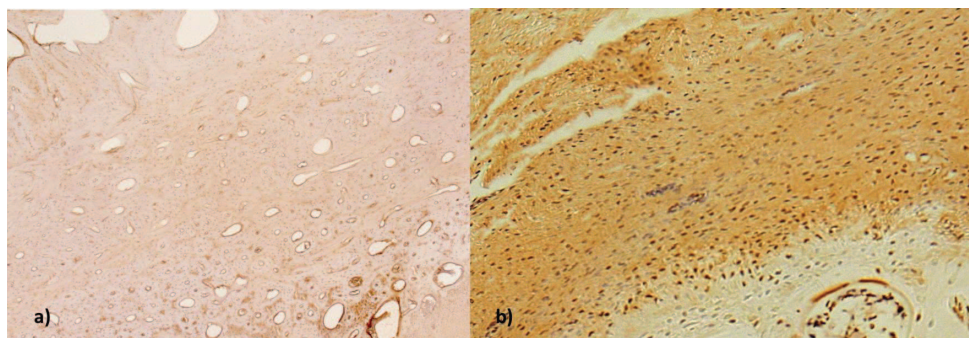


Abb. 52. a) B4 Teil VI SC Osteopontin, b) B4 Teil VI Fibronectin

5.3.6 Tenascin C (Teil V-VII)

In der Tenascin C Färbung konnte festgestellt werden, dass die Sehnen-Knorpel-Knochen Grenze nur teilweise angefärbt wurde. In der Nativgruppe war die Grenze in allen Schnitten negativ. Dem gegenüber waren in der Defektgruppe und in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold inhomogene Anfärbungen zu beobachten (Abb. 53 b) und c).

Dagegen zeigte sich in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten eine gleichmäßig positive Anfärbung (Abb. 53 d). Hieraus könnte geschlossen werden, dass in dieser Gruppe vermehrt Wachstumsprozesse ablaufen und sich die Sehnen-Knorpel-Grenze noch im Aufbau/Umbau befindet.

Das Weiteren zeigt sich in Abb. 54 a) und b), dass die Sehne in den Schnitten, in denen die Sehne knöchern ausgerissen ist, besonders stark positiv erscheint, obwohl sie eigentlich negativ ist, wie in Gruppe 1, Abschnitt 5.2.8, gezeigt werden konnte. Dies könnte erneut auf einen gesteigerten Umbauprozess hinweisen.

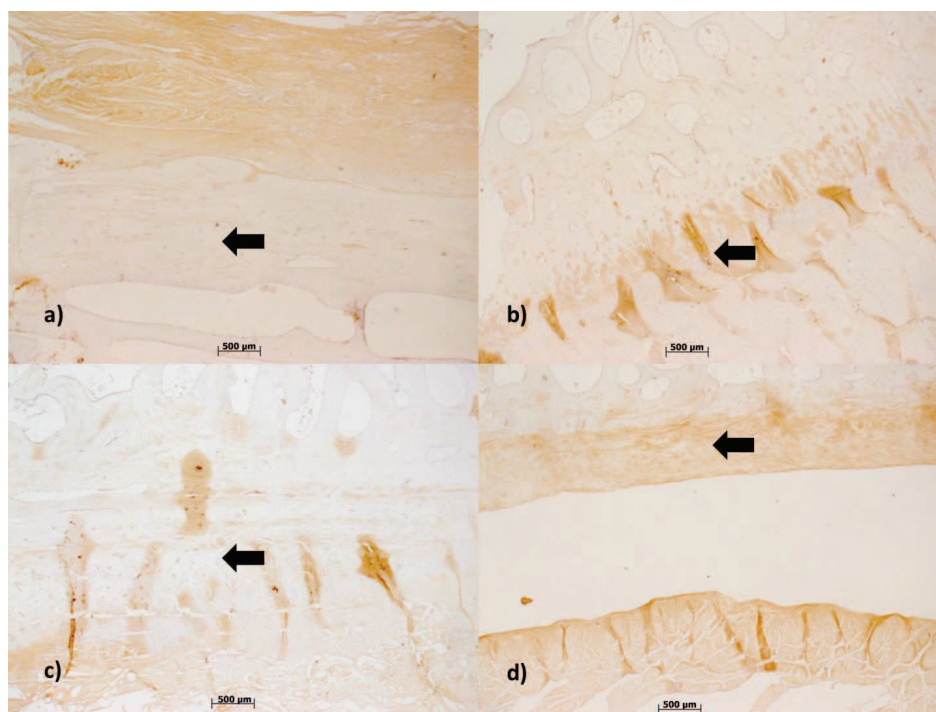


Abb. 53. a) A4 Teil IV Nativ, b) A4 Teil V Defekt, c) B2 Teil VI SC, d) C5 Teil VII SC+TZ, Knorpel = Pfeil, Färbung auf Tenascin C

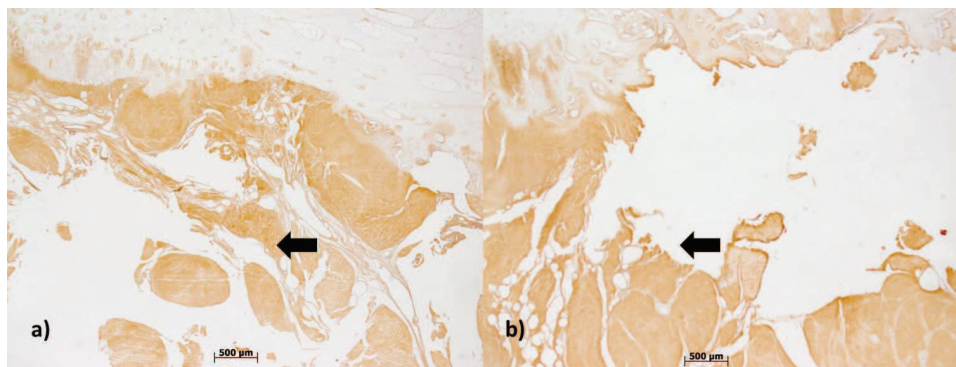


Abb. 54. a) B3 Teil V SC, b) B2 Teil V SC, stark positive Areale = Pfeil, Tenascin C Färbung

5.3.7 HE- und Picrosirius Red Färbung (Teil V-VII)

Die HE- und Picrosirius Red Färbung konnte in den Abschnitten V-VII keine weiteren Erkenntnisse erbringen, da mit dieser Färbung der Sehnen-Knorpel-Knochen Übergang nicht sinnvoll beurteilt werden kann.

Zusammenfassend können in der Untersuchung der Knorpel-Knochen Grenze folgende Aussagen festgehalten werden:

- In der Defektgruppe war der Knorpel in mehreren Färbungen im Defektbereich beschädigt oder nicht mehr vorhanden. Ein direkter Sehnen-Knochen-Übergang wie in der Defektgruppe spricht für eine geringere Stabilität.
- In der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten zeigte sich eine intakte Knorpelschicht.

6 Diskussion und Bewertung der Untersuchungsergebnisse

6.1 Allgemeines

Im diesem Kapitel sollen zunächst die verwendeten Methoden der durchgeführten Forschungsarbeit bezüglich deren Zielsetzung hinterfragt werden. Des Weiteren sind die Ergebnisse dieser Arbeit nochmals in einen Kontext mit dem bisherigen Kenntnisstand aus der Literatur gestellt. Dabei soll auch verdeutlicht werden, welche neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse gewonnen wurden und welche Fragen noch immer offen bleiben bzw. weiterer Forschungsbedarf zur Thematik besteht.

6.2 Methodenevaluierung

6.2.1 Allgemeines

Zunächst soll die gewählte Fragestellung und die dazu angewandten Methoden, sowohl der biomechanischen Testungen, als auch der histologischen Untersuchungen genau bewertet und hinterfragt werden.

6.2.2 Gewählter Forschungsansatz

6.2.2.1 „critical-size“-Defekt

Die Wahl einen „critical-size“-Defekt zu setzen wurde bewusst getroffen, da heutzutage trotz aller Fortschritte in Material und Operatitonstechnik vor allem für massive Sehnendefekte noch keine zufriedenstellende Rekonstruktionsmethode mit niedriger Komplikationsrate vorhanden ist. Klinisch ist bestens bekannt, dass sich Rotatorenmanschettendefekte ohne adäquate operative Rekonstruktion vergrößern und fettige Atrophie und Sehnenretraktion zunehmen und daher die Funktion der Sehnen-Muskel-Einheit erheblich herabgesetzt wird bzw. keine Rolle mehr für die Gesamtfunktion der

Schulter spielt [9, 73]. Eine Sehendefektheilung sollte im günstigsten Fall durch Neubildung von Sehnengewebe geschehen, wobei die Implantation eines Scaffolds ein festes Gerüst zur Zelladhäsion und Zellproliferation und nachfolgend Gewebeneubildung leisten sollte. Durch dieses Modell ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den „critical-size“-Defekt beschränkt, da bei kleinen Defekten ein spontanes Zusammenwachsen der Stumpfen möglich ist.

6.2.2.2 Versuchstier

Nach guten Ergebnissen in der Sehnenregeneration am Kleintiermodell [176] war die Übertragung der Ergebnisse auf das Großtier die logische Konsequenz, zumal im Kleintiermodell ein gewisses Selbstheilungspotential besteht und auch die kleinen anatomischen Strukturen im Kleintiermodell nicht mit der humanen Anatomie vergleichbar sind. Des Weiteren konnte mit dem Schaf als Großtiermodell untersucht werden, ob die beobachtete Ossifikation der Sehne in der Ratte nur auf den geringen Durchmesser der Sehne zurückzuführen ist. Besonders hervorzuheben ist, dass dieses Modell viel besser auf den Menschen übertragbar ist, da anatomische Größe und Struktur der Schafsehne der humanen Anatomie sehr ähnlich ist. Im Belastungsanspruch unterscheiden sich die RM von Schafen von dem Menschen, da durch den Vierfußstand eine kontinuierlichere Belastung der Sehnen stattfindet. Auch muss die Infraspinatus- statt der Supraspinatussehne gewählt werden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Infraspinatussehne übernimmt jedoch im Schaf die Aufgaben, die der Supraspinatussehne im Menschen zukommen, wodurch die Wahl der Infraspinatussehne im Schafmodell gerechtfertigt wird. Das Schaf als Großtiermodell ist innerhalb des Tissue Engineering ein bereits in der Vergangenheit auch von vielen anderen Studiengruppen oft verwendetes und anerkanntes Modell in der Untersuchung zur Rekonstruktion von Rotatorenmanschettendefekten [17, 83, 134, 142, 151, 170].

6.2.2.3 Heilungszeitraum

Der postoperative Heilungszeitraum von 12 Wochen wurde gewählt, da wie in Abschnitt 2.2.2 erläutert, der Umformungsprozess in der Sehnenheilung des Menschen nach drei Monaten abgeschlossen ist und sich hiernach nur noch Reifungsprozesse anschließen [196, 71, 194]. Daher wären weiterführende Studien mit einer Nachbeobachtungszeit von vielleicht 6 oder 12 Monaten in Erwägung zu ziehen.

6.2.3 Methoden der Biomechanik

Biomechanische Testungen werden in der orthopädischen Forschung zur Untersuchung von Zugkräften von Sehngewebe häufig verwendet. Hierbei können verschiedene Variablen in Betracht gezogen werden.

6.2.3.1 Fresh Frozen vs. direkte Verarbeitung

In der vorliegenden Arbeit wurden im Vorfeld auch Vorversuche mit fresh frozen (FF) Präparaten durchgeführt und die Ergebnisse mit frischen Präparaten verglichen. Hierbei zeigten sich jedoch in den FF-Varianten weitaus niedrigere Reißkräfte. Aufgrund ähnlich publizierter Ergebnisse in der Vergangenheit und der Tatsache, dass FF-Präparate nicht die gleichen elastischen Parameter wie eine frisch-präparierte noch vaskularisierte Sehne aufweisen, wird heutzutage eine direkte postmortale Verarbeitung empfohlen [100, 157].

6.2.3.2 Befestigung

Besondere Überlegungen wurden auf das Befestigungssystem zwischen Knochen und Sehnenmaterial verwendet, welches sowohl einen gleichmäßigen Zug auf den Sehnenquerschnitt als auch eine sichere und konstante Befestigung gewährleisten sollte. Bei dieser Problematik unterscheiden sich besonders die häufig beschriebenen Systeme für Rattenversuche vom Großtiermodell Schaf mit deutlich höher erreichbaren

Zugkräften. Die Fixierung des distalen Sehnenanteils im muskulotendinösen Übergang mit einer Sehneklemme übt Druck auf diese aus und könnte eine Verschiebung der biomechanischen Eigenschaften der Sehne hervorrufen. Da in den Versuchen eine Sehnenruptur jedoch nicht direkt unter der Klemme sondern am Sehnen-Knochen Interface auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass bei den Zugversuchen keine negative Beeinflussung der Ergebnisse durch die Befestigungsklemmen eingetreten sind. Auch wird die gewählte Fixierung der Sehnen zwischen zwei Klemmen als häufigste Methode zur biomechanischen Testung von Zugkräften von Sehngewebe in der Literatur beschrieben [192, 15, 144, 167, 223].

6.2.3.3 Zugversuche

Der gleichmäßig mit einer konstanten Vorschubgeschwindigkeit durchgeführter Zugversuch ist ebenfalls zu diskutieren. Physiologisch tritt eine repetitive Zugbeanspruchung der Sehnen auf und keine monoton stärker werdende Belastung [185, 192]. In verschiedenen Literaturquellen treten bei monoton bis zur maximalen Belastung gesteigerter Beanspruchung der Sehnen weitaus höhere Werte im Vergleich zur submaximalen repetitiven Belastung auf [131, 13]. Da aber das vorliegende Projekt bisher singulär in der Untersuchung der Rekonstruktion von Rotatorenmanschettendefekten mit autologen Tenozyten und biodegradabilem Kollagen-Scaffold ist, sollten zunächst nur die Maximalkräfte gemessen werden. Gleiche Versuchsbedingungen wurden allerdings auch in der Vorliteratur beschrieben [16, 123-125, 190]. Eine weitere Betrachtung bei zyklisch repetitiven Belastungen stellt ein Ansatz für weitere Forschung dar. Bei diesen Beanspruchungen finden sich in der allgemeinen Materialforschung durchaus „Ermüdungserscheinungen“ in Abhängigkeit vom repetitiven Beanspruchungsniveau und von der Anzahl der zyklischen Belastungswiederholungen.

6.2.4 Methoden der Histologie

Da die histologischen Untersuchungen der Sehnenregenerate unterschiedliche Färbungen und eine aufwendige Auswertung umfassen, besteht hierbei zur gewählten Vorgehensweise sicherlich Diskussionsbedarf über die Methodik.

6.2.4.1 Färbungen

Die Färbungen sollten einerseits einen guten Überblick bieten, aber auch bestimmte Fragestellungen gezielt untersuchen. Die HE-Färbung zur ersten Übersicht ist hierbei eine weit verbreitete und standardisierte Färbung mit deren Hilfe viele Parameter beurteilt werden konnten [220, 230]. Als zusätzliche Färbungen sollten mit Picrosirius Red- sowie Kollagen I und III die verschiedenen Kollagene voneinander differenziert werden und die Safranin O Färbung sollte die Beurteilung des Knorpelgewebes vereinfachen. Dabei ist Picrosirius Red in der Untersuchung von Sehnen als Standardfärbung etabliert und sehr häufig verwendet [5, 22, 79, 159, 187, 182]. Hierbei könnte allerdings durch verschiedene Protokolle und die damit verbundenen unterschiedlichen Färbungsintensitäten die Vergleiche zwischen Studien erschweren und verfälscht werden. Eine Betrachtung innerhalb einer Arbeit, mit einem standardisierten Protokoll für alle Gruppen, bringt aber eine gute Vergleichbarkeit. Die Safranin O Färbung wird in der Literatur häufig verwendet, darf aber nur zur Anfärbung auf Knorpel angewendet werden [24, 25, 33, 179, 200, 208]. Resümierend gesehen kann durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten drei Übersichtsfärbungen eine weitgehend umfassende und vielschichtige Untersuchung der Sehne vorgenommen werden.

Immunhistologische Färbungen im Schaf sind im Gegensatz zu den Übersichtsfärbungen als schwieriger anzusehen, da viele Antikörper nicht direkt auf Schaf reagieren sollten und daher falsch-negative oder falsch-positive Resultate auftreten können. Bei den verwendeten Antikörpern wurden parallel Präparate mit dem angegebenen spezifischen Tier (Ratte) mitgefärbt, um diese Problematik zu überbrücken und dennoch zu validen Ergebnissen zu gelangen. Des Weiteren wurden Antikörper gegen Schafe gewählt, die in bereits publizierter Literatur erfolgreich zur Anwendung kamen [68, 75,

72, 150]. Durch die fünf verschiedenen immunhistologischen Färbungen konnte auch hier eine weitreichende und umfassende Untersuchung des Sehnengewebes erzielt werden.

