

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Regenerationsfähigkeit der irreversibel verfetteten Muskulatur der
Rotatorenmanschette nach Transplantation von allogenen
mesenchymalen Stammzellen und Myozyten am Ratten-Modell**

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

vorgelegt von

Konstanze M. Macha
geb. Eichmüller
aus Gräfelfing

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitberichterstatter: PD Dr. Dorit Nägler
PD Dr. Attila Aszódi

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Mehmet F. Güleçyüz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Anatomische Grundlagen	1
1.1.1	Anatomie und Funktion der Rotatorenmanschette	1
1.2	Rotatorenmanschettenruptur	1
1.2.1	Ursachen und Einteilung.....	1
1.2.2	Morphologie.....	3
1.2.3	Muskeldegeneration	5
1.2.4	Diagnose und Therapien	6
1.2.4.1	Diagnose	6
1.2.4.2	Konservative Therapie.....	6
1.2.4.3	Operative Therapie.....	7
1.3	Grundlagen auf Zellebene	9
1.3.1	Myozyten	9
1.3.2	Stammzellen.....	10
1.4	Zielsetzung	12
1.4.1	Stand der Forschung	12
1.4.2	Fragestellung.....	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material.....	15
2.2	Methoden.....	15
2.2.1	Versuchsaufbau.....	15
2.2.1.1	Versuchstiere.....	16
2.2.2	Operationen.....	17
2.2.2.1	Operationsvorbereitung	17
2.2.2.2	Defektsetzungsoperation	18
2.2.2.3	Sehnenrefixation und Zelltransplantation	20
2.2.2.4	Verlauf der Operationen	21
2.2.2.5	Euthanasie.....	21
2.2.3	Zellkultur	22
2.2.3.1	Grundlagen der Zellkultur	22
2.2.3.2	Lichtmikroskopie.....	22
2.2.3.3	Nährmedien	23
2.2.3.4	Zellzählung	23
2.2.3.5	Einfrieren von Zellen.....	24
2.2.3.6	Auftauen von Zellen.....	24
2.2.3.7	Kultivierung und Passagieren der Zellen	24
2.2.4	Zellgewinnung und Transfektion.....	25

2.2.4.1	Gewinnung der Myozyten	25
2.2.4.2	Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen.....	26
2.2.4.3	Vermehrung des Plasmides pEGFP-C1	27
2.2.4.4	Transfektion mit Lipofectamine 2000	28
2.2.4.5	Zellvorbereitung zur Transplantation	29
2.2.4.6	Testung der Zellen auf Verunreinigungen mit Mikroorganismen	29
2.2.5	Histologie und Immunhistologie.....	30
2.2.5.1	Allgemeines zur Histologie und Immunhistologie	30
2.2.5.2	Anfertigung der Gefrierschnitte.....	30
2.2.5.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	30
2.2.5.2.2	Nilrot-Färbung	31
2.2.5.2.3	Anti-Laminin-Färbung.....	31
2.2.5.2.4	Nachweis von mesenchymalen Stammzellen	33
2.2.6	Beurteilung	35
2.2.6.1	Bestimmung der Masse	35
2.2.6.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.2.6.3	ImageJ Bildbearbeitungsprogramm	36
2.2.6.4	Statistik.....	36
2.2.6.4.1	t-Test.....	36
2.2.6.4.2	Kruskal-Wallis-Test	37
2.2.6.4.3	p-Wert	37
2.2.6.4.4	Korrelation.....	37
2.2.6.4.5	Lineare Regression	38
2.3	Vorversuche.....	38
2.3.1	Paraffinschnitte.....	38
2.3.2	Färbungen	39
2.3.2.1	Picosiriusred	39
2.3.2.2	Anti-Desmin und Anti-Actin.....	39
2.3.2.3	Fett-Färbungen.....	39
2.3.2.4	Gefrierschnitte	39
2.3.2.5	Querschnitte	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Körpermasse der Ratten.....	41
3.2	Muskelmassen SSP.....	42
3.2.1	Behandelter, rechter SSP	42
3.2.2	Unbehandelter, linker SSP	43
3.2.1	Vergleich behandelte und unbehandelte SSP	44
3.3	Korrelationsanalyse	44
3.3.1	Körpermasse zur behandelten, rechten SSP-Masse.....	44
3.3.2	Körpermasse zur unbehandelten, linken SSP-Masse	45
3.4	Histologie.....	47
3.4.1	Makroskopische Auswertung.....	47
3.4.2	Mikroskopische Auswertung	48

3.4.1	Behandelter, rechter SSP	48
3.4.2	Unbehandelter, linker SSP	49
3.4.1	Vergleich behandelter und unbehandelter SSP	49
3.5	Intramuskuläre Fettverteilung	54
4	DISKUSSION	56
4.1	Methode.....	57
4.1.1	Versuchsaufbau.....	57
4.1.2	Transfektion.....	58
4.2	Diskussion der Auswertung	59
4.2.1	Bestimmung der Muskelmasse.....	59
4.2.2	Histologische Auswertung	60
4.3	Diskussion der Ergebnisse	60
4.4	Limitationen der Studie	61
4.5	Ausblick	62
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	65
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
8	TABELLENVERZEICHNIS	76
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	77
10	ANHANG	79
10.1	Material.....	79
10.1.1	Laborgeräte.....	79
10.1.2	Verwendete Substanzen und Nährmedien.....	80
10.1.3	Verbrauchsmaterialien	81
10.1.4	Verwendete Medikamente	82
10.1.5	Verwendetes chirurgisches Instrumentarium	83
10.1.6	Verwendete Tiere.....	83
10.1.7	Verwendete Software.....	83
10.2	Protokolle der Vorversuche	83
10.2.1	Herstellung von Paraffinschnitten	83
10.2.1.1	Knochen entkalken	83
10.2.1.2	Einbetten der Paraffinblöcke	84
10.2.1.3	Schneiden der Blöcke	84
10.2.1.4	Entparaffinieren der Schnitte vor Färbung	84

10.2.2	Färbungen.....	85
10.2.2.1	Picrosirius-Red-Färbung	85
10.2.2.2	PAX 7.....	85
10.2.2.3	Anti-Desmin/Anti-Actin-Färbung.....	85
10.2.2.4	Fettfärbungen.....	87
10.2.2.4.1	Oil Red	87
10.2.2.4.2	Sudan-III-Färbung	87
11	DANKSAGUNG	89
12	ERKLÄRUNG.....	90

1 EINLEITUNG

1.1 Anatomische Grundlagen

1.1.1 Anatomie und Funktion der Rotatorenmanschette

Als Rotatorenmanschette (RM) werden der Musculus (M.) infraspinatus (ISP), der M. teres minor, der M. subscapularis (SCP), der M. supraspinatus (SSP) mit dem gemeinsamen Ansatz deren Sehnen am Tuberculum majus et minus des Humerus bezeichnet. Diese vier Muskeln haben ihren Ursprung an der Scapula und ziehen über das Humeroscapulargelenk bis zu ihrem Ansatz an die Tubercula des Humerus. Sie ummanteln an weiten Teilen die Capsula articularis, die Ligamentae (Ligg.) coracohumerale und glenohumeralia. Diese Bänder verstärken die Kapsel und teilweise auch die lange Sehne des M. biceps brachii, der unter dem M. subscapularis bzw. M. supraspinatus in das Gelenk zieht. Die Bursae subacromialis und subtendinea liegen der RM cranial und cranioventral, der M. subscapularis ventral auf und werden von der Fornix humeri überdacht. Diese besteht aus dem Acromion und dem Proc. coracoideus, die den knöchernen Anteil bilden. Das Ligamentum (Lig.) coracoacromiale stellt die ligamentäre Verbindung dazwischen dar. Die Articulatio (Art.) humeri ist ein Kugelgelenk mit der Besonderheit, dass die Gelenkfläche des Humeruskopfes wesentlich größer ist, als die der Scapula. Somit besitzt der Arm einen enorm großen Bewegungsumfang [1]. Doch diese außergewöhnlich hohe Bewegungsfreiheit birgt gleichzeitig die Gefahr der Instabilität.

Die Aufgabe der Rotatorenmanschette ist es den nicht ausreichend kräftig ausgebildeten Kapsel-Band-Apparat der Art. humeri zu verstärken, das Gelenk zu stabilisieren und den Humeruskopf zu zentrieren [2]. Jeder der vier Muskeln hat eine Funktion bei der Schulterbewegung: Der M. supraspinatus ist Abduktor, der M. infraspinatus und der M. teres minor sind Außenrotatoren, während der M. subscapularis Innenrotator ist [3].

1.2 Rotatorenmanschettenruptur

1.2.1 Ursachen und Einteilung

Eine Einklemmung der RM in den anatomisch strukturell relativ engen Spaltraum unter der Fornix humeri wird durch den M. deltoideus provoziert, der den Humeruskopf nach cranial gegen das Acromion zieht. Darüber hinaus exponieren der für den SSP

besonders kurze Hebelarm in der Abduktionsbewegung [4] und eine verminderte Durchblutung im Bereich des Sehnenansatzes die RM [5-7]. Aufgrund dieser Faktoren ist die RM häufig von primären degenerativen Veränderungen, dem Impingement-Syndrom oder einer Bursitis subacromialis betroffen, die einer Rotatorenmanschettenruptur (RMR) vorausgehen können [8]. Im Jahr 1834 favorisierte J.G. Smith, bei der ersten wissenschaftlich fundierten Arbeit über die Läsion der RM, noch eine traumatische Ursache [9]. Nach aktuellem Stand der Forschung ist bekannt, dass die RMR eine altersbedingte Erkrankung ist, die durch eben diese vorbestehende Degeneration in Verbindung mit einer Bagatellverletzung und nur in ca. zehn Prozent der Fälle durch ein adäquates Trauma entsteht [8]. Haury et al. [10] zeigten durch ihre Studie an menschlichen Leichenschultern eine RMR-Inzidenz von 77 % an der Normalpopulation der unter 60-Jährigen. Bei den über 61-Jährigen war die Inzidenz bei über 91 %. Die Prävalenz liegt zwischen fünf und 39 % [11]. Ein Defekt der RM betrifft im Besonderen Überkopfsportler, wie zum Beispiel Werfer beim Baseball [12, 13], aber auch Musiker wie z.B. Cellisten [14].

Wenn nur ein Teil des Sehnenquerschnittes rupturiert, so wird dies als Partialruptur bezeichnet. Hierbei ist die Supraspinatussehne am häufigsten betroffen. Selbst wenn die entsprechende Sehne weiterhin von Ursprung bis Ansatz durchgängig erhalten ist, leidet die Stabilität der RM. Partialrupturen, auch inkomplette Rupturen genannt, werden von Ellmann und Gartsman anhand der Risstiefe in drei Schweregrade unterteilt [15] (Tabelle 1), ausgehend von einer durchschnittlichen SSP-Dicke von zehn bis zwölf Millimetern.

Schweregrade	Rissdurchmesser	Rissdurchmesser im Verhältnis
Grad I	< 3 mm	< ¼ der Sehnendicke
Grad II	3 – 6 mm	> ¼ und < ½ der Sehnendicke
Grad III	> 6 mm	> ½ der Sehnendicke

Tabelle 1 Gradeinteilung der Rotatorenmanschetten-Partialrupturen nach Ellmann und Gartsman

In Abgrenzung zu der Partialruptur wird die Massenruptur oder Totalruptur unterschieden. Hierzu entwickelten Habermayer et al. [16] eine Einteilung in drei Zonen, die sich nach der Lokalisation des Risses und der Mitbeteiligung der einzelnen Sehnen richtet, während Bateman die Rissgröße in Zentimeter misst [17].

Um die Biomechanik der RM zu verdeutlichen, vergleicht Burkhart den Ansatz von ISP und SSP, und die daraus resultierende Kraftübertragung der RM, mit einer Hängebrücke [18]. Daraus entsteht eine praktisch orientierte Klassifikation nach Lo

und Burkhart mit der Einteilung in „crescent-shaped tears“, „U-shaped tears“, „L-shaped tears“ und „massive, contracted, immobile tears“ [19, 20].

Cofield et al. [21] machen mit ihrer Studie zu den Langzeitergebnissen operativ therapierter Patienten deutlich, dass es weiterhin Optimierungsbedarf der Therapie, vor allem bei großen und chronischen Läsionen, gibt. Bei unzureichender Therapie drohen ansonsten Schmerzen, Bewegungs-, und Kräfteinbußen bis hin zur sozialen und beruflichen Isolation [22-27]. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Behandlung dieses Themas.

1.2.2 Morphologie

Die genauen Vorgänge auf zellulärer Ebene bei Muskelverletzungen sind nicht geklärt. Nach Müller-Wohlfahrt [28] kann man jedoch nach einer Muskelverletzung eine initiale und eine sekundäre Schädigungsphase unterscheiden (Abbildung 1). Es sind sowohl der zelluläre als auch der extrazelluläre Bereich betroffen sind. In der initialen Zellschädigungsphase kommt es durch einen erhöhten Kalziumeinstrom, der wiederum eine Proteinasenaktivierung und somit die Autolyse verursacht, zu einer Entzündungsreaktion [29, 30]. In der sekundären Schädigungsphase kommt es durch die nicht mehr intakte Kalziumhomöostase zur Hyperkontraktion einzelner Muskelteile, bevor nach vorangeschrittener Muskelzerstörung eine Entspannungsphase eintritt. Schließlich werden von den, durch Selbstverdauung geschädigten Muskelfasern entzündungsfördernde und vasoaktive Stoffe freigesetzt, womit eine weitere Destruktion einsetzt. Immunzellen, wie z.B. Monozyten, neutrophile Makrophagen und natürliche Killerzellen von außerhalb des beschädigten Areals werden angelockt, die die Entzündungsreaktionen fördern und zu Ödemen führen. Eine Verschlechterung der Versorgung des betroffenen Gewebes ist die Folge. Die extrazelluläre Matrix verschwindet bei diesen Vorgängen und wird Teil des erweiterten, intrazellulären Raumes. Diese Prozesse sind nicht voneinander zu trennen und lassen sich auch nicht klar einer Phase zuteilen, sondern verlaufen übergreifend und parallel [30]. Der Destruktionsphase schließt sich eine Reparaturphase bzw. eine Remodulationsphase an. Einige Tage nach der Verletzung kommt es hierbei durch eingewanderte Makrophagen zum Abbau der zerstörten Gewebeanteile. Der extrazelluläre Raum sowie die Kapillaren [31] werden wieder aufgebaut und die Muskelfasern repariert oder neu gebildet. Um den Schaden während der Destruktionsphase möglichst gering zu halten, setzen die Reparationsmechanismen schnellst möglich ein. Jedoch leidet die Qualität des neu hergestellten Gewebes hierunter. Die Remodulationsphase bildet den

Abschluss der Wiederherstellungsprozesse. Hier soll das entstandene Narbengewebe wieder so umgestaltet werden, dass es den Gewebestrukturen vor der Verletzung entspricht [32, 33] (Abbildung 1).

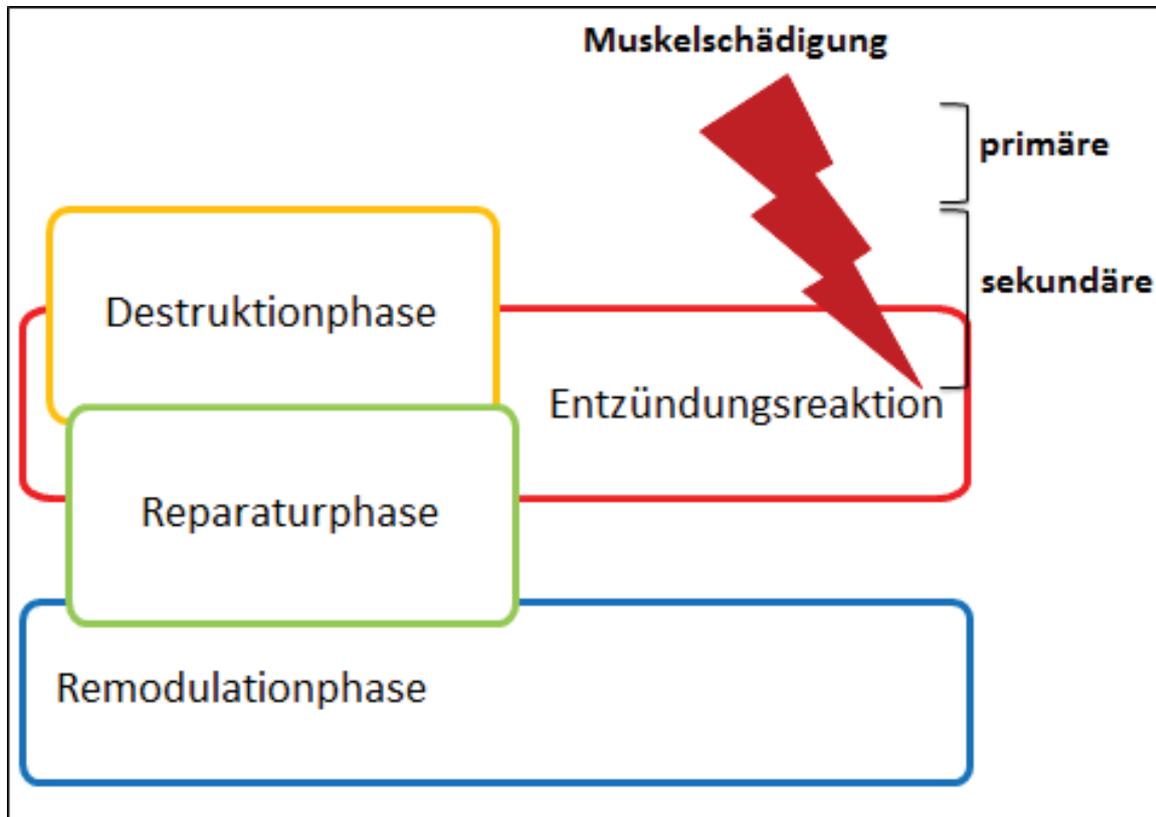


Abbildung 1 Modell der Schädigungs- und Wiederherstellungsmechanismen nach Muskelverletzung in Anlehnung an Müller-Wohlfahrt [30]

Erreicht die Remodulationsphase nicht die Ausgangsqualität, kommt es zur Muskelatrophie bzw. zur Muskelverfettung, die bis zur Fibrose führen kann [26, 34-39]. Dies wird auch nach einer RMR beobachtet. Studien an anderen Muskelgruppen wie z.B. am Musculus soleus zeigen, dass ein derartiger Muskelumbau mit einer Verschlechterung der Muskelfunktion einhergeht [40, 41]. Im Kaninchen-Modell zeigte sich, dass die Verfettung postoperativ, nach Absetzen der Sehne und sechs Wochen später durchgeführter Refixation, nicht weiter fortschreitet, aber sich auch nicht zurückbildet [42] und somit irreversibel ist [43]. Der Erfolg der operativen Versorgung einer RMR korreliert folglich mit dem Grad der Muskelverfettung vor der Operation und kann daher als prognostischer Faktor verwendet werden [24, 34, 44-49]. Bei ausgeprägter Verfettung der Muskulatur wird meistens auf eine aufwendige Rekonstruktion der Sehnenmanschette verzichtet, da nicht von einer Verbesserung des Ergebnisses auszugehen ist. Zur besseren Beurteilung der degenerativen

Veränderungen und der Prognose erstellten Goutallier et al. eine Gradeinteilung mit fünf Stufen, die mit Hilfe der Computertomographie (CT) messbar ist [38] (Tabelle 2).

Gradeinteilung	Fett-Muskel-Relation
Grad 0	kein Fettanteil
Grad 1	geringer Fettanteil
Grad 2	Fettanteil < Muskelanteil
Grad 3	Fettanteil = Muskelanteil
Grad 4	Fettanteil > Muskelanteil

Tabelle 2 Gradeinteilung der Verfettung Rotatorenmanschettenmuskulatur in der CT nach Goutallier

Fuchs et al. [37] übertrugen diese Klassifizierung auf die Magnetresonanztomographie (MRT) und schufen dabei eine Einteilung in drei Stufen, die den Vergleich von MRT und CT möglich machen soll.

Auch Thomazeau et al. untersuchten den Grad der Verfettung der Muskulatur im MRT, in dieser Einteilung wird jedoch das Verhältnis des Muskelquerschnittes zur Querschnittsfläche der Fossa supraspinata herangezogen [50] (Tabelle 3).

Gradeinteilung	Muskelquerschnittes: Querschnittsfläche der Fossa supraspinata
Grad 1	1 - 0,6 normale bis geringe Atrophie
Grad 2	0,6 - 0,4 mittelgradige Atrophie
Grad 3	< 0,4 schwere Atrophie

Tabelle 3 Gradeinteilung der Verfettung der Rotatorenmanschettenmuskulatur in der MRT nach Thomazeau

1.2.3 Muskeldegeneration

Eine traumatische bzw. degenerative RMR führt unbehandelt zu einer Atrophie und im Verlauf zu einer degenerativen Verfettung der Muskulatur. Dies konnte in zahlreichen klinischen Studien und im Tierexperiment bestätigt werden [38, 44, 50-52]. Der dazugehörige Mechanismus ist allerdings in der aktuellen Literatur nicht ausreichend geklärt. Einen Erklärungsversuch unternehmen Meyer und Gerber [43]. In ihrer Studie am Schaf-Modell verstrichen 35 Wochen, bevor die durchtrennten Infraspinatussehnen chirurgisch wiederhergestellt wurden. Bei der Untersuchung der Muskulatur erkannte man später einen deutlich größeren Eindringwinkel und eine Verkürzung des Muskels als Ursache für die Verfettung an. Die sonst parallel

liegenden Myofibrillen hatten durch den größeren Winkel und die Retraktion mehr Raum und lagen demnach nicht mehr aneinander an. Der so entstandene Bereich wurde von eingewanderten Fettzellen aufgefüllt.

1.2.4 Diagnose und Therapien

1.2.4.1 Diagnose

Am Anfang der Diagnosestellung steht die Anamnese und sorgfältige körperliche Untersuchung. Das konventionelle Röntgen dient heute dem Ausschluss von knöcherner Beteiligung am Defektgeschehen. Sonographie und MRT haben sich aufgrund der technischen Entwicklungen zum Goldstandard entwickelt. Die kostengünstige und nebenwirkungsarme Sonographie wird meist als Methode der Erstuntersuchung gewählt. Hedtmann gibt eine Sensitivität des Ultraschalls von mehr als 90 % bei einer Totalruptur von mindestens 0,5 Zentimetern an. Bei einer inkompletten Ruptur, die mindestens ein Drittel des Sehnendurchmessers erreicht, sind es immer noch mehr als 75 %. Dass die Sonografie bei der Diagnostik der RMR hilfreich ist, zeigt auch Daenen [53]. Zudem bietet sich die Möglichkeit einer dynamischen Untersuchung. Die MRT-Untersuchung ist zwar teurer und technisch aufwändiger als der Ultraschall, ist aber nahezu unabhängig von den Fähigkeiten des Untersuchers. Mit einer Sensitivität von bis zu 100 % bei Totalruptur und 82 % bei inkompletten Rupturen [54] ist die Untersuchung ebenfalls sehr aussagekräftig.

1.2.4.2 Konservative Therapie

Eine konservative Therapie sollte laut Habermeyer [55] bei schleichendem Beginn der Symptome, Non-Complicance, inaktiven Patienten, degenerativer Genese oder zusätzlicher „Frozen-Shoulder“-Erkrankung erfolgen. Bei primärer Beteiligung von M. subscapularis und M. infraspinatus, sportlich aktiven Patienten, nach Schulterluxationen, bei Rollstuhlfahrern oder bei Behinderung des jeweils kontralateralen Arms ist von der konservativen Therapie abzusehen. Diese umfasst einerseits die Schmerzreduktion und anti-inflammatorische Komponente, andererseits die Verbesserung der Beweglichkeit und Kräftigung der verbliebenen RM-Muskulatur [56]. Sollte letzteres aufgrund eines zu großen Defektes nicht möglich sein, kann es indiziert sein, dass andere Muskeln wie M. latissimus dorsi, M. pectoralis und M. teres

major trainiert werden, um teilweise die Aufgaben der RM zu übernehmen [57]. Die Ziele der konservativen Therapie werden mit nichtsteroidalen antiphlogistischen Analgetika, Massagen, Dehnungs- und Kräftigungsübungen sowie gelegentlich Kortisoninjektionen erreicht [58, 59]. Zu Beginn der Therapie müssen die Schmerz- und Entzündungszeichen reduziert werden. Es folgt die passive Beübung der Schultermuskulatur und im Anschluss der Kraftaufbau. Ebenfalls von Bedeutung ist die Körperhaltung, speziell von Wirbelsäule und Scapula [56]. Die Erfolge der Therapie variieren abhängig vom gewählten Studienmodell und den berücksichtigten Faktoren. In der Studie von Bokor et al. [58] waren 56 % der Patienten mit dem Ergebnis der konservativen Therapie zufrieden, wenn der Schulterschmerz länger als sechs Monate vor dem Therapiebeginn angefangen hatte. Bei Patienten, die weniger als drei Monate vor Beginn der Studie dem Schmerz ausgesetzt waren, hatten dagegen 86 % ein zufriedenstellendes Ergebnis. Er beobachtete seine Patienten durchschnittlich 7,4 Jahre. Bartolozzi et al. [60] hatten insgesamt einen kürzeren Nachfolge-Zeitraum als Bokor, zeigten aber, dass der positive Ergebnisanteil bei längerem Beobachtungszeitraum anstieg. So hatten in der ersten Gruppe, die nach sechs Monaten untersucht wurde, 66 % der Probanden guten oder gar exzellenten Therapieerfolg. Der positive Ergebnisanteil lag bei der zweiten Gruppe, welche nach 18 Monaten untersucht wurde, bei 76 %. Itoi et al. [61] hatten jedoch einen Abfall der positiven Ergebnisrate bei längerer Beobachtung (mehr als sechs Jahre) festgestellt. Ihre durchschnittliche Beobachtungsdauer lag bei 3,4 Jahren (82 % positive Ergebnisse). Aufgrund der unterschiedlichen Studienansätze ist ein Vergleich der Studien sowie ein Vergleich zu den operativen Therapien nicht durchgängig aussagekräftig. Dies ist einer Vielzahl von verschiedenen Studiendesigns und den unterschiedlichsten Kriterien zur Beurteilung des Therapieerfolges geschuldet, die es erschweren, einen gemeinsamen Nenner zu finden [56].

1.2.4.3 Operative Therapie

Eine chirurgische Therapie soll in Betracht gezogen werden, wenn es sich um eine traumatische oder akute RMR handelt, der Patient im erwerbsfähigen Alter oder sportlich aktiv ist, bereits eine Luxation der Schulter stattgefunden hat, keine weitere Vorschädigung vorliegt oder bei tief gelegener SSP-Ruptur. Kontraindiziert ist eine Operation bei Gelenkinfekt, Omarthrose, Armplexusläsion (bei Beteiligung von C5-6),

Muskelatrophie Grad IV, bei Vorliegen eines Morbus Sudeck, Sehnenretraktion Grad III und wenn der acromiohumerale Abstand weniger als sieben Millimeter beträgt [55]. Grundsätzlich stehen folgende chirurgische Maßnahmen zur Auswahl: Acromioplastik, Debridement und Rekonstruktion der RM [59], welche entsprechend des Bedarfs auch in Kombination angewendet werden können.

Es gibt drei mögliche technische Vorgehensweisen. Bei der offen-chirurgischen Rekonstruktion wird der Sehnen-/ Muskelstumpf per transossärer Nahttechnik am Tuberculum major befestigt. Dieses Herangehen entsprach jahrelang dem Goldstandard und wurde auch in der vorliegenden Studie angewandt. Heutzutage stehen zusätzlich die Arthroskopie, bei der unterschiedlichste Fadenanker eingesetzt werden, und die arthroskopisch assistierte „mini-open“ Operation zur Verfügung. Beim arthroskopisch assistierten Verfahren wird zuerst per Arthroskopie der Schaden im Gelenk begutachtet und wenn nötig subacromial dekomprimiert. Weitere Begleitschädigungen, wie z.B. Bizepssehnenläsionen oder Bursitiden, werden dabei behoben. Anschließend erfolgt ein kleiner Split des M. deltoideus, über den die Sehne refixiert werden kann [62]. Die Arthroskopie bietet kleinere Wundverhältnisse und die Gelenkeinsicht, wobei die offene Operation die gute Übersicht und den freien Zugang ermöglicht. Abgesehen von den Vorteilen der verschiedenen Techniken ist die Wahl des Vorgehens abhängig von Patientenalter, generellem Gesundheitszustand, Ansprechen auf konservative Therapie, Typ und Ausdehnung des Risses, der zugrundeliegenden Pathologie und Vorliebe, Erfahrung und Fertigkeiten des Chirurgen [59]. Sofern möglich, sollte bei der Rekonstruktion der RM Kontinuität erreicht werden, da dies ein besseres Ergebnis verspricht [63, 64]. Besteht zusätzlich zu einer RMR eine fortgeschrittene Omarthrose ist die Indikation für eine inverse Schulterprothese gegeben [65-67]. Falls aufgrund der Defektgröße oder der starken Retraktion eine RM Kontinuität nicht möglich ist, stehen verschiedene Alternativen zur Verfügung. Handelt es sich um eine U- oder L-förmige Ruptur nach Burkhart, ist eine spannungsarme Seit-zu-Seit-Naht vorzuziehen [19]. Bei großen Defekten, die keine spannungsfreie Naht zulassen bzw. bei denen der Riss nicht komplett verschlossen werden kann, aber gleichzeitig noch keine Arthrose des Humeralgelenkes vorliegt, ist der Muskeltransfer vom M. deltoideus, M. latissimus dorsi oder M. pectoralis eine Alternative. Dieses Vorgehen wird bei sportlich aktiven Patienten unter 60 Jahren bevorzugt [68].

