

Aus der
Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Klinik der Universität München – MUM
Direktion:
Prof. Dr. Wolfgang Böcker
Prof. Dr. Boris Holzapfel



*Zellbesiedelung von humanen Supraspinatussehnen Allografts mit humanen
Tenozyten*

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

vorgelegt von

Felix Dootz

aus

Faro, Portugal

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. Peter E. Müller |
| Mitberichterstatter: | PD Dr. Julian Fürmetz Prof. Dr. Christof Birkenmaier |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Prof. Dr. Thomas R. Niethammer |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Thomas Gudermann |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 02.05.2024 |

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | 4 |
| Tabellenverzeichnis | 5 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Aufbau und Struktur einer Sehne | 7 |
| 1.1.1 Allgemein | 7 |
| 1.1.2 Tenozyten | 7 |
| 1.1.3 Extrazelluläre Matrix..... | 8 |
| 1.2 Die Rotatorenmanschette | 10 |
| 1.2.1 Anatomie und Funktion | 10 |
| 1.2.2 Pathophysiologie von Rotatorenmanschettenrupturen..... | 11 |
| 1.2.3 Klassifikation von Rotatorenmanschettenrupturen | 13 |
| 1.2.4 Therapie von Rotatorenmanschettenrupturen | 16 |
| 1.3 Aktuelle Ansätze des Tissue Engineering | 18 |
| 1.3.1 Plasmajektionen / Wachstumsfaktoren (WF)..... | 18 |
| 1.3.2 Scaffolds..... | 20 |
| 2 Zielsetzung | 23 |
| 3 Material und Methoden | 24 |
| 3.1 Material..... | 24 |
| 3.1.1 Sehnen | 24 |
| 3.1.2 Tenozyten | 25 |
| 3.2 Methoden..... | 27 |
| 3.2.1 Studienkollektiv | 27 |
| 3.2.2 Entnahme der Präparate | 29 |
| 3.2.3 Dezellularisierung | 31 |
| 3.2.4 Zellkultur..... | 32 |
| 3.2.5 Rezellularisierung | 34 |
| 3.2.6 Biomechanische Testung | 35 |
| 3.2.7 Histologie (Hämatoxylin-eosin Färbung, Elastica-van-Gieson Färbung) | 37 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.8 | Statistik | 38 |
| 4 | Ergebnisse | 39 |
| 4.1 | Deskriptive Statistik | 39 |
| 4.2 | Histologie..... | 40 |
| 4.2.1 | Hämatoxylin-Eosin Färbung | 40 |
| 4.2.2 | Elastica-van-Gieson Färbung | 43 |
| 4.3 | Biomechanik | 46 |
| 4.3.1 | Load to Failure | 46 |
| 5 | Diskussion | 51 |
| 5.1 | Diskussion der Methoden | 52 |
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse | 55 |
| 5.3 | Limitation der Studie..... | 58 |
| 5.4 | Schlussfolgerung und Ausblick | 60 |
| 6 | Zusammenfassung | 62 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 64 |
| 8 | Anhang: Material | 71 |
| 8.1.1 | Medien..... | 71 |
| 8.1.2 | Material der Sehnenentnahme: | 71 |
| 8.1.3 | Material Dezellularisierung:..... | 72 |
| 8.1.4 | Material Zellkultur | 72 |
| 8.1.5 | Material Biomechanik..... | 73 |
| 8.1.6 | Material Histologie | 74 |
| 8.1.7 | Programme | 75 |
| 9 | Danksagung..... | 76 |
| 10 | Eidesstattliche Versicherung | 77 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 Struktureller Aufbau einer Sehne (8)..... | 9 |
| Abbildung 2 Acromiontyp nach Bigliani (27)..... | 12 |
| Abbildung 3 Flussdiagramm zur Entstehung des Studienkollektivs | 29 |
| Abbildung 4 Schultergelenk nach Entnahme der Supraspinatussehne | 30 |
| Abbildung 5 Inkubation der Sehnen auf dem Shaker..... | 32 |
| Abbildung 6 Biomechanische Testung an der Instron..... | 36 |
| Abbildung 7 Beispiel eines Belastungsdiagramms „Load to failure“ | 37 |
| Abbildung 8 Hämatoxylin-eosin Färbung einer nativen Sehne | 41 |
| Abbildung 9 Hämatoxylin-eosin Färbung einer dezellularisierten Sehnen | 42 |
| Abbildung 10 Hämatoxylin-eosin Färbung einer rezellularisierten Sehne..... | 43 |
| Abbildung 11 Elastica-van-Gieson Färbung einer nativen Sehne..... | 44 |
| Abbildung 12 Elastica-van-Gieson Färbung einer dezellularisierten Sehne | 45 |
| Abbildung 13 Elastica-van-Gieson Färbung einer rezellularisierten Sehne | 45 |
| Abbildung 14 Übersicht Maximallast in allen 3 Gruppen..... | 47 |
| Abbildung 15 Maximallast Sehnen männlicher/weiblicher Spender..... | 49 |
| Abbildung 16 Maximallast rechter/linker Sehnen | 50 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Sehnenkollektiv | 25 |
| Tabelle 2: Tenozyten Vial..... | 26 |
| Tabelle 3: Analysegruppen im Seitenvergleich | 28 |
| Tabelle 4 Übersicht der deskriptiven Statistik in den jeweiligen Gruppen..... | 40 |
| Tabelle 5 Maximallast der Sehnen in allen 3 Gruppen..... | 47 |
| Tabelle 6 p-Werte der Vergleichsanalysen zwischen allen 3 Gruppen | 46 |
| Tabelle 7 Mittelwerte Maximallast Sehnen weiblicher/männlicher Spender..... | 48 |
| Tabelle 8 Mittelwerte Maximallast rechter/linker Sehnen..... | 50 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|--------------------------------------|
| ASES | American Shoulder and Elbow Surgeons |
| cm | Zentimeter |
| CT | Computertomografie |
| DMEM | Dulbecco´s modified eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FCS | fötales Kälberserum |
| GAG | Glykosaminoglykane |
| h | Stunden |
| Hz | Hertz |
| kg | Kilogramm |
| L | links |
| M. | Musculus |
| M | männlich |
| mm | Millimeter |
| MRT | Magnetresonanztomografie |
| N | Newton |
| PAA | peracetic acid |
| PDGF | platelet-derived Growth Factor |
| PG | Proteoglykane |
| PMI | postmortales Intervall |
| PRF | platelet-rich Fibrin |
| PRP | platelet-rich Plasma |
| R | rechts |
| s | Sekunde |
| SDS | Sodium dodecyl Sulfat |
| SP | Sehnenpaar |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| UCLA | University of California Los Angeles |
| W | weiblich |