6.2.4.2 Auswertungsmethoden

Da bei einer Schafsehne, im Gegensatz zu der Sehne eines Kleintieres, aufgrund ihrer Größe eine Betrachtung der Gesamtstruktur nicht möglich ist, musste eine Unterteilung der Sehne in Abschnitte vorgenommen werden. Hierbei und bei der Seitenmarkierung mit einem Faden könnten Beschädigungen der Sehne und somit Veränderungen im histologischen Aufbau aufgetreten sein. Da in der histologischen Untersuchung jedoch keine Veränderungen der getrennten bzw. markierten Regionen in allen Schnitten gefunden wurden, kann dieser Einfluss vernachlässigt werden.

Die Betrachtung der Sehne in Quer- und Längsrichtung lässt ebenso aufgrund ihrer Größe in der Auswertung keine histologische Betrachtung der Rekonstruktion des ehemaligen „critical-size“-Defekts als Gesamtkonstrukt zu. In dieser Arbeit sollte der Schwerpunkt auf der Beurteilung der Sehne vor allem hinsichtlich regenerativer Veränderungen und neuer Synthese von Sehnengewebe gelegt werden. Aus diesem Grund wurde das Hauptaugenmerk auf die Betrachtung der in einzelne Abschnitte unterteilten Sehnenstrukturen sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt gelegt werden.

Das Festlegen eines Standardverfahrens für die mikroskopische Beurteilung der Sehne wurde auch durch die Größe der Präparate erschwert. Für die detaillierte Beurteilung der Schafsehne unter dem Mikroskop finden sich in der Literatur keine Beschreibungen und sollte standardisiert werden, um einen Sehnen-Scaffold-Übergang histologisch beurteilen zu können. Die Verwendung von Gesichtsfeldern mit standardisierter Vergrößerung hilft hierbei, eine bessere Einordnung des Gewebes vornehmen zu können. Eine 100 %-ige Genauigkeit kann allerdings dabei nicht erreicht werden, da sowohl die Gesichtsfelder leicht variieren, als auch die exakte operative Defektsetzung vom manuellen feinmotorischen Geschick des Operateurs abhängig ist. Zusätzlich stellt die Bewertung eines Gesichtsfeldes mit einer Zahl eine Vereinfachung

des Gewebes dar und berücksichtigt nicht deren physiologischen Strukturschwankungen.

Der verwendete histologische Sehnenscore nach Longo et. al ist ein etabliertes Score-system zur histologischen Sehnenbeurteilung [145, 53, 162, 205]. Der Vorteil hierin lag zudem in der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen bereits publizierter Studien.

Die farbschematische Darstellung der Ergebnisse durch die Interpolationsmethode (Grafik-Programm Surfer) stellt eine in der Medizin noch nicht etablierte Darstellungsmethode dar und wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal zur farbschematischen Darstellung von histologischen Untersuchungen von Sehnenregeneraten verwendet. Aus unserer Sicht können damit sehr gute Visualisierungen von umfangreichen qualitativen und quantitativen Untersuchungsergebnissen erzeugt werden. Diese Methode wird darüber hinaus oftmals standardmäßig in den Naturwissenschaften verwendet, wobei die Interpolationsgrenzen genau festgelegt werden müssen [44, 56]. Bei den hier verwendeten Grenzen ist der Übergangsbereich zwischen den Gesichtsfeldern von dem Programm erstellt worden, so dass der Übergang der Ränder fließend verläuft. Damit wird unterstützt, dass auch in der Natur kaum abgebrochene Ränder vorkommen und beobachtet wurden. Der Vorteil der Methode ist ferner die bessere Vergleichbarkeit und Auswertbarkeit der verschiedenen Gruppen zueinander sowie eine klare farbschematische Darstellung, die die Ergebnisse auf einem Blick erfassen lässt.

6.3 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Das Thema „Sehnenregeneration von Rotatorenmanschettendefekten mit Kollagenscaffolds und autologen Tenozyten im Schaf“ ist ein noch nicht in der bisher publizierten Literatur beschriebener neuer Forschungsansatz im Gebiet der experimentellen Sehnenregeneration. Es konnten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse aus den biomechanischen und histologischen Ergebnissen in diesem Themenfeld erzielt werden. Durch die Ergebnisse eines vorherigen Kleintierprojektes konnte die Übertragung auf das Großtier vorgenommen werden, so dass hieraus gewonnene Resultate nicht nur

verglichen, sondern auch erweitert werden konnten [176]. Insbesondere stellt die Verwendung von autologen Tenozyten statt pluripotenter Stammzellen in Kombination mit einem biodegradablen Kollagen-Scaffold einen innovativen neuen Ansatz im Bereich des Tissue Engineering dar, welcher durch die Betrachtung der Ergebnisse vorangegangener Forschungsarbeiten [225, 222, 219, 149, 147, 176] als konsequente Folge anzusehen war.

Bezüglich der operativen Versorgung der Schafe, gleich welcher Gruppenzugehörigkeit, konnte bei den Tieren keine Bewegungsbeeinträchtigung und keine anderweitigen gesundheitlichen Probleme festgestellt werden. Ferner zeigten die Schafe in der Gruppe mit autologen Tenozyten und Kollagen-Scaffold trotz der Doppelbelastung von zwei Operationen keine Unterschiede in der postoperativen Regenerationsphase im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Dies ist eine sehr wichtige Erkenntnis, da in der Vergangenheit in nur wenigen experimentellen Studien beim Schaf zwei nachfolgende Eingriffe durchgeführt wurden [190, 52, 82, 152, 215]. Es ist daher anzunehmen, dass zwei kurzfristig aufeinanderfolgende Eingriffe mit Vollnarkose keine zu hohe körperliche Belastung für ein Großtier darstellen.

Des Weiteren wurden die Sehnen nach einem 12-wöchigen follow-up begutachtet und deutliche Unterschiede in der Struktur zwischen der Gruppe mit Scaffold und autologen Tenozyten und der Defektgruppe bzw. der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold festgestellt. Dabei erzielte das Sehnenregenerat mit Scaffold und Tenozyten, im Gegensatz zu den Sehnenregeneraten der beiden anderen Gruppen, dass die Gesamtsehne eine schlanke Struktur und parallele lineare Ausrichtung beibehielt, welches für die anatomische Zugrichtung und Lastaufnahme der Sehne von Vorteil ist.

Der ehemalige Defektbereich, welcher in den jeweiligen Gruppen unterschiedlich versorgt wurde, konnte in allen Gruppen makroskopisch noch vom gesunden Gewebe differenziert werden. Mikroskopisch zeigte die Gruppe mit Tenozyten und Scaffold jedoch die qualitativ höherwertigen histologischen Ergebnisse im Vergleich zur Defektgruppe und zur Gruppe mit unbehandeltem Scaffold. Darauf aufbauend sollten die Veränderungen der Sehne im Großtier mit dieser Methode weiter erforscht werden. Bevorzugt sollten Daten gesammelt werden, wie sich die Sehne nach einer längeren

Regenerationsphase nach Rekonstruktion, z.B. nach 6 oder 12 Monaten, darstellt. Mit den in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnissen können noch keine Erkenntnisse gesichert darüber abgeleitet werden, ob eine vollständige Sehnenrekonstruktion/-regeneration mit der hier angewandten neuen Methode möglich ist. Zum gegenwärtigen Stand können nur positive aussichtsreiche Ansätze beschrieben werden.

Nach den in Kapitel 4 beschriebenen Ergebnissen der Biomechanik wurden nach der Nativgruppe die höchsten Reißkräfte in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten ermittelt. Hierdurch wurde eine höhere Stabilität dieses Sehnenregenerates gegenüber der Defektgruppe bzw. der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold nachgewiesen. Eine Signifikanz aller biomechanischen Parameter konnte in der statistischen Analyse zwar nicht aufgezeigt werden, jedoch zeigten allein die Sehnenregenerate der Gruppe mit Tenozyten und Scaffold eine deutliche Tendenz hin zu den Werten der gesunden Sehnen und kamen diesen sehr nahe. Mit Hilfe der zusätzlichen Messung des Dehnungsweges konnte dargestellt werden, dass gesunde Sehnen die Fähigkeit besitzen besonders elastisch zu reagieren. Diese Eigenschaft sollte im Optimalfall auch durch eine Sehnenrekonstruktion erreicht werden, um erneut der alltäglichen Belastung Stand halten zu können. Hierbei erreichte die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten eine höhere Elastizität als die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold. Diese Eigenschaft konnte auch durch die Werte der Bruchdehnung und der Bruchspannung bekräftigt werden. Durch die fehlende Signifikanz bei der Berechnung dieser biomechanischen Parameter können diese Ergebnisse jedoch nicht homogen eingeordnet werden. Allerdings wurden auch in vorherigen Projekten anderer Forschungsgruppen mit Stammzellimplantationen ähnliche Ergebnisse und Tendenzen ohne Signifikanz beobachtet [18, 90-92, 39, 210, 226]. Als Hauptproblem ist hierbei die geringe Fallzahl zu vermeiden. Daher sollten weiterführende Großtierprojekte mit höherer Fallzahl angestrebt werden, um eine bessere Einordnung und statistische Absicherung der Ergebnisse zu gewährleisten.

Ein aussagekräftiges Ergebnis ergab aus den Zugversuchen die zusätzliche Ableitung des E-Moduls als Steifigkeitsparameter der Sehnen. Dieser Aspekt wurde bisher in der Literatur nur in geringem Maß berücksichtigt. In unseren Auswertungen konnte sowohl

für die Defektgruppe wie auch für die Gruppe mit unbehandeltem Scaffold eine signifikant höhere Steifigkeit, das heißt eine verminderte Elastizität, im Vergleich zu der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten und zur Nativgruppe gefunden werden. Dies bekräftigt ein weiteres Mal die Erkenntnis, dass die Belastbarkeit der Sehne sehr eng mit ihrer Elastizität bzw. mit ihrem Steifigkeitsgrad zusammenhängt. Daher sollte unserer Ansicht nach dieser Parameter in zukünftigen Untersuchungen mitbestimmt werden. Des Weiteren könnte eine erheblich größere Anzahl von Vergleichswerten bezüglich der anzustrebenden E-Module einer gesunden Sehne erzeugt werden, um daraus einen weiteren Parameter zum Kenntnisstand der idealen biomechanischen Beschaffenheit einer Sehne zu erhalten.

Histologisch konnten in allen Färbungen Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt werden. In Kapitel 5 ist ausgeführt, dass die gesunde Sehne eine sehr homogene und strukturierte Ordnung des Faserverlaufs aufzeigte und sich in den Gruppen histologisch der Defekt nicht eindeutig abgrenzen lässt. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass bei Sehnenverletzungen das Gewebe über den betroffenen Bereich hinaus verändert wird und daher immer die komplette Sehne geschwächt ist. Dieses war makroskopisch vorher nicht festzustellen. Die Verwendung von autologen Tenozyten kann diese Entwicklung positiv beeinflussen, da in der Gruppe mit Tenozyten und Scaffold in verschiedenen Färbungen vergleichbares Gewebe wie in der gesunden Sehne entdeckt werden konnte. Dies konnte in der Defektgruppe wie auch in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold nicht festgestellt werden. Demnach besitzen autologe Tenozyten die Fähigkeit, die Verletzung des gesamten Gewebes auf ein lokales Maß zu beschränken.

Bei der Betrachtung der Entzündungsreaktion ergab sich eine zwar stärkere aber auf den Defekt lokalisierte Entzündung in der Gruppe mit Scaffold und autologen Tenozyten, währenddessen in den beiden anderen Gruppen diffus über die ganze Sehne verbreitete Herde zu finden waren. Eine Reaktion auf das eingebrachte Scaffold scheint hier unwahrscheinlich, da auch in der Defektgruppe ohne Scaffoldimplantation eine Entzündungsreaktion zu finden war. Dies steht in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien, welche bei dem Gebrauch von Kollagen-Scaffolds ebenfalls keine Entzündungsreaktion verzeichneten [138, 95, 204]. Die verstärkte Entzündungsreaktion

in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten könnte daher auf die Tenozyten zurückzuführen sein, die möglicherweise eine vermehrte Entzündungsreaktion im Defektbereich triggerten. Durch die besser abgrenzbare Lokalisation des Entzündungsareals und das Ausbleiben des Übergreifens des Entzündungsvorgangs in das umliegende gesunde Sehngewebe muss dieses Phänomen aber kein negativer Faktor sein, sollte aber weiter untersucht werden.

Diese Faktoren können auch starke Umbau- oder Aufbauprozesse anzeigen, so auch der vermehrte Proteoglykangehalt und die starke Fibronektinexpression im Defektbereich. Beide Anhäufungen wurden nur in der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten deutlich vermehrt gefunden.

Ferner konnte im Defektbereich der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten eine größere Synthese von Kollagen III aufgezeigt werden, welches der Vorläufer des Kollagen I in der Sehnenproduktion darstellt. Dies wurde in keiner der beiden anderen Gruppen nachgewiesen und zeigt, da im Scaffold kein Kollagen III enthalten ist, somit eine Produktion von neuem Gewebe an. Dagegen konnte überraschenderweise in der Defektgruppe Kollagen II im Defektbereich festgestellt werden, welches physiologisch nicht in der Sehne vorkommt. Hieraus lässt sich vermuten, dass in einem nicht versorgten Sehnendefekt der Bereich mit sehnenfremden Gewebe überbrückt wird.

Bei der Untersuchung der Sehnen-Knorpel-Knochen Grenze, die in früheren Studien nicht durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass durch eine Defektsetzung Knorpelgewebe degeneriert, da wahrscheinlich der Stimulus des angrenzenden Gewebes fehlt. Dies kann durch eine Scaffoldimplantation verhindert werden. Die zusätzliche Verwendung der autologen Tenozyten hat dazu geführt, dass hierdurch ein verbesserter Sehnen-Knorpel-Knochen Übergang bestehen bleibt, welcher eine höhere Stabilität generiert. Da in den biomechanischen Testungen die Sehnen-Knorpel-Knochen Grenze aufgrund der erhöhten Rate an Sehnenrupturen in diesem Areal als Schwachstelle ausfindig gemacht werden konnte, sind Erkenntnisse über den histologischen Auf- bzw. Umbau dieses Bereiches bei Sehnenreparaturvorgängen von Vorteil.

Zusammenfassend können durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die alleinige Implantation eines Kollagen-Scaffolds führt zu keiner Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften der Sehne. Das Scaffold kann aber eine Entartung von Gewebe im Defekt verhindern und den Knorpel erhalten. Da jedoch durch ein unbehandeltes Scaffold keine Sehnenregeneration im Defektbereich erzielt werden kann, sind diese Vorteile kaum von Bedeutung. Daher muss die in Kapitel 1 aufgestellte **erste Hypothese**,

dass die alleinige Implantation eines Kollagen-Scaffolds eine biomechanische und histologische Verbesserungen bringt,

abgelehnt werden.

2. Mit der zusätzlichen Verwendung von autologen Tenozyten konnten jedoch die Vorteile des Scaffolds genutzt und sowohl höhere Reißkräfte erzielt, als auch die Elastizität der Sehnen gesteigert werden.

Histologisch konnte ein deutlich weniger verändertes umliegendes Sehngewebe als auch ein verkleinerter Defektbereich nachgewiesen werden. Im Sinne der Gewebeneubildung war eine vermehrte Kollagen III-Synthese festzustellen, welche nur auf die autologen Tenozyten zurückgeführt werden kann. Da aber in der Gesamtlänge des regenerierten Areals kein durchgehend gerichteter Faserverlauf beobachtet werden konnte, ist eine gesicherte Beurteilung des Vorteils der Tenozyten nicht abschließend festzustellen. Es kann allerdings eine deutliche Tendenz beschrieben werden, dass autologe Tenozyten das Potential besitzen möglicherweise in einem längerfristigen Regenerationsprozess eine vollständige Rekonstruktion eines Sehndefekts zu erreichen. Dieses Potential sollte als Gegenstand weitere Untersuchungen dienen.

Daher wird die **zweite Hypothese**,

dass autologe Tenozyten in Kombination mit einem Kollagen-Scaffold einen entscheidenden Vorteil gegenüber einer Defektdeckung mit einem unbehandelten Scaffold erbringen,

mit geringen Limitierungen angenommen.

7 Weiterführende Forschungsansätze und Ausblick

In weiteren Untersuchungen sollte das Schaf als Großtiermodell beibehalten werden. Das Kleintier hat sich hierbei aufgrund des gewissen Selbstheilungspotentials als auch aufgrund der geringen Größe der anatomischen Strukturen als nicht geeignet erwiesen [64, 173, 122, 176]. Zusätzlich können im Schafsmodell die Abläufe des Heilungsprozesses besser beobachtet werden, da hier eine längere Sehnenheilung benötigt wird und daher eine bessere Vergleichbarkeit mit der humanen Situation geschaffen wird.

Die Verwendung von autologen Tenozyten als neuer innovativer Forschungsansatz im Gebiet der Sehnenregeneration hat sich als sinnvoll erwiesen, da auf diese Art keine pluripotente Differenzierung von Stammzellen zu erwarten ist und auch die Gewinnung von autologen Tenozyten, z.B. durch eine Gewebebiopsie, einfacher durchzuführen ist als die von Stammzellen. Das Potential von autologen Tenozyten für die *in-vivo* Sehnenregeneration sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Zusätzlich könnten noch andere Moleküle in zukünftige Forschungsansätze verwendet werden, um Tenozyten in ihrer Funktion zu unterstützen bzw. zu triggern. Als Beispiel sei hier die Integration von Glykosaminoglykanen (GAG) in das Scaffolds genannt, wie auch Hortensius et al. [102] in ihrer *in-vitro* Studie beschrieben. In deren Arbeit konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivität der Tenozyten durch GAG gefördert werden kann. Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen Studien erzielt werden [32, 70, 93, 177, 156]. Die *in-vivo* Verwendung von GAG und Scaffolds zur Rekonstruktion von Sehnendefekten im Großtier wurde jedoch bisher nicht untersucht.