Aufgrund der technisch optimierten Operationsmaterialien erzielen das arthroskopische und das offene Verfahren heute vergleichbar gute Ergebnisse [69,

70]. Bei der chirurgischen Therapie ist ein gutes Ergebnis zu erwarten [71]. Galatz et al. [72] berichten von einer Erfolgsrate von 91 % bei offener OP in einem Nachuntersuchungszeitraum von zehn Jahren. Hierbei wurden ein Patientenfragebogen, der die Funktion und den Schmerz berücksichtigt, und die körperliche Untersuchung der Probanden ausgewertet. Cofield et al. [21] sprechen immerhin noch von einem exzellenten bis zufriedenen Ergebnis in 80 % der Fälle, ebenfalls bei offener Operation und nach einem follow-up Zeitraum von 13,4 Jahren. Die Ergebnisse von Gartsman et al. [73] liegen mit 84 % unter Murray et al. [74], die in 94 % der Fälle ein exzellentes oder gutes Ergebnis beschreiben. Beide Studien befassen sich mit arthroskopischen Eingriffen, wobei sie mit zwei bis 3,3 Jahren einen eher kurzen Nachverfolgungs-Zeitraum aufweisen. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen stehen Studien, die bei ihrer Evaluation eine bildgebende Komponente wie Ultraschall oder MRT mitberücksichtigen. So wurde in einer weiteren Studie von Galatz et al. [75] deutlich, dass, obwohl die klinischen Ergebnisse gut sind, in der Bildgebung bei 17 von 18 Patienten nach zwei Jahren follow-up Zeitraum ein Rezidiv der Ruptur zu sehen ist. Auch Cole et al. [76] haben dieses Problem erkannt. Goutallier et al. haben nach drei Jahren eine Rerupturrate von 36 % [45] beobachtet. In dieser Studie wird der hohe Verfettungsgrad der Muskulatur als Ursache für das Therapieversagen angesehen.

1.3 Grundlagen auf Zellebene

1.3.1 Myozyten

Das Muskelgewebe, welches durch Kontraktion und Relaxation zu Bewegung fähig ist, ist für viele lebensnotwendige Vorgänge im menschlichen Körper verantwortlich. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen haben sich drei verschiedene Typen von Muskelgewebe gebildet. Zum einen gibt es die glatte Muskulatur, die in allen Hohlorganen, mit Ausnahme des Herzens zu finden ist. Sie spielt in der Verdauung und dem Blut- und Sauerstofftransport eine wichtige Rolle. Der zweite Muskeltyp ist die Herzmuskulatur, die durch ihre besondere Beschaffenheit das ständige Schlagen, mit Anpassung an den Energieverbrauch, gewährleistet. Schließlich ermöglicht die Skelettmuskulatur eine Fortbewegung des Menschen.

Der strukturelle Aufbau der Skelettmuskulatur, von peripher nach innen, beginnt mit der Muskelfaszie, die mehrere Muskelfaserbündel zu einem Muskel zusammenfasst. Dieser straffen Bindegewebsschicht liegt eine lockere Bindegewebsschicht nach innen

hin an, das Epimysium. Das Epimysium ist die Aufhängung für das Perimysium. Diese Bindegewebssepten dienen zum einen der Unterteilung in Muskelbündel, zum anderen beherbergen sie die Leitungsbahnen der Muskulatur. Das Perimysium dient zusätzlich mit seiner Verbindung zur Muskelsehne als Übertragungsmedium für die Zugkräfte, die im Muskel gebildet und auf das knöcherne Skelett weitergeleitet werden. Innerhalb des Muskelbündels wird das Bindegewebe Endomysium genannt. Es ummantelt die einzelnen Muskelfasern und dient sowohl der Reißfestigkeit als auch der Versorgung der Muskelfasern, da in ihm die Gefäße der Mikrozirkulation verlaufen. Mehrere Myozyten fusionieren zu einer lang gezogenen (mehrere Zentimeter), mehrkernigen Muskelfaser. Die Kerne einer Muskelfaser sind nicht mehr teilungsfähig. Im Zytoplasma, dem sogenannten Sarkoplasma, sind unter anderem die Myofibrillen beherbergt. Zusammen bilden die Myofibrillen den kontraktilem Apparat des Muskels. In ihnen liegen der Länge nach Sarkomerenketten, welche den Skelettmuskeln die Querstreifung verleihen und aus den dünnen Aktinfilamenten und den doppelt so dicken Myosinfilamenten bestehen. Aktin- und Myosinfilamente können, gesteuert durch den zytosolischen Ca^{2+} -Gehalt, in- oder auseinander gleiten. Auf diesem Wechselspiel aus Verlängerung und Verkürzung basiert die Muskelkraft [77].

1.3.2 Stammzellen

Die kleinste autonome biologische Funktionseinheit des Menschen ist die Zelle. Der Mensch besteht aus einer großen Vielzahl von Zellen. Diese Zellen haben sich im Lauf ihrer Entwicklung ausdifferenziert und oft zugunsten ihrer Spezifität ihre Teilungsfähigkeit eingebüßt. Am Anfang, wenn das männliche Spermium auf die weibliche Eizelle trifft, steht jedoch eine Zelle, die totipotente Zygote. Durch die Teilung dieser Zelle entsteht jede andere Zelle im menschlichen Körper und die Plazenta. Aus der Zygote entstehen über die Zwischenschritte Morula, Blastocyst und Epiblast die drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm. Auf dieser Entwicklungsstufe gelten die Zellen als pluripotent, d.h. dass diese Zellen zwar keinen eigenen Organismus generieren, aber noch zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können. Zusammengefasst entstehen aus dem Endoderm größtenteils die inneren Organe und das Ektoderm stellt das Nervensystem sowie die Haut mit ihren Anhangsgebilden. Das Mesoderm ist für die Bildung der Knochen, Muskeln und des Bindegewebes und zudem für die Zellen des Urogenitaltraktes verantwortlich [78]. Durch weitere Proliferation der Zellen entstehen je nach Reifegrad multipotente,

oligopotente und schließlich unipotente Vorläuferzellen bzw. Stammzellen. Diese unipotenten Zellen können nur noch Kopien ihres eigenen Zelltypus herstellen [79]. Die ausdifferenzierte Zelle erfüllt ihre Aufgabe bis zu ihrem Tod und wird, da die Lebenszeit des Organismus die der Zelle meist überschreitet, optimalerweise von einer neuen Zelle der gleichen Differenzierung abgelöst. Krankheiten und Verletzungen können die Lebenszeit der Zellen reduzieren. Für diesen Zweck der Zellerneuerung hat der Organismus einen Reservezellpool angelegt, der zur Proliferation fähig ist. Dies sind Zellen, die sich in einem frühen Stadium der Zellreihe ausgekoppelt haben und als pluripotente Reservezellen verharren. Wenn die Zellen aktiviert werden, teilen sie sich asymmetrisch. Während eine Tochterzelle Stammzelle bleibt und wieder in den Reservepool übergeht, differenziert sich die andere Tochterzelle weiter [79]. So haben die meisten Gewebe für die charakteristischen Zellen Vorläuferzellen. Die für den Muskel typischen Vorläuferzellen sind beispielsweise die Satellitenzellen.

Friedenstein et al. berichteten 1974 erstmalig über mesenchymale Stammzellen (engl.: mesenchymal stem cells - MSC) im Knochenmark, die unabhängig von der Blutbahn sind [80]. Später wurde in weiteren Arbeitsgruppen entdeckt, dass aus diesen multipotenten Zellen unter anderem Knochen, Muskeln, Knorpel, Fett- und Bindegewebe entstehen können (Abbildung 2) [81, 82]. Nachgewiesen wurden sie sowohl im Knochenmark und in der Nabelschnur als auch in einer Vielzahl von anderen Geweben wie zum Beispiel Fettgewebe und Zahnpulpa [83-88]. MSC definieren sich zum einen über die Fähigkeit, in vitro an Plastikoberflächen zu adhären, zum anderen durch ihren immunphänotypischen Oberflächenmarker, den cluster of differentiation (engl.: Internationales System zur Bestimmung von Differenzierungsantigenen - CD). MSC sind CD73, CD90 und CD105 positiv und unter anderem negativ für human leukocyte antigen (engl.: Human-Leukozyten-Antigen - HLA) Klasse 2 Oberflächenmoleküle CD45, CD34, CD11b oder CD14, CD19 oder CD79a [89]. Da die Zellen aber stark von den Umwelteinflüssen abhängig sind - in vivo wären das z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Zellkontakte etc., in vitro vor allem die Zusammensetzung des Nährmediums [90] - wird in verschiedenen Laboren nicht mit den gleichen Zellen experimentiert.

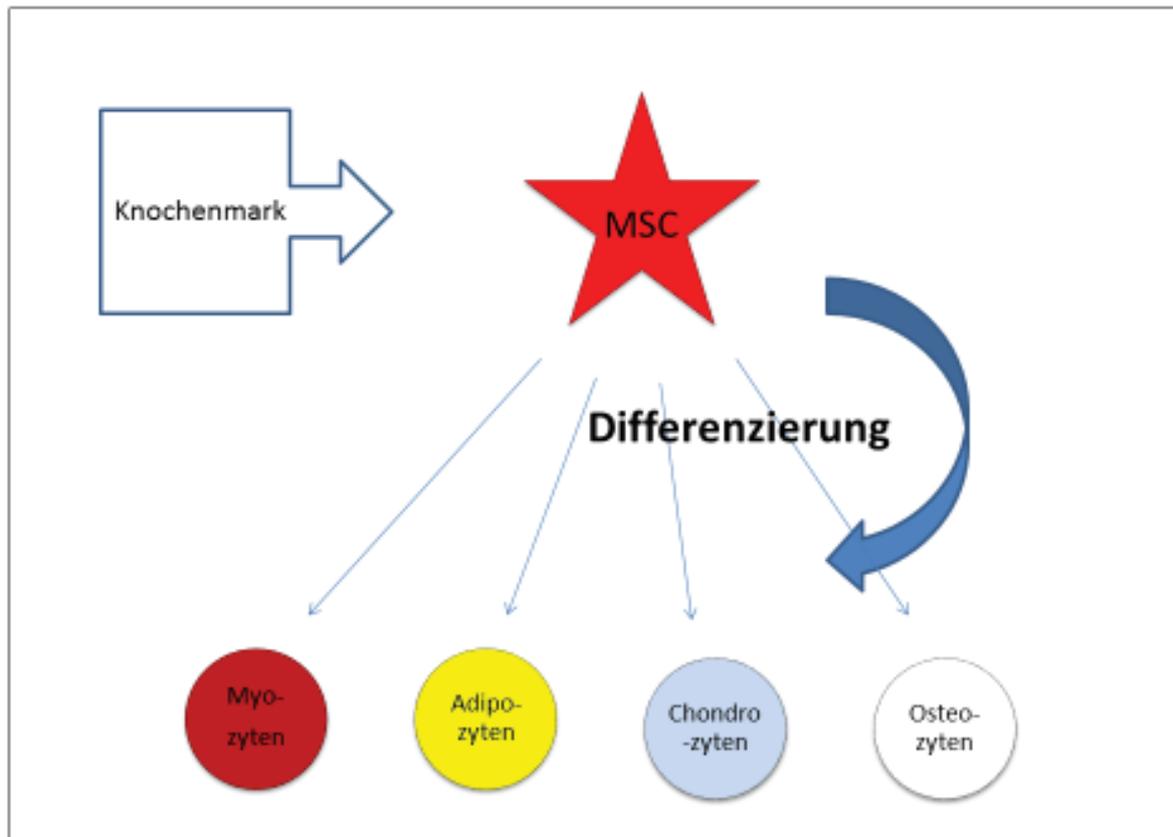


Abbildung 2 Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stammzellen

1.4 Zielsetzung

1.4.1 Stand der Forschung

Aufgrund der anatomischen Ähnlichkeit mit der humanen Schulter hat sich das Rattenmodell als Versuchstiermodell etabliert [91]. Kim et al. verglichen mehrere Nagetier-Modelle miteinander um eine geeignete Nachstellung der humanen RM zu finden [92]. Ähnlich wie beim Menschen, zeigte sich bei der Ratte eine Verfettung der Muskulatur, so dass dieses Tier für die Erforschung einer besseren Therapie bei der RMR verwendet wurde. Speziell an der RM der Ratte wurde mit einem ähnlichen Modell die Reintegration der SSP-Sehne in den Humerus analysiert [93, 94].

Barton et al. zeigten am Rattenmodell, dass vier Wochen nach Defektsetzung bzw. Absetzen der SSP-Sehne am knöchernen Ansatz das Maximum an Muskelatrophie erreicht ist [95].

Satellitenzellen sind Vorläuferzellen von Myozyten, die ruhend zwischen Basal- und Plasmamembran von Muskelfibrillen liegen. Bei Verletzung des entsprechenden Muskels werden diese aktiv und tragen zur Regeneration des Muskels bei [96-105]. Es wurde bereits von einer Förderung bei Skelettmuskelregenerationen durch MSC-

Transplantation berichtet [106]. Pittenger et al. haben gezeigt, dass es für MSC möglich ist, sich zu Satellitenzellen zu differenzieren [82]. Kang et al. wiesen konkret nach, dass sich aus MSC Myoblasten bilden [107].

Winkler et al. verfolgten die Verteilung von allogenen MSC der Ratte in vivo im traumatisierten Skelettmuskel und zeigten, dass die Zahl der angesiedelten Zellen die Regenerationsfähigkeit ausschlaggebend beeinflusst. Hierzu verwendeten sie Eisenoxid-Nanopartikel und verfolgten ihre Verteilung mit Hilfe der MRT bzw. in der histologischen Auswertung [108, 109].

Ähnlich wie bei der Skelettmuskulatur verfettet auch die Herzmuskulatur [110]. In verschiedenen, experimentellen in vivo-Studien mit Cardiomyozyten konnte nachgewiesen werden, dass die Transplantation von MSC die Pumpfunktion des Herzens positiv beeinflusst [84, 111-117]. Des Weiteren wurde von der Gewinnung von Cardiomyocyten ähnlichen Zellen bzw. Cardiomyocyten aus MSC berichtet [118-121].

1.4.2 Fragestellung

Das Regenerationspotential von irreversibel verfetteter Skelettmuskulatur mit der Transplantation von kultivierten MSC und Myozyten wurde bis heute nicht ausreichend untersucht. Die Verfettung der Skelettmuskulatur nach Degeneration wird aktuell immer noch als irreversibel betrachtet. Ziel dieser Dissertation ist es, die Regenerationsfähigkeit von der fettig degenerierten Rotatorenmanschettenmuskulatur am Rattenmodell mit der lokalen Transplantation von allogenen MSC und Myozyten zu untersuchen.

Hierzu wird experimentell im Rattenmodell eine Atrophie des SSP durch Sehnendurchtrennung am Ansatz herbeigeführt. Nach vier Wochen wurde die Sehne, nachdem die maximale Verfettung erreicht wurde [95], refixiert und das Resultat der Therapie nach Injektion von kultivierten Myozyten, kultivierten MSC, NaCl 0,9 % und ohne weitere Therapie verglichen.

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Beurteilung der Ausdehnung der Muskelverfettung des SSP und Muskelmassen-Abnahme nach vier Wochen im Vergleich zur unbehandelten kontralateralen Seite, zur Generierung eines Referenzwertes. Bedingt der gewählte Versuchsaufbau eine ausreichend große Schädigung des Muskels, welcher die muskeleigenen Regenerationsmechanismen übertrifft?

2. Wie ausgeprägt ist die muskuläre Regeneration der Verfettung bzw. Muskelmassenzunahme vier Wochen nach Sehnenrefixation bzw. nach Sehnenrefixation und Transplantation von kultivierten mesenchymalen Stammzellen oder kultivierten Myozyten im Vergleich mit der nicht behandelten Seite?
3. Ist eine Regeneration von Muskelverfettung und funktionaler Verschlechterung der RM im Ratten-Modell durch lokale Transplantation von MSC bzw. Myozyten möglich?
4. Zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine Annäherung der Muskelmasse der behandelten Supraspinatussehne zu der nicht behandelten Kontrollgruppe?
5. Ist auf mikroskopischer Ebene eine Verfettung der Muskulatur zu quantifizieren und ist eine Reversibilität der Verfettung nach Sehnenrefixation und Behandlung nachzuweisen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Die verwendeten Materialien sind im Anhang 10.1 gelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau

Als geeigneter Versuchszeitraum wurde eine Spanne von insgesamt acht Wochen erachtet. Da nach Barton et al. die maximale Verfettung bzw. Degeneration nach vier Wochen erreicht wird [95], wurde vier Wochen nach Defektsetzung die Refixation durchgeführt. Huart et al. gehen bei der Muskelheilung nach Verletzung, in diesem Fall die Ablösung und Refixation, von einem Maximum der Regenerationsprozesse zwei Wochen nach Verletzung und einer Abnahme der Heilungstendenz vier Wochen nach Verletzung aus [122]. Vier Wochen nach Refixation erscheint daher ein Großteil der Muskelregeneration erfolgt zu sein und der Zeitpunkt für die Euthanisierung der Tiere als geeignet. Die Defektsetzung in allen Gruppen erfolgte zu Beginn des Versuchszeitraumes ($t = 0$). Die Refixations-Operation der Gruppe 2 - 5 sowie die Euthanasie und die Muskelentnahme der Gruppe 0 fanden nach vier Wochen ($t = 4$) statt. Die Muskelentnahme der Gruppen 1 - 5 fand nach acht Wochen ($t = 8$) statt (Abbildung 3).

In Gruppe 0, diese wird im Weiteren Ausgangsgruppe genannt, wurde die Verfettung der Muskulatur vier Wochen nach Defektsetzung untersucht. Hierzu wurde Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) vier Wochen nach Defektsetzung euthanasiert und der SSP beidseits entnommen. Gruppe 1, im Weiteren als Defektgruppe bezeichnet, zeigt die Muskelverfettung acht Wochen nach Defektsetzung bzw. durch die körpereigene Spontanheilung. An den Gruppen 2 - 5 wurden vier Wochen nach der Defektsetzung eine Refixations-Operation durchgeführt. Bei Gruppe 2 wurde zusätzlich NaCl in den Muskel infiltriert, der Gruppe 4 wurden Myozyten und der Gruppe 5 MSC in den SSP transplantiert. Gruppe 3 erhielt neben der Naht keine weitere Therapie. Acht Wochen nach Defektsetzung, im Fall der Gruppen 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) vier Wochen nach Refixation, erfolgte die Euthanasie und die Muskelentnahme der Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC). Alle Eingriffe fanden

jeweils nur am rechten SSP der Tiere statt. Bei der Muskelentnahme wurden stets beide Mm. supraspinati zur Massenbestimmung und weiteren histologischen Auswertung geborgen. Die Summe der linken Mm. supraspinati wird im Weiteren als Kontrollgruppe bezeichnet.

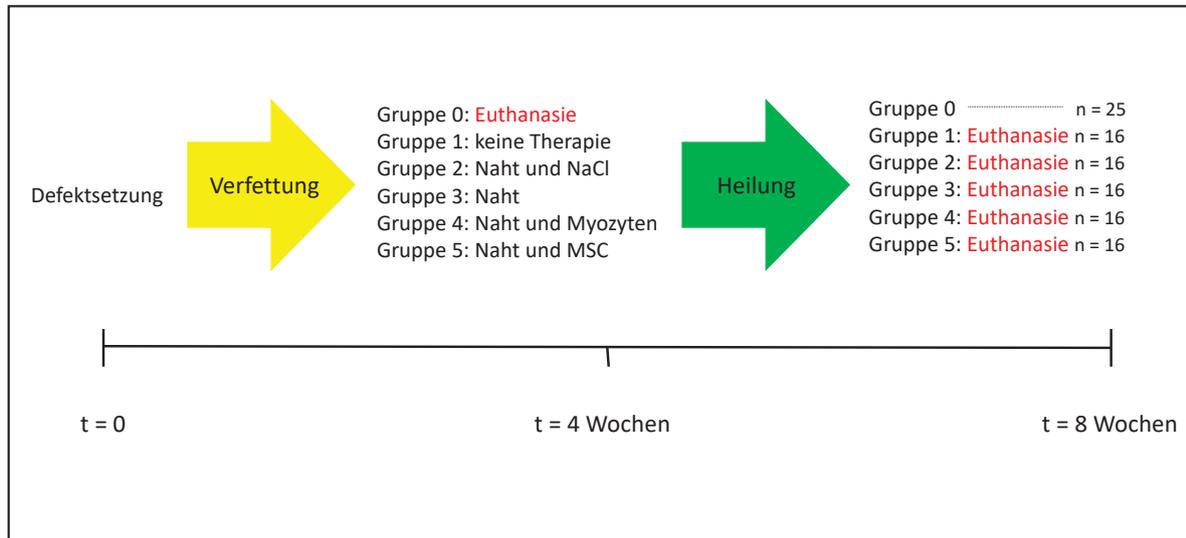


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Zum Zeitpunkt $t = 0$ findet die Defektsetzung statt. In allen Gruppen wurde der rechte SSP durchtrennt und die Verfettung provoziert. Vier Wochen später wurde die Ausgangsgruppe (Gruppe 0) euthanasiert. Die Defektgruppe (Gruppe 1) wurde nicht therapiert. Bei der Gruppe 2 wurde zum Zeitpunkt $t = 4$ neben der Refixation der rechten Mm. supraspinati mit einer Naht NaCl injiziert. Die Gruppe 3 erhielt zum selben Zeitpunkt nur die Naht. Die rechten Mm. supraspinati der Gruppe 4 wurden nach vier Wochen mit einer Naht refixiert und es wurden zusätzlich Myozyten transplantiert. Die rechten Mm. supraspinati der Gruppe 5 wurden mit einer Naht refixiert und es wurden zusätzlich MSC transplantiert. Zum Zeitpunkt $t = 8$, acht Wochen nach der Defektsetzung und vier Wochen nach Naht und ggf. weiterer Therapie, wurden die Tiere der Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) euthanasiert. Mit n = Fallzahl sind die Gruppengrößen beschrieben.

2.2.1.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren gemäß des § 8 des Tierschutzgesetzes von der Regierung Oberbayern genehmigt (Gz.: 55.2-1-54-2531-140-10). Die Versuche fanden im Walter-Straub-Institut für Chirurgische Forschung statt. So wurden in 59,5 cm x 38 cm großen Käfigen je vier weibliche Ratten gehalten, die freien Zugang zu Wasser hatten und mit „Sniff-Diet“-Futter gefüttert wurden. Die Räume der Tierhaltung waren gemäß dem Tierschutzgesetz (TierSchG) § 11 Absatz 1 Satz 2 Nr. 3 zugelassen. Sie verfügten über einen simulierten Tag-/Nachtrhythmus, der im 12-Stunden-Wechsel erfolgte, die Raumtemperatur betrug $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Das Tierpflegepersonal war gemäß TierSchG § 11 Absatz 1 Satz 2 Nr. 2 ausgebildet und zugelassen.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um näherungsweise zwölf Wochen alte weibliche Inzucht-Lewis-Ratten, deren Gewicht im Durchschnitt 192,4 g betrug. Es wurden weibliche Tiere gewählt, da bei ihnen im Gegensatz zu den Männchen nach der zehnten bis zwölften Woche nur noch eine geringe Massenzunahme zu erwarten ist (Abbildung 4). Darüber hinaus zeigen weibliche Tiere weniger Aggressivität und lassen sich daher in Kleingruppen leichter halten bzw. behandeln. Die Gruppengröße betrug je 16 bzw. 25 Tiere und wurde mit einer Power-Analyse durch das Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie bestimmt.

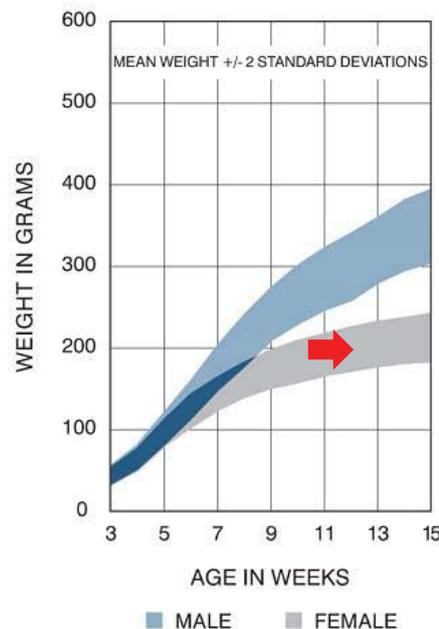


Abbildung 4 Vergleich der Gewichtszunahme von männlichen und weiblichen Ratten. Die Abbildung zeigt einen kalkulierten Verlauf. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt zu dem die Versuchsreihe begann [123] (modifiziert).

2.2.2 Operationen

2.2.2.1 Operationsvorbereitung

Die Ratten wurden in eine ca. 20 cm x 30 cm x 15 cm Kunststoffbox mit Deckel gegeben, Isofluran (3,5 l/min) wurde zusammen mit Sauerstoff (2 l/min) in die Box geleitet und über einen zweiten Schlauch wieder ausgeleitet, sodass es sich insgesamt um ein geschlossenes System handelte. Nach 2 min war das Tier betäubt und konnte aus der Box herausgenommen und mit dem Kopf in eine Narkosemaske gelegt werden. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe eingecremt um ein Austrocknen zu vermeiden. Der Isofluran-Fluss wurde auf 2,5 l/min reduziert. Jede Ratte erhielt 0,01 ml Temgesic zur Analgesie und prophylaktisch eine 0,02 ml single shot i.m. Antibiose

mit Baytril (Enrofloxacin). Der Schulterbereich rechts wurde großzügig mit einer Maschine rasiert und die Ratte am rechten Ohr mit Hilfe einer Stanze zur Identifizierung markiert. Der rasierte Bereich wurde gründlich mit Octenisept desinfiziert und die Ratte wurde auf den steril gehaltenen OP Bereich umgelagert. Alle Operationen fanden auf einer Wärmematte statt, um eine Unterkühlung zu vermeiden.

2.2.2.2 Defektsetzungsoperation

Die Defektoperation der Supraspinatussehne der Ratte wurde ausgeführt, wie in der Literatur mehrfach beschrieben [95, 124-126]. Zunächst wurde durch die Haut das laterale Ende der rechten Clavicula ertastet und ein ca. 3 cm langer Hautschnitt vom proximalen Humerus nach cranial in Richtung Ohr gesetzt. Das laterale Drittel der Clavicula wurde durchtrennt, der M. deltoideus wurde entlang der Faserrichtung ca. 1 cm distal eröffnet und der M. trapezius wurde der Länge nach ca. 1 cm nach proximal inzidiert. Der SSP wurde auf diese Weise freigelegt (Abbildung 5A) und an seinem Ansatz, am Tuberculum majus, untertunnelt (Abbildung 5B). Die Sehne des SSP wurde mit einem nicht-resorbierbaren Prolene-Faden der Größe United States Pharmacopoeica 5/0 gesichert und die SSP-Sehne am Ansatz mit einem Skalpell abgelöst (Abbildung 5C). Mit dem gleichen Faden wurde der, von der Fossa supraspinata mobilisierte SSP, an dem proximalen Teil des M. trapezius angenäht und durch eine Fadenschleife gekennzeichnet (Abbildung 5D). Absicht dieser Prozedur war es, eine spontane Refixation der SSP-Sehne am Ansatz zu verhindern, indem der Sehnenstumpf über 1 cm vom ursprünglichen Ansatz in einem spannungsfreien Zustand refixiert wurde, um eine Atrophie bzw. fettige Degeneration zu fördern. Anschließend wurde schichtweise die Mm. trapezius et deltoidea mit jeweils zwei bis drei resorbierbaren Einzelknopfnähten mit Monocryl 4/0 adaptiert. Der Hautschnittverschluss erfolgte mit einer fortlaufenden Naht aus Monocryl 4/0. Abschließend wurde die Wunde mit Hansaplast Sprühpflaster versiegelt. Nach der Operation erhielten die Ratten eine weitere Temgesic-Injektion (0,01 ml i.m.). Anschließend erfolgte die Anästhesieausleitung im Käfig unter einer Wärmelampe.