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Struktur einer Sehne

1.1.1 Allgemein

Sehnen sind die verbindende Struktur zwischen Muskel und Knochen und sind funktionell für die Übertragung der Kraft vom Muskel auf den Knochen zuständig (1–3). Diese teils hohen Kraftübertragungen ermöglichen die Bewegungen unseres Körpers, weshalb Sehnen eine sehr robuste Struktur besitzen. Sie bestehen aus Tenozyten und einem hohen Anteil extrazellulärer Matrix (EZM). Die Tenozyten sind für die Bildung der extrazellulären Matrix verantwortlich.

1.1.2 Tenozyten

Die Tenozyten sind der zelluläre Bestandteil der Sehne und ähneln in ihrer Struktur und Funktion den Fibroblasten (Flügelzellen). Tenozyten bilden 95% der Zellen einer Sehne und sind für die Bildung der Extrazellulären Matrix hauptsächlich verantwortlich. Im Frühstadium besteht die Sehne aus Tenoblasten, sie kommen in sehr hoher Anzahl und in verschiedenen Formen vor. Eine starke Ausprägung des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums führen zu einer sehr hohen metabolischen Aktivität und somit starken Synthese von Kollagen, Elastin, Proteoglykanen und Glykoproteinen (4,5). Im Laufe des Alters entwickeln sie sich zu Tenozyten und nehmen eine vorwiegend

längliche spindelförmige Gestalt an. Der Abfall in der Zellzahl der Tenozyten ist einer der Hauptgründe, weshalb sich im Alter degenerative Rupturen häufen. Tenozyten sind im späteren Stadium fast vollständig vom Kern ausgefüllt, was zu einer niedrigeren metabolischen Aktivität führt im Vergleich zu den Tenoblasten (3). Ein weiterer Bestandteil der Tenozyten sind das Aktin sowie Myosin, welche an der Kontraktion der Muskulatur maßgeblich beteiligt sind (6).