Die Kombination aus autologen Tenozyten und Scaffold zeigt sich als vielversprechender Ansatz, welcher weiter zu differenzieren ist, um die Basiserkenntnisse zu verifizieren und auszubauen. Allerdings bedarf es noch weiterer sorgfältig angelegter Großtierstudien bis die Übertragung auf den klinischen Einsatz im humanen Sehnenewebe möglich erscheint.

8 Zusammenfassung

a) Einleitung und Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Implantation eines Kollagen-Scaffolds in einen „critical size“-Defekt zu einer verbesserten Sehnenregeneration führt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten Sehnen mit reiner Defektsetzung Sehnen mit implantiertem Kollagen-Scaffold gegenübergestellt werden. Zusätzlich sollten autologe Tenozyten als potentielle Trigger der Sehnenregeneration verwendet werden. Die Tenozyten sollten aus der Patellasehne kultiviert und auf das Scaffold besiedelt werden, um eine höherwertige Rekonstruktion des Sehnendefektes anzustreben. Als Kontrollen wurden die kontralateralen gesunden Sehnen verwendet. Hierbei sollte untersucht werden, ob autologe Tenozyten einen zusätzlichen und entscheidenden Vorteil gegenüber der Implantation eines unbehandelten Scaffolds in einen Sehnendefekt bringen. Vor allem war darauf zu achten, ob autologe Tenozyten *in-vivo* zu einer Sehnenproduktion führen könnten, um so eine vollständige Regeneration zu erzielen. Diese Fragestellungen sollten im Großtiermodell Schaf untersucht werden.

Die Aufgabenstellung und eine Zusammenstellung des Kenntnisstandes der Literatur sind in Kapitel 1 und 2 ausführlich behandelt.

b) Material und Methoden

Es wurden 24 ausgewachsene Merino Schafe verwendet. In jeder Gruppe wurden acht Schafe operiert und nach einer Regenerationsphase von 12 Wochen euthanasiert. Dabei unterschieden sich die Gruppen folgendermaßen:

1. Gruppe → Defektsetzung = *Defektgruppe (Defekt)*
2. Gruppe → Defektsetzung+Implantation eines Kollagen-Scaffolds = *Scaffoldgruppe (SC)*
3. Gruppe
 1. Teil: → Patellasehnenbiopsie → Kultivierung der Tenozyten,

2. Teil: → Defektsetzung → Besiedlung des Scaffolds → Implantation des besiedelten Kollagen-Scaffolds = *Tenozytengruppe (SC+TZ)*

4. Gruppe → Für die Kontrolle wurde die kontralateralen Infraspinatussehnen der Versuchstiere verwendet = *Kontrollgruppe (Nativ)*

Nach Absetzen der Schultern am Körperstamm der Schafe und nachfolgender anatomischer Präparation wurden die Sehnen zunächst makroskopisch beurteilt. Zur weiteren Untersuchung der erläuterten Fragestellung wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen erfolgte die biomechanische Testung mit Prüfung von Reißkraft, Dehnungsweg und daraus die Ableitung der Werte für die Bruchdehnung, Bruchspannung und des E-Moduls. Die Ergebnisse wurden nach dem Wilcoxon U Test statistisch evaluiert. Zum anderen wurden die histologischen Auswertungen mit verschiedenen Übersichtsfärbungen sowie die immunhistologischen Testungen auf Kollagen I und II, Tenascin C, Fibronectin und Osteopontin durchgeführt.

Anschließend konnten die Färbungen unter dem Mikroskop nach einem etablierten Score beurteilt und durch eine Interpolationsmethode farblich dargestellt werden. Dadurch war eine zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse möglich.

Eine ausführliche Darstellung von Material und Methoden ist in Kapitel 3 zu finden

c) *Ergebnisse*

In der makroskopischen Beurteilung konnte der ehemalige Defektbereich noch in allen Gruppen abgegrenzt werden. Dabei war eine Verbreiterung der Sehne und Verwachsung mit umliegendem ursprünglich gesundem Gewebe in der Defektgruppe wie auch in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold zu beobachten. Im Gegensatz hierzu stellte sich die Sehne in der Gruppe mit autologen Tenozyten und Scaffold weiterhin schlank und gerichtet dar.

In den biomechanischen Testungen konnten deutlich höhere Werte für die Gruppe mit autologen Tenozyten und Scaffold im Vergleich zu der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold und zur Defektgruppe erreicht werden. Dabei hatte die Defektgruppe die geringsten und die Nativgruppe die höchsten Werte. Die Werte der Defektgruppe waren

hierbei jeweils signifikant schlechter als die der gesunden Sehnen. Zwischen den Werten der Gruppe mit Scaffold und Tenozyten und der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold war zwar keine statistische Signifikanz vorhanden, jedoch zeigte die Gruppe mit Scaffold und Tenozyten in allen Parametern deutlich bessere Werte auf und näherte sich tendenziell denen der Nativsehnen. Ferner konnte eine signifikant höhere Elastizität der Sehne in der Gruppe mit Scaffold und autologen Tenozyten im Vergleich zur Defektgruppe und zur Gruppe mit unbehandeltem Scaffold nachgewiesen werden.

In der histologischen Auswertung zeigten sich die Sehnen in der kompletten Breite der Sehne verändert. Der Defekt konnte in der Defektgruppe und in der Gruppe mit unbehandeltem Scaffold nicht klar abgegrenzt werden. Dem hingegen waren in der Gruppe mit autologen Tenozyten und Scaffold nicht veränderte Anteile und ein deutlich kleinerer Defektbereich vorhanden. Des Weiteren konnte in dieser Gruppe im Vergleich zu beiden anderen Gruppen eine Kollagen III-Synthese sowie eine erhöhte Glykosaminoglykanproduktion und Fibronectinexpression festgestellt werden.

d) Schlussfolgerungen

Die Implantation eines unbehandelten Scaffolds erbringt keinen Zugewinn für die Sehnenregeneration. Allein die Knorpeldegeneration am Sehnen-Knorpel-Knochen Übergang konnte durch das Einbringen des Scaffolds aufgehalten werden. Anderweitig zeigten sich makroskopisch, biomechanisch und histologisch kaum Verbesserungen in der Beschaffenheit der Sehne durch die Verwendung des unbehandelten Scaffolds.

Die Kombination des Scaffolds mit den autologen Tenozyten zeigt hingegen erhebliches Potential in der Sehnenregeneration. Zum einen konnte eine Erhöhung der Reißkraft sowie der Elastizität festgestellt werden. Zum anderen wurde eine Verkleinerung und Beschränkung des ehemaligen Defektes als auch die Neuproduktion von Kollagen III aufgezeigt. Zusätzlich wurde eine höhere Regenerationsaktivität im ursprünglichen Defektbereich gefunden. Da der künstlich geschaffene Defekt nach 12-wöchiger Nachbeobachtungszeit noch nicht vollständig mit gerichtetem und strukturiertem Gewebe regeneriert war, muss für zukünftige Arbeiten eine längere Regenerationszeit postuliert werden.

Eine ausführliche zusammenfassende Beschreibung und Bewertung der in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse und eine Diskussion mit Ausblick finden sich in den Kapiteln 4 bis 6.

9 Literaturverzeichnis

1. Abrams J. Arthroscopic approach to massive rotator cuff tears. *Instructional course lectures*. 2006;55:59.
2. Amiel D, Frank C, Harwood F, et al. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1984;1:257-65.
3. ARNER O, Lindholm A, Orell S. Histologic changes in subcutaneous rupture of the Achilles tendon; a study of 74 cases. *Acta Chirurgica Scandinavica*. 1959;116:484.
4. Arroyo JS, Hershon SJ, Bigliani LU. Special considerations in the athletic throwing shoulder. *The Orthopedic clinics of North America*. 1997;28:69-78.
5. Arruda EM, Mundy K, Calve S, et al. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292:R983-7.
6. Åström M, Rausing A. Chronic Achilles Tendinopathy: A Survey of Surgical and Histopathologic Findings Mats. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995;316:151-64.
7. Athanasiou KA, Agrawal CM, Barber FA, et al. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1998;14:726-37.
8. Aurora A, McCarron JA, van den Bogert AJ, et al. The biomechanical role of scaffolds in augmented rotator cuff tendon repairs. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et al.]*.
9. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003;21:420-31.
10. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering*. 1999;5:267-77.
11. Bagnaninchi P-O, Yang Y, El Haj AJ, et al. Tissue engineering for tendon repair. *British journal of sports medicine*. 2007;41:e10-e10.
12. Baker CL, Liu SH. Comparison of open and arthroscopically assisted rotator cuff repairs. *The American journal of sports medicine*. 1995;23:99-104.
13. Barber FA, Herbert MA, Richards DP. Sutures and suture anchors: update 2003. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2003;19:985-90.
14. BASSETT RW, COFIELD RH. Acute tears of the rotator cuff: the timing of surgical repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1983;175:18-24.
15. Baums MH, Buchhorn G, Spahn G, et al. Biomechanical characteristics of single-row repair in comparison to double-row repair with consideration of the suture configuration and suture material. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2008;16:1052-60.
16. Baums MH, Buchhorn GH, Gilbert F, et al. Initial load-to-failure and failure analysis in single- and double-row repair techniques for rotator cuff repair. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2010;130:1193-9.
17. Baums MH, Spahn G, Buchhorn GH, et al. Biomechanical and magnetic resonance imaging evaluation of a single- and double-row rotator cuff repair in

- an in vivo sheep model. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2012;28:769-77.
18. Beitzel K, Solovyova O, Cote MP, et al. The Future Role of Mesenchymal Stem Cells in the Management of Shoulder Disorders. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2013.
 19. Benjamin M, Ralphs J. Tendons and ligaments-an overview. *Histology and histopathology*. 1997;12:1135-44.
 20. Benjamin M, Ralphs JR. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *International review of cytology*. 2000;196:85-130.
 21. Bennett WF. Arthroscopic repair of massive rotator cuff tears: a prospective cohort with 2-to 4-year follow-up. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2003;19:380-90.
 22. Bi X, Li G, Doty SB, et al. A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS). *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2005;13:1050-8.
 23. Biberthaler P, Wiedemann E, Nerlich A, et al. Microcirculation Associated with Degenerative Rotator Cuff Lesions In Vivo Assessment with Orthogonal Polarization Spectral Imaging During Arthroscopy of the Shoulder. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2003;85:475-80.
 24. Blaney Davidson EN, Vitters EL, Bennink MB, et al. Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014.
 25. Bleil J, Maier R, Hempfing A, et al. Histomorphological and histomorphometric characteristics of zygapophyseal joint remodelling in ankylosing spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*. 2014.
 26. Boes MT, McCann PD, Dines DM. Diagnosis and management of massive rotator cuff tears: the surgeon's dilemma. *Instructional course lectures*. 2006;55:45-57.
 27. Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, et al. Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a GraftJacket allograft: technique and preliminary results. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2008;24:403. e1-03. e8.
 28. Boyer MI, Watson JT, Lou J, et al. Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19:869-72.
 29. Branam BR, Johnson DL. Allografts in knee surgery. *Orthopedics*. 2007;30:925.
 30. Burkhart SS, Lo IK. Arthroscopic rotator cuff repair. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2006;14:333-46.
 31. BUSILACCHI A, ALOISI A, ENEA D, et al. BIOLOGICAL SCAFFOLDS FOR TENDON AND LIGAMENT REPAIR: NEW TREND.
 32. Caliarì SR, Harley BA. The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity. *Biomaterials*. 2011;32:5330-40.
 33. Camplejohn KL, Allard SA. Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 1988;89:185-8.

34. Cao D, Liu W, Wei X, et al. In vitro tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids: a preliminary report. *Tissue Eng.* 2006;12:1369-77.
35. Cao Y, Liu Y, Liu W, et al. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. *Plastic and reconstructive surgery.* 2002;110:1280-89.
36. Cao Y, Vacanti JP, Ma X, et al. Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes. *Transplant Proc.* 1994;26:3390-2.
37. Chansky H, Iannotti J. The vascularity of the rotator cuff. *Clinics in sports medicine.* 1991;10:807.
38. Chao YH, Tsuang YH, Sun JS, et al. Effects of shock waves on tenocyte proliferation and extracellular matrix metabolism. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:841-52.
39. Chen C-H, Chang C-H, Wang K-C, et al. Enhancement of rotator cuff tendon-bone healing with injectable periosteum progenitor cells-BMP-2 hydrogel in vivo. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy.* 2011;19:1597-607.
40. Chen J, Xu J, Wang A, et al. Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices.* 2009;6:61-73.
41. Chen J, Yu Q, Wu B, et al. Autologous tenocyte therapy for experimental Achilles tendinopathy in a rabbit model. *Tissue Eng Part A.* 17:2037-48.
42. Chen JM, Willers C, Xu J, et al. Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits. *Tissue engineering.* 2007;13:1479-91.
43. Chen JM, Willers C, Xu J, et al. Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits. *Tissue Eng.* 2007;13:1479-91.
44. Chen Q, Wu WJ, Zhang ZF, et al. [Geostatistic analysis of spatial pattern of *Fruhstorferiola tonkinensis* Will]. *Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology / Zhongguo sheng tai xue xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban.* 2007;18:467-70.
45. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical and Biological Engineering and Computing.* 2000;38:211-18.
46. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, et al. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell.* 1986;47:131-39.
47. Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, et al. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 2004;52:1151-7.
48. Codman EA. *The shoulder: rupture of the supraspinatus tendon and other lesions in or about the subacromial bursa:* RE Kreiger; 1984.
49. Codman EA. Complete rupture of the supraspinatus tendon. Operative treatment with report of two successful cases. 1911. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et al.].* 2011;20:347-9.
50. Cofield RH, Parvizi J, Hoffmeyer PJ, et al. Surgical Repair of Chronic Rotator Cuff Tears A Prospective Long-Term Study. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 2001;83:71-71.
51. Cofield RH, Parvizi J, Hoffmeyer PJ, et al. Surgical repair of chronic rotator cuff tears. A prospective long-term study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* 2001;83-A:71-7.

52. Coleman SH, Fealy S, Ehteshami JR, et al. Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* 2003;85-A:2391-402.
53. Cook J, Feller J, Bonar S, et al. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *Journal of orthopaedic research.* 2004;22:334-38.
54. Cook JJ, Cook EA. Bioscaffolds and the Reconstruction of Ligaments and Tendons in the Foot and Ankle. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery.* 2009;26:535-43.
55. Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clinics in podiatric medicine and surgery.* 2009;26:507-23.
56. Dastane A, Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J, et al. Development and evaluation of a new 3-D digitization and computer graphic system to study the anatomic tissue and restoration surfaces. *Journal of oral rehabilitation.* 1996;23:25-34.
57. De Deyne PG, Dauria RE, Bruder SP. The introduction of an extracellular matrix-based scaffold to the marketplace. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery.* 2007;16:S164-S70.
58. De Deyne PG, Kladakis SM. Bioscaffolds in tissue engineering: a rationale for use in the reconstruction of musculoskeletal soft tissues. *Clinics in podiatric medicine and surgery.* 2005;22:521.
59. DeFranco MJ, Derwin K, Iannotti JP. New therapies in tendon reconstruction. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* 2004;12:298-304.
60. Dietz SO, Habermeyer P, Magosch P. [Current concepts in treatment of rotator cuff tears]. *Zentralblatt für Chirurgie.* 2002;127:194-202.
61. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-17.
62. Dona E, Niechoda B, CHT M, et al. Tendons of the Hand. *Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule:* Springer; 2006:49-86.
63. Dopirak R, Bond JL, Snyder SJ. Arthroscopic total rotator cuff replacement with an acellular human dermal allograft matrix. *International Journal of Shoulder Surgery.* 2007;1:7.
64. Dressler M, Butler D, Boivin G. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *Journal of orthopaedic research.* 2005;23:287-93.
65. Economopoulos KJ, Brockmeier SF. Rotator cuff tears in overhead athletes. *Clinics in sports medicine.* 2012;31:675-92.
66. Edelstein L, Thomas S, Soslowsky L. Rotator cuff tears: what have we learned from animal models. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions.* 2011;11:150-62.
67. Ellman H, Kay SP. Arthroscopic subacromial decompression for chronic impingement. Two- to five-year results. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* 1991;73:395-8.
68. Enea D, Henson F, Kew S, et al. Extruded collagen fibres for tissue engineering applications: effect of crosslinking method on mechanical and biological properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2011;22:1569-78.