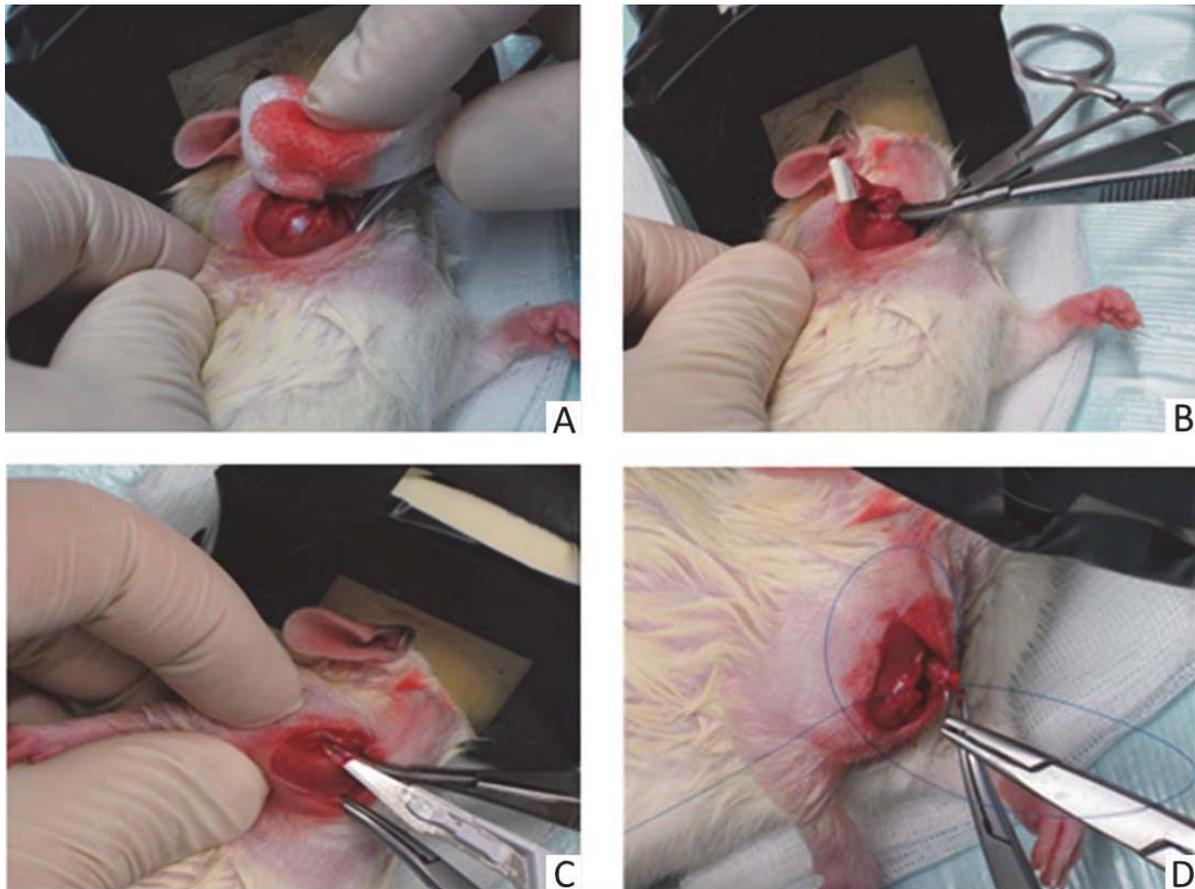


Abbildung 5 Defektsetzung. A: Präparation der SSP-Sehne; B: Untertunnelung der SSP-Sehne; C: Abtrennen der SSP-Sehne; D: Markierung der SSP-Sehne

Um den Grad der Verfettung bzw. die Spontanheilungstendenz zu dokumentieren, dienten die Gruppen 0 (Ausgangsgruppe) und 1 (Defektgruppe), die nach vier bzw. acht Wochen geopfert wurden, ohne Refixation der Sehne (Abbildung 6).

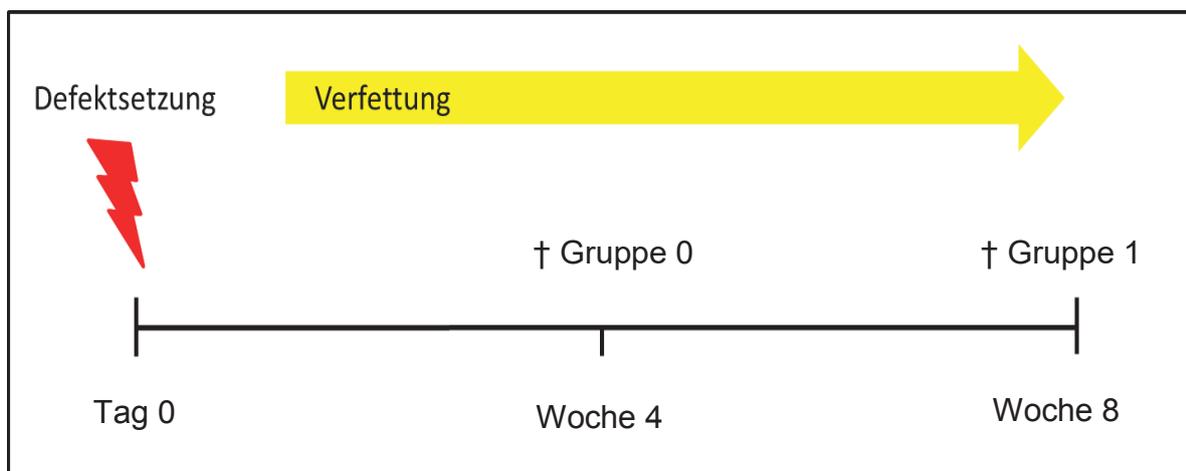


Abbildung 6 Zeitachse der Verfettung bei Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) und Gruppe 1 (Defektgruppe) nach Defektsetzung.

2.2.2.3 Sehnenrefixation und Zelltransplantation

Die zweite Operation fand vier Wochen (± 2 Tage) nach der Defektsetzung statt. Die OP-Vorbereitung glich der des ersten Eingriffes.

Haut, M. deltoideus und M. trapezius wurden, wie bei der Defektoperation beschrieben, durchtrennt. Der SSP-Sehnenstumpf wurde mithilfe der Proleneschleife aufgesucht. Der Humeruskopf wurde freigelegt ohne das glenohumerale Gelenk zu beschädigen und anschließend wurden mit einem Handbohrer zwei parallele Löcher von 0,5 mm von proximal nach distal in den Tuberculum majus gebohrt (Abbildung 7A), die ca. 3 mm im Knochen verlaufen. Die retrahierte SSP-Sehne wurde vom umliegenden Binde-/Narbgewebe gelöst und die Sehne mit einem neuen Faden (Prolene 5/0) durch die vorgebohrten Löcher an den Tuberculum majus (Abbildung 7B/C) im Sinne einer intraossären Matratzennaht fixiert [126]. Die Wunde wurde, wie unter 2.2.2.2 Defektsetzungsoperation beschrieben, geschlossen und das Versuchstier wie zuvor versorgt.

Gruppe 3 (Naht) erhielt nach der intraossären Sehnenrefixation keine zusätzliche Behandlung. In den rechten SSP der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) wurden ca. 5 Mio. Myozyten, welche in NaCl 0,9 % gelöst wurden, infiltriert. Die Nadel wurde im distalen tendomuskulären Übergang angesetzt, die Nadelspitze innerhalb der Faszie intramuskulär nach proximal geführt und die Suspension dann anschließend fächerförmig appliziert. Gruppe 5 (Naht und MSC) erhielt 5 Mio. mesenchymale Stammzellen in NaCl 0,9 % gelöst und Gruppe 2 (Naht und NaCl) wurden 0,05 ml NaCl 0,9 % injiziert, was dem Volumen der Injektionen von Gruppe 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) entsprach (Abbildung 7D).

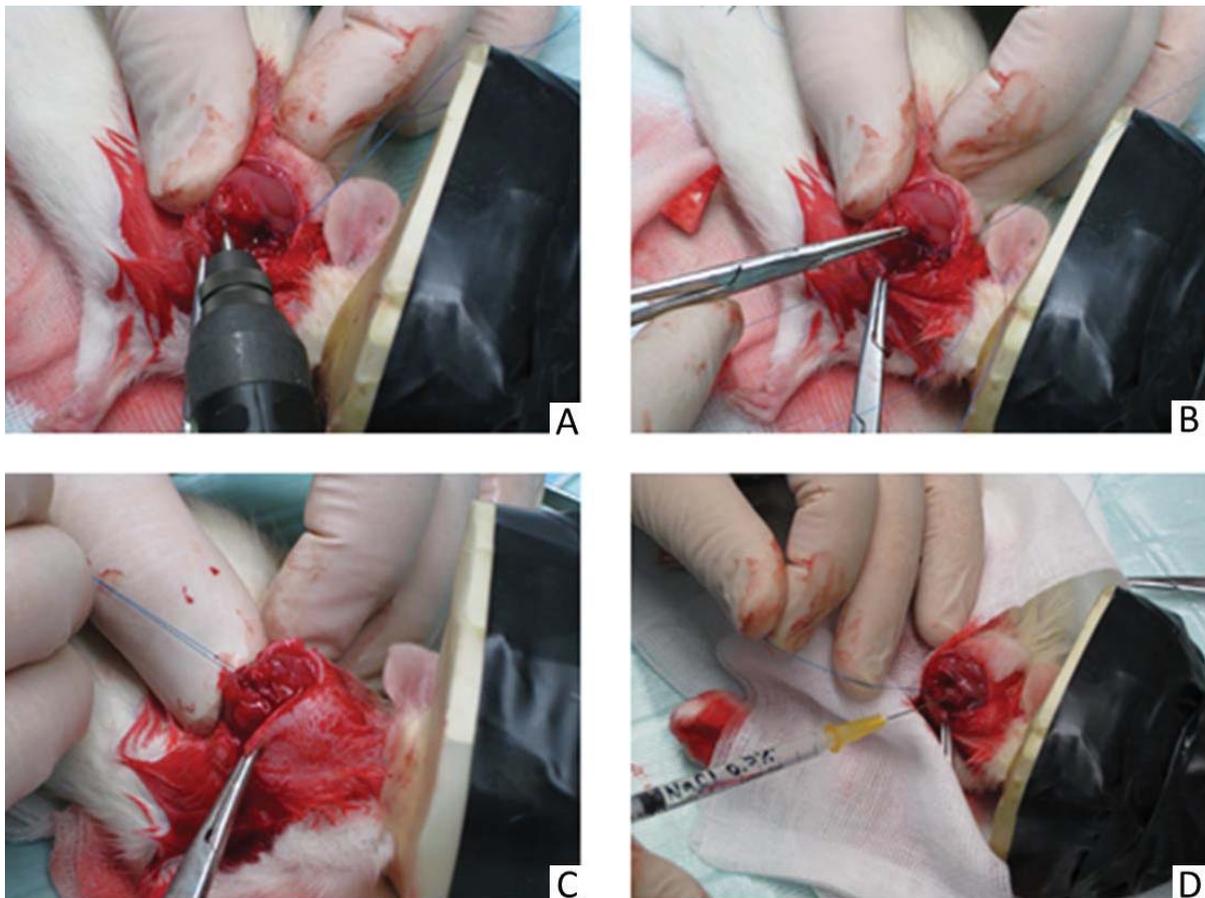


Abbildung 7 Sehnenrefixation und Zelltransplantation in den Muskel. A: Vorbohren zweier Löcher in den Humeruskopf; B/C: Refixation der SSP-Sehne am Humerus; D: Infiltration des SSP

2.2.2.4 Verlauf der Operationen

Bereits wenige Minuten nach den Operationen zeigten sich die Tiere wieder vital und eine Beeinträchtigung durch Schmerzen wurde nicht beobachtet. Die Hautnaht musste bei zwei Tieren am ersten postoperativen Tag erneuert werden, da die Fäden von den Ratten abgebissen worden waren. Die Wunden der übrigen Tiere heilten komplikationslos ab. Bei einem Tier war die vollständige Refixation der Sehne am Knochen chirurgisch nicht möglich, da das Tuberculum majus beim Bohren der transossären Kanäle zersprengte; hier war nur eine Fixierung im Sinne einer transossären single-stich Naht möglich.

2.2.2.5 Euthanasie

Die Ratten wurden mit einer Narcoreninjektion, wie in 2.2.4.1 Gewinnung der Myozyten beschrieben, euthanasiert. Die SSP-Sehnen der behandelten, rechten Seite sowie die SSP-Sehnen der unbehandelten, linken Seite wurden von jedem Tier entnommen.

Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) wurde vier Wochen (± 2 Tage) und Gruppe 1 (Defektgruppe) acht Wochen (± 2 Tage) nach der Defektoperation euthanasiert. Die Gruppen 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) wurden vier Wochen (± 2 Tage) nach der Refixation euthanasiert. Sofort nach der Entnahme wurden die Mm. supraspinatus standardisiert, feucht gewogen und anschließend für die histologische Beurteilung vorbereitet.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Grundlagen der Zellkultur

Mit den Zell- und Gewebekulturen wurde, soweit nicht anders beschrieben, unter der Sterilbank gearbeitet. Im verwendeten Brutschrank herrschten folgende Bedingungen: 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre in Raumluft. Die Reinigung des Brutschanks erfolgte durch ein präinstalliertes Sterilisationsprogramm mit Heißluft (4 h, 200 °C). Das verwendete Nährmedium wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Wasserbad wurde mit Wasserbad-Schutzmittel „Aqua stabil“ desinfiziert. Das Zentrifugieren von Zellsuspensionen erfolgte, falls nicht anders vermerkt, bei 470 g für 5 min bei Raumtemperatur. Die nötigen labortechnischen Voraussetzungen für die Räumlichkeiten eines S1-Labors wurden nach § 7 des Gesetzes zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz – GenTG) eingehalten. Sowohl die bei der Arbeit mit den Zellen genutzten Einweghandschuhe als auch die Arbeitsfläche wurden mit 70 % Ethanol sauber gehalten. Arbeitsgeräte und Arbeitsmaterialien, die hitzeunempfindlich sind, wurden im Autoklaven (120 °C, 20 min, 0,3 bar Überdruck) sterilisiert. Hitzeempfindliche Flüssigkeiten wurden durch Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) filtriert [127].

2.2.3.2 Lichtmikroskopie

Die Zellen bzw. Gewebe wurden in regelmäßigen Abständen und immer vor weiterführenden Arbeitsschritten unter dem inversen Lichtmikroskop beurteilt und in 50- bzw. 100-facher Vergrößerung abfotografiert. Speziell die Myozyten wurden durch engmaschige Kontrollen mit dem inversen Lichtmikroskop dabei beobachtet, wie sie aus dem Muskelgewebe auswuchsen.

2.2.3.3 Nährmedien

Zur Kultivierung der Zellen wurden verschiedene Nährmedien (Tabelle 4) benötigt, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Zum einen liefern die Medien zellspezifische Nährstoffe, zum anderen kann aber beispielsweise durch die Zugabe eines Antibiotikums ein Selektionsdruck aufgebaut werden, hier Gentamycin 418 (G418). Nach der Herstellung wurde das jeweilige Medium bis zum Gebrauch bei 6 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde das Medium im Wärmebad auf 37 °C erwärmt. Penicillin/Streptomycin (P/S) wurde in einer Konzentration von 10000 U/ml / 10000 µg/ml eingesetzt.

Medium(zusätze)	Mengenanteil im Induktionsmedium	Mengenanteil im Erhaltungsmedium	Mengenanteil im Selektionsmedium
DMEM	500 ml	500 ml	500 ml
FCS	50 ml	50 ml	50 ml
P/S	9 ml	3 ml	3 ml
G418	0 ml	0 ml	2,5 µl / ml Medium

Tabelle 4 Zusammensetzung Nährmedium für MSC und Myozyten

Mediumzusatz	FBS	DMSO	Fibroblastenmedium
Konzentration im Medium	50 %	10 %	40 %

Tabelle 5 Zusammensetzung Einfriermedium

Mediumzusatz (in Aqua dest. gelöst)	Hefeextrakt	Peptone	NaCl
Konzentration im Medium	5 g/l	10 g/l	5,5 g/l

Tabelle 6 Zusammensetzung LB-Medium (lysogeny broth)

2.2.3.4 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Auf die gereinigte Zählkammer wurde ein durch Atemluft angefeuchtetes Deckglas gepresst. 10 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau 0,4 % durch Auf- und Abpipettieren vermischt und ein Tropfen dieses Gemisches an das aufgelegte Deckglas gegeben. Durch Kapillarkräfte verteilte sich der Tropfen unter dem ganzen Deckglas und so ließen sich die Zellen unter dem Mikroskop auszählen. Dabei werden nur die vier Eckquadranten gezählt und - um keine Zelle doppelt zu zählen - jeweils nur die der

unteren und linksständigen Ränder. Die Zellzahl pro ml konnte nun mit folgender Formel ausgerechnet werden:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{Suspension in ml}} = \frac{n \text{ Zellen gesamt}}{n \text{ ausgezählte Quadrate}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.3.5 Einfrieren von Zellen

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % vom Untergrund gelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit Medium gestoppt, dieses wurde anschließend abzentrifugiert und das Pellet in 1,5 ml Einfriermedium (Tabelle 5) resuspendiert. In einem Kryoröhrchen wurde die Zellsuspension über Nacht bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in die Langzeitkryokonservierung bei -196 °C in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs überführt.

2.2.3.6 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen mit den entsprechenden Zellen für wenige Minuten bei 37 °C in das Wärmebad gestellt, bis sich der Inhalt verflüssigte. Direkt darauffolgend wurden 5 ml Nährmedium zugegeben und das Zellgemisch wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet in Medium gelöst.

2.2.3.7 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden in T75-Flaschen kultiviert. Das Nährmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Hierzu wurde unter der Sterilbank das alte Medium vorsichtig abpipettiert und 10 ml neues Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre in Raumluft im Brutschrank inkubiert. Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis der Flaschenboden zu ca. 80 % von den Zellen bewachsen war. Sobald dies eintrat, wurden die Zellen passagiert. Um Nährmediumsreste und andere störende Partikel wie Teile abgestorbener Zellen zu entfernen, wurden die Zellen in den Flaschen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde ein Trypsin/EDTA-Gemisch mit der Konzentration 0,05 % bzw. 0,02 % in A. dest. gelöst auf die Zellen gegeben und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch

die Spaltung der Strukturproteine an der Zelloberfläche lösten sich die Zellen ab. Wegen der kurzen Einwirkzeit wurden hierbei die intrazellulären Proteine nicht beschädigt und die Zellen blieben intakt. Durch kräftiges Klopfen der Flasche auf die Handfläche konnten die Zellen anschließend vom Flaschenboden gelöst werden. Das Ablösen der Zellen wurde stets lichtmikroskopisch überprüft, bevor zum Abstoppen der Trypsinierungsreaktion Zellmedium hinzugefügt wurde. Das Zellgemisch wurde mit einer Konzentration von 2000 Zellen pro cm^2 in neue Flaschen ausgesät und somit in die nächst höhere Passage überführt.

2.2.4 Zellgewinnung und Transfektion

2.2.4.1 Gewinnung der Myozyten

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 1 ml Nacoren (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium, Konzentration: 16 g/100 ml). Anschließend wurden die Hinterläufe der Ratte rasiert und das Tier für 30 min in 70 % Ethanol desinfiziert. Die Haut der Hinterläufe wurde mit einem 15-er Skalpell von der Muskulatur abgetrennt. Am Hüftgelenk wurde bis auf den Knochen präpariert und das Gelenk mit einem Seitenkneifer exartikuliert (Abbildung 8A). Nachfolgend wurden die Gliedmaßen in eine Lösung aus 500 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung und 9 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) eingelegt (Abbildung 8B). Die Muskulatur wurde von dem Faszien- und Sehnengewebe getrennt (Abbildung 8C) und unter Zuhilfenahme von zwei 20-er Skalpellen in ca. 1 x 1 mm große Würfel zerteilt. Diese Muskelwürfel wurden auf 10 cm große Petrischalen verteilt (Abbildung 8D) und zum Trocknen drei Stunden bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Im Anschluss daran wurde pro Platte 15 ml Induktionsmedium (Tabelle 4) zugegeben [98]. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt, die Umstellung vom Induktions- auf das Erhaltungsmedium (Tabelle 4) erfolgte nach ca. zehn Tagen.

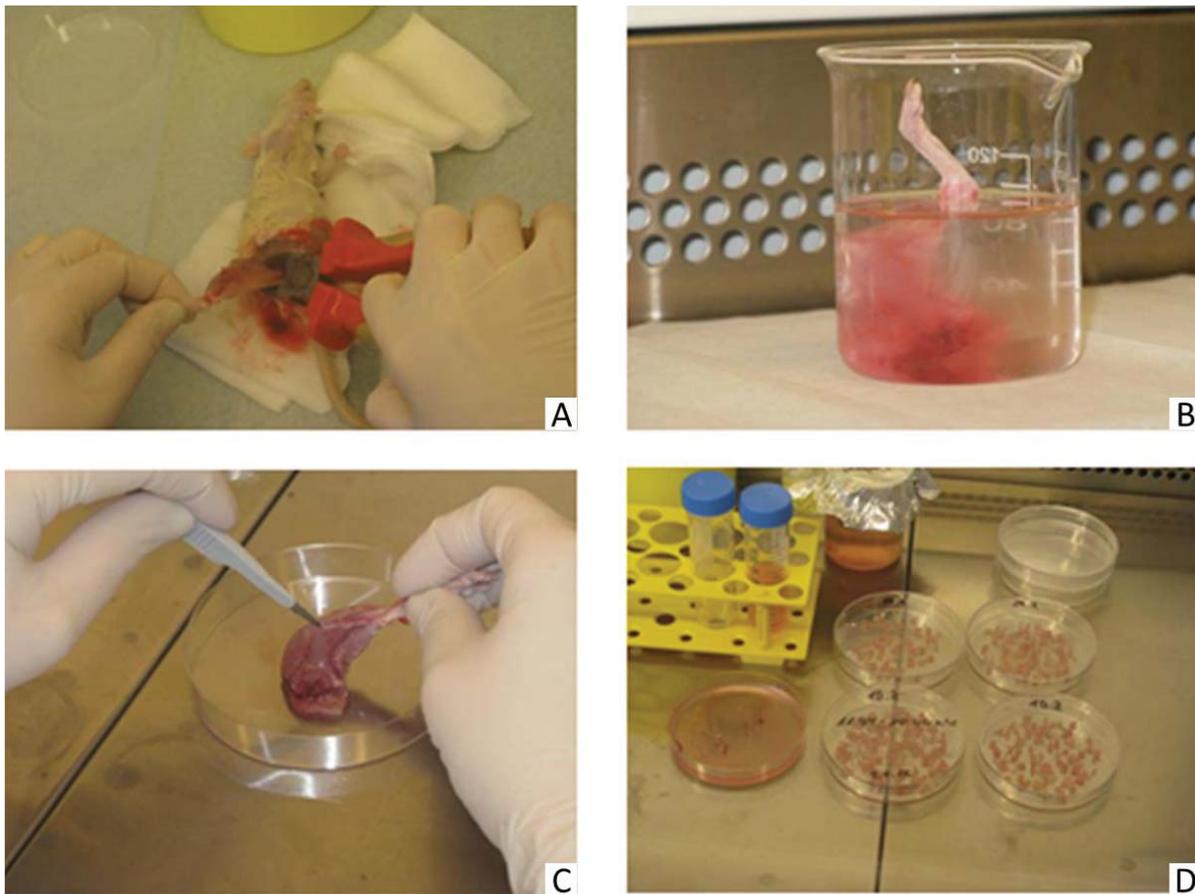


Abbildung 8 Aufarbeitung Spendertier. A: Exartikulation der Gliedmaße; B: Einlegen der Gliedmaße in Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung und Penicillin/Streptomycin; C: Abtrennen der Muskulatur vom Knochen; D: Aufteilen der Muskelwürfel auf Petrischalen

Nach vier Wochen im Brutschrank wurden die ausgewachsenen Myozyten von den Platten auf T175-Flaschen überführt. In der fünften Woche erfolgte die Transfektion. Hierzu wurden die Zellen (2 Millionen Zellen pro T175 in 25 ml Induktionsmedium) ausgesät. Am Tag nach der Aussaat wurde ein Transfektionskomplex von 40 μ g pEGFP-C1 und 80 μ l Lipofectamine 2000 von Invitrogen pro Flasche zugegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in 2.2.4.4 Transfektion mit Lipofectamine 2000 beschrieben.

2.2.4.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen

Nach der Myozytengewinnung wurden das Femur und die Tibiae von Weichteilgewebe befreit und die Epi- und Metaphyse abgetrennt. Mit einer 10-ml-Spritze und einer 20-G-Kanüle wurde das Knochenmark mit PBS herausgespült. Diese Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 7 ml PBS vermischt. Mit diesem Gemisch wurden 3,5 ml BicolI in einem 15-ml-Falcon überschichtet. Anschließend wurde das Gemisch erneut zentrifugiert (2000 U/min, 30

min, Bremse 1). Der entstandene weiße Ring (Interface) wurde in ein 15-ml-Falcon abpipettiert, der Rest verworfen. Das Falcon wurde mit 12 ml PBS aufgefüllt und abermals zentrifugiert (1500 U/min, 5 min, Bremse 3). Das nun entstandene Pellet wurde in 10 ml Induktionsmedium (Tabelle 4) suspendiert und in T75-Flaschen ausgesät [128]. Die MSC adhären an der Plastikoberfläche. Der erste Mediumwechsel fand am ersten Tag, die weiteren Mediumwechsel wie unter 2.2.3.7 Kultivierung und Passagieren der Zellen beschrieben statt. Am zehnten Tag wurde von Induktions- auf Erhaltungsmedium umgestellt. Die erste Passage erfolgte nach zwei Wochen, die zweite Passage nach vier Wochen. Die Stammzellen wurden regelmäßig mit dem Lichtmikroskop auf Vitalität überprüft. Es zeigte sich eine deutliche Adhäsionsneigung an Plastikoberflächen (Abbildung 9). Dies ist ein für Stammzellen typisches Verhalten [129]. Diese Eigenschaft wurde auch bei der Kultivierung genutzt. Durch das Abpipettieren des Kulturmediums konnten mobile und abgestorbene Zellen entfernt werden, während die MSC am Flaschenboden haften blieben.

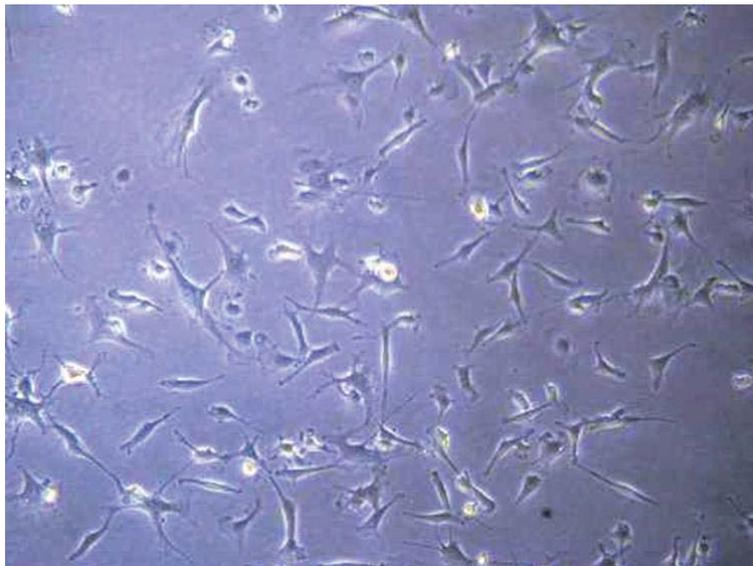


Abbildung 9 Mesenchymale Stammzellen aus Rattenknochenmark nach mehrwöchiger in vitro Expansion unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung.

In der zweiten Passage erfolgte die Transfektion. Hierzu wurden T175-Flaschen mit je 2 Millionen Zellen bestückt. Am ersten Tag nach der Aussaat wurden die Zellen, wie unter 2.2.4.4 Transfektion mit Lipofectamine 2000 beschrieben, transfiziert.

2.2.4.3 Vermehrung des Plasmides pEGFP-C1

Zur Transfektion wurde ein Komplex aus Plasmid und Lipofectamine benötigt. Zur Vermehrung des Plasmides wurden autoklavierte Schikane-Erlenmeyerkolben und

LB-Medium (engl.: lysogeny broth) verwendet (Tabelle 6). In 5 Schikane-Erlenmeyerkolben wurden je 200 ml LB-Medium mit 2 ml Kanamycin angesetzt. Unter Zuhilfenahme einer sterilen Impföse wurden die Kolben mit DH5 α pEGFP-C1 (ein *Escherichia coli*) aus einem Glycerolstock beimpft. Es folgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler (220 rpm). Da das Plasmid, neben der Information für GFP, eine Kanamycinresistenz besitzt, wurden *E. coli* Bakterien ohne das Plasmid abgetötet. Die Desoxyribonukleinsäure-Extraktion (DNS) aus dem Bakterium erfolgte mit dem Maxiprekit von Qiagen nach entsprechender Anleitung und die DNS-Elution in 500 μ l Elutionspuffer. Die Konzentration der DNS wurde mit dem Spektralphotometer bestimmt. Hierfür wurde das Programm geöffnet und die Messung von doppelsträngiger DNS ausgewählt. Doppelsträngige DNS wird bei einer Wellenlänge von 260/280 nm gemessen. Jedes DNS-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde dreimal gemessen. Die Konzentration lag zwischen 2,0 und 2,5 μ g DNS/ μ l.

2.2.4.4 Transfektion mit Lipofectamine 2000

Das Plasmid und das Lipofectamin von Invitrogen bilden einen Transfektionskomplex. Dieser kann von der Zelle aufgenommen werden, wodurch das Plasmid ins Zellinnere gelangt. Hierzu werden 2 ml Medium (RPMI) mit 40 μ g Plasmid-DNS und 2 ml Medium (RPMI) mit 80 μ l Lipofectamine 2000 5 min lang bei Raumtemperatur (RT) gemischt. Im Anschluss daran wurden die zwei Gemische zusammengegeben und für 15 min bei RT mit Hilfe des Vortex-Genies vermischt, so dass es zur Komplexbildung kommt. Die Transfektionskomplexe wurden am Tag der Transfektion auf die MSC bzw. Myozyten gegeben und 23 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und unter Selektionsdruck kultiviert. Der Anteil der GFP-transfizierten Zellen war nicht stabil, sondern nahm stark ab. In der vierten Passage waren nur noch unter 1 % der Zellen grün fluoreszierend (Abbildung 10).