1.1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Kollagenfasern, elastischen Fasern, Grundsubstanz und anorganischer Substanz. Die EZM besteht zu 80% aus Kollagenfasern, hauptsächlich aus Kollagen Typ I, gefolgt von Kollagen Typ III (4,7). Die Kollagenfasern sind in Fibrillen angeordnet und bestehen aus Aminosäuren, die alpha-Ketten bilden. Drei alpha-Ketten bilden Tropokollagen Einheiten und fünf Einheiten bilden eine Kollagenfibrille, welche sich zu Kollagenfasern zusammenschließen. Diese wiederum bilden primäre, sekundäre und tertiäre Faserbündel, welche dann die Einheit der Sehne bilden. Die einzelnen Faserbündel werden durch das Endotenon und die dazwischenliegenden Proteoglykane zusammengehalten. Das Endotenon ermöglicht des Weiteren das Gleiten zwischen den einzelnen Fasern und Bündeln und führt Nerven, Blut- und Lymphgefäße zur Versorgung und Innervierung der Sehne. Um die Sehne herum befinden sich zwei weitere Schichten, das Epitenon und das Paratenon, welche die Sehne zusammenhalten und das Gleiten gegenüber dem umliegenden Gewebe ermöglichen (3,4).

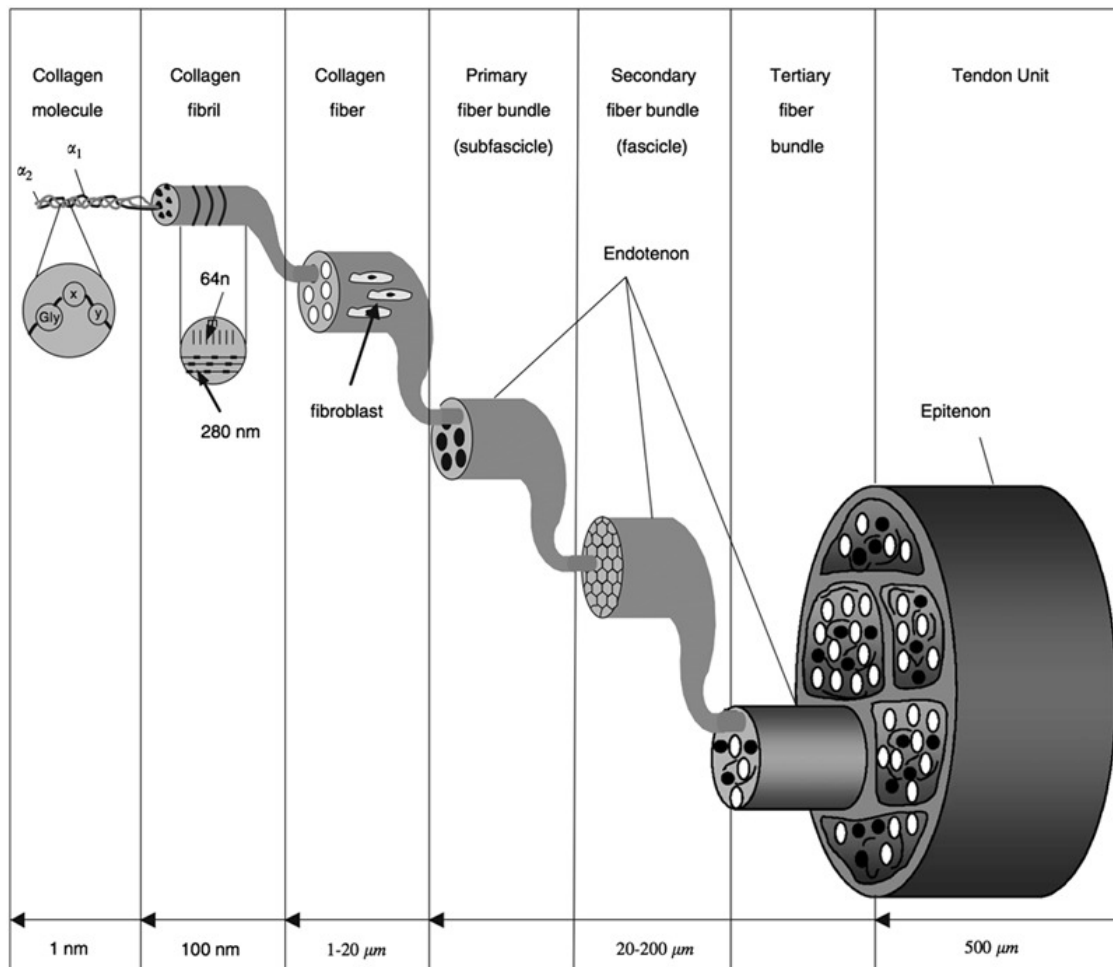


Abbildung 1 Struktureller Aufbau einer Sehne (8)