69. Fanelli GC, Tomaszewski DJ. Allograft use in the treatment of the multiple ligament injured knee. *Sports medicine and arthroscopy review*. 2007;15:139-48.
70. Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, et al. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue engineering*. 2006;12:459-68.
71. Fernandez-Sarmiento JA, Dominguez JM, Granados MM, et al. Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2013;95:246-55.
72. Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005;432:14-33.
73. Forslund C, Aspenberg P. CDMP-2 induces bone or tendon-like tissue depending on mechanical stimulation. *Journal of orthopaedic research*. 2002;20:1170-74.
74. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nature Biotechnology*. 1994;12:689-93.
75. Frias C, Reis J, Capela e Silva F, et al. Polymeric piezoelectric actuator substrate for osteoblast mechanical stimulation. *Journal of biomechanics*. 2010;43:1061-66.
76. Fröhlich V. Experimentelle Untersuchung biomechanischer Eigenschaften von Verankerungssystemen zur Rotatorenmanschetten-Rekonstruktion am Tuberculum majus des Humerus. Imu; 2009.
77. Fukuda H. The management of partial-thickness tears of the rotator cuff. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 2003;85:3-11.
78. Garner W, McDonald J, Koo M, et al. Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons. *Plastic and reconstructive surgery*. 1989;83:875-79.
79. Gebhard H, Bowles R, Dyke J, et al. Total disc replacement using a tissue-engineered intervertebral disc in vivo: new animal model and initial results. *Evidence-based spine-care journal*. 2010;1:62-6.
80. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*. 2003;55:1531-46.
81. Gerber C, Hersche O, Farron A. Isolated rupture of the subscapularis tendon. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 1996;78:1015-23.
82. Gerber C, Meyer DC, Schneeberger AG, et al. Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2004;86-A:1973-82.
83. Gerber C, Meyer DC, Von Rechenberg B, et al. Rotator cuff muscles lose responsiveness to anabolic steroids after tendon tear and musculotendinous retraction: an experimental study in sheep. *The American journal of sports medicine*. 2012;40:2454-61.
84. Gerber C, Schneeberger AG, Beck M, et al. Mechanical strength of repairs of the rotator cuff. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1994;76:371-80.
85. Gigante A, Cesari E, Busilacchi A, et al. Collagen I membranes for tendon repair: effect of collagen fiber orientation on cell behavior. *Journal of*

- orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2009;27:826-32.
86. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2008;89:338-44.
 87. Goodship AE, Birch HL, Wilson AM. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice.* 1994;10:323.
 88. Grillo HC. Origin of fibroblasts in wound healing an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local X-irradiation. *Annals of surgery.* 1963;157:453.
 89. Grood E, Butler D, Noyes F. Models of ligament repairs and grafts. In: *Symposium of the knee.* Mosby, St. Louis. 1985:169-81.
 90. Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, et al. Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *The American journal of sports medicine.* 2009;37:2126-33.
 91. Gulotta LV, Kovacevic D, Montgomery S, et al. Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site. *The American journal of sports medicine.* 2010;38:1429-37.
 92. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *The American journal of sports medicine.* 2011;39:1282-89.
 93. Gulotta LV, Rodeo SA. Growth factors for rotator cuff repair. *Clinics in sports medicine.* 2009;28:13-23.
 94. Gupta R, Leggin BG, Iannotti JP. Results of surgical repair of full-thickness tears of the rotator cuff. *The Orthopedic clinics of North America.* 1997;28:241.
 95. Gurkan UA, Cheng X, Kishore V, et al. Comparison of morphology, orientation, and migration of tendon derived fibroblasts and bone marrow stromal cells on electrochemically aligned collagen constructs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2010;94:1070-79.
 96. Haraldsson BT, Aagaard P, Qvortrup K, et al. Lateral force transmission between human tendon fascicles. *Matrix biology.* 2008;27:86-95.
 97. Hartright D, Bruce WJ. Biomechanical and Clinical Evaluation of Tendons and Ligaments. *Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule:* Springer; 2006:185-99.
 98. Hastings D. The non-operative management of collateral ligament injuries of the knee joint. *Clinical orthopaedics and related research.* 1980;147:22-28.
 99. Hintermann B, Gachter A. Arthroscopic findings after shoulder dislocation. *The American journal of sports medicine.* 1995;23:545-51.
 100. Hirpara KM, Sullivan PJ, O'Sullivan ME. The effects of freezing on the tensile properties of repaired porcine flexor tendon. *The Journal of hand surgery.* 2008;33:353-58.
 101. Ho JY, Miller SL. Allografts in the treatment of athletic injuries of the shoulder. *Sports medicine and arthroscopy review.* 2007;15:149-57.
 102. Hortensius RA, Harley BA. The use of bioinspired alterations in the glycosaminoglycan content of collagen-GAG scaffolds to regulate cell activity. *Biomaterials.* 2013;34:7645-52.
 103. Huang D, Balian G, Chhabra AB. Tendon tissue engineering and gene transfer: the future of surgical treatment. *The Journal of hand surgery.* 2006;31:693-704.

104. Iannotti JP, Codsí MJ, Kwon YW, et al. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears: A randomized, controlled trial. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2006;88:1238-44.
105. Ingelmark BE. Der Bau der Sehnen während verschiedener Altersperioden und unter wechselnden funktionellen Bedingungen. I. *Cells Tissues Organs*. 2008;6:113-40.
106. Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, et al. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1980;62:583-98.
107. James R, Kesturu G, Balian G, et al. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *The Journal of hand surgery*. 2008;33:102-12.
108. Jarvinen TA, Kannus P, Jarvinen TL, et al. Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2000;10:376-82.
109. Józsa L, Balint JB, Reffy A, et al. Histochemical and ultrastructural study of adult human tendon. *Acta histochemica*. 1979;65:250-7.
110. Józsa LG, Kannus P. *Human tendons: anatomy, physiology, and pathology*: Human Kinetics Champaign, IL; 1997.
111. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, et al. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue engineering*. 2006;12:369-79.
112. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*. 1979;11:447-55.
113. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2000;10:312-20.
114. Kannus P, Józsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 1991;73:1507-25.
115. Kannus P, Józsa L, Jarvinen M. Basic science of tendons. *Principles and practice of orthopaedic sports medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2000;2000:21-37.21.
116. Kannus P, Paavola M, Paakkala T, et al. [Pathophysiology of overuse tendon injury]. *Der Radiologe*. 2002;42:766-70.
117. Kannus P, Paavola M, Paakkala T, et al. Pathophysiologie des Sehnenüberlastungsschadens. *Der Radiologe*. 2002;42:766-70.
118. KASPERCZYK WJ, BOSCH U, OESTERN H-J, et al. Staging of patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament reconstruction: a biomechanical and histological study in a sheep model. *Clinical orthopaedics and related research*. 1993;286:271-82.
119. Kastelic J, Galeski A, Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connective tissue research*. 1978;6:11-23.
120. Kasten P, Loew M. Differenzialtherapie massiver Rotatorenmanschettenläsionen. *Der Orthopäde*. 2007;36:855-61.
121. Katzer A, Wening J, Becker-Männich H-U, et al. Die Rotatorenmanschettenruptur. *Unfallchirurgie*. 1997;23:52-59.

122. Khosla S, EGHBALI-FATOURECHI GZ. Circulating cells with osteogenic potential. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1068:489-97.
123. Klinger HM, Buchhorn GH, Heidrich G, et al. Biomechanical evaluation of rotator cuff repairs in a sheep model: suture anchors using arthroscopic Mason-Allen stitches compared with transosseous sutures using traditional modified Mason-Allen stitches. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2008;23:291-8.
124. Klinger HM, Koelling S, Baums MH, et al. Cell biological and biomechanical evaluation of two different fixation techniques for rotator cuff repair. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2009;19:329-37.
125. Klinger HM, Steckel H, Spahn G, et al. Biomechanical comparison of double-loaded suture anchors using arthroscopic Mason-Allen stitches versus traditional transosseous suture technique and modified Mason-Allen stitches for rotator cuff repair. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2007;22:106-11.
126. Koh JL, Szomor Z, Murrell GA, et al. Supplementation of rotator cuff repair with a bioresorbable scaffold. *The American journal of sports medicine*. 2002;30:410-3.
127. Kuhn MA, Ross G. Allografts in the treatment of anterior cruciate ligament injuries. *Sports medicine and arthroscopy review*. 2007;15:133-38.
128. Kukkonen J, Joukainen A, Itala A, et al. Operatively treated traumatic versus non-traumatic rotator cuff ruptures: a registry study. *Upsala journal of medical sciences*. 2013;118:29-34.
129. Kvist M, Jóazsa L, Järvinen MJ, et al. Chronic Achilles paratenonitis in athletes: a histological and histochemical study. *Pathology*. 1987;19:1-11.
130. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. *Principles of tissue engineering*: Academic press; 2011.
131. Leedle BP, Miller MD. Pullout strength of knotless suture anchors. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2005;21:81-85.
132. Levy HJ, Uribe JW, Delaney LG. Arthroscopic assisted rotator cuff repair: preliminary results. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1990;6:55-60.
133. Lichtenberg S, Liem D, Magosch P, et al. Influence of tendon healing after arthroscopic rotator cuff repair on clinical outcome using single-row Mason-Allen suture technique: a prospective, MRI controlled study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2006;14:1200-06.
134. Liem D, Dedy NJ, Hauschild G, et al. In vivo blood flow after rotator cuff reconstruction in a sheep model: comparison of single versus double row. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2013.
135. Ling S, Chen C, Wan R. A study on the vascular supply of the supraspinatus tendon. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 1990;12:161-65.
136. Liu SH, Baker CL. Arthroscopically assisted rotator cuff repair: correlation of functional results with integrity of the cuff. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1994;10:54-60.
137. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, et al. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995:265-78.
138. Liu Y, Ramanath H, Wang D-A. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. *Trends in biotechnology*. 2008;26:201-09.
139. Loew M, Habermeyer P, Wiedemann E, et al. [Recommendations for diagnosis and expert assessment of traumatic rotator cuff lesions]. *Der Unfallchirurg*. 2000;103:417-26.

140. Lohr J, Uhthoff H. The microvascular pattern of the supraspinatus tendon. *Clinical orthopaedics and related research*. 1990;254:35-38.
141. Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, et al. Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears. *The American journal of sports medicine*. 2008;36:533-8.
142. Lovric V, Ledger M, Goldberg J, et al. The effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendon-bone healing in a transosseous-equivalent sheep rotator cuff model. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2013;21:466-75.
143. Lynch SA, Renström PA. Treatment of acute lateral ankle ligament rupture in the athlete. *Sports Medicine*. 1999;27:61-71.
144. Ma CB, Comerford L, Wilson J, et al. Biomechanical evaluation of arthroscopic rotator cuff repairs: double-row compared with single-row fixation. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2006;88:403-10.
145. Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, et al. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *The American journal of sports medicine*. 2000;28:499-505.
146. Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, et al. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2007;83:1019-26.
147. Marturano JE, Arena JD, Schiller ZA, et al. Characterization of mechanical and biochemical properties of developing embryonic tendon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:6370-5.
148. Matschke S, Kessler T, Hochstein P, et al. Gutachterliche Aspekte bei der Beurteilung der distalen Bizepssehnenruptur. *Trauma und Berufskrankheit*. 1999;1:264-69.
149. McFadden TM, Duffy GP, Allen AB, et al. The delayed addition of human MSCs to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularisation of a collagen-GAG scaffold in vivo. *Acta biomaterialia*. 2013.
150. Melrose J, Burkhardt D, Taylor T, et al. Calcification in the ovine intervertebral disc: a model of hydroxyapatite deposition disease. *European Spine Journal*. 2009;18:479-89.
151. Melrose J, Smith MM, Smith SM, et al. Altered stress induced by partial transection of the infraspinatus tendon leads to perlecan (HSPG2) accumulation in an ovine model of tendinopathy. *Tissue & cell*. 2013;45:77-82.
152. Meyer DC, Gerber C, Von Rechenberg B, et al. Amplitude and Strength of Muscle Contraction Are Reduced in Experimental Tears of the Rotator Cuff. *The American journal of sports medicine*.
153. Milgrom C, Schaffler M, Gilbert S, et al. Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1995;77:296-8.
154. Milz S, Ockert B, Putz R. [Tenocytes and the extracellular matrix : a reciprocal relationship]. *Der Orthopade*. 2009;38:1071-9.
155. Modi A, Singh HP, Pandey R, et al. Management of irreparable rotator cuff tears with the GraftJacket allograft as an interpositional graft. *Shoulder & Elbow*. 2013.

156. Molloy T, Wang Y, Murrell GA. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Medicine*. 2003;33:381-94.
157. Moon DK, Woo SL, Takakura Y, et al. The effects of refreezing on the viscoelastic and tensile properties of ligaments. *Journal of biomechanics*. 2006;39:1153-57.
158. Moore DR, Cain EL, Schwartz ML, et al. Allograft reconstruction for massive, irreparable rotator cuff tears. *The American journal of sports medicine*. 2006;34:392-96.
159. Moraes JR, Facco GG, Moraes FR, et al. Effects of glycosaminoglycan polysulphate on the organisation of collagen fibres in experimentally induced tendonitis in horses. *The Veterinary record*. 2009;165:203-5.
160. Moseley HF, Goldie I. THE ARTERIAL PATTERN OF THE ROTATOR CUFF OF THE SHOULDER. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1963;45:780-9.
161. Moser M, Jablonski MV, Horodyski M, et al. Functional outcome of surgically treated massive rotator cuff tears: a comparison of complete repair, partial repair, and debridement. *Orthopedics*. 2007;30:479-82.
162. Movin T, Gad A, Reinholt FP, et al. Tendon pathology in long-standing achillodynia: biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthopaedica*. 1997;68:170-75.
163. Murrell GA, Lilly EG, 3rd, Collins A, et al. Achilles tendon injuries: a comparison of surgical repair versus no repair in a rat model. *Foot & ankle*. 1993;14:400-6.
164. Nasca RJ. The use of freeze-dried allografts in the management of global rotator cuff tears. *Clinical orthopaedics and related research*. 1988;228:218-26.
165. NEER CS. Impingement lesions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1983;173:70-77.
166. Neer CS, 2nd. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder. 1972. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2005;87:1399.
167. Nelson CO, Sileo MJ, Grossman MG, et al. Single-row modified mason-allen versus double-row arthroscopic rotator cuff repair: a biomechanical and surface area comparison. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2008;24:941-8.
168. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1997;7:55-61.
169. Obaid H, Connell D. Cell Therapy in Tendon Disorders What Is the Current Evidence? *The American journal of sports medicine*. 2010;38:2123-32.
170. Onay U, Akpınar S, Akgun RC, et al. Comparison of repair techniques in small and medium-sized rotator cuff tears in cadaveric sheep shoulders. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*. 2013;47:179-83.
171. Ozaki J, Fujimoto S, Nakagawa Y, et al. Tears of the rotator cuff of the shoulder associated with pathological changes in the acromion. A study in cadavera. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 1988;70:1224-30.
172. Pauly S, Klatte F, Strobel C, et al. Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff. *Eur Cell Mater*. 20:84-97.
173. Pauwels F. A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure]. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 1960;121:478.

174. Peacock Jr E. FUNDAMENTAL ASPECTS OF WOUND HEALING RELATING TO THE RESTORATION OF GLIDING FUNCTION AFTER TENDON REPAIR. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1964;119:241.
175. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, et al. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86:2229-33.
176. Pietschmann M, Frankewycz B, Schmitz P, et al. Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24:211-20.
177. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature materials*. 2009;8:457-70.
178. Plate JF, Haubruck P, Walters J, et al. Rotator cuff injuries in professional and recreational athletes. *Journal of surgical orthopaedic advances*. 2013;22:134-42.
179. Pothacharoen P, Najarus S, Settakorn J, et al. Effects of sesamin on the biosynthesis of chondroitin sulfate proteoglycans in human articular chondrocytes in primary culture. *Glycoconjugate journal*. 2013.
180. Putz R, Muller-Gerbl M. [Anatomy and pathology of tendons]. *Der Orthopade*. 1995;24:180-6.
181. Rathbun JB, Macnab I. The microvascular pattern of the rotator cuff. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1970;52:540-53.
182. Reed SK, Semevolos SA. Molecular and histologic evaluation of idiopathic hyperextension of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints in adult llamas. *American journal of veterinary research*. 2010;71:211-5.
183. Rees JD, Maffulli N, Cook J. Management of tendinopathy. *The American journal of sports medicine*. 2009;37:1855-67.
184. Ribbans WJ, Mitchell R, Taylor GJ. Computerised arthrotomography of primary anterior dislocation of the shoulder. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1990;72:181-5.
185. Rickert M, Georgousis H, Witzel U. The native tensile strength of the supraspinatus tendon. A biomechanical study. *Der Unfallchirurg*. 1998;101:265-70.
186. Rickert M, Loew M. [Traumatic rupture of the rotator cuff in an adolescent--case report]. *Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete*. 2000;138:340-3.
187. Rossi MA. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *International journal of cardiology*. 1998;66:183-94.
188. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, et al. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal of cellular physiology*. 2004;199:174-80.
189. Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, et al. The effects of augmentation with Swine small intestine submucosa on tendon healing under tension: histologic and mechanical evaluations in sheep. *The American journal of sports medicine*. 2006;34:275-80.
190. Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, et al. An in vivo comparison of the modified Mason-Allen suture technique versus an inclined horizontal mattress suture technique with regard to tendon-to-bone healing: a biomechanical and histologic study in sheep. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et al.]*. 2007;16:115-21.