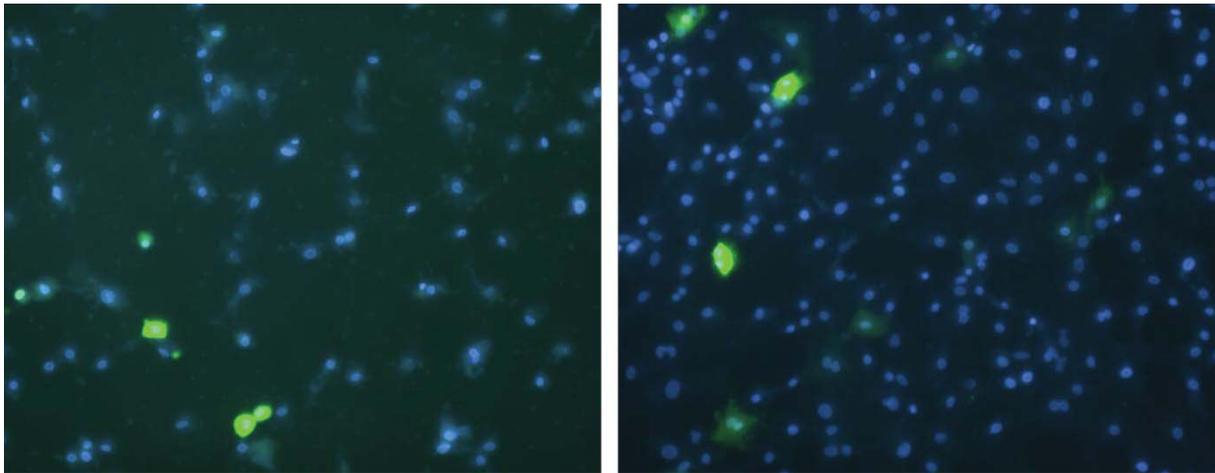


Abbildung 10 Grünleuchtend sind die transfizierten Myozyten dargestellt, als blau sind die Zellkerne von nicht-transfizierten Zellen zu sehen. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt in Passage 4.

2.2.4.5 Zellvorbereitung zur Transplantation

Die Ernte der transfizierten Myozyten und MSC erfolgte nach Entfernung des Nährmediums und Waschen der Zellen mit 10 ml PBS. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA bedeckt, bevor sie sich nach 10-minütiger Bebrütung bei 37 °C vom Untergrund abklopfen ließen. Das Trypsin wurde mit 5 ml Fibromedium gestoppt, die Zellen in einem 50-ml-Falcon gesammelt und 5 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden wie beschrieben in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Daraufhin wurde die Zellzahl mit PBS auf 10 Mio Zellen pro ml eingestellt. Im Anschluss daran wurden 5 ml Zellsuspension erneut in einer 50-ml-Falcon-Flasche wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 µl NaCl 0,9 % resuspendiert und in die Spritzen gegeben. Jede Spritze enthielt näherungsweise 5 Mio Zellen. Diese wurden bei 4 °C im Dunkeln, bis zum Verabreichen der Injektion, auf Eis und unmittelbar vor der Transplantation bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.4.6 Testung der Zellen auf Verunreinigungen mit Mikroorganismen

Pro Flasche wurden vor der Transplantation 10 ml Mediumüberstand aufgehoben und gekühlt aufbewahrt, um es auf Verunreinigung mit Mikroorganismen zu überprüfen. Die Bakterientestung erfolgte mit 2 ml LB-Medium und 100 µl Mediumüberstand über Nacht bei 37 °C im Schüttler (220 rpm). Um einen Pilzbefall auszuschließen, wurden 2 ml LB-Medium und 100 µl Überstand zwei Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesen beiden Tests wurde jeweils eine Negativkontrolle, die nur aus LB-Medium

bestand, mitgeführt. Der Ausschluss eines Mykoplasmenbefalls wurde mit dem Mycoplasmentestkit von Venor GeM erbracht.

2.2.5 Histologie und Immunhistologie

2.2.5.1 Allgemeines zur Histologie und Immunhistologie

Das Sauberhalten der Arbeitsfläche erfolgte wie im Kapitel 2.2.3.1 Grundlagen der Zellkultur beschrieben. Auf den Boden der Inkubationskammer wurde destilliertes Wasser gegeben (Feuchtekammer), um die Präparate vor dem Austrocknen zu bewahren. Alle Präparate wurden deutlich beschriftet und es wurde stets eine Negativkontrolle angefertigt. Als Waschpuffer wurde ein Gemisch aus 1 l PBS und 1 ml Brij (Detergenz) verwendet.

2.2.5.2 Anfertigung der Gefrierschnitte

Unmittelbar nach Wiegen der entnommenen feuchten SSP wurden diese in Tissue Tek und die hierfür vorgesehenen Plastikförmchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren [95]. Die Proben wurden als Längsschnitte angefertigt. Dazu wurde jeder Muskel 1 cm vom Ursprung entfernt durchschnitten. Das kleinere, ansatznahe Stück wurde jeweils aufrecht eingebettet, während das ursprungsnahe Stück liegend eingefroren wurde. Dieses Vorgehen diente dem Zweck, anschließend sowohl einen Querschnitt als auch einen Längsschnitt für die Auswertung zu erhalten. Nachfolgend wurden die Proben bei -20 °C in Alufolie gehüllt im Tiefkühlfach gelagert. Die Proben wurden im Kryoschneider von Leica bei den Einstellungen Objektstichtemperatur -18 °C sowie Kammertemperatur -21 °C in 7 µm dünne Präparate geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Proben wurden zwei Stunden lang bei Raumtemperatur getrocknet, jeweils zwei Objektträger Rücken an Rücken gelegt und in Alufolie eingewickelt bei -20 °C aufbewahrt. Vor dem Färben der Schnitte wurden diese erst 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend rehydriert.

2.2.5.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient der Übersicht. Während der basische Anteil Hämatoxylin die sauren Anteile der Zelle, insbesondere DNS im Zellkern, blau färbt, ist das Eosin für die Rotfärbung der basischen Anteile, wie z.B. Zellplasmaproteine

verantwortlich. Hierfür wurde ein Färbeautomat verwendet. Die Färbegondeln mit den Präparaten wurden zuerst 1 min in destilliertem Wasser rehydriert, bevor sie 9 min in Hämatoxylin gefärbt wurden. Es folgte das Bläuen der Präparate. Hierzu wurden sie 6 min von Leitungswasser umspült, bevor sie 3 min in Eosin gefärbt wurden. Nach einem 3-minütigen Bad in destilliertem Wasser folgte die Entwässerung der Präparate für die Dauer von 9 min in 100 %-igem Ethanol. Zur Klärung wurden die Präparate 6 min in Rotihistol getaucht. Abschließend wurden die Präparate mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt und so haltbar gemacht.

In der HE-Übersichtsfärbung stellt sich der Fettanteil als weiße Fettvakuole dar, während die gestreiften Muskelzellen rosa erscheinen (Abbildung 11/2).

2.2.5.2.2 Nilrot-Färbung

Die Nilrot-Färbung ist eine Fettfärbung, die Fett unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchtend gelb zeigt. Die Präparate wurden zum Auftauen für 30 min bei RT ausgelegt. Anschließend wurden sie in ein Gemisch aus 100 ml PBS, 100 ml Nilrot und 50 µl Höchst gegeben und im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Waschung in PBS, bevor die Präparate in DAPI Mountain Medium eindeckt wurden.

In der Nilrot-Färbung ist Fett gelb dargestellt (Abbildung 11/3).

2.2.5.2.3 Anti-Laminin-Färbung

In dieser immunhistologischen Färbung wird die Basalmembran der Myozyten dargestellt. Sie dient daher dem Nachweis von Muskelzellen [95, 130]. Da der erste Antikörper über Nacht einwirken muss, dauert die Färbung mit Vorbereitung zwei Tage.

Am ersten Tag tauten die Präparate 20 min in der Alufolie und 20 min ohne Alufolie auf. Anschließend wurden die Präparate 10 min in Aceton fixiert und für 30 min an der Luft getrocknet. Nach einer 10-minütigen Rehydratation in PBS wurden endogene Peroxidasen für 30 min mit einem Gemisch aus 200 ml PBS, 2 ml Brij und 1 ml Wasserstoffperoxid geblockt. Es folgte das Waschen der Präparate in Waschpuffer (PBS/Brij), bevor die Präparate 45 min mit Horseseum (1:20, Serum: PBS) geblockt wurden. Hierfür wurden auf jeden Schnitt 100 µl des Horseseumgemisches pipettiert und die Objektträger zum Inkubieren in die Feuchtekammer gegeben. Anschließend wurde das Horseseum von den Präparaten abgeklopft und das erste Antikörpergemisch (20 µl Antikörper + 1 µl Horseseum + 979 µl Antikörperverdünner)

auf den Schnitt pipettiert und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde nur Verdünner verwendet. Am zweiten Färbetag wurden die Präparate mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 min mit dem zweiten Antikörpergemisch, bestehend aus Verdünner (400 Teile) und Biotinylated Anti mouse Ig G (1 Teil), bedeckt. Es folgte das Waschen mit Waschpuffer bevor die Präparate 30 min mit ABC-Lösung in der Feuchtekammer inkubierten. Zur Herstellung der ABC-Lösung wurden pro ml PBS je ein Tropfen Peroxidase und ein Tropfen Streptokinase zusammenpipettiert und geschüttelt. Die ABC-Lösung wurde ebenfalls mit Waschpuffer von den Präparaten gewaschen. Zur Färbung mit AEC wurde eine Tablette AEC in 10 ml DMSO gelöst und das Gemisch anschließend gefiltert. Die Arbeit mit AEC-Farbe erfolgte unter dem Abzug und soweit möglich im Dunkeln. Die AEC-Farbe wurde mit 200 ml Na-Acetat-Puffer zusammengegeben und auch dieses Gemisch wurde filtriert. Das Filtrat wurde mit 60 µl H₂O₂ aktiviert und die Präparate für 9 min angefärbt. Durch einminütiges Tauchen in PBS wurde die Färbereaktion gestoppt. Nach 5 min in destilliertem Wasser waren die Präparate fertig für das Eindecken mit Aquatex.

Durch die braun bis rostrot angefärbten Zellkerne in der Anti-Lamin-Färbung lassen sich im ersten Bild die Kerne der Myozyten nachweisen (Abbildung 11/1).

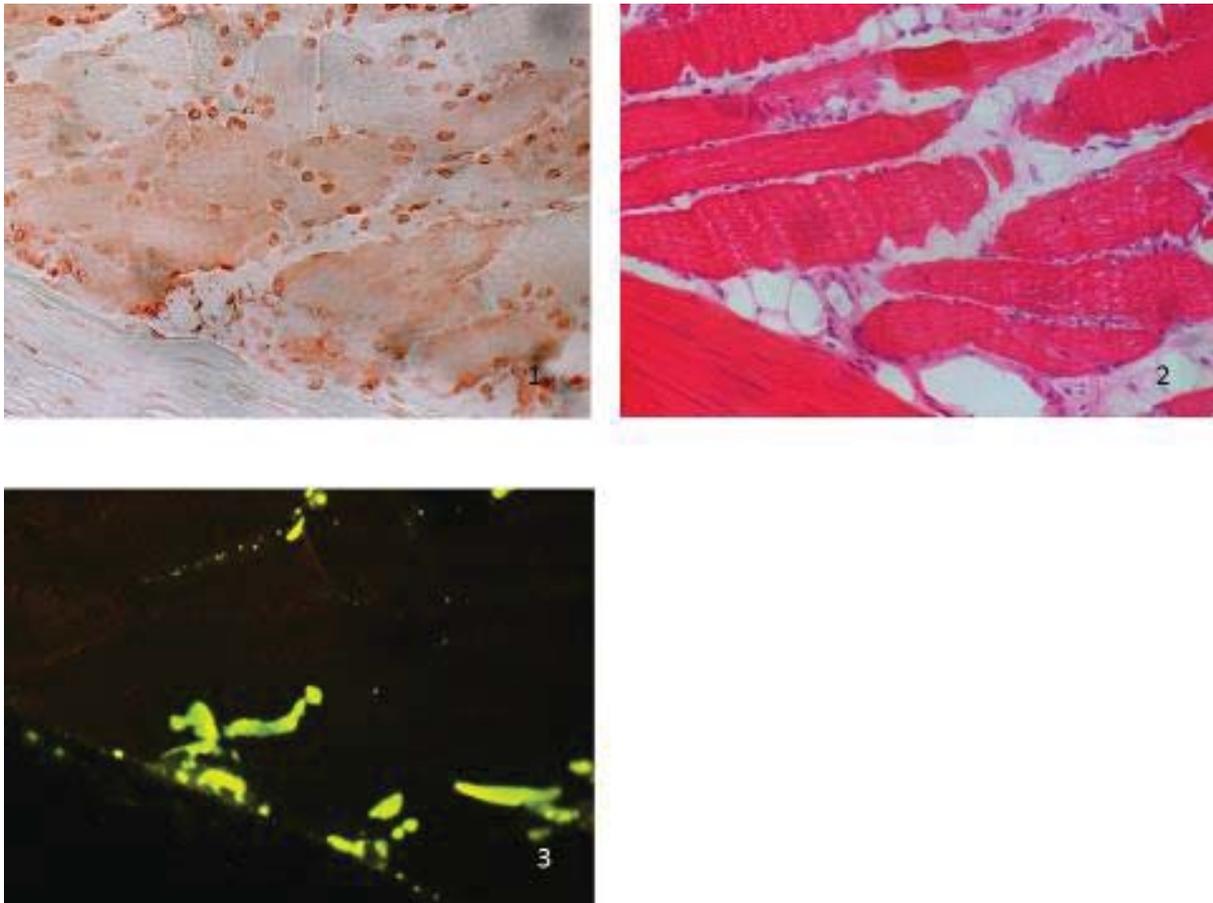


Abbildung 11 Serienaufnahme des gleichen Abschnittes in verschiedenen Färbungen, die Muskelanteil (1) und Fettanteil (3) nachweisen, bzw. eine Übersicht geben (2); 200-fache Vergrößerung.

2.2.5.2.4 Nachweis von mesenchymalen Stammzellen

Die Verifizierung des Stammzellencharakters der MSC erfolgte mithilfe von CD-Antikörpern. Hierzu wurden CD73-, CD90- und CD105-Antikörper verwendet, die bei einem positiven Färbeargebnis den Stammzellencharakter der Zellen nachweisen. Auch diese Färbung dauert zwei Tage.

An Tag eins wurde damit begonnen, die Präparate mit PBS zu waschen. Es folgten die Fixierung in eiskaltem 4 % (Paraformaldehyd) PFA (pH 7,0) für 15 min und erneutes Waschen in Waschpuffer. Zum Blocken wurden die Präparate für 30 min in 5 % BSA in PBS gegeben. Der erste AK (CD73, CD90, CD105) wurde 1:100 mit 5 % BSA in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C in der Feuchtekammer inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit 5 % BSA in PBS versehen. Am zweiten Tag wurde das erste Antikörpermisch mit Waschpuffer von den Präparaten gewaschen. Dieser Arbeitsschritt erfolgte auf dem Schüttler. Anschließend wirkten die Präparate für 15 min in 0,1 % Triton X-100 in PBS ein, bevor sie abermals mit Waschpuffer gewaschen wurden. Der zweite AK wurde für 30 min bei RT auf den Präparaten belassen bevor,

die Präparate wieder gewaschen wurden. Als zweiter AK wurde für CD73 und CD90 Anti-Mouse-Alexa 488 in einer 1:400-PBS-Verdünnung und für CD105 Anti-goat-Alexa 488 in einer 1:200-PBS-Verdünnung verwendet. Nach dem Waschen erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI 1:1000 in PBS für 9 min bei RT. Nach diesem Schritt erfolgte erneut ein gründliches Waschen auf dem Schüttler mit Waschpuffer. Eingedeckt wurden die fertig gefärbten Präparate mit Fluoromount.

Die Färbung mit den CD73-, CD90- und CD105-Antikörpern zeigte einen positiven Färbungsnachweis und somit das Vorliegen von mesenchymalen Stammzellen [110, 131]. Die CD-positive Zelloberfläche ist grün und die Zellkerne blau dargestellt (Abbildung 12).

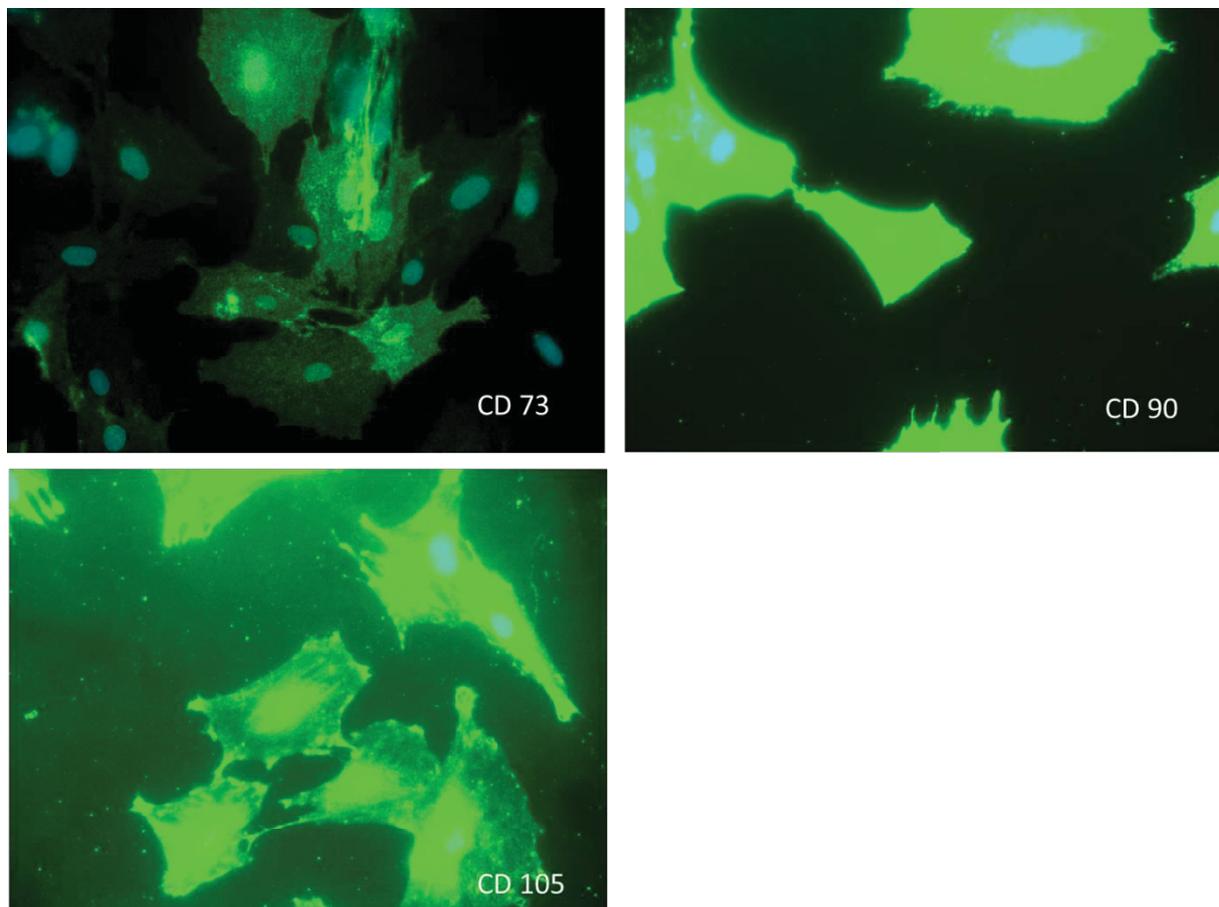


Abbildung 12 Positive grün gefärbte MSC. Die CD Antikörper färben die Zelloberfläche grün. Der Zellkern ist blau gefärbt.

2.2.6 Beurteilung

2.2.6.1 Bestimmung der Masse

Alle Tiere wurden sowohl zum Zeitpunkt der Defektsetzung als auch zum Zeitpunkt der Euthanasie bis auf die zweite Kommastelle gewogen. Die beidseits entnommenen Mm. supraspinati wurden direkt nach der Entnahme, vor der Einbettung in Tissue Tek, mit der Analysewaage gewogen und somit die Feuchtmasse bestimmt [132]. Die Feuchtmasse wurde zur statistischen Evaluation verwendet.

2.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Alle Nilrot-gefärbten Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 200-fachen Vergrößerung und aufgrund des guten Kontrastes mit dem FITC- (Fluorescein isothiocyanate) Filter. Alle Präparate lagen im Längsschnitt vor. Zur Beurteilung wurden pro Präparat sechs Bilder angefertigt, je zwei muskelursprungsnah (1+2), zwei mittig (3+4) und zwei muskelansatznah (5+6) (Abbildung 13). Dabei wurde je ein Bild über der längs durch den Muskel auslaufenden Sehne und eines darunter gemacht. Alle Präparate wurden „blind“, also weder mit Kenntnis der Präparatnummer noch der Körperseite, von der das Präparat stammte, ausgewertet.

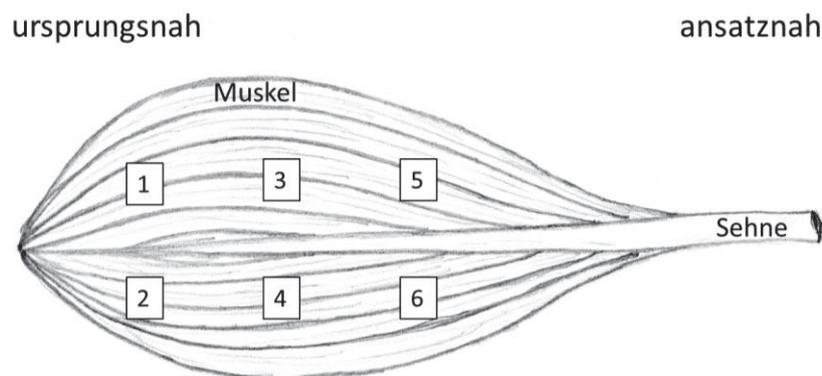


Abbildung 13 Schematische Darstellung des Muskel Längsschnittes und der zur Auswertung herangezogenen Bildausschnitte.

2.2.6.3 ImageJ Bildbearbeitungsprogramm

Mit Hilfe von der ImageJ freeware software [133] wurden die gelb gefärbten Bereiche, die das Fett präsentieren, herausgerechnet und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtfläche des Bildausschnittes evaluiert (Abbildung 14).

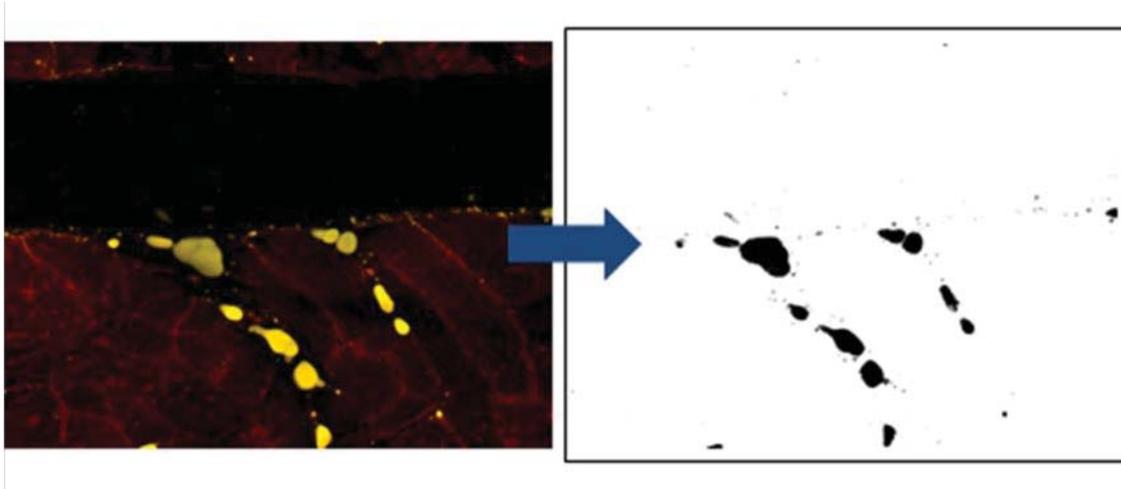


Abbildung 14 Umwandlung eines histologischen Bildes in ein schwarz-weißes Bild zur statistischen Auswertung der Fläche: Die schwarze Fläche entspricht hier einem Anteil von 2,1 % der Gesamtfläche.

2.2.6.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism 5 Statistik Software. Zur Visualisierung wurden Balken-Diagramme verwendet.

2.2.6.4.1 t-Test

Mit dem t-Test, einem Hypothesentest, werden die Mittelwerte von zwei Gruppen miteinander verglichen. Es können nicht mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, um zu beurteilen, ob die Gruppen von der gleichen oder von unterschiedlichen Populationen stammen. In dieser Studie wurde der Test angewandt, um zwei Versuchsgruppen z.B. in Bezug auf ihre Masse zu vergleichen. Die Nullhypothese würde in diesem Fall davon ausgehen, dass die beiden Gruppen aus der gleichen Population kommen, also sich in ihrem Gewicht nicht unterscheiden. Die Alternativhypothese besagt, dass die verglichenen Werte so unterschiedlich sind, dass sie aus verschiedenen Populationen kommen. Jedoch kann auch bei großer Abweichung der Werte nicht sicher ausgeschlossen werden, dass den zwei Gruppen nicht doch eine Population zugrunde liegt, dies ist nur unwahrscheinlich. Wie

wahrscheinlich bzw. unwahrscheinlich die Nullhypothese ist, wird durch den p-Wert ausgedrückt [134].

2.2.6.4.2 Kruskal-Wallis-Test

Ebenso wie der t-Test, ist auch dieser nicht-parametrische Test, ein statistischer Hypothesentest. Es können mehrere Gruppen, die unabhängig voneinander sind, miteinander verglichen werden. Zur Untersuchung der Signifikanz der Mittelwerte wurde dem Kruskal-Wallis-Test als Post-hoc-Test der Dunn's multiple Comparison Test angeschlossen.

2.2.6.4.3 p-Wert

Der p-Wert ist eine Größe, die beschreibt, inwieweit die Nullhypothese abgelehnt werden kann. Je geringer der p-Wert, desto deutlicher kann die Nullhypothese verworfen werden. Die Nullhypothese beschreibt hier, dass kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen vorliegt. Der p-Wert gibt, in Verbindung mit dem festgelegten Signifikanzniveau, zudem eine Indikation zu der statistischen Signifikanz der Ergebnisse. Je deutlicher das Signifikanzniveau unterschritten wird, desto höher ist die statistische Signifikanz. Ab einem Signifikanzniveau von 5 % kann der Unterschied als signifikant bezeichnet werden [135]. Dies entspricht einem p-Wert von 0,05. In den folgenden Graphiken werden signifikante Unterschiede mit einem Pfeil markiert. Um die unterschiedlichen Signifikanzniveaus zu verdeutlichen, wird im Weiteren ein p-Wert von $< 0,05$ mit * markiert, ein p-Wert von $< 0,01$ mit ** und ein p-Wert ab 0,0001 mit *** markiert.

2.2.6.4.4 Korrelation

Durch eine Korrelationsanalyse kann ein linearer Zusammenhang bzw. eine Abhängigkeit von zwei oder auch mehreren Merkmalen, im konkreten Fall von der Masse, aufgezeigt werden. Eine kausale Beziehung muss aber nicht zwingend zugrunde liegen. Liegt eine zufällige Korrelation vor, wird dies als stochastische Beziehung bezeichnet. Um eine Korrelationsanalyse durchführen zu können, müssen zumindest intervallskalierte Merkmale vorliegen.

Der Korrelationskoeffizient ist das dimensionslose Maß für die Ausprägung des Zusammenhanges. Benannt ist der Korrelationskoeffizient nach seinem Erfinder

Pearson. Pearson r liegt zwischen +1 und -1. Während +1 eine positive Korrelation ausdrückt, beschreibt -1 eine negative Korrelation. Bei dem Wert 0 ist nicht von einem linearen Zusammenhang auszugehen [136].

2.2.6.4.5 Lineare Regression

Mit Hilfe der linearen Regression kann ein Modell erstellt werden, in dem der Zusammenhang von abhängigen und unabhängigen Variablen dargestellt wird [137]. Bildlich eignet sich hierfür das Ziehen einer Geraden durch eine Punktwolke. Durch das Bestimmtheitsmaß R^2 wird in Prozent angegeben wie linear der Zusammenhang ist. $R^2 = 0$ entspricht 0 %, $R^2 = 1$ entspricht 100 % [138].

2.3 Vorversuche

Die genauen Protokolle der Vorversuche befinden sich im Anhang 10.2..

2.3.1 Paraffinschnitte

Aufgrund der einfacheren Verarbeitungsmöglichkeiten und dadurch oft besseren Färbeergebnisse wurde am Anfang mit Paraffinschnitten experimentiert. Die Mm. supraspinati der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe), welche vier Wochen nach Defektsetzung geopfert wurden, wurden ebenfalls so aufgearbeitet. Nach Entkalkung, Einbettung in Paraffin sowie Schneiden der Blöckchen wurden Färbungen angefertigt, die von besserer Qualität als der Gefrierschnitt waren. Das große Problem bei dieser Technik ist jedoch die Tatsache, dass das Fett während des Einbettens herausgelöst wird und anschließend histologisch nicht mehr nachweisbar ist. Da das Fett bzw. dessen Nachweis jedoch als maßgeblich für diese Arbeit betrachtet wird, wurde anschließend mit der Methode der Gefrierschnitte weitergearbeitet. Dementsprechend beschränkt sich die Auswertung für die Gruppe 0 auf die Werte der Masse.

2.3.2 Färbungen

2.3.2.1 Picosiriusred

Diese Färbung dient dem Anfärben der Sehne. Ziel der Färbung in dieser Studie war zu überprüfen, ob sich MSC im Modell in Sehnengewebe differenzieren. Da die Transfektion in sehr kleinem Umfang erfolgreich war, konnten die Zellen nach der Transplantation nicht verfolgt und eine Aussage hierzu nicht getroffen werden.