Das Kollagen ist in hohem Maße für die Zugfestigkeit der Sehne verantwortlich. Aktivität und Belastung fördern die Kollagensynthese, während Inaktivität zu einem vermehrten Abbau des Kollagens führt und somit auch zu Schwächung der Sehne. Bei Verletzungen ist sie weniger regenerationsfähig, somit ist vor allem bei älteren Menschen eine Ruptur durch Degeneration zu erwarten (4).

Im Ruhezustand weisen die Fasern eine wellige Form auf, bei Zug in Faserrichtung kommt es zu einer Längsorientierung der Fasern. Auch wenn die Faserbündel makroskopisch meistens eine parallele Ausrichtung aufweisen (4,9), sind einzelne Kollagenfibrillen überkreuzt um neben longitudinal, auch

transversal, horizontal und rotatorisch einwirkenden Kräften standzuhalten (4,10).

Die Sehne besteht zu 1-2% aus elastischen Fasern, welche die Funktion besitzen in der Entspannungsphase die Kollageneinheiten wieder in ihre ursprüngliche wellige Form zu bekommen.

Die Grundsubstanz der Sehne besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen (PG), Glykosaminoglykanen (GAG) und strukturellen Glykoproteinen. Diese Makromoleküle weisen stark hydrophile Eigenschaften auf und führen durch vermehrte Wasseraufnahme zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften hinsichtlich Elastizität und Zugfestigkeit. Weiterhin stabilisieren sie die Kollagenstruktur.

1.2 Die Rotatorenmanschette

1.2.1 Anatomie und Funktion

Die Rotatorenmanschette ist eine aus vier Muskeln bestehende Struktur des Schultergelenkes, dessen Sehnen alle an den Tuberculi humeri ansetzen. Der Musculus supraspinatus entspringt an der Fossa supraspinata der Scapula und inseriert an der oberen bis mittlere Facette des Tuberculum majus des Humerus. Er zieht unter dem Acromion durch und wird cranial durch die Bursa subacromialis vor dem Acromion geschützt. Der M. infraspinatus und M. teres minor ziehen von der Fossa infraspinata bzw. Margo lateralis der dorsalen Scapula zur mittleren bzw. unteren Facette des Tuberculum majus. Der M. subscapularis entspringt der Fossa subscapularis und inseriert mit seiner Sehne am Tuberculum minus (11). Die Sehnen dieser Muskeln konfluieren im

Ansatzbereich mit der darunter und darüber liegenden Gelenkkapsel des Schultergelenkes (12). Dadurch ergibt sich funktionell gemeinsam mit der Kapsel eine Stabilisierung des Schultergelenkes durch mechanische Kompression und Zentrierung des Humeruskopfes in der Fossa glenoidalis. Diese Funktion ist essentiell, da das Schultergelenk über kaum knöcherner Stabilität durch das Glenoid verfügt (13). Isoliert betrachtet ist der M. supraspinatus für die Abduktion zuständig und unterstützt somit den Deltamuskel. Der M. subscapularis ist für die Innenrotation des Oberarmes zuständig, während der infraspinatus und teres minor die Außenrotation unterstützen. (14)

1.2.2 Pathophysiologie von Rotatorenmanschettenrupturen

Rotatorenmanschettenrupturen sind eine der häufigsten Schulterverletzungen weltweit und der häufigste Therapiegrund bei Schulterbeschwerden (15). Betroffen sind vor allem ältere Menschen (16–18). Die Prävalenz bei Patienten zwischen 60 und 69 Jahren wird mit 15-20%, zwischen 70 und 79 Jahren 26-31% und über 80 Jahren gar mit 36-51% angegeben (19,20). Die Genese von Supraspinatussehnenrupturen ist vielfältig. Die Korrelation zwischen erhöhtem Alter und zunehmender Prävalenz zeigt, dass ein Großteil der Rupturen degenerativer Genese sind (21). Eine wesentliche Rolle im degenerativen Abbau der Sehne spielt die Schulteranatomie. Der subakromiale Raum ist oftmals eng, abhängig vom Hochstand des Humeruskopfes sowie der Anatomie des Akromions. Die Akromionform wurde von Bigliani in 3 Typen unterteilt: Typ I flach, Typ II gebogen und Typ III hakenförmig (22,23). Vor allem beim Akromion Typ III nach Bigliani kommt es zu einer ausgeprägten subakromialen Enge, welche zu