191. SCHMITZ JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986;205:299-308.
192. Schneeberger AG, von Roll A, Kalberer F, et al. Mechanical Strength of Arthroscopic Rotator Cuff Repair Techniques An in Vitro Study. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2002;84:2152-60.
193. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, et al. Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol*. 2004;122:219-28.
194. Seto AU, Culp BM, Gatt CJ, Jr., et al. Radioprotection provides functional mechanics but delays healing of irradiated tendon allografts after ACL reconstruction in sheep. *Cell and tissue banking*. 2013.
195. Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ. Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:1061-9.
196. Sharma P, Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. 2005;3:309-16.
197. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2005;87:187-202.
198. Sher JS, Uribe JW, Posada A, et al. Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 1995;77:10-5.
199. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of biomechanics*. 2003;36:1529-53.
200. Singh A, Goel SC, Gupta KK, et al. The role of stem cells in osteoarthritis: An experimental study in rabbits. *Bone & joint research*. 2014;3:32-7.
201. Snyder SJ, Arnoczky SP, Bond JL, et al. Histologic evaluation of a biopsy specimen obtained 3 months after rotator cuff augmentation with GraftJacket Matrix. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2009;25:329-33.
202. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*. 2012;7:1918-29.
203. Strickland JW. The scientific basis for advances in flexor tendon surgery. *Journal of Hand Therapy*. 2005;18:94-110.
204. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, et al. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*. 2010;47:1-4.
205. Tallon C, Maffulli N, Ewen SW. Ruptured Achilles tendons are significantly more degenerated than tendinopathic tendons. *Medicine and science in sports and exercise*. 2001;33:1983-90.
206. Tang JB. Clinical outcomes associated with flexor tendon repair. *Hand clinics*. 2005;21:199-210.
207. Tashjian RZ. Epidemiology, natural history, and indications for treatment of rotator cuff tears. *Clinics in sports medicine*. 2012;31:589-604.
208. Tay LX, Lim CK, Mansor A, et al. Differential protein expression between chondrogenic differentiated MSCs, undifferentiated MSCs and adult Chondrocytes derived from oryctolagus cuniculus in vitro. *International journal of medical sciences*. 2014;11:24-33.

209. Tilley J, Chaudhury S, Hakimi O, et al. Tenocyte proliferation on collagen scaffolds protects against degradation and improves scaffold properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2012;23:823-33.
210. Tsai C-C, Huang T-F, Ma H-L, et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Shoulder Rotator Cuff: A Potential Source for Muscle and Tendon Repair. *Cell Transplantation*. 2013;22:413-22.
211. Tuoheti Y, Itoi E, Pradhan RL, et al. Apoptosis in the supraspinatus tendon with stage II subacromial impingement. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 2005;14:535-41.
212. Turner AS. Experiences with sheep as an animal model for shoulder surgery: strengths and shortcomings. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et al.]*. 2007;16:S158-63.
213. U. W. *Lehrbuch Histologie*; 2006.
214. Vailas A, Tipton C, Laughlin H, et al. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *Journal of Applied physiology*. 1978;44:542-46.
215. Van Kampen C, Arnoczky S, Parks P, et al. Tissue-engineered augmentation of a rotator cuff tendon using a reconstituted collagen scaffold: a histological evaluation in sheep. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2013;3:229.
216. Wagenhäuser MU, Pietschmann MF, Sievers B, et al. Collagen type I and decorin expression in tenocytes depend on the cell isolation method. *BMC musculoskeletal disorders*. 2012;13:140.
217. Walton JR, Bowman NK, Khatib Y, et al. Restore orthobiologic implant: not recommended for augmentation of rotator cuff repairs. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2007;89:786-91.
218. Watson EM, Sonnabend DH. Outcome of rotator cuff repair. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 2002;11:201-11.
219. Weisgerber DW, Kelkhoff DO, Caliari SR, et al. The impact of discrete compartments of a multi-compartment collagen-GAG scaffold on overall construct biophysical properties. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013;28C:26-36.
220. Wen JM, Tong Y, Han FY, et al. [Observation on pathological changes of the medial aspect of the first metatarsal head of hallux valgus]. *Zhongguo gu shang = China journal of orthopaedics and traumatology*. 2008;21:883-5.
221. Wong I, Burns J, Snyder S. Arthroscopic GraftJacket repair of rotator cuff tears. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 2010;19:104-09.
222. Xu Y, Wu J, Wang H, et al. Fabrication of Electrospun Poly(L-Lactide-co-varepsilon-Caprolactone)/Collagen Nanoyarn Network as a Novel, Three-Dimensional, Macroporous, Aligned Scaffold for Tendon Tissue Engineering. *Tissue engineering. Part C, Methods*. 2013.
223. Yamagami N, Mori R, Yotsumoto T, et al. Biomechanical differences resulting from the combination of suture materials and repair techniques. *Journal of Orthopaedic Science*. 2006;11:614-19.
224. Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, et al. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 2010;19:116-20.
225. Yin Z, Chen X, Zhu T, et al. The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair. *Acta biomaterialia*. 2013.

226. Yokoya S, Mochizuki Y, Natsu K, et al. Rotator Cuff Regeneration Using a Bioabsorbable Material With Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model. *The American journal of sports medicine*. 2012;40:1259-68.
227. Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2005;5:22-34.
228. Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies. *Spine*. 2010;35:E475-E80.
229. Yuan J, Murrell GA, Wei AQ, et al. Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. *Journal of orthopaedic research*. 2002;20:1372-79.
230. Zhang L, Li ZY, Sun J, et al. [Effect of Panax Notoginseng Saponins on autograft tendon healing in bone tunnel: interface histological characteristics]. *Zhongguo gu shang = China journal of orthopaedics and traumatology*. 2011;24:132-6.
231. Zschabitz A. [Structure and behavior of tendons and ligaments]. *Der Orthopade*. 2005;34:516-25.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Darstellung der Scaffoldbesiedlung, Toluidinblau Färbung mit 200-facher und 400-facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop fotografiert: a) I. Besiedlung der Schwammseite, II. Seite der Membran b) Darstellung der einzelnen Zellen im Schwamm mit 400-facher Vergrößerung	20
Abb. 2.	Besiedlungsmethode [176].....	20
Abb. 3.	Verwendete Operationsmethoden; a) Defekt, b) SC, c) SC+TZ	22
Abb. 4.	Rasterelektronenmikroskopisches Bild des Scaffolds: Foto: JOTEC GmbH, Hechingen, a) Membran, b) Schwamm	24
Abb. 5.	<i>In vitro</i> -Scaffoldbesiedlung	26
Abb. 6.	a) Humerus-Sehne-M.infraspinatus, b) Freipärierte Sehne mit Humerus.....	29
Abb. 7.	Schematische Darstellung der Halterung [76].....	30
Abb. 8.	a) Versuchsaufbau, b) Versuchsaufbau mit Zugkraftmesseinrichtung.....	31
Abb. 9.	Aufteilung der histologisch zu testenden Gruppen (Sehne = S, Knochen = K, Muskel = M) .	32
Abb. 10.	a) C1 Nativ (abgetrennte Sehne), b) B8 SC nach Biomechanik (geschnitten)	33
Abb. 11.	Makroskopisches Begutachtung nach Präparation, a) Links: Nativgruppe; rechts: Defektgruppe; 12 Wochen postoperativ (Pfeil = Sehne der Defektgruppe) b) Links: Nativgruppe; rechts: Defektgruppe in Naheinstellung	35
Abb. 12.	a) Defektgruppe, b)Tenozytengruppe, (Pfeil = ehemaliger Defektbereich).....	36
Abb. 13.	Beispiel einer Ergebniskurve aus den Sehnen-Zugversuchen	37
Abb. 14.	Zusammenstellung der Formeln für die abgeleiteten Kenngrößen	38
Abb. 15.	Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede der Reißkraft zwischen den Sehnen Gruppen, $p^*=0,0313$ signifikant, $p^{**}>0,05$ nicht signifikant 40	
Abb. 16.	Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede im den Dehnungsweg der Sehnen in allen Gruppen, $p>0,05$	41
Abb. 17.	Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede in der Bruchdehnung aller Gruppen, $p>0,05$	42
Abb. 18.	Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede in der Bruchspannung, $p^*=0,0313$, $p^{**}>0,05$	43
Abb. 19.	Darstellung der Untersuchungsergebnisse und Berechnung auf signifikante Unterschiede im E-Modul für alle Gruppen, $p^*=0,0313$, $p^{**}=0,0313$, $p^{***}=0,4375$ ns.	44
Abb. 20.	Gesichtsfeldschema zur mikroskopischen Beurteilung.....	50

Abb. 21. Beispiel der farblichen Darstellungen der histologischen Ergebnisse in einem Sehnenschnitt mit dem jeweiligen Grad der Veränderung des Sehngewebes	54
Abb. 22. a) C1 Teil I 0 Nativgruppe, b) A2 Teil III 1 Defektgruppe beide in 100-facher Vergrößerung	56
Abb. 23. a) A2 Teil III 2 Defektgruppe, b) A1 Teil III 3 Defektgruppe	56
Abb. 24. a) Farbschematische HE Färbung Teil III Faserverlauf, b) Farbskala	57
Abb. 25. HE Färbung Zellmorphologie in 400-facher Vergrößerung, a) A2 Teil I Nativgruppe 0 , b) A1 Teil I Defektgruppe 1 , c) A1 Teil III Defektgruppe 2 , d) A4 Teil I Defektgruppe 3	59
Abb. 26. a) Farbschematische HE-Färbung Teil III Zellmorphologie in allen Gruppen, b) eingescannte HE-Schnitte Teil III	60
Abb. 27. a) HE-Färbung Entzündung in 200-facher Vergrößerung a) A2 Teil III Defektgruppe 0 , b) B1 Teil III SC Gruppe 1 , c) A1 Teil I Defektgruppe 2 , d) C4 Teil III SC+TZ Gruppe 3	61
Abb. 28. a) Farbschematische Auswertung der HE Färbung Teil III Entzündungsreaktion in allen Gruppen	63
Abb. 29. A4 Teil II Defekt a) orange = Sehne, b) weiße Färbung = Muskel	64
Abb. 30. a) C2b Teil I Nativ, b) A1 Teil I Defekt.....	65
Abb. 31. a) B4 Teil IV SC, b) C2 Teil III SC+TZ	66
Abb. 32. Picosirius Red Färbung unter polarisierendem Licht, a) C1 Teil III Nativ 0 , b) c) d) A2 Teil III Defekt 1-3	67
Abb. 33. Picosirius Red Färbung unter polarisierendem Licht, a)-d) C4 Teil I-IV SC+TZ Gruppe grünliche Anfärbung	68
Abb. 34. a) Farbschematische Picosirius Red-Färbung Teil IV, b) eingescannte Picosirius Red Schnitte Teil IV	69
Abb. 35. Kollagen I a) A4 Teil I Nativ 0 , b) A1 Teil III Defekt 1 , c) A4 Teil I Defekt 2 , d) A4 Teil I Defekt 3	71
Abb. 36. a) Kollagen I Immunhistofärbung Teil III, b) Farbskala zu Kollagen I, c) C4 Teil III SC+TZ Gruppe inhomogener Abschnitt	72
Abb. 37. Kollagen II a-d) in 100-facher Vergrößerung, a) C2b Teil III Nativ, b) A2 Teil III Defekt, c) B4 Teil III SC, d) C2 Teil III SC+TZ, Kollagen II in 200-facher Vergrößerung,e) A1 Teil II Defekt rechter Übergang, f) A1 Teil III Defekt oberer Abschnitt	73
Abb. 38. a) A4 Teil I Nativ 0 , b) C2 Teil III SC+TZ Teil III 1 , c)B1 Teil III SC 1 , d) A2 Teil III Defekt 2 , e) C2 Teil III SC+TZ Wundgeschehen	75
Abb. 39. a) Farbschematische Fibronektin Immunhistofärbung Teil III, b) Farbskala zu Fibronektin c) C4 Teil III SC+TZ 0	76
Abb. 40. Tenascin C, a-d) 100-fache Vergrößerung, a) C1 Teil III Nativ, b) A1 Teil III Defekt, c) B1 Teil III SC, d) C2 Teil III SC+TZ e) Tenascin C, 200-fache Vergrößerung, C2 Teil I SC+TZ Pfeil: Muskel positiv.....	77
Abb. 41. Osteopontin,a-c) 100-fache Vergrößerung, a) C2b Teil III Nativ 0 , b) C2 Teil III SC+TZ 1 , c) A4 Teil III Defekt 2 , d) A4 Teil I Defekt Luftschlüsse in 200-facher Vergrößerung.....	78

Abb. 42. a) Farbschematische Osteopontin Immunhistofärbung Teil III, b) eingescannte mikroskopische Schnitte Osteopontin Teil III	79
Abb. 43. a) A1 Teil V Defekt Knorpel nicht durchgängig, b) A4 Teil VI Defekt wenig Knorpel vorhanden, c) C2 Teil V SC+TZ Kontrollbild	81
Abb. 44. A4 Teil V Nativ (Knochen = K, Knorpel = Pfeil)	82
Abb. 45. C1 Teil V Nativ Kollagen II, K = Knochen, → = Knorpel, S = Sehne	82
Abb. 46. a) A6 Teil V Kollagen II Defekt, b) A6 Teil V Safranin O Defekt (Knorpel = Pfeil)	83
Abb. 47. a) C1 Teil V Nativ, b) C8 Teil V SC+TZ, c) A6 Teil V Defekt, A1 Teil V Defekt	83
Abb. 48. a) A1 Teil V Defekt, b) A4 Teil VI Defekt, c) B1 Teil IV SC, d) C4 Teil V SC+TZ, (Pfeil = Knorpel) in der Kollagen I Färbung	85
Abb. 49. a) B2 Teil V SC,, b) B3 Teil V in der Kollagen I Färbung (Pfeil = ausgerissene Stellen)	86
Abb. 50. a) A4 Teil V Nativ, b) A1 Teil IV Defekt, c) B4 Teil VI SC, d) C2 Teil V SC+TZ Fibronectin Färbung	87
Abb. 51. a) A4 Teil V Nativ, b) A4 Teil VI Defekt, c) B4 Teil VI SC, d) C4 Teil V SC+TZ, Färbung auf Osteopontin	88
Abb. 52. a) B4 Teil VI SC Osteopontin, b) B4 Teil VI Fibronectin	88
Abb. 53. a) A4 Teil IV Nativ, b) A4 Teil V Defekt, c) B2 Teil VI SC, d) C5 Teil VII SC+TZ, Knorpel = Pfeil, Färbung auf Tenascin C	89
Abb. 54. a) B3 Teil V SC, b) B2 Teil V SC, stark positive Areale = Pfeil, Tenascin C Färbung	90

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Zusammenstellung der Mittelwerte der Versuchsergebnisse	45
Tab. 2 Zahlencodes für die Übersichtsfärbung	50
Tab. 3 Zahlencodes für immunhistologische Färbungen	52

Teile dieser Dissertationsschrift wurden auf folgenden Kongressen vorab präsentiert:

- III. Münchener Symposium für Experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskeletale Forschung, München, Februar 2013
- 61. Jahrestagung der VSOU, Baden Baden, Mai 2013
- 14th EFORT Congress, Istanbul, Juni 2013
- 28. Jahreskongress der GOTS, Mannheim, Juni 2013
- 20. Jahreskongress der DVSE e.V., Würzburg, Juni 2013
- 30. AGA-Kongress, Wiesbaden, September 2013
- 21. Jahreskongress der DVSE e.V., Wiesbaden, April 2014
- 62. Jahrestagung der VSOU, Baden Baden, Mai 2014
- 29. Jahreskongress der GOTS, München, Juni 2014
- 31. AGA-Kongress, Innsbruck, September 2014
- DKOU-Kongress, Berlin, Oktober 2014

Teile dieser Dissertationsschrift wurden mit folgenden Auszeichnungen prämiert:

- EFORT Free Paper Award (Silver), 14th EFORT Congress, Istanbul, Juni 2013
- DVSE Best Paper Award, 20. Jahreskongress der DVSE e.V., Würzburg, Juni 2013

Arbeitsprotokolle

In der Anlage A sind die, in dem experimentellen Teil der Arbeit, verwendeten Protokolle und Methoden zusammengestellt.

Protokoll 1 Herstellung von Primärmedium

1. FBS hitzeinaktivieren

- Erhitzung des FBS 30 Min. bei 56 °C im Wasserbad
- FBS auf zehn 50 ml Falcons steril aliquotieren
- Falcons bei -20 °C lagern

2. Primärmedium herstellen

- 50 ml aus der DMEM HG Flasche in Falcon pipettieren, beschriften und bei +4 °C zur Wiederverwendung lagern
- 50 ml FBS HI in DMEM HG Flasche vorsichtig dekantieren
- 312,5 µl Gencin 80 in das Medium pipettieren
- bei +4 °C lagern

Protokoll 2 Zellpassagierung

- Medienüberstand absaugen
- Spülen mit sterilem PBS
- 5 min Inkubation mit Trypsin-/EDTA-Lösung (1 ml je 25 cm²)
- (Licht-)Mikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs
- durch Medienzugabe (2 ml je 25 cm²) Trypsinwirkung inaktivieren
- abzentrifugieren (5 min, 300 G)
- in Medium resuspendieren

Das Prinzip der Zelllösung von der Oberfläche erfolgt durch Zugabe der Serinprotease Trypsin in Form einer Trypsin-EDTA-Lösung. Dabei werden die Strukturproteine an der Zelloberfläche gespalten und die Zellen lösen sich ab. Die intrazellulären Proteine werden bei einer Einwirkzeit von ca. 5 min in der Regel kaum beeinflusst und die Zellen bleiben unbeschädigt.