2.3.2.2 Anti-Desmin und Anti-Actin

Beide Färbungen dienen ebenso wie Anti-Lamin-Färbungen dem Muskelnachweis. Im direkten Vergleich aller drei Färbungen zeigte die Anti-Lamin-Färbung jedoch eine stärkere Anfärbung und dadurch ein klareres Ergebnis, weshalb die Färbung mit Anti-Desmin und Anti-Actin nicht weiterverfolgt wurde.

2.3.2.3 Fett-Färbungen

Die Sudan-III-Färbung dient, ebenso wie die Oil-Red-Färbung, dem Fettnachweis. Während des Färbeprozesses ist es unter Verwendung dieser Färbungen zum Herauslösen des Fettes aus den Zellen und zu einer Verteilung über den Schnitt gekommen. So konnte der Fettanteil nicht quantifiziert werden, weshalb die Nilrot-Färbung diesen Alternativen vorgezogen wurde.

2.3.2.4 Gefrierschnitte

Die Dicke von 7 μm der Gefrierschnitte zeigte sich als überlegen, da dickere Schnitte mehrere Zellen übereinander zeigten, wodurch die Auswertung nicht eindeutig nachvollziehbar war.

Die optimale Schneidetemperatur von Muskulatur (ca. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) weicht von der optimalen Schneidetemperatur von Fett (-22 bis $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) [139] ab. Für die Auswertung beider Anteile musste ein Kompromiss gefunden werden, der die strukturellen Bestandteile beider Gewebe berücksichtigt. Bei zu kalten Temperaturen neigt der Muskel dazu, spröde zu werden und zu reißen, wohingegen das Fett im Warmen schmilzt und sich beim Schneiden auf den ganzen Schnitt verteilt.

2.3.2.5 Querschnitte

Die Muskelquerschnitte haben eine deutlich geringere Fläche als der Muskellängsschnitt, was letzteren quantitativ aussagekräftiger macht. Der Längsschnitt liefert auch die besseren Bilder, da die Muskelzellen der Länge nachwachsen und so deutlich häufiger der Zellkern angeschnitten wurde. In dieser Studie wurde für die Auswertung daher der Längsschnitt herangezogen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Körpermasse der Ratten

Die Gesamtkörpermasse der Ratten wurde bei jedem operativen Eingriff bestimmt. Alle Gruppen wurden zu Beginn der Versuchsreihe, zum Zeitpunkt 0 ($t = 0$), gewogen. Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) wurde zusätzlich nach vier Wochen ($t = 4$), Gruppe 1 (Defektgruppe) nach acht Wochen ($t = 8$) gewogen. Die Gruppen 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) wurden sowohl nach vier als auch nach acht Wochen gewogen. Während dem Versuchszeitraum zeigte sich eine signifikante Zunahme $p < 0,0001$ (***) der Gesamtkörpermasse der Ratten in der Versuchswoche vier (16. Lebenswoche) im Vergleich zum Versuchsstartpunkt (12. Lebenswoche), zwischen der Versuchswoche acht (20. Lebenswoche) und der Versuchswoche vier bzw. zum Versuchsstartpunkt (Abbildung 15).

Zunahme der Körpermasse

Kruskal-Wallis Test
(Dunn's Multiple Comparison Test)
p-Wert: $p < 0,0001$

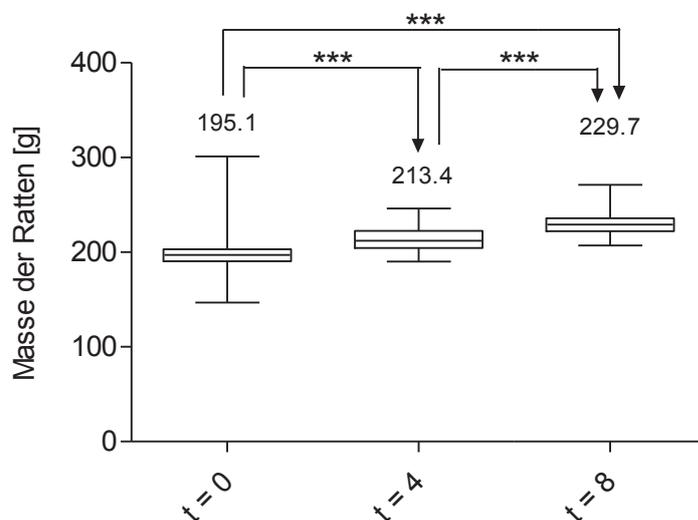


Abbildung 15 Das Diagramm zeigt, dass die Versuchstiere während des gesamten Versuchszeitraums im Wachstum waren. Die Körpermasse wurde im Abstand von vier Wochen bestimmt und war jeweils im Vergleich zur Voruntersuchung signifikant $p < 0,0001$ (***) gestiegen (Pfeil).

3.2 Muskelmassen SSP

3.2.1 Behandelte, rechte SSP

Es konnte eine Signifikanz $p < 0,05$ (*) zwischen den rechten Mm. supraspinati der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) und der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) und Gruppe 5 (Naht und MSC) gezeigt werden (Abbildung 16). Diese Signifikanz war weder bei Gruppe 2 (Naht und NaCl) noch bei Gruppe 3 (Naht) zu beobachten. Auch Gruppe 1 (Defektgruppe) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe 0 (Ausgangsgruppe). Dieser Effekt ist unabhängig vom natürlichen Wachstum des Tieres zu betrachten, wie in Kapitel 3.3.1 Körpermasse zur behandelten, rechten SSP-Masse gezeigt wird. Allerdings ist der Effekt zu klein, als dass eine Signifikanz zwischen den Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl) und 3 (Naht) und den Gruppen 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) vermerkt werden kann.

Massenvergleich der rechten, behandelten Mm. supraspinati

Kruskal-Wallis Test
(Dunn's Multiple Comparison Test)
p-Wert: $p < 0,05$

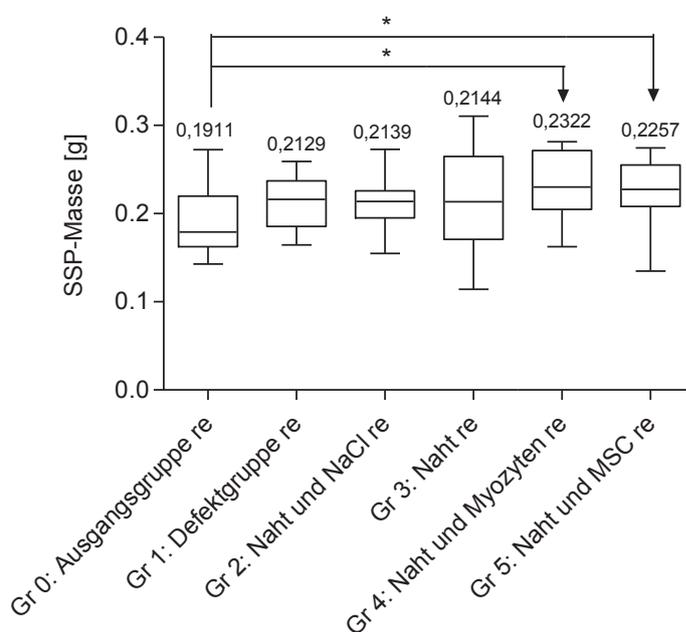


Abbildung 16 Diagramm des Massenvergleiches der behandelten, rechten Mm. supraspinati der verschiedenen Gruppen. Mit Pfeilen hervorgehoben ist die Signifikanz zwischen der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) zu den Gruppen 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC). Es zeigt sich, dass diese Gruppen signifikant $p < 0,05$ (*) eine höhere Masse haben.

3.2.2 Unbehandelter, linker SSP

Eine Massenzunahme zeigt sich bei Betrachtung der unbehandelten, linken Mm. supraspinati. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der Masse des linken SSP der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe), der einem 16 Wochen alten Tier entnommen wurde, zu der Masse des linken SSP der Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC), die alle im Alter von 20 Wochen geopfert wurden. Die Signifikanz von Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) zu Gruppe 1 (Defektgruppe) war dabei weniger stark ausgeprägt $p < 0,05$ (*), als die Signifikanz von Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) zu den Gruppen 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) $p < 0,0001$ (***) (Abbildung 17). Bei der Auswertung muss dieser Massenunterschied nur in Statistiken, welche die Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) erfassen, berücksichtigt werden, da die Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC), zeitgleich geopfert wurden.

Massenvergleich der unbehandelten, linken Mm. supraspinati

Kruskal-Wallis Test

(Dunn's Multiple Comparison Test)

p-Wert: $p < 0,05$

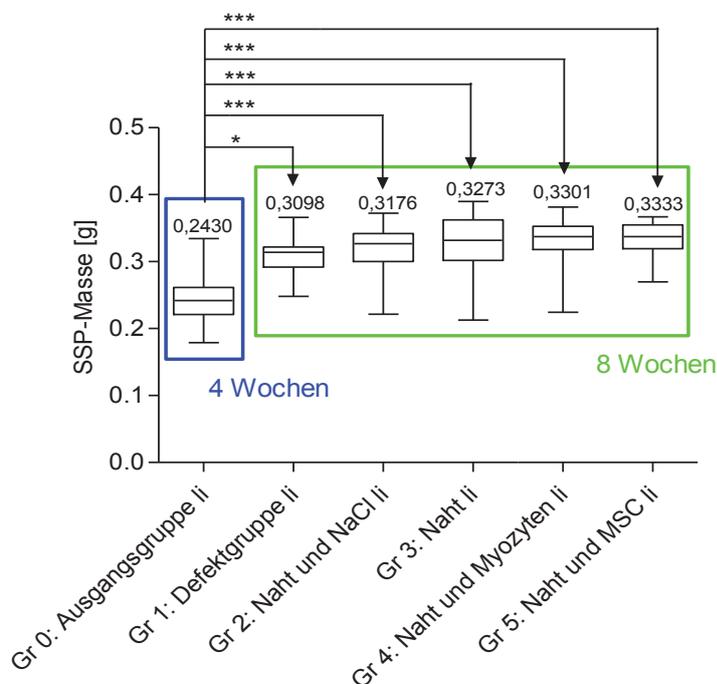


Abbildung 17 Diagramm des Massenvergleiches der unbehandelten, linken Mm. supraspinati: Dieses Diagramm zeigt, dass das Muskelwachstum bei den Versuchstieren bis zum Ende der Studie stattfand. Bei dem Vergleich der Gruppen 0 (Ausgangsgruppe) und 1 (Defektgruppe) war das Signifikanzniveau weniger stark ausgeprägt $p < 0,05$ (*), als bei den anderen Gruppen $p < 0,0001$ (***) .

3.2.1 Vergleich behandelter und unbehandelter SSP

Es konnte bei jeder Gruppe ein signifikanter Unterschied $p < 0,0001$ (***) zwischen dem behandelten, rechten und dem unbehandelten, linken SSP verzeichnet werden (Abbildung 18). Hierbei lag in allen Gruppen die Masse des unbehandelten SSP über der des behandelten SSP.

Massenvergleich der behandelten, rechten mit den unbehandelten, linken *Mm. supraspinati*

Mann-Whitney Test
p-Wert: $p < 0,0001$

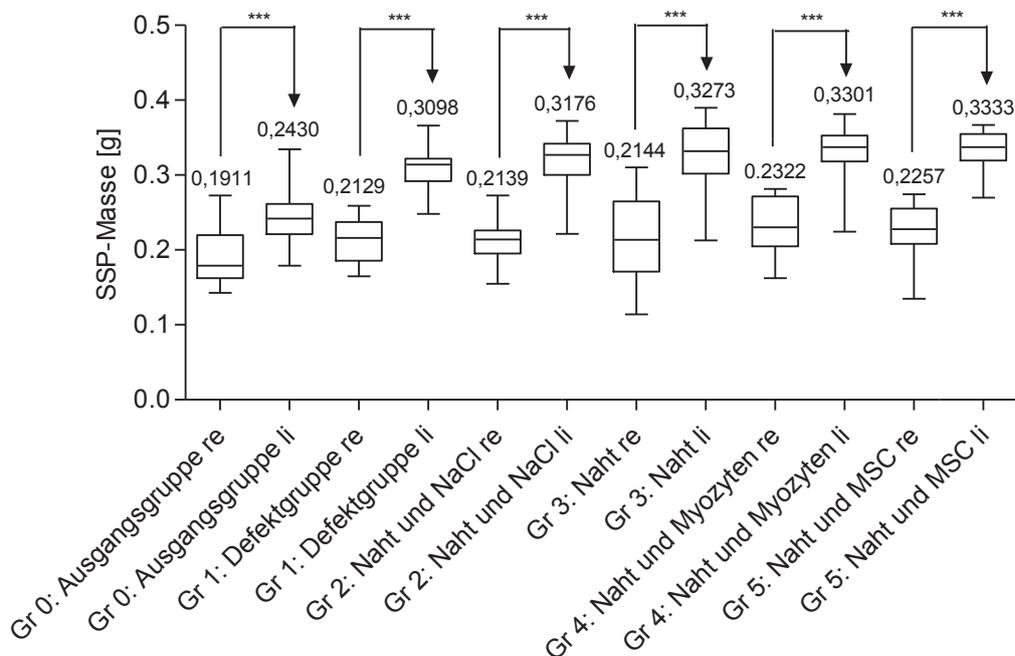


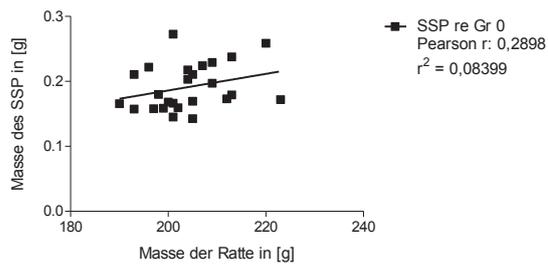
Abbildung 18 Diagramm des Massenvergleiches zwischen den behandelten, rechten und den unbehandelten, linken *Mm. supraspinati*. Bei allen Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied $p < 0,0001$ (***) zwischen der rechten und linken Seite, wie mit einem Pfeil markiert.

3.3 Korrelationsanalyse

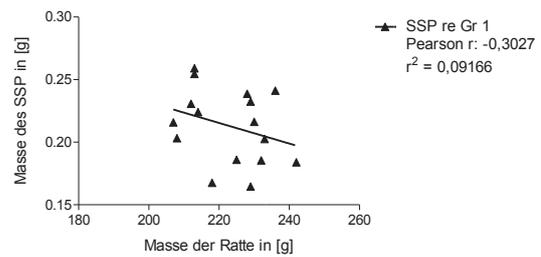
3.3.1 Körpermasse zur behandelten, rechten SSP-Masse

Es gibt in keiner der Gruppen eine Korrelation, weder positiv noch negativ, bezüglich der Körpermasse der Ratte zu den behandelten, rechten *Mm. supraspinati*, unabhängig davon, ob nach der Defektoperation eine Refixation und Therapie stattgefunden hat, oder nicht (Abbildung 19).

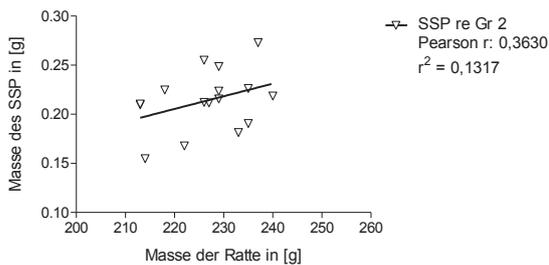
Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse Gruppe 0 rechts



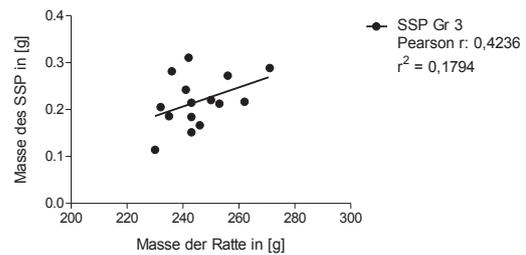
Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse Gruppe 1 rechts



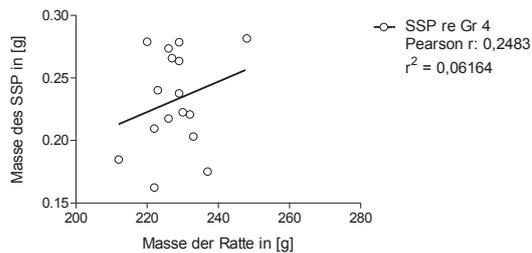
Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse Gruppe 2 rechts



Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse Gruppe 3 rechts



Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse Gruppe 4 rechts



Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse Gruppe 5 rechts

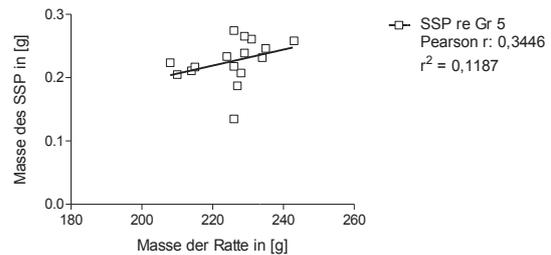


Abbildung 19 Diagramm der Korrelation der Masse des Tieres zu der Masse der rechten Mm. supraspinati. In keiner der Gruppen zeigt sich eine Korrelation von der Masse des Tieres zur Muskelmasse.

3.3.2 Körpermasse zur unbehandelten, linken SSP-Masse

Es zeigt sich bei den unbehandelten, linken Mm. supraspinati eine positive Korrelation der Masse der Mm. supraspinati zur Masse der Ratte. Bei größerer Masse des Tieres ist auch die Masse des SSP größer (Abbildung 20).

Korrelation Körpermasse zur SSP-Masse links

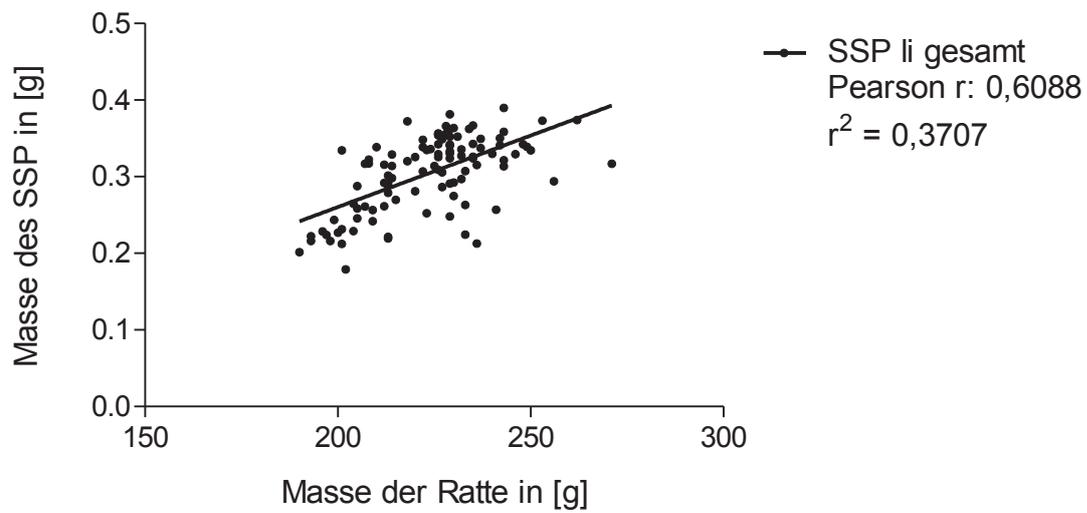


Abbildung 20 Diagramm, das die Korrelation der Masse des Tieres zu der Masse der unbehandelten, linken Mm. supraspinati zeigt. Bei steigender Masse des Tieres vergrößert sich auch die Masse des SSP.

3.4 Histologie

3.4.1 Makroskopische Auswertung

Makroskopisch präsentierte sich der behandelte, rechte SSP im direkten Vergleich mit dem unbehandelten, linken SSP deutlich atrophiert im Sinne einer weniger stark ausgeprägten Muskulatur. Des Weiteren zeigte sich distal des nach proximal verlagerten Sehnenstumpfes die Ausbildung eines bindegewebigen, narbigen Stranges, ausgehend von den Fossa suprapinata nahen Muskelanteilen bis zum Humeruskopf bzw. Tuberculum majus, im Sinne einer „Neo-Sehne“ (Abbildung 21).

Diese „Neo-Sehne“ konnte in allen Schultern der Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) nachgewiesen werden. Bei Gruppe 1 (Defektgruppe) zum Zeitpunkt der Muskelgewinnung, bei den Gruppen 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) zum Zeitpunkt der Refixationsoperation.

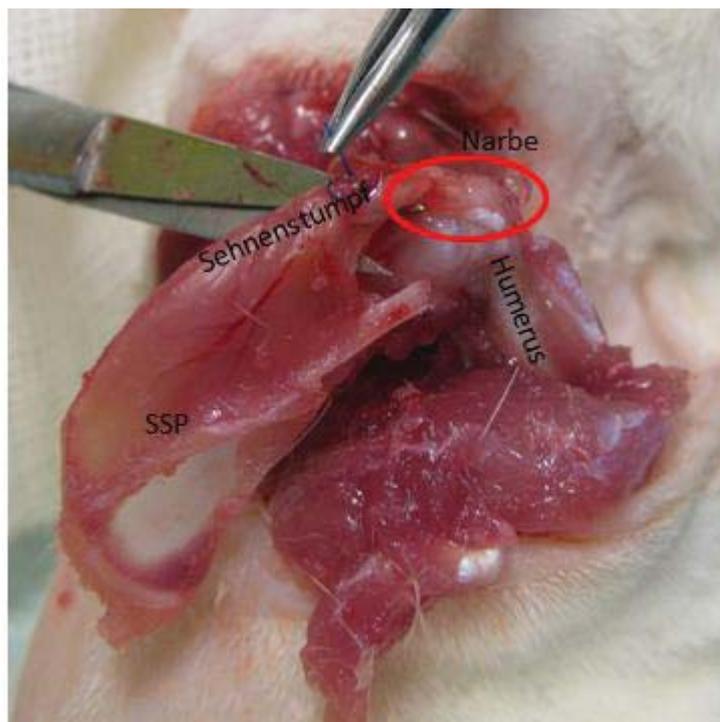


Abbildung 21 „Neo-Sehne“ bei Entnahme (Gruppe 1) rot umrundet. Mit dem Klemmchen markiert ist der Proleneffaden, mit dem bei Defektsetzung die Sehne zurückgebunden wurde.

Das Narbengewebe in den Gruppen 2 (Naht mit NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC), welches vier Wochen nach Refixation um den chirurgisch wiederhergestellten Sehnenansatz entstanden war, war deutlicher ausgeprägt als das der Gruppe 1 (Defektgruppe) bzw. das Narbengewebe welches zum Zeitpunkt der Refixation sichtbar war. Insgesamt war in den Gruppen 2 (Naht mit

NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) makroskopisch ein gutes Ergebnis der Refixation erkennbar.

3.4.2 Mikroskopische Auswertung

Für die mikroskopische Auswertung standen hierfür die Gruppe 1 (Defektgruppe), Gruppe 2 (Naht mit NaCl), Gruppe 3 (Naht), Gruppe 4 (Naht und Myozyten) und Gruppe 5 (Naht und MSC) zur Verfügung. Die Fallzahl n pro Gruppe betrug 14 Tiere.

3.4.1 Behandelte, rechte SSP

Eine Signifikanz $p < 0,0038$ (**) konnte zwischen den behandelten, rechten Mm. supraspinati der Gruppe 3 (Naht) und 4 (Naht mit Myozyten) beobachtet werden. Die Gruppe 4 (Naht mit Myozyten) ist dabei weniger verfettet, als die Gruppe 3 (Naht). (Abbildung 22). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die behandelten, rechten Mm. supraspinati waren nicht zu erkennen.

Muskelfettanteil der behandelten, rechten Mm. supraspinati Gruppen 3 und 4

Kruskal-Wallis Test
(Dunn's Multiple Comparison Test)
p-Wert: $p < 0,0038$

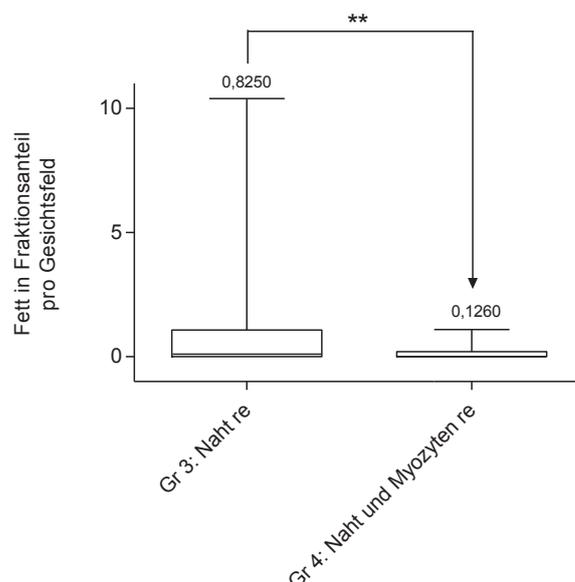


Abbildung 22 Diagramm, welches zeigt, dass bei den behandelten, rechten Mm. supraspinati nur im Vergleich der Gruppen 3 (Naht) mit der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) eine Signifikanz besteht. Die Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) sind dabei signifikant (**) weniger verfettet, als die der Gruppe 3 (Naht).

3.4.2 Unbehandelter, linker SSP

Auch bei den unbehandelten, linken Mm. supraspinati der Gruppe 3 (Naht) und 4 (Naht und Myozyten) konnte eine Signifikanz $p < 0,0246$ (*) beobachtet werden. Die Gruppe 4 (Naht mit Myozyten) ist dabei weniger verfettet, als die Gruppe 3 (Naht). Dieser Unterschied ist weniger stark ausgeprägt als kontralateral (Abbildung 23). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die unbehandelten, linken Mm. supraspinati waren nicht zu erkennen.

Muskelfettanteil der unbehandelten, linken Mm. supraspinati Gruppen 3 und 4

Kruskal-Wallis Test
(Dunn's Multiple Comparison Test)
p-Wert: $p < 0,05$

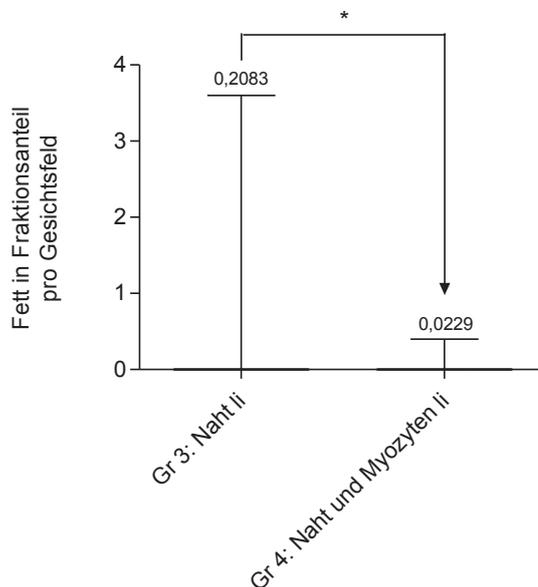


Abbildung 23 Diagramm, welches zeigt, dass bei den unbehandelten, linken Mm. supraspinati nur im Vergleich der Gruppen 3 (Naht) mit der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) eine Signifikanz besteht. Die Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) sind dabei signifikant (*) weniger verfettet, als die der Gruppe 3 (Naht).

3.4.1 Vergleich behandelte und unbehandelte SSP

Hier wurde als Vergleichsgruppe die Summe aller unbehandelten, linken Mm. supraspinati genommen (Kontrollgruppe). Bei allen behandelten, rechten Mm. supraspinati ist im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Verfettungsrate zu beobachten (Abbildung 24). Die Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe zu den Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), und 5 (Naht und MSC) war mit $p < 0,0001$ (***) ausgeprägter als die Signifikanz beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe 4 (Naht und Myozyten). Hier war $p < 0,05$ (*) (Abbildung 25).

Muskelfettanteil der unbehandelten, linken und behandelten, rechten Mm. supraspinati

Kruskal-Wallis Test
(Dunn's Multiple Comparison Test)
p-Wert: $p < 0,0001$

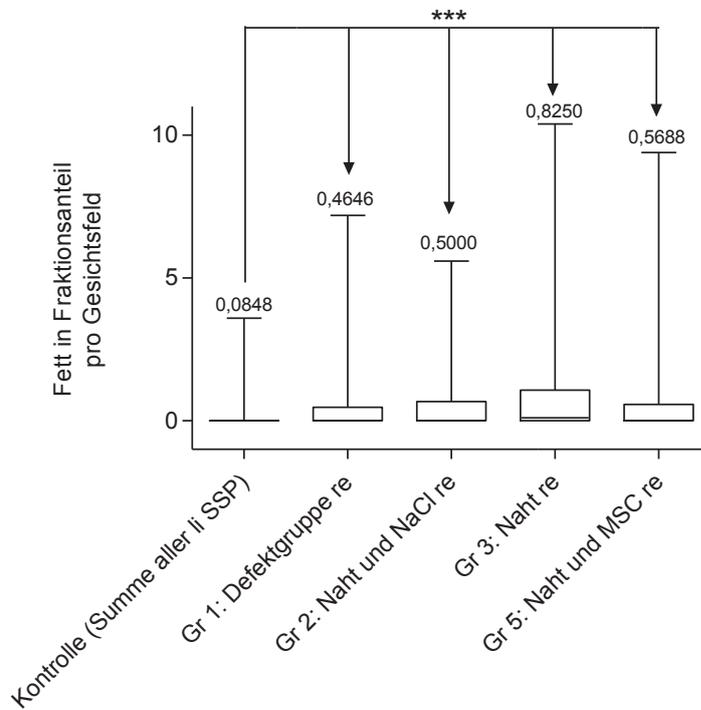


Abbildung 24 Diagramm der Auswertung der Histologie der unbehandelten, linken Mm. supraspinati im Vergleich zu den behandelten, rechten Mm. supraspinati. Die unbehandelten, linken Mm. supraspinati alle Gruppen sind signifikant mehr verfettet. In diesem Diagramm sind die Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), und 5 (Naht und MSC) abgebildet.