einem chronischen Schaden der Sehne führen kann und mit erhöhter Rupturrate assoziiert ist (22,23). Diese mechanische Einengung der Sehne zwischen Humeruskopf und Akromion wird als Impingement Syndrom bezeichnet und ist eine der häufigsten Ursachen für Rotatorenmanschettendefekte (24,25). Durch hohe Belastungen kommt es ebenfalls zu degenerativen Veränderungen der Sehne. Durch die hohe multidirektionale Belastung der Sehne, welche nicht immer in Faserrichtung verläuft, erleidet die Sehne chronische Mikrotraumata. Diese können sich mit der Zeit in größere Defekte umwandeln (26). Je mehr Fasern reißen, desto mehr Spannung ruht auf den noch intakten Anteilen der Sehne. Dies wiederum erhöht die Belastung und führt zu einer Vergrößerung der Defekte (7).

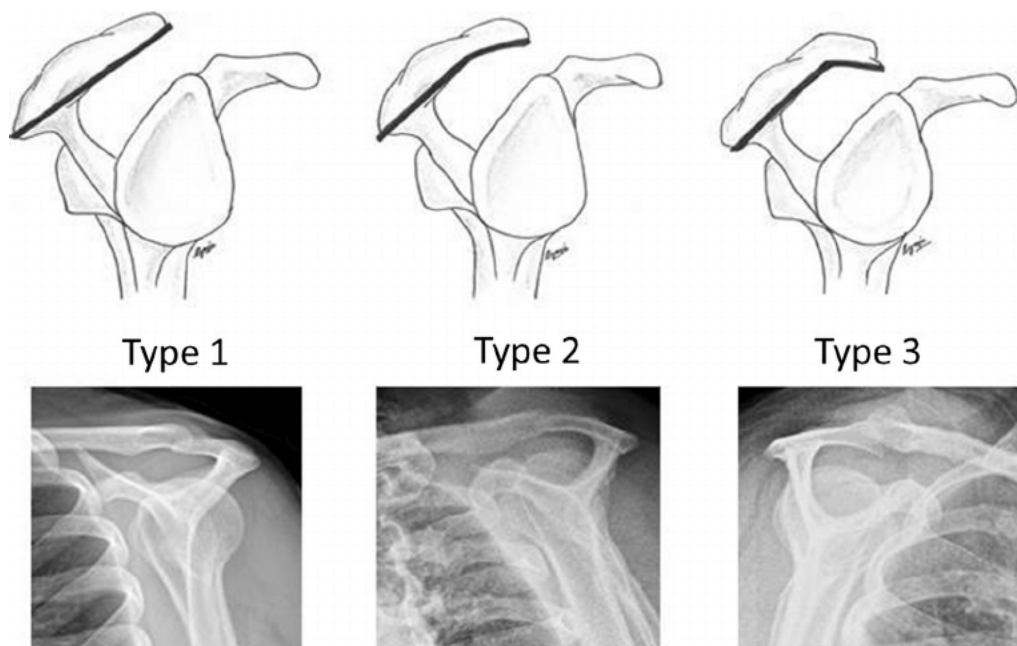


Abbildung 2 Acromiontyp nach Bigliani (27)

Im Gegensatz hierzu stehen die akuten Supraspinatussehnenrupturen, welche deutlich seltener vorkommen als degenerativ bedingte Rupturen (28). Akute

Rupturen treten in Folge von traumatischen Ereignissen auf. Diese sind auch in höherem Alter häufig, da die Sehnen häufig schon degenerative Veränderungen aufweisen. So ist eine Supraspinatussehnenruptur nach Schulterluxationen im höheren Alter nicht unüblich (29,30). Diesen Verhalt bezeichnet man auch als akut auf chronisch.