Protokoll 3 Anfertigen von Kryoschnitten

- Präparat vom -20°C Schrank in den vorgekühlte Gefrierbehälter des Kryostaten legen und vollständig mit tissue freezing medium bedecken
- Gefrierbehälter bei - 20 °C einfrieren
- Probe im Objektisch einspannen und Objektisch mit dem maximalen Rückschub zurück fahren
- Präparat in gewünschter Dicke schneiden und Gewebe mit der Beschriftungsfläche zum Gewebe auf den Objektträger aufziehen
- 2h über Nacht bei Raumtemperatur trocknen
- Präparate 10 min mit Aceton fixieren, 30min trocknen, in Alufolie einwickeln und bis zur Färbung bei - 20 °C lagern

Protokoll 4 Einbetten in Paraffinblöcke

- Gewebe aus gepufferten Formalin 4% in Gewebeförmchen geben
- 1h mit Leitungswasser wässern
- In 70% Alkohol lagern

1.Paraffinierungsreihe

	Temp	Vac	Immersion	Drain
Alkohol 70%	A	J	02:00:00	1:00
Alkohol 70%	A	J	01:00:00	1:00
Alkohol 96%	A	J	01:00:00	1:00
Alkohol 96%	A	J	01:00:00	1:00
Alkohol 96%	A	J	01:00:00	1:00
Alkohol 100%	A	J	01:00:00	1:00
Alkohol 100%	A	J	01:00:00	1:00
Alkohol 100%	A	J	01:00:00	1:20
Rotihistol	A	J	01:30:00	1:00
Rotihistol	A	J	01:30:00	1:20
Paraffin	60	J	01:30:00	1:20
Paraffin	60	J	01:30:00	1:20

- Gewebe in Gewebeförmchen in die Gießstation geben
- Gewebe aus Förmchen herausnehmen und in festgelegter Richtung in die Gussform geben
- Paraffin übergießen, Deckel draufgeben und nochmals Paraffin draufgeben
- auf Eis stellen und auskühlen lassen
- aus Gussförmchen herauslösen

Protokoll 5 Herstellung von Paraffinschnitten

- Wasserbad mit Aqua Dest. füllen und auf 45°C einstellen
- Wärmeplatte auf 45°C vorheizen
- Paraffinblock mit beschrifteter Seite nach oben einspannen und in gewünschter Dicke schneiden (5µm)
- Schnitte ins Wasserbad überführen, mit Objektträger aufnehmen und auf Wärmeplatte trocknen
- Schnitte 24h bei 50°C trocknen

Protokoll 6 Toluidinblaufärbung für Kryoschnitte

- 3min in 1% Toluidinblau (1g Toluidinblau +1g Natriumtartratsäure in 100ml Aqua dest. lösen, 2x filtrieren)
- 120min in Leitungswasser wässern
- Filterpapier oder Küchentuch aufpressen
- Mit DPX eindecken

Protokoll 7 Knochen entkalken

- Knochen in 20% Citronensäure/EDTA geben
- Lösung alle 2 Wochen wechseln (ca. ½ Jahr)

Protokoll 8 HE-Färbung mit Vollautomaten

Je Küvette 3 min.

1. Entparaffinieren

- 2x Rotihistol
- 2x 100% Alkohol
- 96% Alkohol
- 70% Alkohol

2. Färben

- 3x Hämalun Farblösung
- 2x fließendes Leitungswasser
- Eosin Farblösung
- Aqua dest.

3. Entwässern

- 3x 100% Alkohol
- 2x Rotihistol

Protokoll 9 Picrosirius Red Färbung

1. Ansetzen der Farblösungen

Pikrinsäure: 200ml Pikrinsäure+ 2 g Direct Red mit der Feinwaage und anschließendem Rühren auf Magnetrührer(10 Minuten)

Weigerts Hämatoxylin: 100ml Lösung A+ 100 ml Lösung B filtrieren

Essigsäures A.Dest.: 1000ml A.Dest.+ 5 ml Essigsäure 100%

2. Färbeprotokoll

a) Entparaffinieren:

2x10min in Rotihistol

2x 5min 100% Ethanol

5min 96% Ethanol

5min 70% Ethanol

5min A.Dest.

b) Färbung

15 min Weigerts Hämatoxylin

15 min fließendes Leitungswasser

30 min Pikrinsäure

2x kurz essigsäures A.Dest.

kurz A.Dest. spülen

a) Eindecken

- 5min Ethanol 96%
- 5min Ethanol 100%
- 2x10 min Rotihistol
- Eindecken mit DPX

Protokoll 10 Safranin O

a)Entparaffinieren: siehe Picro.Red

b)Färbung:

- 6 min 1,5% Safranin O
- 4x Aqua dest. je 8 mal dippen
- 10 sec 0,02%Fast Green
- 1% Eisessig (1ml Essigsäure+99ml Aqua dest.) 8 mal dippen
- Aqua dest. 8mal dippen
- 96% Alkohol 8x d.
- 2x100% Alkohol 8x d.
- 2x 10 min Rotihistol

- Eindecken mit DPX

Protokoll 11 Kollagen I Immunhistologie am Paraffinschnitt

Verwendet wurde der Antikörper Collagen I von Novus IgG1 NB600-450 aus der Maus.

Entparaffinierung:

- Objektträger beschriften
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 70% Alkohol

Immunhistologie:

- 10 min Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 30 min 37°C Proteinase XXIV (0,2 mg/ 1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min Methanol 100% + Wasserstoffperoxid 30% (198 ml+ 2 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min 37°C Chondroitinase AC (0,25U/1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30min RT Pferdeserum+ Ziegenserum (1:20 in PBS)
- Über Nacht 4°C, Antikörper, Kontrolle nur AK Verdünner
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min biotinylierter horse-anti-mouse (1:200 in AK Verdünner)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min ABC- Komplex (Komplex sollte vorher 30 min inkubieren/ Kühlschrank)
- 3x 5 min Waschpuffer
- Ca. 4 min Impact DAB im Dunkeln inkubieren
- Stoppen in Aqua Dest.
- 30 sec Gegenfärben mit Mayers Hämalan
- 10 min mit Leitungswasser bläuen

Aufsteigende Alkoholreihe:

- 5 min 70% Alkohol
- 5 min 80% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II

Eindecken: DPX und 40x50mm Deckgläser

Protokoll 12 Kollagen II

Collagen CII C2 von Develop. Stud. Hybr. Bank Iowa (1:6)

Entparaffinierung:

- Objektträger beschriften
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 70% Alkohol

Immunhistologie:

- 10 min Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 30 min 37°C Proteinase XXIV (0,2 mg/ 1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min Methanol 100% + Wasserstoffperoxid 30% (198 ml+ 2 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min 37°C Chondroitinase AC (0,25U/1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30min RT Pferdeserum+ Ziegenserum (1:20 in PBS)
- üN 4°C, Antikörper, Kontrolle nur AK Verdünner
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min biotinylierter horse-anti-mouse (1:200 in AK Verdünner)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min ABC- Komplex (Komplex sollte vorher 30 min inkubieren/ Kühlschrank)

- 3x 5 min Waschpuffer
- Ca. 4 min Impact DAB im Dunkeln inkubieren
- Stoppen in Aqua Dest.
- 30 sec Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 10 min mit Leitungswasser bläuen

Aufsteigende Alkoholreihe:

- 5 min 70% Alkohol
- 5 min 80% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II

Protokoll 13 Tenascin C

Tenascin C Novus IgG2a aus Maus NBP-42317 (1:100)

Entparaffinierung:

- Objektträger beschriften
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 70% Alkohol

Immunhistologie:

- 10 min Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 30 min 37°C Proteinase XXIV (0,2 mg/ 1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min Methanol 100% + Wasserstoffperoxid 30% (198 ml+ 2 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min 37°C Chondroitinase AC (0,25U/1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30min RT Pferdeserum+ Ziegenserum (1:20 in PBS)
- ün 4°C, Antikörper, Kontrolle nur AK Verdünner
- 3x 5 min Waschpuffer

- 30 min biotinylierter horse-anti-mouse (1:200 in Ak Verdünner)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min ABC- Komplex (Komplex sollte vorher 30 min inkubieren/ Kühlschrank)
- 3x 5 min Waschpuffer
- Ca. 4 min Impact DAB im Dunkeln inkubieren
- Stoppen in Aqua Dest.
- 30 sec Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 10 min mit Leitungswasser bläuen

Aufsteigende Alkoholreihe:

- 5 min 70% Alkohol
- 5 min 80% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II

Protokoll 14 Fibronektin

Fibronektin Sigma monoklonal IgG aus Maus F0791(1:50)

Entparaffinierung:

- Objektträger beschriften
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 70% Alkohol

Immunhistologie:

- 10 min Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 30 min 37°C Proteinase XXIV (0,2 mg/ 1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min Methanol 100% + Wasserstoffperoxid 30% (198 ml+ 2 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min 37°C Chondroitinase AC (0,25U/1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer

- 30min RT Pferdeserum+ Ziegenserum (1:20 in PBS)
- ün 4°C, Antikörper, Kontrolle nur AK Verdünner
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min biotinylierter horse-anti-mouse (1:200 in AK Verdünner)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min ABC- Komplex (Komplex sollte vorher 30 min inkubieren/ Kühlschrank)
- 3x 5 min Waschpuffer
- Ca. 4 min Impact DAB im Dunkeln inkubieren
- Stoppen in Aqua Dest.
- 30 sec Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 10 min mit Leitungswasser bläuen

Aufsteigende Alkoholreihe:

- 5 min 70% Alkohol
- 5 min 80% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II

Protokoll 15 Osteopontin

Osteopontin IgG Poly aus Kaninchen gegen Human (1:50)

Entparaffinierung:

- Objektträger beschriften
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 70% Alkohol

Immunhistologie:

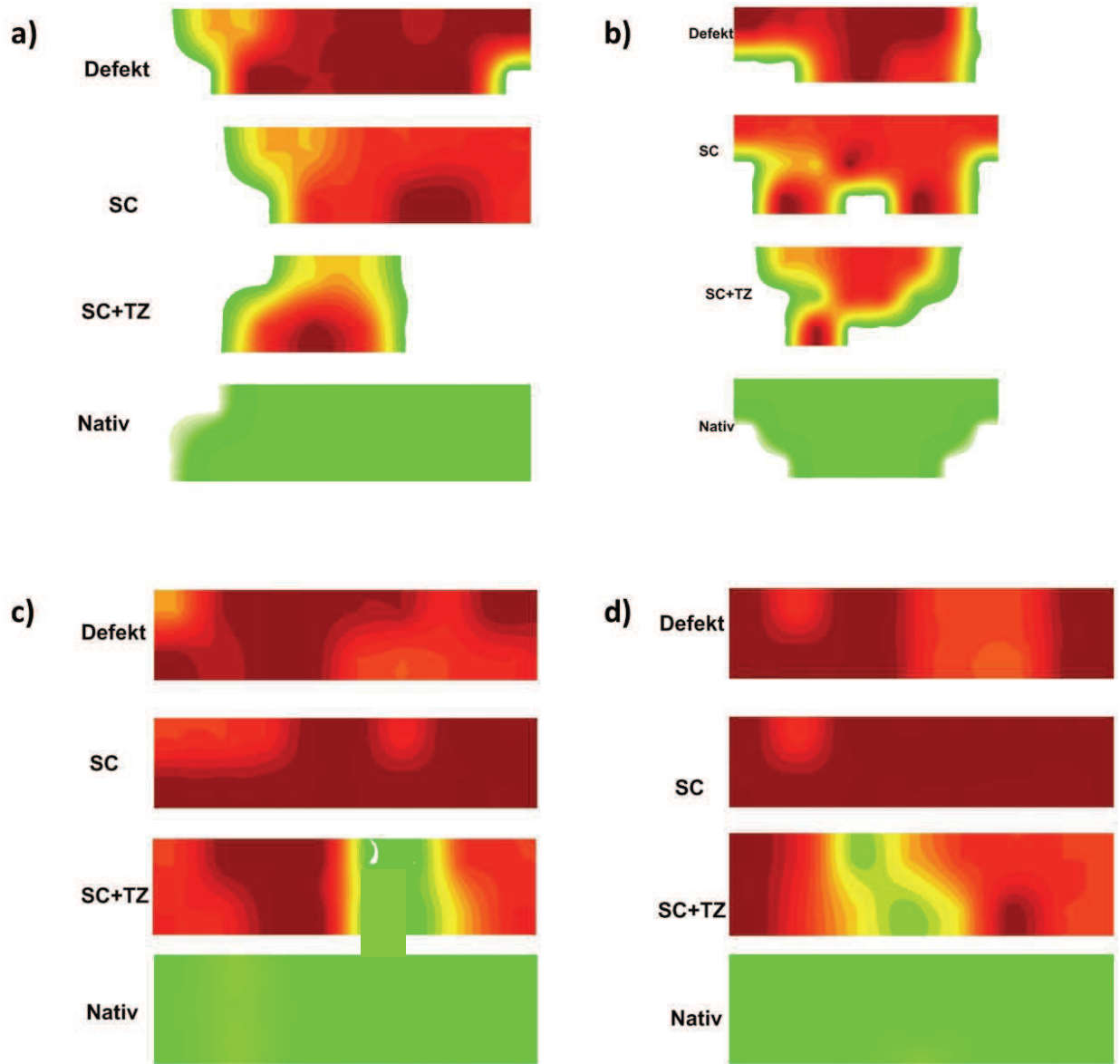
- 10 min Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 30 min 37°C Proteinase XXIV (0,2 mg/ 1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min Methanol 100% + Wasserstoffperoxid 30% (198 ml+ 2 ml)

- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min 37°C Chondroitinase AC (0,25U/1 ml)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30min RT Ziegenserum (1:20 in PBS)
- 30min 4°C, Osteopontin (Novus 1:50 in AK Verdünner), Kontrolle nur AK Verdünner
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min biotinylierter horse-rabbit aus goat (1:200 in Ak Verdünner)
- 3x 5 min Waschpuffer
- 30 min ABC- Komplex (Komplex sollte vorher 30 min inkubieren/ Kühlschrank)
- 3x 5 min Waschpuffer
- ca 4 min Impact DAB im Dunkeln inkubieren
- Stoppen in Aqua Dest.
- 30 sec Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 10 min mit Leitungswasser bläuen

Aufsteigende Alkoholreihe:

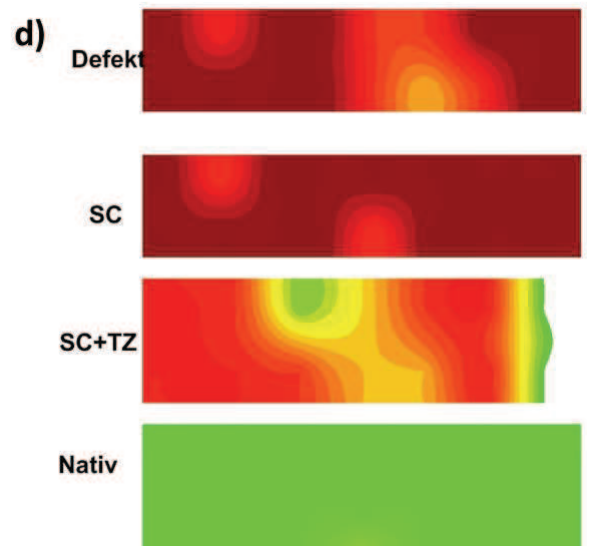
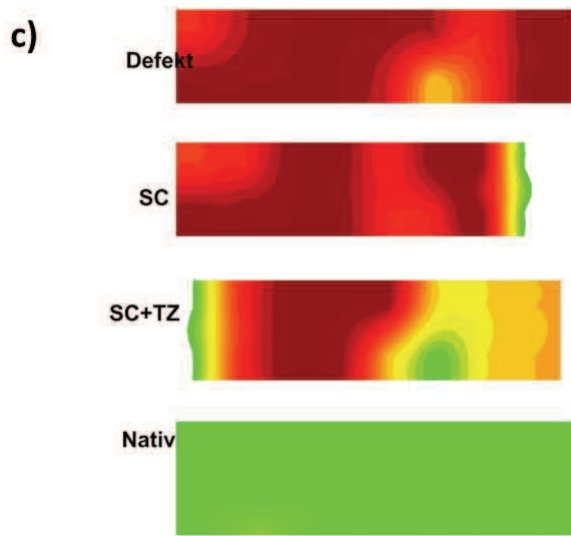
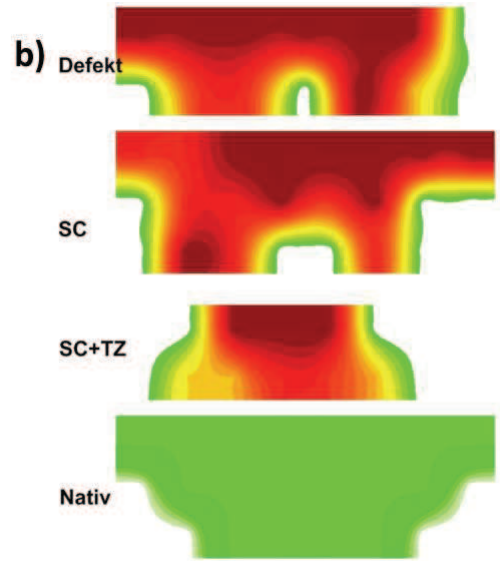
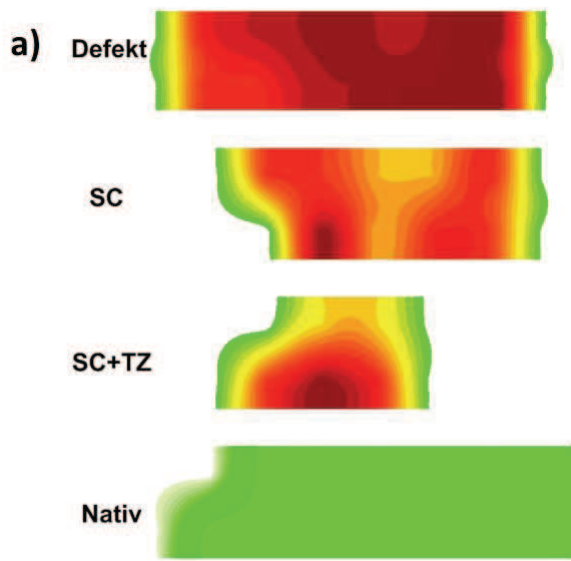
- 5 min 70% Alkohol
- 5 min 80% Alkohol
- 5 min 96% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 5 min 100% Alkohol
- 10 min Rotihistol I
- 10 min Rotihistol II