Muskelfettanteil der unbehandelten, linken und behandelten, rechten Mm. supraspinati Gruppe 4

Kruskal-Wallis Test
(Dunn's Multiple Comparison Test)
p-Wert: $p < 0,05$

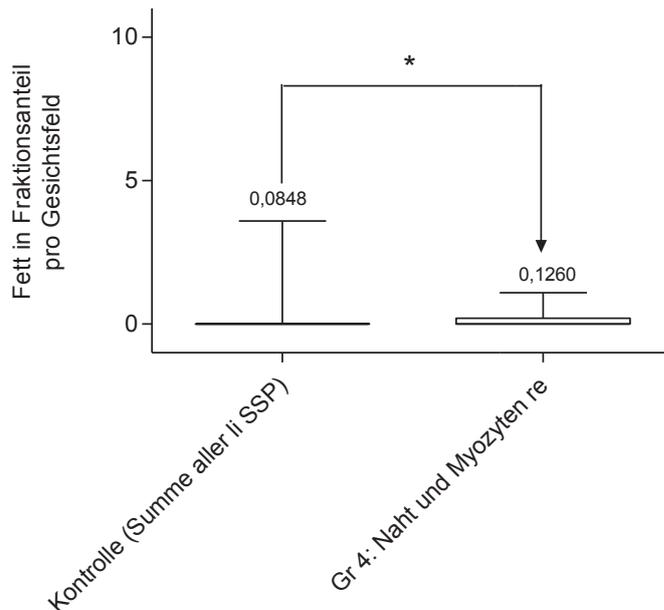


Abbildung 25 Dieses Diagramm zeigt, dass auch zu der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) eine signifikante Mehrverfettung im Vergleich zu der Kontrolle stattgefunden hat. Die Signifikanz $p < 0,05$ (*) war hierbei jedoch weniger stark ausgeprägt.

Innerhalb jeder Gruppe ist zwischen dem linken und rechten SSP ein signifikanter Unterschied $p < 0,0001$ (***) zu beobachten (Abbildung 26). Die Übersicht der Nilrot-Färbungen der Muskelpräparate in der achten Woche bestätigt histologisch die deutliche Verfettung der behandelten, rechten Mm. supraspinati im Vergleich zu der unbehandelten, linken Muskulatur in den entsprechenden Gruppen (Abbildung 27).

Die Mm. supraspinati der behandelten, rechten Seite zeigen deutlich mehr Fettanteil pro Gesichtsfeld, als die der unbehandelten, linken Seite. Die Ergebnisse der Auswertung der Masse stimmen mit den hier gewonnenen Ergebnissen überein.

Muskelfettanteils der behandelten, rechten und unbehandelten, linken Mm. supraspinati

Mann-Whitney Test
p-Wert: $p < 0,0001$

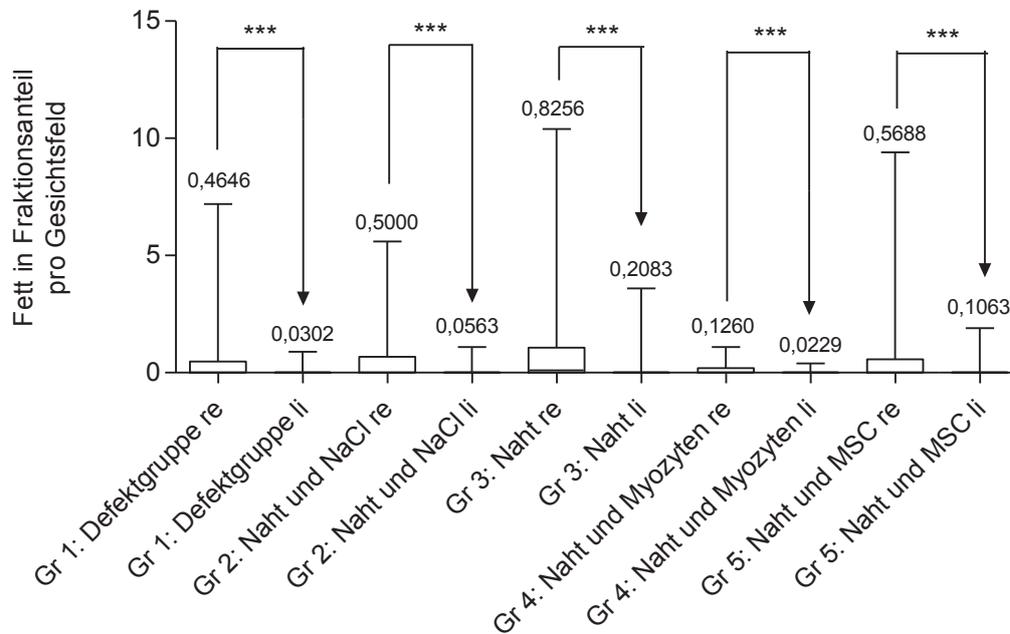


Abbildung 26 Diagramm von histologischem Vergleich der behandelten, rechten und unbehandelten, linken Mm. supraspinati innerhalb der Gruppen. In jeder Gruppe zeigte sich eine signifikante (***) Mehrverfettung der behandelten, rechten Mm. supraspinati im Vergleich zu den unbehandelten, linken Mm. supraspinati.

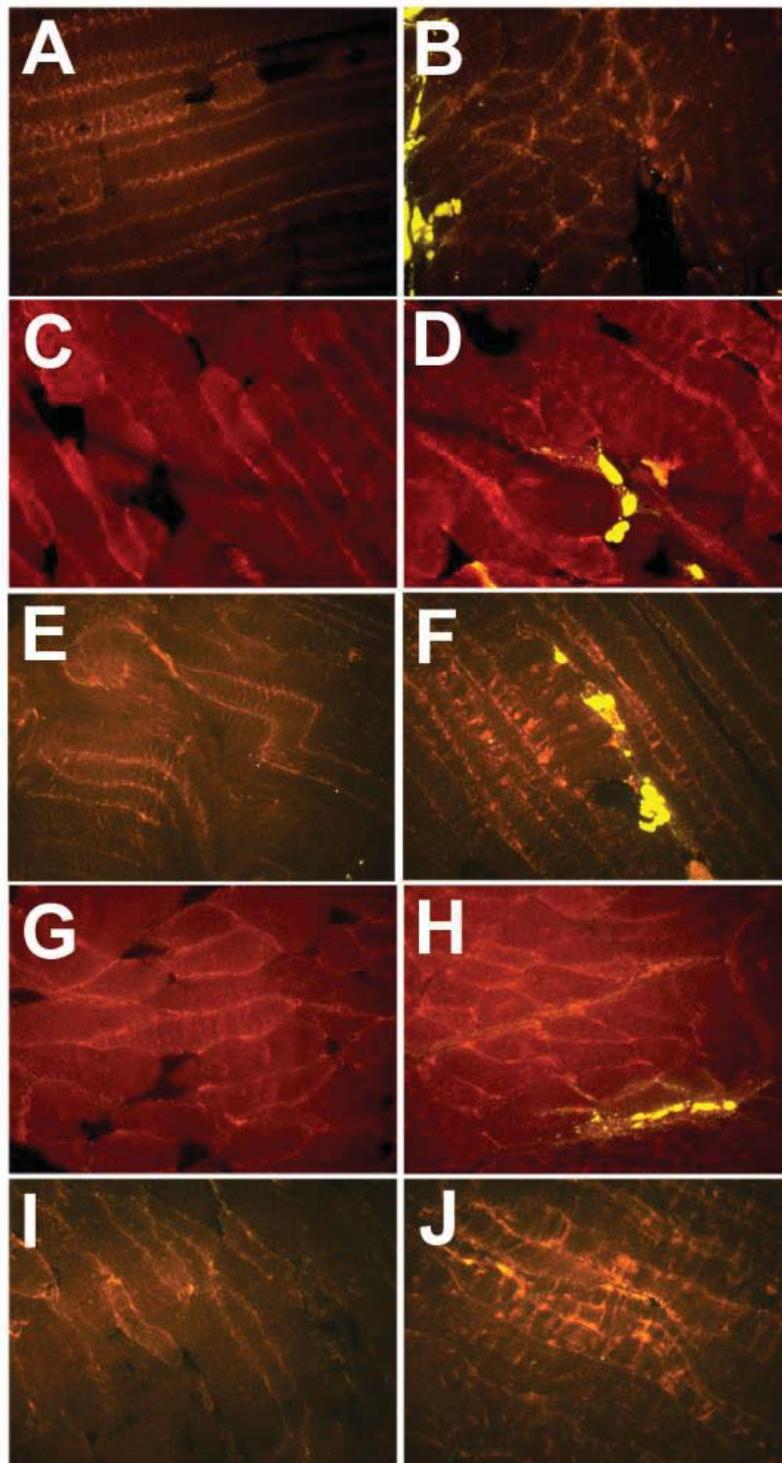


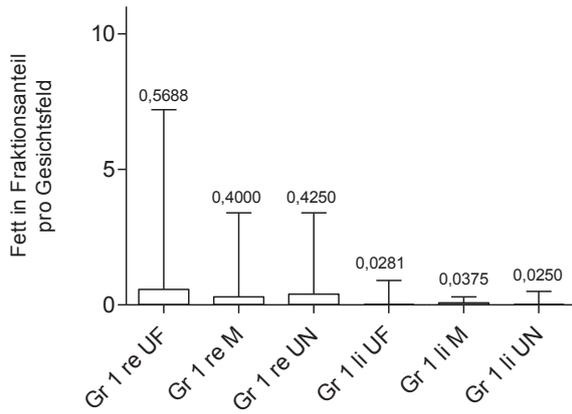
Abbildung 27 Die Nilrot-Färbung der SSP-Präparate zeigen eine deutliche Verfärbung der behandelten, rechten Seite im Vergleich zu der unbehandelten, linken Seite in der 200-fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem fluorescein isothiocyanate (FITC) Filter. A und B: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 1 (Defektgruppe). C und D: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 2 (Naht und NaCl). E und F: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 3 (Naht). G und H: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten). I und J: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 5 (Naht und MSC).

3.5 Intramuskuläre Fettverteilung

Bei Gruppe 2 (Naht und NaCl) und Gruppe 3 (Naht) konnte bei den behandelten, rechten Mm. supraspinati eine stärkere Verfettung ursprungsfern gegenüber ursprungsnah beobachtet werden (Abbildung 28). In Gruppe 2 (Naht und NaCl) betrug $p < 0,0343$, in Gruppe 3 (Naht) betrug $p < 0,0387$. Gruppe 1 (Defektgruppe), Gruppe 4 (Naht mit Myozyten), Gruppe 5 (Naht mit MSC) und alle linken Mm. supraspinati (Kontrollgruppe) zeigen jedoch eine gleichmäßige Verfettung über den ganzen Muskel hinweg (Abbildung 28). Eine signifikant stärkere Verfettung ursprungsnah konnte in keiner der Gruppen nachgewiesen werden.

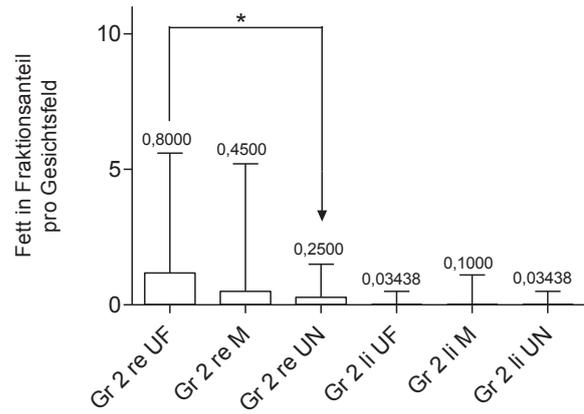
Fettverteilung Gruppe 1

Ungepaarter t-Test
p-Wert: $p < 0,05$



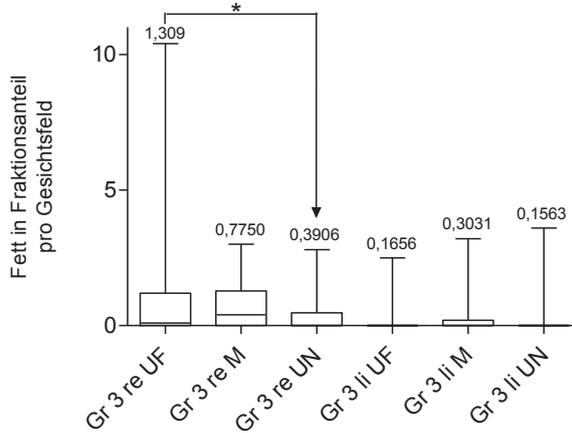
Fettverteilung Gruppe 2

Ungepaarter t-Test
p-Wert: $p < 0,0343$



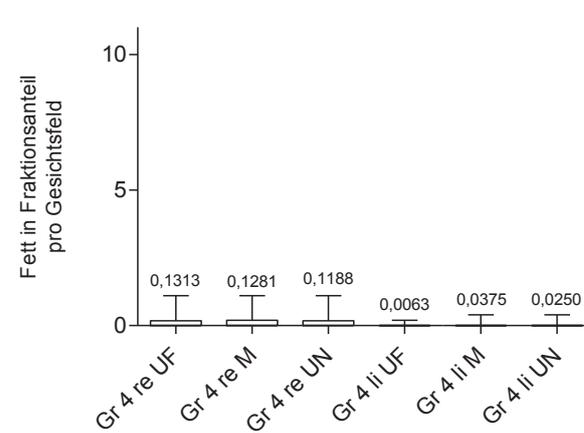
Fettverteilung Gruppe 3

Ungepaarter t-Test
p-Wert: $p < 0,0387$



Fettverteilung Gruppe 4

Ungepaarter t-Test
p-Wert: $p < 0,05$



Fettverteilung Gruppe 5

Ungepaarter t-Test
p-Wert: $p < 0,05$

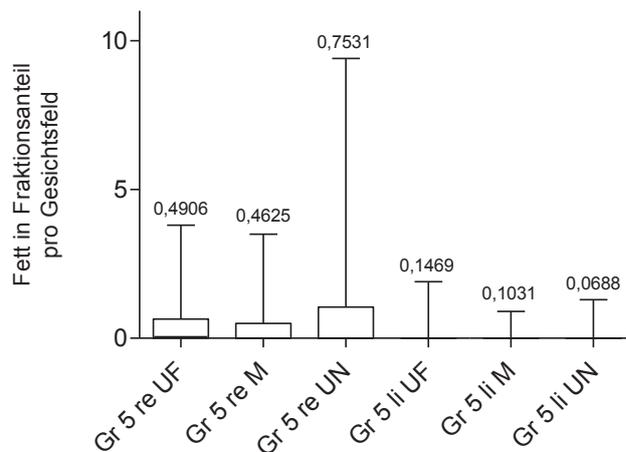


Abbildung 28 Diagramme über das Verteilungsmuster der Verfettung von ursprungsnah (UN) über mittig (M) zu ursprungfern (UF). Gruppe 2 (Naht mit NaCl) und 3 (Naht) zeigen hier eine Mehrverfettung der behandelten, rechten Mm. supraspinati ursprungfern. In den anderen Gruppen und in allen unbehandelten, linken Mm. supraspinati wurde eine gleichmäßige Verteilung der Verfettung beobachtet.

4 DISKUSSION

Die Hypothese, dass die Transplantation von allogenen mesenchymalen Stammzellen und kultivierten Myozyten eine Verbesserung der Muskelmasse der Supraspinatusmuskulatur und eine Reduktion der Muskelverfettung hervorrufen würde, wurde in der Studie nur teilweise bestätigt.

Es wurde nachgewiesen, dass vier Wochen nach Defektsetzung die behandelten, rechten Mm. supraspinati eine signifikant geringere Masse als die unbehandelten, linken Mm. supraspinati besitzen. Dies wurde durch eine Muskelatrophie und Muskelverfettung bedingt. Mit dem Rattenmodell ist es möglich, eine Muskeldegeneration des SSP mit der Durchtrennung und dem spannungsfreien Reinserieren der Sehne am M. trapezius herbeizuführen. Der gewählte Versuchsaufbau bedingt eine ausreichend große Schädigung des Muskels, welcher die muskeleigenen Regenerationsmechanismen übertrifft.

Die Refixierung der Supraspinatussehne und Behandlung der Muskulatur mit mesenchymalen Stammzellen und kultivierten Myozyten zeigte eine Verbesserung der Muskelmasse im Vergleich zu der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) in der vierten Woche; im direkten Vergleich zu der Gruppe 1 (Defektgruppe), der Gruppe 2 (Refixation und NaCl) oder der Gruppe 3 (Naht) sehen wir aber keine signifikante Supraspinatusmuskel-Massenzunahme. Eine Regeneration der Muskelverfettung des SSP bis hin zum Ausgangswert, hier dargestellt durch die unbehandelte, linke Seite (Kontrollgruppe), war in diesem Versuch nicht zu beobachten. Dies widerspricht der Beobachtung von Barton et al., in welcher acht Wochen nach Defektsetzung und Spontanheilung die Muskelmasse mit den Kontrollgruppen fast vergleichbar war.

Im Rahmen der histologischen Auswertung konnte bei allen Gruppen an den behandelten, rechten Mm. supraspinati deutlich eine Verfettung erkannt werden. Als Kontrolle wurden hier die unbehandelten, linken Mm. supraspinati herangezogen. Im Vergleich dazu konnte bei allen Gruppen, unabhängig ob eine Refixationsoperation durchgeführt wurde oder nicht, eine Mehrverfettung beobachtet werden. Bemerkenswert ist hierbei eine signifikante Mehrverfettung der Gruppe 3 (Naht) gegenüber der Gruppe 4 (Naht und Myozyten). Dieser Befund zeigt sich jedoch auch bei den unbehandelten, linken Mm. supraspinati der Gruppe 3 (Naht) gegenüber den unbehandelten, linken Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten). Dadurch wird das Ergebnis relativiert und es muss überlegt werden, ob es trotz Inzuchttieren in gleichem Alter grundsätzlich Unterschiede der individuellen Muskelverfettung gibt.

Eine andere mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass sich die in Gruppe 4 transplantierten Myozyten nicht nur am Ort der Transplantation ansiedeln, sondern im Körper wandern und sich auch im kontralateralen SSP ansiedeln.

4.1 Methode

4.1.1 Versuchsaufbau

Für dieses Experiment war es wichtig, ein Versuchsmodell zu finden, bei dem der Sehndefekt nachweislich die Selbstheilungstendenzen der Sehne übersteigt. Dies ist essentiell um den Unterschied zwischen einer Spontanheilung und einer Heilung durch Therapie unterscheiden zu können. Außerdem sollte das Trauma in gleicher Weise beliebig oft reproduzierbar sein.

In anderen Studien zur Muskelregeneration wurden Traumata durch Toxininjektionen [140], Kälte [98, 141, 142] oder stumpfe Quetschungen [105, 128] herbeigeführt. Die Defektzone kann bei solchen Ansätzen nicht exakt bestimmt werden und das Verletzungsausmaß ist gering. Dem gegenüber steht ein hoher Verletzungsgrad bei einer offenen Herangehensweise, wie z.B. Garrett et al. am Kaninchenmodell demonstrierten [143]. Hier wurde ein Muskelbauch komplett oder teilweise zerschnitten.

Ebenfalls am Kaninchenmodell wiesen Gupta und Lee Atrophie und Verfettung der RM nach Verletzungen nach [144]. Liu zeigte am Rattenmodell, dass mit Durchtrennung einer Sehne und der Entnahme von 5 mm dieser Sehne eine signifikante Verfettung im entsprechenden Muskel nachweisbar ist [130]. Durch zusätzliches Durchtrennen des innervierenden Nervs wiesen sie eine noch größere Massenabnahme nach. Bei dieser Studie wurde auf das Durchtrennen des Nervs sowie die Entnahme eines Sehnenanteils verzichtet. Stattdessen wurde die Sehne abgesetzt und fern vom Ansatz sowie ohne Spannung unter dem M. trapezius zurückgenäht. Diese Weiterentwicklung des Vorgehens erschwert eine Selbstheilung, ermöglicht aber die Refixation der Sehne zu einem späteren Zeitpunkt und damit die Erforschung der Therapiemöglichkeiten. Da die Operation offen durchgeführt wurde, waren Lokalisation und Ausmaß der Defektsetzung gut zu überprüfen und aufgrund eines Operationsteams gut zu standardisieren. In Bezug auf diese Punkte beinhaltet das hier verwendete Modell die beschriebenen Vorteile.

Wie hier gezeigt wurde, reichen die muskeleigenen Regenerationsmechanismen nach einer Ruptur nicht aus, um den Muskel ad intergrum zu regenerieren. Für die Klinik ist es aber wichtig, Therapieoptionen zu entwickeln, welche dies ermöglichen.

Zu diskutieren ist, ob es sinnvoll war, Ratten zu operieren, die zu Beginn der Studie jung und noch nicht vollständig ausgewachsen waren. Melis vertritt in seiner Studie von 2009 die Ansicht, dass das höhere Alter der Patienten mehr Verfettung bewirkt [145]. Farshad et al. konnten jedoch keinen altersabhängigen Unterschied der muskulären Fettinfiltration bei Ratten nach Sehnendurchtrennung feststellen [146]. Es bleibt ungeklärt, ob eine Abweichung bei der Regenerationsfähigkeit nach Wiederannähen der Sehne auftritt.

Die Auswertung der Histologie und der Masse zeigten, dass es in dieser Studie gelungen ist die Muskelverfettung der RM nach RMR nachzustellen. Des Weiteren konnten vier Wochen nach Refixation bzw. Therapie Regenerationstendenzen beobachtet werden. Daher ist die Wahl des Versuchszeitraumes, die sich an verschiedenen anderen Studien orientiert, gelungen.

Das Rattenmodell wurde bewusst gewählt, da eine große Fallzahl möglich ist und die Tier- sowie Haltungskosten vergleichsweise gering sind. Obwohl die Anatomie und Funktion der Rotatorenmanschette der Ratte, wie auch bei anderen Kleintieren, von der menschlichen Anatomie abweicht [144] und sie bessere Regenerationsmechanismen als der Mensch besitzt, ist es gelungen die Muskelverfettung nachzustellen. Das Ausmaß der Muskelverfettung wird als entscheidendes Kriterium für den Therapieerfolg bei einer RMR angesehen [92].

Die Narbenplatte die nach der Defektsetzung entstand und in dieser Studie auch als „Neo-Sehne“ bezeichnet wird, wurde bereits in anderen Studien beschrieben [95, 125, 147, 148].

4.1.2 Transfektion

In dieser Studie konnten weniger als ein Prozent der Stammzellen bzw. der Myozyten mit GFP transfiziert werden. Die Transfektion mit GFP war somit nicht erfolgreich und ein Tracking der transplantierten Zellen war nicht möglich. Es wäre aufschlussreich gewesen, die mit GFP markierten Zellen auf ihrer Wanderung durch das Empfängergewebe bzw. bei ihrer weiteren Vermehrung im Empfängergewebe während des Heilungsprozesses zu beobachten. Eine Alternative für die Transfektion der Stammzellen mit GFP ist die Züchtung von Sprague-Dawley Ratten mit

chimärischem GFP Knochenmark. Diese Ratten zeigen ein GFP Signal auch nach der Zelldifferenzierung in den endgültigen Phänotyp und ermöglichen so ein longitudinale in vivo Verfolgung der Zellen, wie Kida et al. [149] zeigten. Eine andere Möglichkeit der longitudinalen in vivo Zellverfolgung ist die Verwendung von Luciferase wie Eliasberg et al. [150] erfolgreich demonstrierten.

Eine weitere Alternative für den Nachweis der Spenderzellen im Versuchstier stellt die Verwendung von männlichen Spenderzellen in weiblichen Versuchstieren dar [151, 152]. Anhand des Y-Chromosoms kann das Spendermaterial im weiblichen Empfänger verfolgt und Überlebenslänge bzw. Ort der Ansiedelung beobachtet werden.

Als mögliche Fehlerquelle in Bezug auf die fehlgeschlagene Transfektion kommen folgende Punkte in Betracht: Zum einen könnte es an einer zu geringen Konzentration des Selektionsmediums G418 gelegen haben. In diesem Versuch wurde keine Überlebenskurve ermittelt. Durch die Ermittlung der Überlebenskurve hätte auf die G418 Konzentration mit dem optimalen Selektionsdruck rückgeschlossen werden können. Zum anderen war für die schlechte Transfektionsausbeute der hier verwendete heterogene Zellpool mitverantwortlich. Um homogene Zellen zu erhalten, wären jedoch Einzellkolonien notwendig gewesen. Dies wiederum hätte die Notwendigkeit mehrerer Passagen bedeutet. Da jedoch Primärzellen verwendet wurden, hätten sich in der dafür benötigten Monolayerzellkultur auch die Zelleigenschaften verändert und die Zellen wären unbrauchbar geworden. Zudem erschwert es die Arbeit mit GFP, dass das Licht und die für die Kontrollen notwendige PFA-Fixierung zu einer Veränderung des Signals führen und die Zellen im Laufe der Zeit die Expression des GFP-Gens wiedereinstellen. Zukünftig sollten daher auch andere Transfektionsmethoden bzw. andere Plasmide auf eine höhere Effizienz überprüft werden.

4.2 Diskussion der Auswertung

4.2.1 Bestimmung der Muskelmasse

Im rein quantitativen Teil der Auswertung wird die Feuchtmasse der SSP bestimmt [130]. Jung et al. [153] zeigen, dass die Atrophie eines Muskels durch die Abnahme der Muskelmasse festgestellt werden kann. Da die Atrophie des Muskels eine wichtige Pathologie der RMR ist, wurde diese Herangehensweise gewählt. Dem gegenüber

steht die Messung der Kontraktilität nach Muskeltraumata bei anderen Studien. Ein Vorteil dieser Methode ist sicher, dass ein Vergleich zu Patienten hergestellt werden kann. Jost et al. zeigen, dass eine Verbesserung von Kraft und Funktion auch ohne den entsprechenden Bildnachweis möglich ist [24].

4.2.2 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung lehnt sich an die Arbeit von Liu et al. an [130]. Liu arbeitet ebenfalls mit einem Rattenmodell und setzt einen Sehndefekt in die SSP- und ISP-Sehne bzw. führt zusätzlich eine Denervierung durch. Die Muskeln werden, im Gegensatz zu dieser Studie, zwei bzw. sechs Wochen nach Defektsetzung entnommen. Im Anschluss wird sowohl die Feuchtmasse ermittelt als auch eine histologische Auswertung durchgeführt. Hierzu werden Gefrierschnitte angefertigt und jeweils eine Übersichts-, eine Muskel-, eine Fett- und eine Collagenfärbung durchgeführt. Diese Art der Untersuchung unterscheidet sich von der rein biomechanischen Untersuchung, in der nur die Kraftkomponente gemessen wird. Der Schwerpunkt wird hier auf die histologisch sichtbaren Veränderungen gelegt. So konnte die Verfettung dargestellt und das Auftreten eines Umbaus zu Gewebe mit weniger Masse bestätigt werden. Begründet wurde dieses Vorgehen durch den Massenverlust der Muskulatur.

Dieses Herangehen ist prädestiniert, da beim Menschen ebenfalls die Verfettung bei RMR bewiesen ist und zu den Hauptprognosefaktoren zählt [45, 154, 155].

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Matziolis et al. und Winkler et al. haben gezeigt, dass es durch MSC möglich ist, die Kontraktionskraft und damit die Muskelregeneration nach Verletzung zu erhöhen [108, 128]. Des Weiteren wiesen sie nach, dass eine Abhängigkeit zwischen Muskelregeneration und Konzentration der MSC besteht. Auch diese Studie zeigt, dass mit einer Transplantation von 5×10^6 MSC eine Verbesserung gegenüber der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) erzielt werden kann. Im Gegensatz zu Matziolis Arbeit wurde in dieser Studie jedoch die Masse zur Auswertung herangezogen und nicht die Kontraktionskraft, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Darüber hinaus sind unsere Ergebnisse mit denen von Matsumoto und Rubino vergleichbar. Beide Forschungsgruppen verwendeten keine Stammzellen zur

Therapie, sondern behandelten nur mit Refixation der Sehne, wie in Gruppe 3 (Naht) dieser Studie. Die Studien wiesen nach, dass es nach operativer Defektsanierung keine Verbesserung im Sinne einer Tendenz hin zur Ausgangssituation gibt [42, 156]. Ein Verfettungsmuster, bei dem die Verfettung zum Ursprung hin abnimmt, wie es Rubino et al. beobachtet haben, [51] konnte bei dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Hier war die Verteilung eher zufällig.

Bartons Studie zur Regenerationsfähigkeit der Rattenmuskulatur kam zu einem vergleichbaren Ergebnis bezüglich der Muskelmasse nach Defektsetzung. Auch bei unserer Studie befindet sich die Masse der Mm. supraspinati vier Wochen nach Defektoperation auf einem Minimum, allerdings ist die Regeneration der Muskulatur acht Wochen nach Defektoperation nicht so stark ausgeprägt [95].

4.4 Limitationen der Studie

Die Manipulation des SSP erfolgte ohne eine Rechts-/Links-Randomisierung, was jedoch anhand der Beobachtungen keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte, da laut Literatur Rechts- und Linkshändigkeit bei Ratten gleichmäßig verteilt ist [157]. Unklar ist, ob es durch das Trauma zu einer deutlichen Mehrbelastung und damit Massenzunahme der linken nicht traumatisierten Schulter kommt und dadurch dieser Kontrollwert verfälscht wird. Wenngleich in der engmaschigen Nachkontrolle der Tiere keine Schonhaltung beobachtet wurde, ist diese nicht auszuschließen.