Pathophysiologisch werden häufig auch extrinsische und intrinsische Faktoren unterschieden. Hierbei wird ein Impingement-Syndrom zu den extrinsischen Ursachen gezählt. Als intrinsische Ursachen für Rotatorenmanschettenrupturen werden vor allem degenerative Veränderungen der Sehnen selbst im Alter bezeichnet. Es kommt vermehrt zu mukoider Degeneration und Einlagerung von Hydroxyapatitmikrokalzifikationen (26,31). Des Weiteren kommt es im Alter zu einer Atrophie der Muskulatur und Sehne, was zu einer deutlich verringerten Funktionalität und erhöhten Rupturrate führt. Nach Rupturen kommt es häufig reaktiv zu einer fettigen Degeneration im Bereich der gerissenen Fasern, was die Stabilität der Sehne mindert (7,26). Die Durchblutung der Supraspinatussehne ist vor allem Ansatznah vermindert. Diese Zone wird in der Literatur auch als Critical Zone bezeichnet. Durch die geringere Durchblutung ist die Regeneration der Sehne in dieser Zone deutlich vermindert und das Rupturrisiko erhöht (32,33).

1.2.3 Klassifikation von Rotatorenmanschettenrupturen

Rotatorenmanschettenrupturen werden je nach Ausmaß, Ursache und Lokalisation unterschiedlich klassifiziert. Codman und Akerson unterschieden bereits 1931 zwischen traumatischen und degenerativen Ursachen (34). Die erste vorgenommene Klassifikation erfolgte durch Neer 1983, welcher die

Rupturen in traumatisch (Typ I), nach Schulterluxation (Typ II) und nach Impingement (Typ III) unterteilt. Typ I und II sind dabei als akut einzustufen und Typ III als degenerativ.

Weiterhin unterscheidet man zwischen vollständigen/transmuralen Rupturen und Partialrupturen. Bei ersteren ist die Sehne in der Gesamtdicke durchtrennt, der Subakromialraum kommuniziert mit dem subtendinösen/glenohumeralen Raum. Diese werden entsprechend der Defektbreite nach Bayne und Bateman klassifiziert (35):

| | |
|----------|--------|
| Grad I | <1 cm |
| Grad II | 1-3 cm |
| Grad III | 3-5 cm |
| Grad IV | >5cm |

Partiellläsionen sind Läsionen, die nicht die gesamte Dicke der Sehne betreffen.

Diese werden ebenfalls unterteilt und nach Snyder klassifiziert (36):

| | |
|----------|--------------|
| Klasse A | gelenkseitig |
| Klasse B | bursaseitig |
| Klasse C | komplett |

Die Größe der Ruptur wird zusätzlich unterteilt in:

| | |
|---------|--|
| Grad 0: | intakte Rotatorenmanschette, leichte Auflagerung von Synovia/Bursa |
| Grad I: | < 1 cm, Synovitis |

- Grad II: 1 cm, Sehnen Splicing, Sehnenpartialruptur
- Grad III: < 3 cm, Fragmentation
- Grad IV: > 3 cm, schwerwiegende proximale RM Partialruptur, Lappenriss

Die Klassifikation nach Ellmann bezieht sich auf die Rupturgröße in Bezug auf die Sehnendicke (37):

- Grad 0: Normalbefund
- Grad I: <1/4 des Sehnendurchmessers oder <3 mm
- Grad II: <1/2 des Sehnendurchmessers oder 3-6 mm
- Grad III: >6 mm

Radiologische Klassifikationssysteme für die Supraspinatussehnenrupturen werden ebenfalls häufig verwendet, insbesondere die Klassifikationen nach Patte, Fuchs/Goutallier und Thomazeau. Die Patte Klassifikation bezieht sich auf die Retraktion des proximalen Sehnenstumpfes (38):

- Stadium I: proximaler Sehnenstumpf zwischen Tuberculum majus und Apex
- Stadium II: proximaler Sehnenstumpf zwischen Apex und Glenoidrand
- Stadium III: proximaler Sehnenstumpf auf Höhe des Glenoids oder dahinter

Die Goutallier (CT) / Fuchs (MRT) Klassifikation berücksichtigt die fettige Infiltration des Muskels (39,40):

- Grad I: geringe Verfettung

- Grad II: weniger muskuläre Verfettung als Muskelmasse
- Grad III: fettige Degeneration mit Muskelmasse identisch
- Grad IV: vermehrte fettige Degeneration im Vergleich zur Muskelmasse