Histologische Grafiken

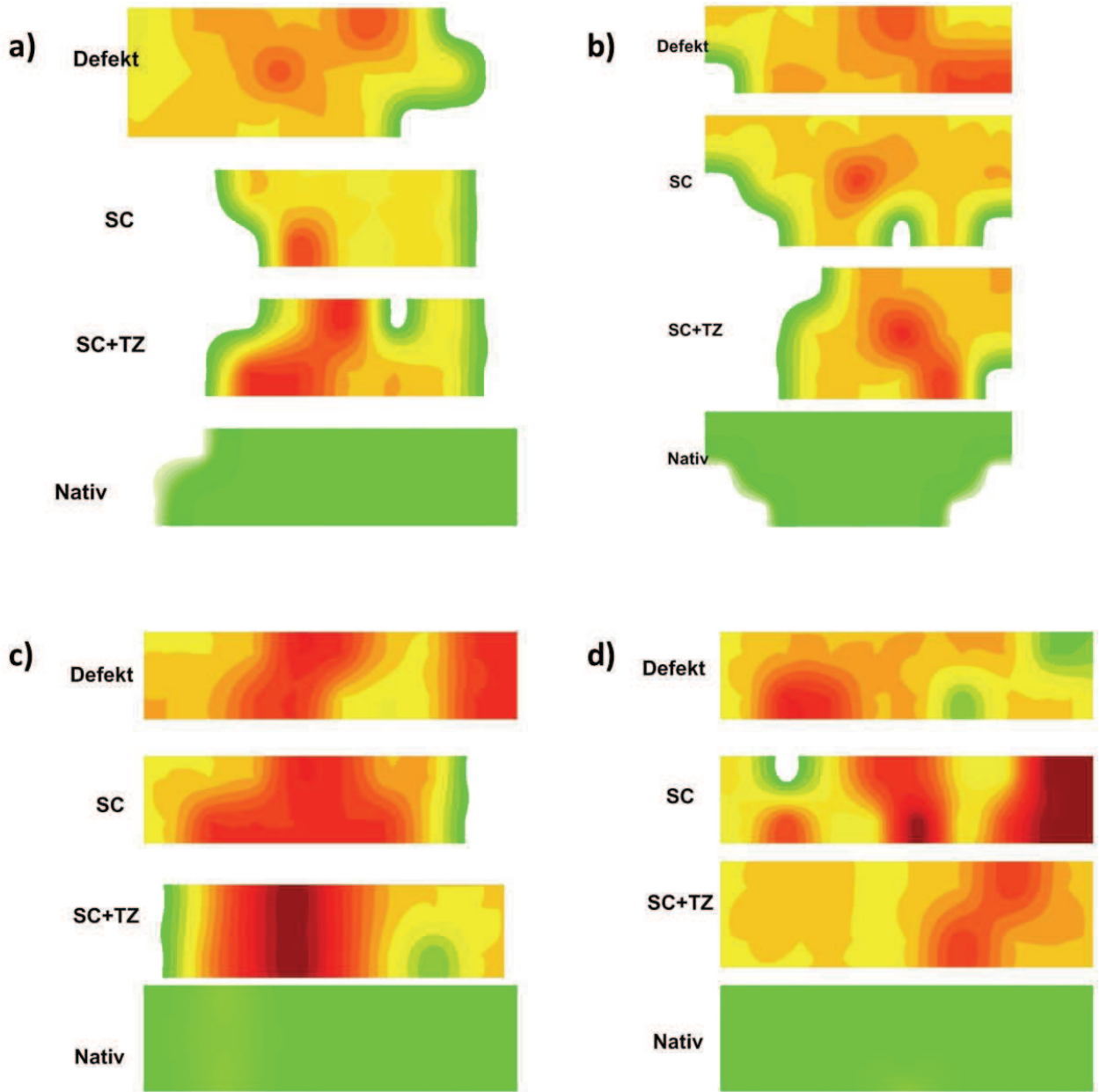


HE Färbung Merkmal Faserverlauf;

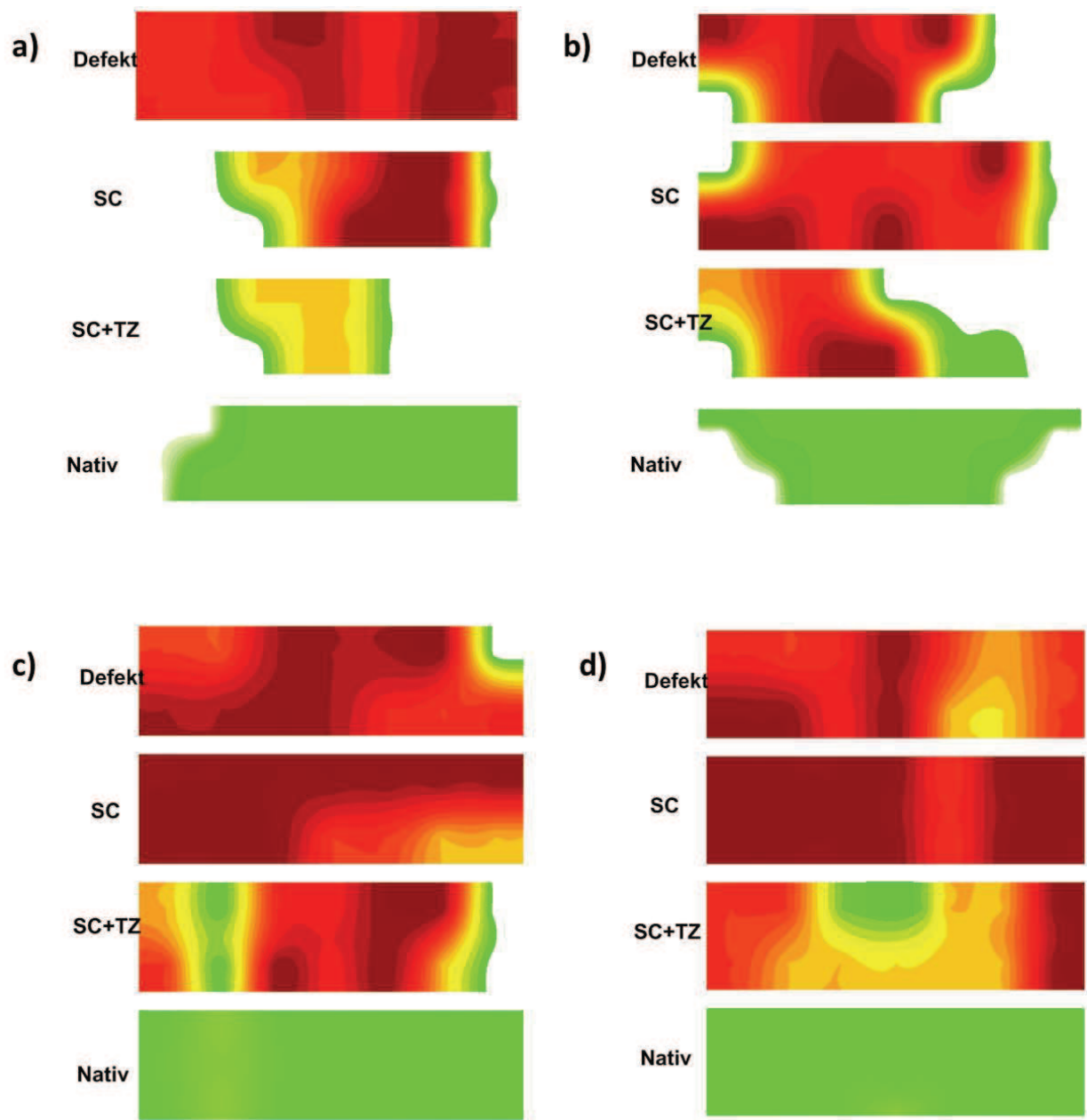
a) Teil I, b) Teil II,
c) Teil III, d) Teil IV



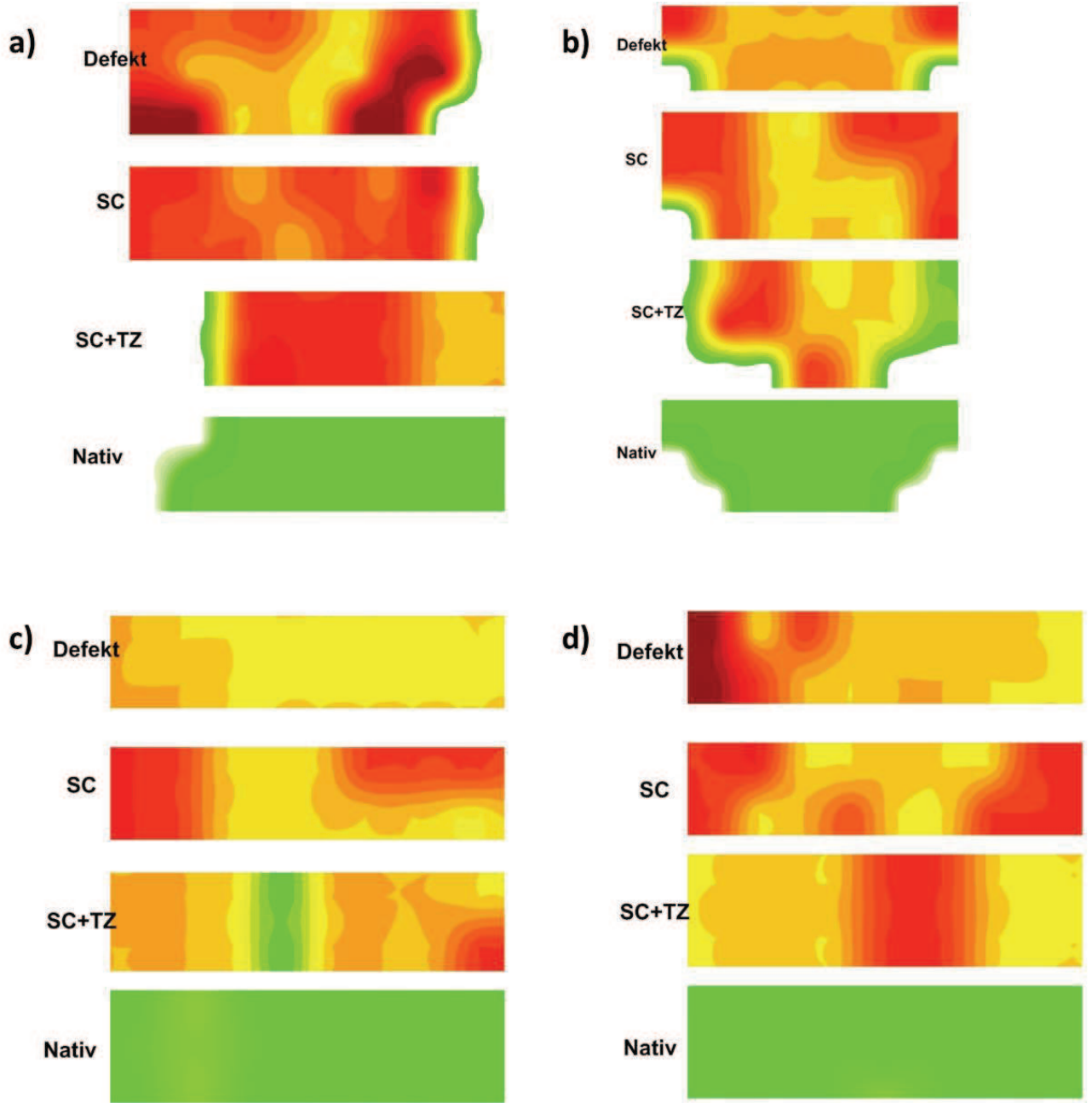
HE Färbung Merkmal Zellmorphologie



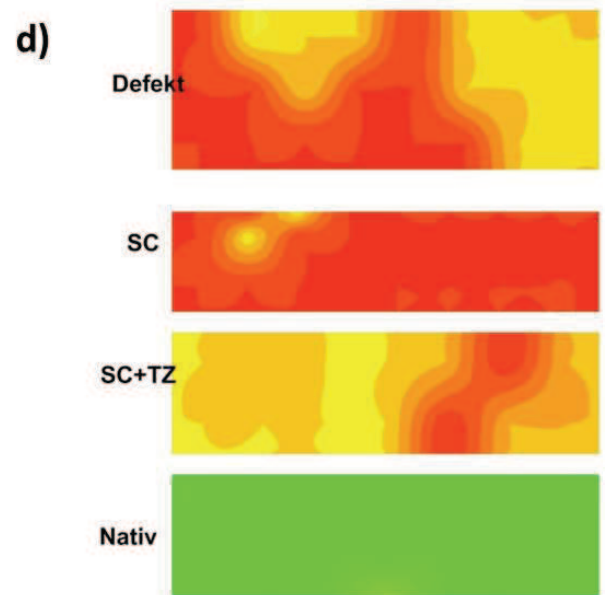
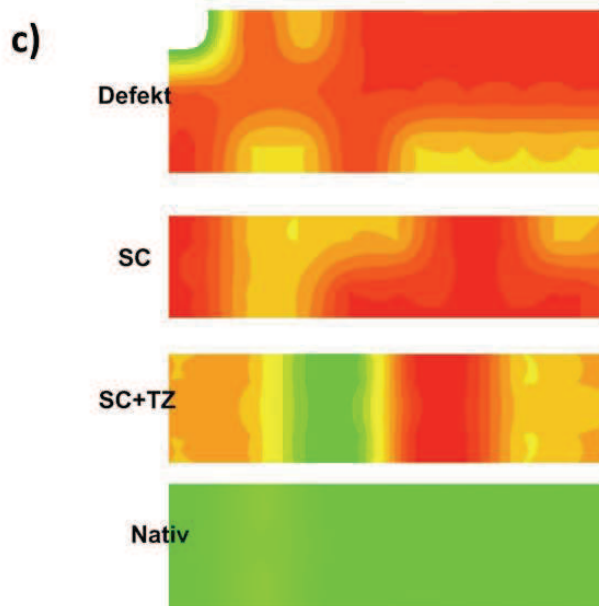
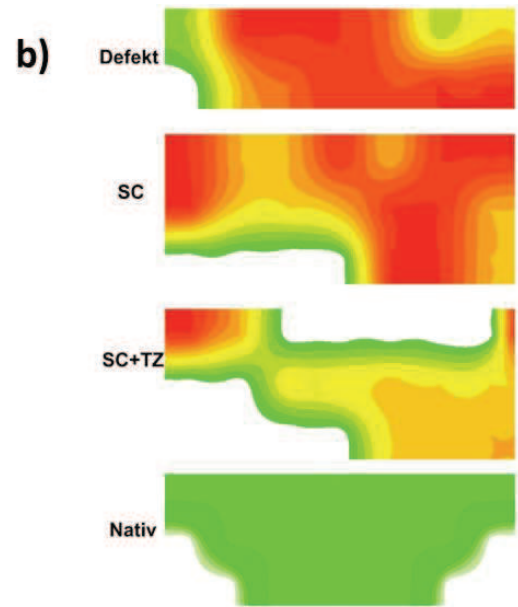
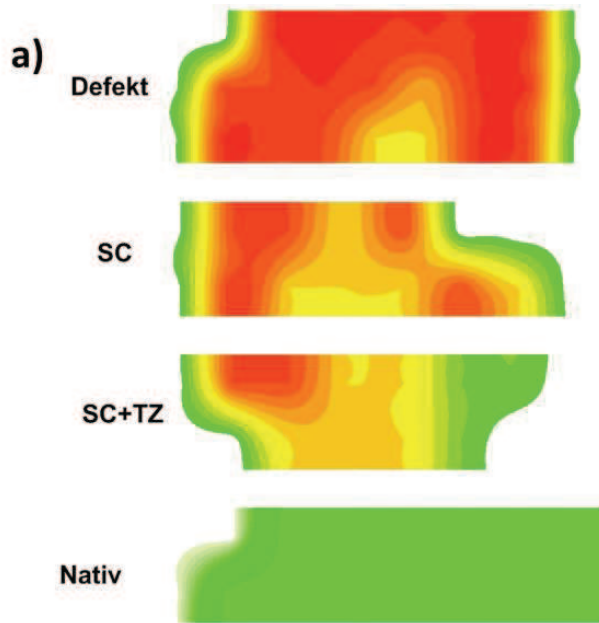
HE Färbung Merkmal Entzündung