Da eine etablierte Methode zur Gewinnung der MSC verwendet wurde und sowohl die Oberflächenmarker als auch die Adhäsionsfähigkeit auf Plastik geprüft wurden, ist davon auszugehen, dass es sich um MSC handelte.

Die Muskelzellen wurden vor der Kultivierung nicht selektiert, sondern es wurde das Heranwachsen der Zellen lichtmikroskopisch überprüft.

Die Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) wurde in Paraffinschnitten und nicht wie die übrigen Gruppen in Gefrierschnitten aufgearbeitet. Bei der Verarbeitung zu Paraffinschnitten zeigte sich, dass das Fett aus dem Muskel herausgelöst wurde und so nicht länger nachzuweisen, bzw. zu quantifizieren war. Da die Quantifizierung als Schwerpunkt in dieser Studie galt, wurden die weiteren Proben zu Gefrierschnitten verarbeitet. Somit konnte die Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) histologisch nicht mit den anderen Gruppen verglichen werden.

In den Gefrierschnitten konnte ein histologischer Nachweis von Satellitenzellen trotz intensiver Recherche und eigener Erprobung von neuen immunhistologischen

Methoden nicht erbracht werden. In Paraffinschnitten hingegen ist der Nachweis von Satellitenzellen bereits erfolgt, daher scheint für diese Fragestellung die Arbeit mit Paraffinschnitten geeigneter.

4.5 Ausblick

Noch immer sind die genauen Prozesse, die im Muskel nach einer Verletzung ablaufen, bzw. die Regenerationsprozesse, die sich an eine Verletzung anschließen, nicht ausreichend gut verstanden. Speziell bei der Aufklärung der Vorgänge auf zellulärer Ebene besteht noch großer Forschungsbedarf. Anfänge in diesem Gebiet sind geschaffen, vor allem im Bereich der Muskelverletzung [30, 158, 159]. Die Degeneration bzw. Wiederherstellung der Muskulatur sind nur im Ansatz erforscht [43, 160]. Detailliertere Verständnisse der Pathologien sind notwendig, um geeignete Ansatzpunkte für die Therapie zu finden.

Im Speziellen ist es interessant zu wissen, aus welchem Gewebe die entstandene Narbenplatte, eine Art „Neo-Sehne“ besteht. Dieses Gewebe war unterschiedlich stark ausgeprägt und bei allen Versuchstieren makroskopisch sichtbar.

Auch diese Studie hat gezeigt, dass durch den Einsatz von MSC eine Verbesserung gegenüber der rein chirurgischen Therapie erzielt werden kann. Die Herstellung des Ausgangsniveaus, also der Leistung eines gesunden Muskels, ist nach aktuellem Forschungsstand nicht nachweisbar.

Als weiterführende Studie wäre die Transplantation von MSC gemeinsam mit entsprechenden Wachstumsfaktoren anzudenken. Pak et al. beispielsweise erreichten in ihrer Herzstudie an Schweinen bessere Ergebnisse, indem sie zu den MSC noch frisches Knochenmark applizierten [117, 118]. Alternativ können die Zellen vor der Transplantation mit entsprechenden Stoffen/Medien behandelt werden. Antonitis et al., ebenfalls eine Arbeitsgruppe, die sich mit Herzstudien befasst, behandelten ihre MSC vor Transplantation mit 5-Azacytidine und erhielten dadurch bessere Ergebnisse als in der Kontrollgruppe, welcher diese Behandlung nicht zuteilwurde [118]. Cao et al. bewiesen in vitro, dass es möglich ist, Cardiomyozyten ähnliche Zellen aus MSC durch die Heranzucht im richtigen Medium herzustellen [161]. Ob sich diese Ansätze auf die Skelettmuskelschäden übersetzen lassen, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass die Regeneration von atrophierter bzw. verfetteter Skelettmuskulatur nur in sehr begrenztem Maße möglich ist. Daher ist die Forschung an neuen Methoden, die es ermöglichen diese Muskelverfettung rückgängig zu machen, für die Klinik von großem Interesse.

Die Zielsetzung dieser Studie war zum einen die Generierung eines Modells, welches verlässlich den Zustand eines degenerativ verfetteten SSP reproduzierbar macht. Zum anderen sollte eine chirurgische Refixation möglich sein, um die alleinige chirurgische Behandlung bzw. die zusätzlich erfolgten Therapieansätze mittels MSC und Myozyten zu untersuchen. Die Generierung des Modells ist gelungen. Des Weiteren gelang es, Stammzellen und Myozyten in vitro heranzuzüchten. Die Quantifizierung der Muskelmasse bzw. die histologische Auswertung ergab Folgendes:

Bei der Auswertung der Masse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 3 (Naht), die nur chirurgisch behandelt wurde, und den Gruppen 2 (Naht und NaCl), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC), die neben der chirurgischen Sanierung eine zusätzliche Therapie erhalten haben. Ebenfalls wurde kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe 1 (Defektgruppe) nachgewiesen, welche acht Wochen nach Defektsetzung und ohne Refixation geopfert wurde. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Gruppen 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) im Vergleich zur Gruppe 0 (Ausgangsgruppe). Diese Gruppe wurde vier Wochen nach Defektoperation untersucht. Dies spricht dafür, dass die zusätzliche Zelltherapie besser angeschlagen hat, als die bloße Refixation (Gruppe 3) und die Therapie mit NaCl 0,9% (Gruppe 2). Histologisch konnte dieses Ergebnis nicht verifiziert werden, da die histologische Auswertung der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) nicht zur Verfügung stand. In der histologischen Auswertung zeigte sich die Gruppe 4 (Naht mit Myozyten) signifikant weniger verfettet, als Gruppe 3 (Naht).

Eine Annäherung eines einmal verfetteten und degenerierten Muskels an die Masse bzw. an den histologischen Zustand eines gesunden Muskels konnte mit diesem Therapieansatz nicht erreicht werden.

Das entwickelte und verwendete Modell zur Analyse des degenerativ verfetteten SSP der Ratte kann für zukünftige Studien als Grundlage genutzt werden, um weitere Therapieoptionen zu testen bzw. diesen Versuchsaufbau zu optimieren und zu erweitern. Um an die Erfolge, die in anderen Studien mit Hilfe der MSC erbracht

Zusammenfassung

wurden anzuknüpfen, ist z.B. eine zusätzliche Injektion mit Wachstumsfaktoren zu der Zelltransplantation denkbar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schünke, S., Schumacher, Voll, Wesker, *Prometheus, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 2005: p. 542.
2. Aumüller, G., G. Aust, and A. Doll, *Duale Reihe Anatomie*. 2010: Georg Thieme Verlag.
3. Paulsen, W., *Sobotta, Atlas d. Anatomie d. Menschen*. 2000.
4. Gschwend, N., et al., *Die Therapie der Rotatorenmanschettenruptur an der Schulter*. Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, mit besonderer Berücksichtigung der Frakturenlehre und der orthopädisch-chirurgischen Technik, 1975. **83**(2): p. 129-143.
5. Rothman, R.H. and W.W. Parke, *The Vascular Anatomy of the Rotator Cuff**,+(Nicolas Andry Award for 1964). Clinical orthopaedics and related research, 1965. **41**: p. 176-188.
6. Lohr, J. and H. Uhthoff, *The microvascular pattern of the supraspinatus tendon*. Clinical orthopaedics and related research, 1990. **254**: p. 35-38.
7. Moseley, H.F. and I. Goldie, *The arterial pattern of the rotator cuff of the shoulder*. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 1963. **45**(4): p. 780-789.
8. Rössler, R., *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2007: p. 436.
9. Smith, J.G., *Pathological appearances of seven cases of injury of the shoulder joint with remarks*. London Med Gaz, 1834. **14**: p. 280.
10. Haury, J., et al., *Inzidenz der SLAP-, Labrum-und Rotatorenmanschetten-Läsion bei Leichenschultern—MR-tomographisch und arthroskopisch kontrolliert*, in *Schulterinstabilität—Rotatorenmanschette*. 1999, Springer. p. 145-152.
11. Holanda, M., et al., *Schulter und Schultergürtel*. Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung, 2011: p. 439.
12. Mazoué, C.G. and J.R. Andrews, *Repair of full-thickness rotator cuff tears in professional baseball players*. The American journal of sports medicine, 2006. **34**(2): p. 182-189.
13. Tibone, J.E., et al., *Surgical treatment of tears of the rotator cuff in athletes*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1986. **68**(6): p. 887-891.
14. Rickert, D., et al., *A study of right shoulder injury in collegiate and professional orchestral cellists: an investigation using questionnaires and physical assessment*. Med. Probl. Perform. Art, 2012. **27**: p. 65.
15. Zeichen, J., U. Bosch, and C. Krettek, *Rotatorenmanschette*. Trauma und Berufskrankheit, 2003. **5**(1): p. s120-s125.
16. Braune, C., H. Gramlich, and P. Habermeyer, *Der makroskopische Aspekt der Rotatorenmanschettenruptur bei traumatischen und atraumatischen Rupturformen*. Der Unfallchirurg, 2000. **103**(6): p. 462-467.
17. Bateman, J., *The diagnosis and treatment of ruptures of the rotator cuff*. The Surgical clinics of North America, 1963. **43**: p. 1523-1530.
18. Burkhart, S.S., J.C. Esch, and R.S. Jolson, *The rotator crescent and rotator cable: an anatomic description of the shoulder's "suspension bridge"*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 1993. **9**(6): p. 611-616.
19. Lo, I.K. and S.S. Burkhart, *Spotlight on surgical techniques. Current concepts in arthroscopic rotator cuff repair*. The American journal of sports medicine, 2003. **31**(2): p. 308-324.

20. Burkhart, S.S., *A stepwise approach to arthroscopic rotator cuff repair based on biomechanical principles*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2000. **16**(1): p. 82-90.
21. Cofield, R.H., et al., *Surgical Repair of Chronic Rotator Cuff Tears A Prospective Long-Term Study*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2001. **83**(1): p. 71-71.
22. Hersche, O. and C. Gerber, *Passive tension in the supraspinatus musculotendinous unit after long-standing rupture of its tendon: a preliminary report*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 1998. **7**(4): p. 393-396.
23. Gore, D., et al., *Shoulder-muscle strength and range of motion following surgical repair of full-thickness rotator-cuff tears*. J Bone Joint Surg Am, 1986. **68**(2): p. 266-272.
24. Jost, B., C.W. Pfirrmann, and C. Gerber, *Clinical Outcome After Structural Failure of Rotator Cuff Repairs**. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2000. **82**(3): p. 304-14.
25. Jost, B., et al., *Long-term outcome after structural failure of rotator cuff repairs*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2006. **88**(3): p. 472-479.
26. Gerber, C., B. Fuchs, and J. Hodler, *The Results of Repair of Massive Tears of the Rotator Cuff*†*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2000. **82**(4): p. 505-505.
27. Fuchs, B., et al., *Clinical and structural results of open repair of an isolated one-tendon tear of the rotator cuff*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2006. **88**(2): p. 309-316.
28. Müller-Wohlfahrt, U., Hänsel, *Muskelerletzung im Sport*. 2014. p. 488.
29. Best, T. and K. Hunter, *Muscle injury and repair*. Physical medicine and rehabilitation clinics of North America, 2000. **11**(2): p. 251-266.
30. Howatson, G. and K.A. Van Someren, *The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage*. Sports Medicine, 2008. **38**(6): p. 483-503.
31. Järvinen, T.A., et al., *Muscle injuries biology and treatment*. The American journal of sports medicine, 2005. **33**(5): p. 745-764.
32. Järvinen, T.A., et al., *Muscle injuries: optimising recovery*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2007. **21**(2): p. 317-331.
33. Gharaibeh, B., et al., *Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2012. **96**(1): p. 82-94.
34. Shen, P., et al., *Long-term functional outcomes after repair of rotator cuff tears correlated with atrophy of the supraspinatus muscles on magnetic resonance images*. The Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 2008 Jan-Feb. **17**((1 Suppl)): p. 1-7.
35. Steinbacher, P., et al., *Effects of rotator cuff ruptures on the cellular and intracellular composition of the human supraspinatus muscle*. Tissue and Cell, 2010. **42**(1): p. 37-41.
36. Edwards, T.B., et al., *The influence of rotator cuff disease on the results of shoulder arthroplasty for primary osteoarthritis*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2002. **84**(12): p. 2240-2248.
37. Fuchs, B., et al., *Fatty degeneration of the muscles of the rotator cuff: assessment by computed tomography versus magnetic resonance imaging*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 1999. **8**(6): p. 599-605.
38. Goutallier, D., et al., *Fatty muscle degeneration in cuff ruptures: pre-and postoperative evaluation by CT scan*. Clinical orthopaedics and related research, 1994. **304**: p. 78-83.

39. Tillander, B., L. Franzén, and R. Norlin, *Fibronectin, MMP-1 and histologic changes in rotator cuff disease*. Journal of orthopaedic research, 2002. **20**(6): p. 1358-1364.
40. Musacchia, X., J.M. STEFFEN, and R.D. FELL, *Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models*. Exercise and sport sciences reviews, 1988. **16**(1): p. 61-88.
41. Ohira, Y., et al., *Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension*. Journal of Applied Physiology, 1992. **73**(2): p. S51-S57.
42. Rubino, L.J., et al., *Fatty infiltration does not progress after rotator cuff repair in a rabbit model*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2008. **24**(8): p. 936-940.
43. Gerber, C., 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 & Joint Surgery, 2004. **86**(9): p. 1973-1982.
44. Gladstone, J.N., et al., *Fatty infiltration and atrophy of the rotator cuff do not improve after rotator cuff repair and correlate with poor functional outcome*. The American Journal of Sports Medicine, 2007. **35**(5): p. 719-728.
45. Goutallier, D., et al., *Influence of cuff muscle fatty degeneration on anatomic and functional outcomes after simple suture of full-thickness tears*. Journal of shoulder and elbow surgery, 2003. **12**(6): p. 550-554.
46. Goutallier, D., et al., *Tension-free cuff repairs with excision of macroscopic tendon lesions and muscular advancement: results in a prospective series with limited fatty muscular degeneration*. Journal of shoulder and elbow surgery, 2006. **15**(2): p. 164-172.
47. Mellado, J., et al., *MR assessment of the repaired rotator cuff: prevalence, size, location, and clinical relevance of tendon rerupture*. European radiology, 2006. **16**(10): p. 2186-2196.
48. Mellado, J., et al., *Surgically repaired massive rotator cuff tears: MRI of tendon integrity, muscle fatty degeneration, and muscle atrophy correlated with intraoperative and clinical findings*. American Journal of Roentgenology, 2005. **184**(5): p. 1456-1463.
49. Yoo, J.C., et al., *Correlation of arthroscopic repairability of large to massive rotator cuff tears with preoperative magnetic resonance imaging scans*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2009. **25**(6): p. 573-582.
50. Thomazeau, H., et al., *Prediction of rotator cuff repair results by magnetic resonance imaging*. Clinical orthopaedics and related research, 1997. **344**: p. 275-283.
51. Rubino, L.J., et al., *Fatty infiltration of the torn rotator cuff worsens over time in a rabbit model*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2007. **23**(7): p. 717-722.
52. Bellumore, Y., M. Mansat, and J. Assoun, *[Results of the surgical repair of the rotator cuff. Radio-clinical correlation]*. Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur, 1993. **80**(7): p. 582-594.
53. Daenen, B., et al., *Ultrasound of the shoulder*. JBR BTR, 2007. **90**(5): p. 325.
54. Stanwood, W. and G. Marra, *Massive rotator cuff tears*. Current Opinion in Orthopaedics, 2001. **12**(4): p. 319-324.
55. Habermeyer, P. and J.D. Agneskirchner, *Schulterchirurgie*. 2002: Urban & Fischer.
56. Heers, H. and G. Heers, *Konservative Therapie bei Rotatorenmanschettendefekten*. Der Orthopäde, 2007. **36**(9): p. 817-824.

57. Kuechle, D.K., et al., *Shoulder muscle moment arms during horizontal flexion and elevation*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 1997. **6**(5): p. 429-439.
58. Bokor, D.J., et al., *Results of nonoperative management of full-thickness tears of the rotator cuff*. Clin Orthop Relat Res, 1993(294): p. 103-10.
59. Fukuda, H., *The management of partial-thickness tears of the rotator cuff*. JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-BRITISH VOLUME-, 2003. **85**(1): p. 3-11.
60. Bartolozzi, A., D. Andreychik, and S. Ahmad, *Determinants of outcome in the treatment of rotator cuff disease*. Clin Orthop Relat Res, 1994(308): p. 90-7.
61. Itoi, E. and S. Tabata, *Conservative treatment of rotator cuff tears*. Clin Orthop Relat Res, 1992(275): p. 165-73.
62. Levy, H.J., J.W. Uribe, and L.G. Delaney, *Arthroscopic assisted rotator cuff repair: preliminary results*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 1990. **6**(1): p. 55-60.
63. Moser, M., et al., *Functional outcome of surgically treated massive rotator cuff tears: a comparison of complete repair, partial repair, and debridement*. Orthopedics, 2007. **30**(6): p. 479-482.
64. Melillo, A.S., F. Savoie III, and L.D. Field, *Massive rotator cuff tears: debridement versus repair*. Orthopedic Clinics of North America, 1997. **28**(1): p. 117-124.
65. Arntz, C., S. Jackins, and F.r. Matsen, *Prosthetic replacement of the shoulder for the treatment of defects in the rotator cuff and the surface of the glenohumeral joint*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1993. **75**(4): p. 485-491.
66. Pollock, R.G., et al., *Prosthetic replacement in rotator cuff—deficient shoulders*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 1992. **1**(4): p. 173-186.
67. Rockwood, C., G. Williams, and W. Burkhead, *Debridement of degenerative, irreparable lesions of the rotator cuff*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1995. **77**(6): p. 857-866.
68. Kasten, P. and M. Loew, *Differenzialtherapie massiver Rotatorenmanschettenläsionen*. Der Orthopäde, 2007. **36**(9): p. 855-861.
69. Ide, J., S. Maeda, and K. Takagi, *A comparison of arthroscopic and open rotator cuff repair*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2005. **21**(9): p. 1090-1098.
70. Kim, S.-H., et al., *Arthroscopic versus mini-open salvage repair of the rotator cuff tear: outcome analysis at 2 to 6 years' follow-up*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2003. **19**(7): p. 746-754.
71. Iannotti, J.P., *Full-thickness rotator cuff tears: factors affecting surgical outcome*. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994. **2**(2): p. 87-95.
72. Galatz, L.M., et al., *Prospective longitudinal analysis of postoperative shoulder function a ten-year follow-up study of full-thickness rotator cuff tears*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2001. **83**(7): p. 1052-1056.
73. Gartsman, G.M., M. Khan, and S.M. Hammerman, *Arthroscopic Repair of Full-Thickness Tears of the Rotator Cuff**. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1998. **80**(6): p. 832-40.
74. Murray Jr, T.F., et al., *Arthroscopic repair of medium to large full-thickness rotator cuff tears: outcome at 2-to 6-year follow-up*. Journal of shoulder and elbow surgery, 2002. **11**(1): p. 19-24.
75. Galatz, L.M., et al., *The Outcome and Repair Integrity of Completely Arthroscopically Repaired Large and Massive Rotator Cuff Tears*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2004. **86**(2): p. 219-224.

76. Cole, B.J., et al., *Arthroscopic rotator cuff repair: prospective functional outcome and repair integrity at minimum 2-year follow-up*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 2007. **16**(5): p. 579-585.
77. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2006: Thieme.
78. Aumüller, A., Doll, Engele, Kirsch, Mense, Reißig, Salvetter, Schmidt, Schmitz, Schulte, Spanel-Borowski, Wolff, Wurzinger, Zilch, *Anatomie*. 2007. **Duale Reihe**: p. 1344.
79. *Stammzellen*, in *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tieren*. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 519-536.
80. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-340.
81. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. Journal of orthopaedic research, 1991. **9**(5): p. 641-650.
82. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
83. Barachini, S., et al., *Morpho-functional characterization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood for potential uses in regenerative medicine*. Stem cells and development, 2009. **18**(2): p. 293-306.
84. Cheng, P.-H., et al., *Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee*. BMC cell biology, 2008. **9**(1): p. 20.
85. Kermani, A.J., F. Fathi, and S.J. Mowla, *Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy*. Rejuvenation research, 2008. **11**(2): p. 379-386.
86. Mageed, A.S., 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**(8): p. 1019-1026.
87. Meirelles, L.d.S. and N.B. Nardi, *Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization*. British journal of haematology, 2003. **123**(4): p. 702-711.
88. Schäffler, A. and C. Büchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem cells, 2007. **25**(4): p. 818-827.
89. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
90. Pittenger, M., et al., *Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy*. JOURNAL OF MUSCULOSKELETAL AND NEURONAL INTERACTIONS, 2002. **2**(4): p. 309-320.
91. Soslowsky, L.J., et al., *Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 1996. **5**(5): p. 383-392.
92. Kim, H.M., et al., *The effect of tear size and nerve injury on rotator cuff muscle fatty degeneration in a rodent animal model*. J Shoulder Elbow Surg, 2012. **21**(7): p. 847-58.
93. Bedi, A., et al., *Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair*. The American journal of sports medicine, 2010. **38**(2): p. 308-317.

94. Bedi, A., et al., *The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, 2010. **19**(3): p. 384-391.
95. Barton, E.R., et al., *Rat supraspinatus muscle atrophy after tendon detachment*. Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(2): p. 259-265.
96. Bischoff, R. and C. Heintz, *Enhancement of skeletal muscle regeneration*. Developmental dynamics, 1994. **201**(1): p. 41-54.
97. Grounds, M.D., *Age-associated Changes in the Response of Skeletal Muscle Cells to Exercise and Regeneration*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **854**(1): p. 78-91.
98. Irintchev, A., et al., *Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts*. The Journal of physiology, 1997. **500**(Pt 3): p. 775-785.
99. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1961. **9**(2): p. 493-495.
100. Muir, A., A. Kanji, and D. Allbrook, *The structure of the satellite cells in skeletal muscle*. Journal of anatomy, 1965. **99**(Pt 3): p. 435.
101. Murray, M. and N. Robbins, *Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells*. Neuroscience, 1982. **7**(7): p. 1823-1833.
102. Murray, M. and N. Robbins, *Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse*. Neuroscience, 1982. **7**(7): p. 1817-1822.
103. Schmalbruch, H. and U. Hellhammer, *The number of satellite cells in normal human muscle*. The Anatomical Record, 1976. **185**(3): p. 279-287.
104. Schultz, E., *Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle*. American Journal of Anatomy, 1976. **147**(1): p. 49-69.
105. Schultz, E., D.L. Jaryszak, and C.R. Valliere, *Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury*. Muscle & nerve, 1985. **8**(3): p. 217-222.
106. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-1530.
107. Kang, J.R. and R. Gupta, *Mechanisms of fatty degeneration in massive rotator cuff tears*. Journal of shoulder and elbow surgery/American Shoulder and Elbow Surgeons...[et al.], 2012. **21**(2): p. 175-180.
108. Winkler, T., et al., *Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats*. Tissue Engineering Part A, 2008. **15**(3): p. 487-492.
109. Winkler, T., et al., *In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats*. Tissue Engineering Part A, 2008. **14**(7): p. 1149-1160.
110. Chacko, S.M., et al., *Myocardial oxygenation and functional recovery in infarct rat hearts transplanted with mesenchymal stem cells*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2009. **296**(5): p. H1263-H1273.
111. Shake, J.G., et al., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. The Annals of Thoracic Surgery, 2002. **73**(6): p. 1919-1926.
112. Wang, J.-S., et al., *Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2000. **120**(5): p. 999-1006.
113. Kocher, A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nature medicine, 2001. **7**(4): p. 430-436.

114. Tomita, S., et al., *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function*. Circulation, 1999. **100**(suppl 2): p. II-247-li-256.
115. Atsma, D.E., W.E. Fibbe, and T.J. Rabelink, *Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair*. Current opinion in lipidology, 2007. **18**(6): p. 645-649.
116. Christoforou, N. and J.D. Gearhart, *Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies*. Progress in cardiovascular diseases, 2007. **49**(6): p. 396-413.
117. Pak, H.N., et al., *Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction*. Journal of cardiovascular electrophysiology, 2003. **14**(8): p. 841-848.
118. Antonitsis, P., et al., *Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro*. The Thoracic and cardiovascular surgeon, 2008. **56**(2): p. 77-82.
119. Kruglyakov, P., et al., *In vitro and in vivo differentiation of mesenchymal stem cells in the cardiomyocyte direction*. Bulletin of experimental biology and medicine, 2006. **142**(4): p. 503-506.
120. Tomita, Y., et al., *Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved*. Medical & biological engineering & computing, 2007. **45**(2): p. 209-220.
121. Makino, S., et al., *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(5): p. 697.
122. Huard, J., Y. Li, and F.H. Fu, *Muscle injuries and repair: current trends in research*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2002. **84**(5): p. 822-832.
123. <https://www.criver.com/products-services/find-model/lewis-rat?region=23>. 2016.
124. Carpenter, J.E., S. Thomopoulos, and L.J. Soslowsky, *Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications*. Clinical orthopaedics and related research, 1999. **367**: p. S296-S311.
125. Gimbel, J.A., et al., *Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model*. Journal of biomechanics, 2004. **37**(5): p. 739-749.
126. Thomopoulos, S., et al., *The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study*. Journal of Orthopaedic Research, 2002. **20**(3): p. 454-463.
127. Lindl, T. and J. Bauer, *Zell-und Gewebekultur. Einfuehrung in die Grundlagen sowie ausgewaehlte Methoden und Anwendungen*. 1989.
128. Matziolis, G., et al., *Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats*. Tissue engineering, 2006. **12**(2): p. 361-367.
129. Tondreau, T., et al., *Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential*. Cytotherapy, 2004. **6**(4): p. 372-379.
130. Liu, X., et al., *A rat model of massive rotator cuff tears*. J Orthop Res, 2011. **29**(4): p. 588-95.
131. Haasters, F., et al., *Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing*. Journal of anatomy, 2009. **214**(5): p. 759-767.
132. Skittone, L.K., et al., *Matrix metalloproteinase-2 expression and promoter/enhancer activity in skeletal muscle atrophy*. Journal of Orthopaedic Research, 2008. **26**(3): p. 357-363.

133. Rasband, W. <http://www.computerbild.de/download/ImageJ-422527.html>. 2016.
134. Janczyk, M. and R. Pfister, *Inferenzstatistik verstehen*. 2013: Springer.
135. Stigler, S., *Fisher and the 5% level*. CHANCE, 2008. **Band 21, Nr. 4**.
136. Bortz, J., *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler* 2010: p. 655.
137. Fahrmeir, L., T. Kneib, and S. Lang, *Regression: modelle, methoden und anwendungen*. 2007: Springer-Verlag.
138. Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Wasserman, W., *Applied linear statistical models*. 1996: p. 1408.
139. Taugner, R., et al., *Serienmäßige Herstellung von Gefrierschnitt-Autoradiogrammen mit optimalem Kontakt*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1958. **234(4)**: p. 336-342.
140. Palermo, A.T., et al., *Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress*. Developmental biology, 2005. **279(2)**: p. 336-344.
141. Irintchev, A., M. Zweyer, and A. Wernig, *Cellular and molecular reactions in mouse muscles after myoblast implantation*. Journal of neurocytology, 1995. **24(4)**: p. 319-331.
142. Wernig, A., et al., *Formation of new muscle fibres and tumours after injection of cultured myogenic cells*. Journal of neurocytology, 1991. **20(12)**: p. 982-997.
143. Garrett, W.E., et al., *Recovery of skeletal muscle after laceration and repair*. The Journal of hand surgery, 1984. **9(5)**: p. 683-692.
144. Gupta, R. and T.Q. Lee, *Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology*. Journal of Shoulder and Elbow Surgery. **16(5)**: p. S149-S157.
145. Melis, B., C. Nemoz, and G. Walch, *Muscle fatty infiltration in rotator cuff tears: descriptive analysis of 1688 cases*. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2009. **95(5)**: p. 319-324.
146. Farshad, M., et al., *Effect of age on fatty infiltration of supraspinatus muscle after experimental tendon release in rats*. BMC Res Notes, 2011. **4**: p. 530.
147. Buchmann, S., et al., *Rotator cuff changes in a full thickness tear rat model: verification of the optimal time interval until reconstruction for comparison to the healing process of chronic lesions in humans*. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2011. **131(3)**: p. 429-435.
148. Gilotra, M.N., et al., *Healing of rotator cuff tendons using botulinum toxin A and immobilization in a rat model*. BMC musculoskeletal disorders, 2016. **17(1)**: p. 127.
149. Kida, Y., et al., *Bone marrow-derived cells from the footprint infiltrate into the repaired rotator cuff*. Journal of shoulder and elbow surgery, 2013. **22(2)**: p. 197-205.
150. Eliasberg, C.D., et al., *Perivascular stem cells diminish muscle atrophy following massive rotator cuff tears in a small animal model*. JBJS, 2017. **99(4)**: p. 331-341.
151. Fan, Y., et al., *Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy*. Muscle & nerve, 1996. **19(7)**: p. 853-860.
152. Petersen, B., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science, 1999. **284(5417)**: p. 1168-1170.
153. Jung, H.-S., et al., *Effect of dipsaci radix on hind limb muscle atrophy of sciatic nerve transected rats*. The American journal of Chinese medicine, 2009. **37(06)**: p. 1069-1084.
154. Goutallier, D., et al., *Fatty infiltration of disrupted rotator cuff muscles*. Rev Rhum Engl Ed, 1995. **62(6)**: p. 415-22.