Die Thomazeau Klassifikation bezieht sich auf die Atrophie der Muskulatur (41):

- Grad I: normaler oder nur gering atrophierter Muskel, bei dem das Verhältnis zwischen Muskel und Fossa supraspinata zwischen 1,00 und 0,60 liegt
- Grad II: mäßige Atrophie, das Verhältnis Muskel zu Fossa supraspinata liegt zwischen 0,60 und 0,40
- Grad III: schwere Atrophie, das Verhältnis Muskel zu Fossa supraspinata liegt $< 0,40$

1.2.4 Therapie von Rotatorenmanschettenrupturen

Die Therapie der Supraspinatussehnenrupturen richtet sich nach Ausmaß und Lokalisation der Ruptur sowie nach dem Alter und funktionellem Anspruch des Patienten (42). Bei älteren Patienten mit degenerativen Rupturen und geringerem funktionellem Anspruch wird häufig ein konservativer Therapieansatz gewählt (43). Dieser besteht vor allem aus Physiotherapie zur Aktivierung und Kräftigung der Muskulatur des Schultergelenkes insbesondere des M. deltoideus und intakter Restanteile der Rotatorenmanschette. Dies führt in vielen Fällen zu einer funktionellen Verbesserung (44). Nicht steroidale Antirheumatika und Injektionen von Cortison werden ebenfalls angewandt um eine Schmerzreduktion zu erzielen

(43). Bei Ansprechen der konservativen Therapie zeigen sich innerhalb der ersten 6-12 Wochen Verbesserungen (45). Auch bei vollständigen und ausgedehnten Rotatorenmanschettenrupturen, bei denen bei einer operativen Therapie aufgrund der Größe des Defektes ein Verschluss schwierig oder nicht erzielbar erscheint, ist ein konservativer Therapieansatz möglich und zeigt teils eine deutliche Verbesserung der Symptomatik und Funktionalität (46,47).

Bei jüngeren Patienten mit traumatischen Rupturen, Patienten mit hohem funktionellem Anspruch oder Versagen der konservativen Therapie und bestehenden Symptomen ist eine Rekonstruktion der Rotatorenmanschette die Therapie der Wahl. Während früher die Rotatorenmanschettenrekonstruktion häufig offen durchgeführt wurde, ist heutzutage die arthroskopische Rekonstruktion in Single oder Double Row Technik das Standardverfahren (48,49). In der Literatur zeigen sich die klinischen funktionellen Outcomes bei Single und Double Row Technik ähnlich gut, wobei die Double Row Technik eine etwas geringere Re-Ruptur Rate aufzuweisen scheint (50,51). Die Rotatorenmanschettenrekonstruktionen zeigen gute Ergebnisse bezüglich des funktionellen Outcomes und geringe Re-Ruptur Raten mit einer Heilungstendenz zwischen 83% und 93% bei Rupturen zwischen 1-4 cm (52,53).

Massive Rotatorenmanschettenrupturen hingegen bleiben weiterhin eine Herausforderung in ihrer Versorgung. Sie machen bis zu 30% aller Rotatorenmanschettenrupturen (54) und bis zu 80% aller Re-Rupturen aus (55,56). Die Ergebnisse durch operative sowie konservative Maßnahmen sind hierbei deutlich schlechter mit hohen Re-Ruptur Raten und schlechtem funktionellem und subjektiven Outcome (57). Dies ist vor allem der reaktiven

Fibrose, verringerten Vaskularität und Zellularität, sowie fehlender Strukturierung des Kollagens geschuldet (58,59). Eine operative Behandlungsmöglichkeit ist die partielle Rekonstruktion der Rotatorenmanschette oder ein Sehnentransfer des M. latissimus dorsi im Sinne eines Autografts. Kim et al. beschreiben eine leichte Verbesserung der Funktionalität durch partielle Rekonstruktion (60). Eine signifikante Verbesserung der Funktionalität und Kraft sind dadurch jedoch nur eingeschränkt zu erzielen. Bis zu 55% der Patienten berichten nach partieller Rekonstruktion nach wie von starken Einschränkungen und mit dem Outcome nicht zufrieden zu sein (61,62). Selbiges wird von einem Latissimus dorsi und Pectoralis major Transfer berichtet (63–65).