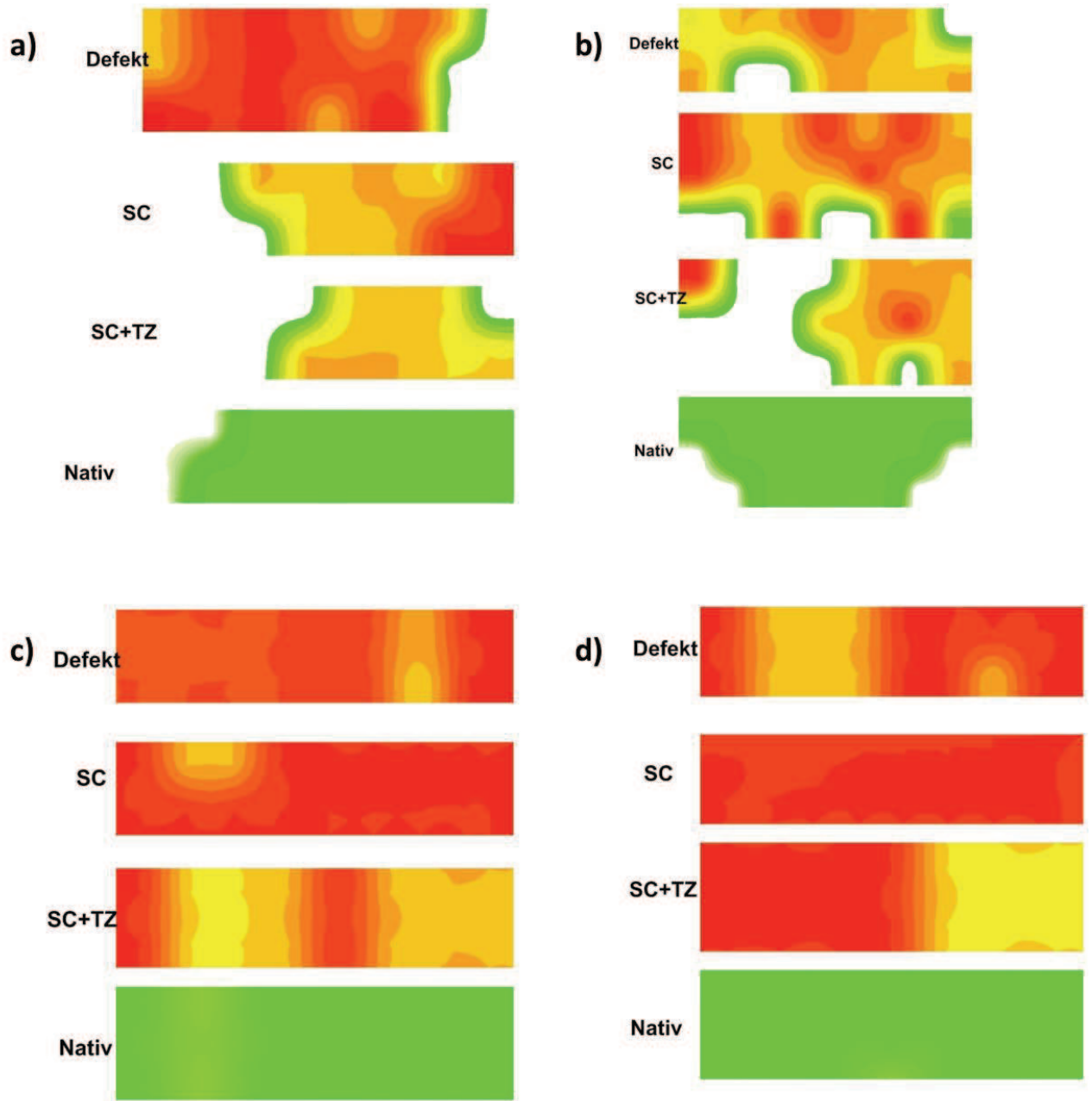
Picrosirius Red Färbung



Kollagen I Immunhistofärbung



Fibronectin Immunhistofärbung



Osteopontin Immunhistofärbung

Verwendete Substanzen und Nährmedien

I. verwendete Substanzen

ABC Komplex	Vector Laboratories, Inc. , Burlingame(USA)
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Alkohol 70%	CLN GmbH, Niederhummel
Alkohol 96%	CLN GmbH, Niederhummel
Alkohol 100%	CLN GmbH, Niederhummel
Antikörperverdünner	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Brij	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chondroitinase AC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
20% Citronensäure/EDTA	Apotheke Innenstadt Universität München, München
DAB Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Direct Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DPX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco´s Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Apotheke Innenstadt Universität München, München
EDTA Puffer 9,0	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Fast Green 0,02%	Waldeck GmbH & Co., Münster
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin
Hämalaun Farblösung	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Hämatoxilin A und B	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Methanol (100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge	AppliChem GmbH, Darmstadt
Paraffin, Paraplast®	Leica Biosystem, Richmond, IL, USA
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Proteinase XXIV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rotihistol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Safranin O 1,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Serum vom Pferd	Vector Laboratories, Inc. , Burlingame(USA)
Serum von der Ziege	Dako Deutschland GmbH
Tissue freezing medium	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Toluidine Blue O	Coaldeck GmbH & co., Münster
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck KGaA, Darmstadt

II. verwendete Antikörper

Collagen I Anti-Human, Ratte, Kaninchen (IgG 1) aus Maus	Novus Biologicals, Ltd. Cambridge United Kingdom
Collagen C II C2	Develop. Stud. Hybr. Bank, Iowa, USA
Collagen III Anti-Human, Ratte, Maus (IgG1) aus Maus	Novus Biologicals, Ltd. Cambridge United Kingdom
Fibronektin Anti-Human (IgG) aus Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Osteopontin IgG Anti-Human Poly aus Kaninchen	Thermo Scientific, Dreieich
Tenascin C Anti-Human, Ratte(IgG2a) aus Maus	Novus Biologicals, Ltd. Cambridge United Kingdom

III. Verwendete Medikamente

Cefuroxim
 Diazepam
 Isofluran (Forene 100%)
 Isotone Natriumchlorid Lösung
 Ketamin (Ketavet)
 Ketoprofen (Romefen) PR 10%
 Metamizol (Novaminsulfan)
 Nacoren
 Propofol
 Ringer Baxter Infusionslösung
 Temgesic
 Veracin Compositum

Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg
 Ratiopharm GmbH, Ulm
 Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
 Pfizer Pharma GmbH, Berlin
 Merial GmbH, Hallbergmoos
 betapharm Arzneimittel GmbH, Augsburg
 Merial GmbH, Hallbergmoos
 Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg
 Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
 Essex Pharma GmbH, München
 Albrecht GmbH, Aulendorf

IV. Verwendetes chirurgisches Instrumentarium

10 ml Spritze
 20 ml Spritzen
 Abdecktücher
 Absaugvorrichtung
 Ambubeutel
 anatomische Pinzetten
 Atemfilter
 Atemschläuche
 Braunülen 18 G grün
 chirurgische Pinzetten
 CO² Absorberkalk
 Desinfektionsmittel OP Feld
 Desinfektionsspray
 Drei-Wege Hahn
 Fadenschere
 Infusionsbesteck
 Intubationsbesteck
 Kanülen 20G gelb
 Kanülen 21 G grün
 Lochtücher
 Nadelhalter
 OP Handschuhe (steril)
 OP Haube
 OP Kittel
 OP Mundschutz
 Pansensonde
 Pulsoximeter
 Präparierschere
 Schere
 Schermaschine
 Skalpell 11
 Skalpell 15
 Skalpell 21
 Sterile Kompressen
 Handbohrer
 Sprühverband

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
 Segewald Klinikprodukte GmbH,Rohrdorf-Thansau
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 Laerdal Medical GmbH, Puchheim
 Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
 Laerdal Medical GmbH, Puchheim
 Laerdal Medical GmbH, Puchheim
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
 Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
 Laerdal Medical GmbH, Puchheim
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 Segewald Klinikprodukte GmbH,Rohrdorf-Thansau
 Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
 Mai Med GmbH, Neukirchen
 Mölnlycke Health Care AB, Göteborg ,Schweden
 Segewald Klinikprodukte GmbH,Rohrdorf-Thansau
 Medeco B.v. Quel-Beijerland, Niederlande
 Tierärztebedarf J. Lehnecke GmbH, Schortens
 Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
 Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
 Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
 Smith & Nephew GmbH, Hamburg

V. Verbrauchsmaterialien

5 ml Pipetten	Corning Incorporated, New York, USA
10 ml Pipetten	Corning Incorporated, New York, USA
15 ml Falcon®	Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
50 ml Falcon®	Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
6-Well Flaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Alufolie, Typ Universal 30	VWR International GmbH, Darmstadt
Cellulose Acetat Filter	Sartorius AG, Göttingen
Deckgläser 24x50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Dassel
Einfrierröhrchen	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Einmal-Handschuhe, Typ sempercure edition	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien (Österreich)
Einmal-Kanülen steril	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Einmal-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Einmal-Pinzetten steril	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Einmal-Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Einmal-Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Filter Whatmann	Whatman GmbH, Dassel
Glasobjektträger, Typ Superfrost Plus	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co., Braunschweig
Kryoröhrchen	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Küchenpapier Flori Professional	Flory Cart, Tassignano, Italien
Microtom Blade R35.1	Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Objektträger-Kästen	VWR International GmbH, Darmstadt
Petrischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pipette, Typ Pipetman 2, 10, 20, 200, 1000 µl	Gilson Inc., Middleton, (USA)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Plastikmesstrichter	Labomedic GmbH, Bonn
Plastikspritzen, 2, 5, 10, 20 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Prolene Faden 5-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Rotilabo®-embedding cassettes, Macro	Carl Roth GmbH+Co., KG, Karlsruhe
sterile Handschuhe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
T-225 Flasks	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
T-25 Flasks	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
T-75 Flasks	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Tissue freezing medium	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Vicyl Faden 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Zellsiebe BD Falcon	BD, Franklin Lakes NJ, USA

VI. Laborgeräte

Abzug: Lamin Air® HB 2448	Heraeus Holding GmbH, München
Abzug: Köttermann Typ:2-453	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Analysenwaage, Typ Kern 770-12	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Autoklav, Typ Varioklav 300	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Axiocam MR	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Brutschrank IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Cell Coulter T-540	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Duran-Glasware (Flaschen, Bechergläser)	Schott AG, Mainz
Erlenmeyerkolben, diverse Größen	Schott AG, Mainz
Feinanalysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefriermikrotom Leica:CM 3050	Leica Microsystem GmbH, Wetzlar
HE-Färbeautomat	Histo Lab Products, Göteborg, Schweden
Kryostat, Typ Vacutome HM 200 OM	Microm International GmbH, Walldorf
Kühl-Gefrier-Kombination, Typ 561284	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
Längenänderungsaufnehmer, Typ Z010/TN2A	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm
Magnetrührer ARE Axon	VELP Scientifica srl, Usmate (Italien)
Multi Gourmet Kocher	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroskop, Typ Axiophot	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Mikroskop, Typ Axiovert S100	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Objektträgerkästen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Heidelberg
Paraffinautomat: Leica:EG 1160	Leica Microsystem GmbH, Wetzlar
Pipette, Typ Pipetman	Gilson Inc., Middleton (USA)
Pipettierhilfe, Typ Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Rasiergerät	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Rostastahl Drahtbrücken	RoSta Rohr und Stahl GmbH, Wenden-Hünsborn
Sicherheitswerkbank, steril	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Tiefkühlschrank (- 80 °C), Typ 6485	GFL GmbH, Burgwedel
Tiefkühlschrank (- 80 °C), Typ 6485	GFL GmbH, Burgwedel
Ultracut ultramicrotome OmV3	Reichert-Jung, C. Reichert AG, Wien (Austria)
Vakuumpumpe für die Zellkultur, Typ VDE0530	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortex-Genie	Scientific Industries Inc. ,Bohemia N.Y., USA
Wärmeplatte	Medax GmbH & Co., Rendsburg
Wärmeschrank 37 °C	Jouan GmbH, Unterhaching
Wasserbad, Typ 1012	GFL GmbH, Burgwedel
Zentrifuge, Typ Univ. 16R, Rotor 1624	Hettlich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

VII. Verwendete Tiere

Merino Schafe	Schafzucht Fam. Schleich, Brunenthal
---------------	--------------------------------------

VIII. Verwendete Software

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems Inc., San Jose (USA)
AxioVision 2.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, (USA)
Surfer 10	Golden Software, Inc., Golden, (USA)
testXpert V5.0	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
%	Prozent
§	Paragraf
A.	arteria (lat.)
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
α	Signifikanzniveaue
AK	Antikörper
A	Ausgangsfläche
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CL	Konfidenzintervall(engl.)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
°C	Celsius
Col I	Kollagen I (engl.)
d.	dippen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
des.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und andere(lat.)
etc.	und so weiter (lat.)
E	E-Modul
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum
FF	Fresh Frozen
GAG	Glykosaminoglykane
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
lat.	Lateinisch

I	Ausgangslänge
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
m	Meter
M.	musculus (lat.)
Min	Minuten
N	Newton
n	Fallzahl
n.s	nicht signifikant
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Nr.	Nummer
OP	Operation
PAG	Proteoaminoglykane
P	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p.o.	post operationem (lat.)
pos.	positiv
RM	Rotatorenmanschette
RMR	Rotatorenmanschettenruptur
red.	reduzierter
s.c.	subkutan
SC	Scaffold
SC+TZ	Scaffold+ Tenozyten
sog.	sogenannt
TierSchG	Tierschutzgesetz
TVA-Nr.	Tierversuchsantragsnummer
u.a.	unter anderem
üN.	über Nacht
v.a.	vor allem
Ver.	Veränderung
vs.	gegen

Publikationen und Preise

Preise:

Teile dieser Dissertationsschrift wurden mit folgenden Auszeichnungen prämiert:

- EFORT Free Paper Award (Silver), 14th EFORT Congress, Istanbul, Juni 2013
- DVSE Best Paper Award, 20. Jahreskongress der DVSE e.V., Würzburg, Juni 2013

Präsentationen:

Teile dieser Dissertationsschrift wurden auf folgenden Kongressen vorab präsentiert:

- III. Münchener Symposium für Experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskelettale Forschung, München, Februar 2013
- 61. Jahrestagung der VSOU, Baden Baden, Mai 2013
- 14th EFORT Congress, Istanbul, Juni 2013
- 28. Jahreskongress der GOTS, Mannheim, Juni 2013
- 20. Jahreskongress der DVSE e.V., Würzburg, Juni 2013
- 30. AGA-Kongress, Wiesbaden, September 2013
- 21. Jahreskongress der DVSE e.V., Wiesbaden, April 2014
- 62. Jahrestagung der VSOU, Baden Baden, Mai 2014
- 29. Jahreskongress der GOTS, München, Juni 2014
- 31. AGA-Kongress, Innsbruck, September 2014
- DKOU-Kongress, Berlin, Oktober 2014

Danksagung

Sehr gerne würde ich mich in diesem Rahmen bei den Personen bedanken, die zu der Entstehung, Durchführung und dem Abschluss der Doktorarbeit und des Forschungsprojektes beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. P. Müller für die Überlassung des Themas und die Führung und Lenkung des Arbeitsprozesses.

Meinem Betreuer Dr. med. B. Roßbach danke ich besonders für die gute Planung und Organisation des Projektes und die umfassende, sehr gute und kontinuierliche Betreuung. Herr PD Dr. M. Pietschmann danke ich für die beratende Unterstützung und das fähige operieren.

Auch danke ich dem Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie des Klinikums Großhadern für die Bereitstellung der Geräte und des Arbeitsplatzes und besonders Bärbel Schmidt für die gute Einarbeitung und Hilfestellung bei jedwedem Problem.

Für die Anästhesie und umfassende Tierbetreuung danke ich ganz herzlich Tina Ullmann und Konstanze Eichmüller und Michaela Serr für deren Rat und Unterstützung in der Zeit.

Für die Biomechanische Hilfestellung danke ich insbesondere Christian Schröder und für die histologische Unterstützung Prof. Dr. med. S. Milz.

Außerdem möchte ich mich besonders bei meinem Vater bedanken, einmal für seine Hilfeleistung mit umfassendem biomechanisches Fachwissen und der zeitraubenden Erstkorrektur der Arbeit und meiner Mutter und meinem Freund für die moralische Unterstützung.

Abschließend möchte ich der Firma Tetec für die Bereitstellung des Scaffolds und die Finanzierung dieser Forschung bedanken.