155. Nakagaki, K., et al., *Fatty degeneration in the supraspinatus muscle after rotator cuff tear*. J Shoulder Elbow Surg, 1996. **5**(3): p. 194-200.
156. Matsumoto, F., et al., *Delayed tendon reattachment does not reverse atrophy and fat accumulation of the supraspinatus—an experimental study in rabbits*. Journal of orthopaedic research, 2002. **20**(2): p. 357-363.
157. Stoodley, J.F.S.u.C.J., *Neuroscience. An Introduction*. ISBN 1-86156-389-2, . Chichester 2006: p. S. 428 und 433.
158. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury*. Medicine and science in sports and exercise, 1995. **27**(7): p. 1022-1032.
159. Toumi, H. and T. Best, *The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury?* British journal of sports medicine, 2003. **37**(4): p. 284-286.
160. Jamali, A.A., et al., *Skeletal muscle response to tenotomy*. Muscle & nerve, 2000. **23**(6): p. 851-862.
161. CAO, J. and X. ZHANG, *Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions*. Acta pharmacologica sinica, 2006. **27**(9): p. 1153-1158.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Modell der Schädigungs- und Wiederherstellungsmechanismen nach Muskelverletzung in Anlehnung an Müller-Wohlfahrt [30] 4

Abbildung 2 Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stammzellen 12

Abbildung 3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Zum Zeitpunkt $t = 0$ findet die Defektsetzung statt. In allen Gruppen wurde der rechte SSP durchtrennt und die Verfettung provoziert. Vier Wochen später wurde die Ausgangsgruppe (Gruppe 0) euthanasiert. Die Defektgruppe (Gruppe 1) wurde nicht therapiert. Bei der Gruppe 2 wurde zum Zeitpunkt $t = 4$ neben der Refixation der rechten Mm. supraspinati mit einer Naht NaCl injiziert. Die Gruppe 3 erhielt zum selben Zeitpunkt nur die Naht. Die rechten Mm. supraspinati der Gruppe 4 wurden nach vier Wochen mit einer Naht refixiert und es wurden zusätzlich Myozyten transplantiert. Die rechten Mm. supraspinati der Gruppe 5 wurden mit einer Naht refixiert und es wurden zusätzlich MSC transplantiert. Zum Zeitpunkt $t = 8$, acht Wochen nach der Defektsetzung und vier Wochen nach Naht und ggf. weiterer Therapie, wurden die Tiere der Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC) euthanasiert. Mit $n =$ Fallzahl sind die Gruppengrößen beschrieben. 16

Abbildung 4 Vergleich der Gewichtszunahme von männlichen und weiblichen Ratten. Die Abbildung zeigt einen kalkulierten Verlauf. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt zu dem die Versuchsreihe begann [123] (modifiziert). 17

Abbildung 5 Defektsetzung. A: Präparation der SSP-Sehne; B: Untertunnelung der SSP-Sehne; C: Abtrennen der SSP-Sehne; D: Markierung der SSP-Sehne 19

Abbildung 6 Zeitachse der Verfettung bei Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) und Gruppe 1 (Defektgruppe) nach Defektsetzung. 19

Abbildung 7 Sehnenrefixation und Zelltransplantation in den Muskel. A: Vorbohren zweier Löcher in den Humeruskopf; B/C: Refixation der SSP-Sehne am Humerus; D: Infiltration des SSP 21

Abbildung 8 Aufarbeitung Spendertier. A: Exartikulation der Gliedmaße; B: Einlegen der Gliedmaße in Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung und Penicillin/Streptomycin; C: Abtrennen der Muskulatur vom Knochen; D: Aufteilen der Muskelwürfel auf Petrischalen 26

Abbildung 9 Mesenchymale Stammzellen aus Rattenknochenmark nach mehrwöchiger in vitro Expansion unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung 27

Abbildung 10 Grünleuchtend sind die transfizierten Myozyten dargestellt, als blau sind die Zellkerne von nicht-transfizierten Zellen zu sehen. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt in Passage 4. 29

Abbildung 11 Serienaufnahme des gleichen Abschnittes in verschiedenen Färbungen, die Muskelanteil (1) und Fettanteil (3) nachweisen, bzw. eine Übersicht geben (2); 200-fache Vergrößerung. 33

Abbildung 12 Positive grün gefärbte MSC. Die CD Antikörper färben die Zelloberfläche grün. Der Zellkern ist blau gefärbt 34

Abbildung 13 Schematische Darstellung des Muskel Längsschnittes und der zur Auswertung herangezogenen Bildausschnitte 35

Abbildung 14 Umwandlung eines histologischen Bildes in ein schwarz-weißes Bild zur statistischen Auswertung der Fläche: Die schwarze Fläche entspricht hier einem Anteil von 2,1 % der Gesamtfläche. 36

Abbildung 15 Das Diagramm zeigt, dass die Versuchstiere während des gesamten Versuchszeitraums im Wachstum waren. Die Körpermasse wurde im Abstand von vier Wochen bestimmt und war jeweils im Vergleich zur Voruntersuchung signifikant $p < 0,0001$ (***) gestiegen (Pfeil). 41

Abbildung 16 Diagramm des Massenvergleiches der behandelten, rechten Mm. supraspinati der verschiedenen Gruppen. Mit Pfeilen hervorgehoben ist die Signifikanz zwischen der Gruppe 0 (Ausgangsgruppe) zu den Gruppen 4 (Naht und Myozyten) und 5 (Naht und MSC). Es zeigt sich, dass diese Gruppen signifikant $p < 0,05$ (*) eine höhere Masse haben 42

Abbildung 17 Diagramm des Massenvergleiches der unbehandelten, linken Mm. supraspinati: Dieses Diagramm zeigt, dass das Muskelwachstum bei den Versuchstieren bis zum Ende der Studie stattfand. Bei dem Vergleich der Gruppen 0 (Ausgangsgruppe) und 1 (Defektgruppe) 42

war das Signifikanzniveau weniger stark ausgeprägt $p < 0,05$ (*), als bei den anderen Gruppen $p < 0,0001$ (***).....	43
Abbildung 18 Diagramm des Massenvergleiches zwischen den behandelten, rechten und den unbehandelten, linken Mm. supraspinati. Bei allen Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied $p < 0,0001$ (***) zwischen der rechten und linken Seite, wie mit einem Pfeil markiert.	44
Abbildung 19 Diagramm der Korrelation der Masse des Tieres zu der Masse der rechten Mm. supraspinati. In keiner der Gruppen zeigt sich eine Korrelation von der Masse des Tieres zur Muskelmasse.	45
Abbildung 20 Diagramm, das die Korrelation der Masse des Tieres zu der Masse der unbehandelten, linken Mm. supraspinati zeigt. Bei steigender Masse des Tieres vergrößert sich auch die Masse des SSP.	46
Abbildung 21 „Neo-Sehne“ bei Entnahme (Gruppe 1) rot umrundet. Mit dem Klemmchen markiert ist der Prolenefaden, mit dem bei Defektsetzung die Sehne zurückgebunden wurde.	47
Abbildung 22 Diagramm, welches zeigt, dass bei den behandelten, rechten Mm. supraspinati nur im Vergleich der Gruppen 3 (Naht) mit der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) eine Signifikanz besteht. Die Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) sind dabei signifikant (**) weniger verfettet, als die der Gruppe 3 (Naht).	48
Abbildung 23 Diagramm, welches zeigt, dass bei den unbehandelten, linken Mm. supraspinati nur im Vergleich der Gruppen 3 (Naht) mit der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) eine Signifikanz besteht. Die Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) sind dabei signifikant (*) weniger verfettet, als die der Gruppe 3 (Naht).	49
Abbildung 24 Diagramm der Auswertung der Histologie der unbehandelten, linken Mm. supraspinati im Vergleich zu den behandelten, rechten Mm. supraspinati. Die unbehandelten, linken Mm. supraspinati alle Gruppen sind signifikant mehr verfettet. In diesem Diagramm sind die Gruppen 1 (Defektgruppe), 2 (Naht und NaCl), 3 (Naht), und 5 (Naht und MSC) abgebildet.	50
Abbildung 25 Dieses Diagramm zeigt, dass auch zu der Gruppe 4 (Naht und Myozyten) eine signifikante Mehrverfettung im Vergleich zu der Kontrolle stattgefunden hat. Die Signifikanz $p < 0,05$ (*) war hierbei jedoch weniger stark ausgeprägt.	51
Abbildung 26 Diagramm von histologischem Vergleich der behandelten, rechten und unbehandelten, linken Mm. supraspinati innerhalb der Gruppen. In jeder Gruppe zeigte sich eine signifikante (***) Mehrverfettung der behandelten, rechten Mm. supraspinati im Vergleich zu den unbehandelten, linken Mm. supraspinati.	52
Abbildung 27 Die Nilrot-Färbung der SSP-Präparate zeigen eine deutliche Verfettung der behandelten, rechten Seite im Vergleich zu der unbehandelten, linken Seite in der 200-fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem fluorescein isothiocyanate (FITC) Filter. A und B: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 1 (Defektgruppe). C und D: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 2 (Naht und NaCl). E und F: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 3 (Naht). G und H: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 4 (Naht und Myozyten). I und J: unbehandelte, linke und behandelte, rechte Mm. supraspinati der Gruppe 5 (Naht und MSC).	53
Abbildung 28 Diagramme über das Verteilungsmuster der Verfettung von ursprungsnah (UN) über mittig (M) zu ursprungsfern (UF). Gruppe 2 (Naht mit NaCl) und 3 (Naht) zeigen hier eine Mehrverfettung der behandelten, rechten Mm. supraspinati ursprungsfern. In den anderen Gruppen und in allen unbehandelten, linken Mm. supraspinati wurde eine gleichmäßige Verteilung der Verfettung beobachtet.	55

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Gradeinteilung der Rotatorenmanschetten-Partialrupturen nach Ellmann und Gartsman	2
Tabelle 2 Gradeinteilung der Verfettung Rotatorenmanschettenmuskulatur in der CT nach Goutallier.....	5
Tabelle 3 Gradeinteilung der Verfettung der Rotatorenmanschettenmuskulatur in der MRT nach Thomazeau.....	5
Tabelle 4 Zusammensetzung Nährmedium für MSC und Myozyten	23
Tabelle 5 Zusammensetzung Einfriermedium.....	23
Tabelle 6 Zusammensetzung LB-Medium (lysogeny broth)	23

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A. dest.	Aqua destillata (lat.) = destilliertes Wasser
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AK	Antikörper
Art.	Articulatio (lat.) = Gelenk
bds.	beidseits
bFGF	basic fibroblast growth factor (engl.) = Basisfibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation (engl.) = Internationales System zur Bestimmung von Differenzierungsantigenen
cm ²	Quadratcentimeter
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.) = Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPX	Distyrene Plasticizer Xylene (engl.) = Distyrolweichmacher Xylol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
et al.	et alteri (lat.) = und andere
FBS	fetal bovine serum (engl.) = fetales Kälberserum
g	Gramm
G418	Gentamycin 418
GenTG	Gentechnikgesetz
GFP	green fluorescent protein (engl.) = grün fluoreszierendes Protein
Gr.	Gruppe
h	hor (lat.) = Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	human leukocyte antigen (engl.) = Human-Leukozyten-Antigen
HRP	horseradish peroxidase (engl.) = Meerrettich-Peroxidase
i.m.	intramuskulär
Inc.	Incorporated (engl.) = eingetragen
ISP	Musculus infraspinatus
l/min	Liter pro Minute
lat.	lateinisch
LB	lysogeny broth (engl.) = Lysogenes Bouillon
Lig	Ligament (lat.) = Band
Ligg	Ligamentae (lat.) = Bänder
M	mittig
M.	musculus (lat.) = Muskel
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mm.	musculi (lat.) = Muskeln
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymal stem cells (engl.) = mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
o.n.	over night (engl.) = über Nacht
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAX 7	Paired Box 7
PBS	phosphate buffered saline solution (engl.) = Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
Proc.	Processus
RM	Rotatorenmanschette
RMR	Rotatorenmanschettenruptur
rpm	rotations per minute (engl.) = Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCP	Musculus subscapularis
SSP	Musculus supraspinatus
t	time (engl.) = Zeit
TierSchG	Tierschutzgesetz
Tr	Tropfen
UF	ursprungsfern
UHMWPE	ultra-high-molecular-weight-polyethylene (engl.) = Polyethylen mit ultrahohem Molekulargewicht
UN	ursprungsnah
USA	United States of America (engl.) = Vereinigte Staaten von Amerika
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

10 ANHANG

10.1 Material

10.1.1 Laborgeräte

500-ml-Trinkflaschen mit Kugeldeckel ACC2521	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Abzug: Köttermann Typ: 2-453	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Abzug: Lamin Air® HB 2448	Heraeus Holding GmbH, München
Analysenwaage Typ Kern 770-12	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Autoklav, Typ Varioklav 300	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Axiocam MRc5	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Brutschrank IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Combitec Slide Stainer 4009	Histolab Products, Göteborg, Schweden
Cryostat Leica CM3050	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Duran-Glasware (Flaschen, Bechergläser)	Schott AG, Mainz
Ecomed Heating Pad	Medisana AG, Neuss
Erlenmeyerkolben, diverse Größen	Schott AG, Mainz
Färbekammer Stain Tray™	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbekasten und -gestell	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Feinanalysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Fluoreszenz Lampe FluoArc	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Hypercenter XP	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig
Infrarotlampe	Beurer GmbH, Ulm
Kryostat, Typ Vacutome HM 200 OM	Microm International GmbH, Walldorf
Küchenwaage	Beurer GmbH, Ulm
Kühl-Gefrier-Kombination, Typ 561284	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
Magnetrührer ARE Axon	VELP Scientifica srl, Usmate (Italien)
Makorolon Käfige 1354G Eurostandard Typ IV	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Micromot 50/E	Proxxon GmbH, Föhren
Mikroskop, Axioskop 40	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Mikroskop, Typ Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
NanoDrop Lite	Thermo Scientific, Wilmington (USA)
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Paraffinausgießstation Leica EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Pipette, Typ Pipetman	Gilson Inc., Middleton (USA)
Pipettierhilfe, Typ Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Schikane-Erlenmeyerkolben	Schott AG, Mainz
Schüttler Certomat® MO II	Satorius AG, Göttingen
Sicherheitswerkbank, steril	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stickstoffaufbewahrungstank, Typ Thermolyne Locator JR	Barnstead International, Inc., Iowa (USA)
Stickstoffvorratstank, Typ XL-120	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Mildstedt
Tiefkühlschrank (- 80 °C), Typ 6485	GFL GmbH, Burgwedel
Vakuumpumpe für die Zellkultur, Typ VDE0530 Vapor®	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck

Vortex-Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia N.Y. (USA)
Impföse	Wagner & Munz GmbH, München
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, Tutting

10.1.2 Verwendete Substanzen und Nährmedien

4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Invitrogen/Life Technologies, Eugene (USA)
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Actin AK	Acris Antibodies GmbH, Herford
AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit, (3-amino-9-ethylcarbazole)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat Ig G Bestellnummer: A-11055	Invitrogen/Life Technologies, Eugene (USA)
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse Ig G Bestellnummer: A 11001	Invitrogen/Life Technologies, Eugene (USA)
Alkohol 100 %	CLN GmbH, Niederhummel
Alkohol 70 %	CLN GmbH, Niederhummel
Alkohol 96 %	CLN GmbH, Niederhummel
Antikörperverdünner	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aqua stabile	Julabo GmbH, Seelbach
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt
Bacillol AF	Bode Chemie, Hamburg
Bicoll	Biochrom AG, Berlin
Biotinylierter anti-mouse aus horse Bestellnummer: BA-2001	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Biotinylierter anti-rabbit aus goat Bestellnummer: BA-1000	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brij	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CD105	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas (USA)
CD73 Bestellnummer: 551123	BD Pharmingen Inc., San Diego (USA)
CD90 Bestellnummer: 554802	BD Pharmingen Inc., San Diego (USA)
Citronensäure 20%/EDTA	Apotheke Innenstadt Universität München, München
DAB (3, 3 -diaminobenzidine) Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
DAB Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Eindeckmedium	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Desmin Antikörper aus Maus Katalognummer: ABIN335226	Antibodies-online GmbH, Aachen
Direct Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KgaA, Darmstadt
DPX (Distrene, Plasticiser, Xylene) Mountant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Apotheke Innenstadt Universität München, München

Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca/Mg	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Ethylenediaminatetraacetic acid (EDTA) Puffer PH 8	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Eukitt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fast Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FBS Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fluoromount W	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung 4 % gepuffert	Apotheke Innenstadt Universität München, München
Goatserum	Dako Deutschland GmbH
Hämalaun	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxilin A und B	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hoechst 33342	Invitrogen/Life Technologies, Eugene (USA)
Horseserum	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KgaA, Darmstadt
Kaisers Gelatine	Merck KgaA, Darmstadt
Lamin-Antikörper aus Maus Katalognummer: ABIN400876	Antibodies-online GmbH, Aachen
LB Broth EZMix™ powder microbial growth medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamine	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Lipofectamine® 2000	Invitrogen/Life Technologies, Eugene (USA)
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
Mycoplasma Detection Kit VenorGeM	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Nile red	Invitrogen/Life Technologies, Eugene (USA)
Oil Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paired Box 7 (PAX 7)	Antibodies-online GmbH, Aachen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyclonal Goat anti-mouse IG G	Dako GmbH, Eching
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen, Düsseldorf
Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde AG, Pullach
Sudan III	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Super Vision RED 2 Polymer Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH, Hamburg
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek USA Inc., Torrance (USA)
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau 0,4 %	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin/EDTA	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Medium RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KgaA, Darmstadt

10.1.3 Verbrauchsmaterialien

50 ml Falcon®	Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
---------------	--

Abdecktücher	Segewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf-Thansau
Alufolie, Typ Universal 30	VWR International GmbH, Darmstadt
Cellulose Acetat Filter	Sartorius AG, Göttingen
Cryomold Standard/Biopsy	Sakura Finetek USA Inc., Torrance (USA)
Deckgläschen rund	Erhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24x32 mm	Erhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24x50 mm	Erhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Einmal-Pinzetten	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Einmal-Handschuhe, Typ sempercare edition	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien (Österreich)
Einmal-Spritzen, verschiedene Größen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon® 15 ml und 50 ml	Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Messer C-35	pfm medical ag, Köln
Faltenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Filter Whatmann 42	Herolab GmbH Laborgeraete, Wiesloch
Glasobjektträger, Typ Superfrost® Plus	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co., Braunschweig
Kryoröhrchen	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Küchenpapier Flori Professional	Flory Cart, Tassignano (Italien)
Leukoplast®	BSN medical GmbH, Hamburg
Microtom Blade R35	Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Monogryl 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Multiwell 24	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Objektträgerkästen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Heidelberg
OP-Haube	Mölnlycke Health Care AB, Göteborg (Schweden)
OP-Kittel	Segewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf-Thansau
OP-Mundschutz	Medeco B.v. Quel-Beijerland (Niederlande)
Parafilm	Bemis Company, Inc., Oshkosh (USA)
Paraplast® (Paraffin)	Leica Biosystem, Richmond, IL (USA)
Petrischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg
Plastikmesstrichter	Labomedic GmbH, Bonn
Prolene Faden 5-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Rotilabo®-embedding cassettes, macro	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten, verschiedene Größen	Corning Incorporated, New York (USA)
Sterican Kanülen, verschiedene Größen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
sterile Handschuhe	Mai Med GmbH, Neukirchen
Sterile Kompressen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
T175 Flasks	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
T75 Flasks	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vicyl Faden 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Zellsiebe BD Falcon	BD Pharmingen Inc., San Diego (USA)

10.1.4 Verwendete Medikamente

Amphotericin B	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
----------------	-------------------------------------

Baytril®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Bepanthen®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Forene®	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Gentamycin 418	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Kanamycin	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
NaCl 0,9 %	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Narcoren®	Merial GmbH, Halbergmoos
Octenisept®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Opsite™ Spray	Smith & Nephew GmbH, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG/Merck Millipore, Berlin
Sauerstoff, flüssig	Linde AG, Pullach
Temgesic®	Essex Pharma GmbH, München

10.1.5 Verwendetes chirurgisches Instrumentarium

anatomische Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
chirurgische Pinzette	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Einmal-Skapelle, verschiedene Größen	Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Fadenschere	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Handbohrer	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
kleine Schere	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Nadelhalter	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Präparierschere	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schermaschine Favorita II	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

10.1.6 Verwendete Tiere

Lewis-Ratten	Charles River Laboratories Inc., Sulzfeld
--------------	---

10.1.7 Verwendete Software

ImageJ	National Institute of Health, Bethesda (USA) Public-Domain-Software
AxioVision 4.8	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, (USA)

10.2 Protokolle der Vorversuche

10.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

10.2.1.1 Knochen entkalken

- Probe mit darin enthaltenem Knochen in Citronensäure EDTA 4 % geben
- Neue Lösung alle 14 Tage
- Per Nadelstichprobe den Entkalkungsprozess verfolgt
- Nach ca. 8 Wochen war die Entkalkung abgeschlossen

10.2.1.2 Einbetten der Paraffinblöcke

- Gewebe nach Entnahme in Gewebeförmchen gegeben und in gepuffertem Paraformaldehyd (PFA) 4 % o.n. aufbewahrt
- Proben entkalkt
- 1h mit Leitungswasser wässern
- In 70 % Alkohol lagern
- Für die Paraffinierung wurden die Proben in den Entwässerungsautomaten gegeben

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

- Befüllte 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 auskühlen lassen
- Aus Gussförmchen herauslösen

10.2.1.3 Schneiden der Blöcke

- Wasserbad mit A. dest. füllen, auf 45 °C einstellen und Luftblasen mit Pinsel austreichen
- Wärmeplatte auf 45 °C erhitzen
- Paraffinblock in das Microtom einspannen und 5 µm dicke Schnitte anfertigen
- Schnitte ins Wasserbad überführen, mit Objektträger aufnehmen und auf Wärmeplatte trocknen
- Schnitte 24 h bei 50 °C im Trockenschrank trocknen

10.2.1.4 Entparaffinieren der Schnitte vor Färbung

- 10' Rotihistol
- 10' Rotihistol
- 5' 100 % Ethanol
- 5' 100 % Ethanol

- 5' 96 % Ethanol
- 5' 70 % Ethanol
- 5' A. dest.

10.2.2 Färbungen

10.2.2.1 Picrosirius-Red-Färbung

a) Herstellung der Farblösung:

Pikrinsäure:

10' 200 ml Pikrinsäure + 2 g Direct Red mit dem Magnetrührer vermischen

Weigerts Hämatoxylin:

100 ml Lösung A + 100 ml Lösung B filtrieren

Essigsäures A. dest.:

1000 ml Aqua Dest. + 5 ml Essigsäure 100 %

b) Färbung

- 15' Weigerts Hämatoxylin
- 15' fließendes Leitungswasser
- 30' Pikrinsäure
- 2x in essigsäures A. Dest. tauchen
- Kurz mit A. dest. spülen

c) Eindecken

- 5' Ethanol 96 %
- 5' Ethanol 100 %
- 10' Rotihistol
- 10' Rotihistol
- Eindecken mit DPX

10.2.2.2 PAX 7

Siehe Protokoll von Anti-Actin. Sowohl die Serumkonzentration als auch die AK-Konzentration wurden variiert, ohne brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

10.2.2.3 Anti-Desmin/Anti-Actin-Färbung

Tag 1

- 20' Präparate in Alufolie auftauen
- 20' ohne Alufolie auftauen
- 10' in Aceton fixieren
- 30' an der Luft trocknen lassen
- 10' mit PBS rehydrieren
- 30' blocken mit 200 ml PBS, Brij und 1ml H₂O₂
- 3x5' waschen in PBS und Brij
- 45' blocken mit Horseserum (Serum 1:PBS 20) bei Anti-Desmin

bzw.

blocken mit Goatserum (Serum 1:PBS 20) bei Anti-Actin

- PBS abklopfen
- Definieren
- 100 µm pro Schnitt aufpipettieren
- In Feuchtekammer inkubieren

o.n. 1. AK-Gemisch bei 4 °C inkubiert

- 1. Antikörper (20 Teile), Verdünner (1000 Teile) und Horseserum (1 Teil) mischen (zuvor wurden verschiedene Verdünnungen ausgetestet)
- Negativkontrolle nur mit Verdünner

Tag 2

3x5' waschen in PBS mit Brij

30' 2. Antikörper inkubiert

- AK Biotinylated Anti-Mouse Ig G (1 Teil) + Verdünner (400 Teile) bei anti-Desmin
- AK Polyclonal Goat Anti-Mmouse Ig G (POX) (1 Teil) + Verdünner (100 Teile) bei Anti-Actin

3x5' waschen in PBS mit Brij

30' Objektträger mit ABC Lösung in Feuchtekammer inkubieren

- Pro ml PBS je ein Tropfen Peroxidase und Streptokinase zupipetieren und schütteln
- Gemisch 1h im Kühlschrank inkubieren
- ABC nur bei Anti-Desmin nötig

3x5' waschen in PBS mit Brij

9' AEC-Farbe inkubieren unter dem Abzug im Dunkeln

- 1 AEC Tablette + 10 ml DMSO luftdicht verschlossen im Dunkeln schütteln
- 200 ml Na-Acetat-Puffer + AEC Lösung vermischen und filtrieren
- 60 µl H₂O₂ als Starter der Lösung zugeben

1' Reaktion in PBS stoppen

5x in A. dest. tauchen

Präparate mit Aquatex eindecken.

Alternativen zur AEC Farbe

1.) DAB

8' in DAB- Farbe inkubieren

- 5 ml Aqua Dest. + 2 Tr. Puffer + 4 Tr. DAB + 2 Tr. H₂O₂ mischen

2x2,5' A. dest.

1' Hämalaun

10' fließendes Leitungswasser

o.n. trocknen

5' 70 % Ethanol

5' 96 % Ethanol

5' 100 % Ethanol

5' 100 % Ethanol

10' Rotihistol

10' Rotihistol

Eindecken mit Eukitt

2.) Polymer-Färbung

- 2x5' PBS/Brij
- 30' Enhancer (DCS super vision Red 2 AP Polymer Kit) 2 Tr.
- 2x5' PBS/Brij
- 30' Polymer (DCS super vision Red 2 AP Polymer Kit) 2 Tr.
- 2x5' PBS/Brij
- 30' Fast Red (DCS super vision Red 2 AP Polymer Kit) 2 Tr.
- 2x2,5' A. dest.
- 1' Häkalaun
- 10' fließendes Leitungswasser
- o.n. trocknen
- 5' 70 % Ethanol
- 5' 96 % Ethanol
- 5' 100 % Ethanol
- 5' 100 % Ethanol
- 10' Rotihistol
- 10' Rotihistol
- Eindecken mit Eukitt

10.2.2.4 Fettfärbungen

10.2.2.4.1 Oil Red

- a) Herstellung der Farblösung
 - 0,25 g Oil Red Farbe + 50 ml Isopropanol schütteln, in 37 °C warmes Wärmebad geben und filtrieren
- b) Färben
 - 30' PFA bei 4 °C
 - 15' Oil Red Farbe
 - 7x in 60 % Isopropanol tauchen
 - 2' Häkalaun
 - 10' fließendes Leitungswasser
 - 7x in A. dest. tauchen
 - Eindecken

10.2.2.4.2 Sudan-III-Färbung

- a) Herstellung der Farblösung
 - 0,3 g Sudan-III + 100 ml 60 °C heißes 70 % Ethanol vermischen
 - o.n. bei 60 °C ins Wasserbad
 - Abkühlen
 - Filtrieren
- b) Färben
 - 20' Präparate in Alufolie auftauen
 - 20' ohne Alufolie auftauen
 - 2' 50 % Ethanol
 - 25' Sudan-III Lösung
 - 5x in 50 % Ethanol tauchen

- 5x in A. dest. tauchen
- 4' Hämalaun
- 10' fließendes Leitungswasser
- Eindecken

Alternativ Variante Sudan-III-Färbung

- a) Herstellung der Farblösung
 - 0,3 g Sudan-III + 100 ml 75 °C heißes 70 % Ethanol vermischen
 - o.n. bei 75 °C ins Wasserbad
 - Abkühlen
 - Filtrieren
- b) Färben
 - 20' Präparate in Alufolie auftauen
 - 20' ohne Alufolie auftauen
 - 4' Hämalaun
 - 10' fließendes Leitungswasser
 - 2' 50 % Ethanol
 - 30' Sudan-III Lösung
 - 5x in 50 % Ethanol tauchen
 - 5x in 30 % Ethanol tauchen
 - 5x in 10 % Ethanol tauchen
 - 5x in Aqua Dest. tauchen
 - Eindecken mit Glycerin-Gelatine

11 DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Müller für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit diese zu bearbeiten herzlich bedanken.

Herrn Dr. Mehmet Gülecyüz danke ich für die geduldige Betreuung meiner Arbeit. Vor allem möchte ich mich für die Hilfe bei dem experimentellen Teil bedanken.

Claudia Böhland und Bärbel Schmitt betreuten mich bei der Arbeit im Labor und unterstützen mich jederzeit mit Rat und Tat. Zusammen mit meinen Mitdoktoranten und Weggefährten Lena Kempfert und Michaela Serr haben sie meine Laborzeit zu einer wertvollen Erfahrung gemacht, die ich nicht missen möchte. Vielen Dank dafür.

Stefan Macha danke ich für die große Hilfe bei jeglichen Computerproblemen und die durchgängige Motivation.

Abschließend geht ein großes Dankeschön an meine Eltern, die mir das Medizinstudium und damit diese Promotion ermöglichten.

12 ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung

Macha, Konstanze

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Regenerationsfähigkeit der irreversibel verfetteten Muskulatur der Rotatorenmanschette nach Transplantation von allogenen mesenchymalen Stammzellen und Myozyten am Ratten-Modell“

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.

München, 08.02.2020

Ort, Datum

Konstanze Macha

Unterschrift Doktorandin