Insgesamt wird die Versagensrate bei der Therapie von Rotatorenmanschettenrupturen, aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung der Rupturgröße, Lokalisation, schlechten Vaskularisierung des Sehngewebes und degenerativer Veränderungen, welche die Sehnenqualität und Heilungstendenz deutlich herabsetzen, zwischen 20 und 95% angegeben (48,66). Die adäquate Versorgung massiver und degenerativer Rupturen ist nach wie vor eine große Herausforderung, welche durch multiple neue Ansätze im Bereich des Tissue Engineering gemeistert werden soll.

1.3 Aktuelle Ansätze des Tissue Engineering

1.3.1 Plasmajektionen / Wachstumsfaktoren (WF)

Bei vor allem schlechter Heilungstendenz im Knochen/Sehnen Übergang werden Verfahren der biologischen Augmentation als alleinige oder zusätzliche Therapie

zur operativen Therapie getestet und erforscht. Diese bestehen darin Wachstumsfaktoren, Zytokine, PRP (platelet-rich Plasma) sowie Stammzellen in den Bereich des Defektes zu injizieren, um die Regeneration zu fördern.

Eine Form der Augmentation ist das PRP (platelet-rich Plasma). Dieses wird nach Zentrifugation des Patientenblutes gewonnen mit dem Ziel bioaktive Faktoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren im Defektbereich freizusetzen (67). Diese sollen die Angiogenese, Defekt- und Matrixrekonstruktion fördern und den Entzündungsprozess regulieren (68). Es gibt eine flüssige Applikationsform, das PRP, sowie eine Applikation in Form einer Matrix, das PRF (platelet-rich fibrin). Diese können zusätzlich Leukozyten enthalten oder in bereinigter Form ohne Leukozyten appliziert werden. Unabhängig von der Form des applizierten PRPs zeigte sich *in vitro* eine vermehrte Kollagenproduktion und bessere Abheilungstendenz. Diese konnte *in vivo* klinisch im Sinne einer verringerten Re-Rupturrate bei kleinen Rotatorenmanschettendefekten reproduziert werden, jedoch ohne signifikante biomechanische Verbesserung der Sehnen (69–71). Die Datenlage ist aktuell noch kontrovers. Bergeson et. al zeigten beispielsweise eine erhöhte Versagensrate nach P-PRF Augmentation (72). Pandey et al. berichteten hingegen nach 3 Monaten sonographisch eine erhöhte Vaskularisierung und nach 2 Jahren eine verringerte Re-Rupturrate festgestellt zu haben (73). Jo et al. stellten ebenso eine geringere Re-Rupturrate nach Augmentation fest, jedoch ohne Verbesserung im klinischen Outcome der Patienten (57). Insgesamt scheint es eine leichte Tendenz hinsichtlich einer geringeren Re-Rupturrate zu geben.

Die alleinige Applikation von Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB (Platelet-derived Growth Factor) oder TGF- β (Transforming Growth Factor) zeigte im Tiermodell keine signifikante Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften der Sehnen. Lediglich die Kombination aus einem Scaffold mit zusätzlicher Applikation von Wachstumsfaktoren zeigte in einigen Studien eine leichte biomechanische Verbesserung des Sehnengewebes (48).

Die Augmentation einer arthroskopischen Naht mittels Stammzellen zeigte in klinischen Studien verbesserte biomechanische Eigenschaften sowie eine verbesserte Einheilungstendenz im Vergleich zu den Kontrollgruppen (74). Dieses Verfahren ist auch Gegenstand aktueller Forschung im Tissue Engineering.

1.3.2 Scaffolds

Die Problematik der adäquaten Versorgung von massiven meist degenerativen Rotatorenmanschettendefekten wird in den letzten Jahren im Bereich des Tissue Engineering verstärkt adressiert. An der Verwendung von Scaffolds zur Deckung und Förderung der Heilung von Rotatorenmanschettendefekten wird seit einigen Jahren geforscht. Sie werden als Augmentation oder zum Überbrücken (Bridgen) der Defekte eingesetzt. Hierbei werden Allografts und Xenografts, sowie synthetische Grafts verwendet (48).

Die Verwendung von intestinalen submucosa Xenografts vom Schwein zeigte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es wurde teils im MRT ein Einwachsen

des Xenografts festgestellt, jedoch keine signifikante Verbesserung der Schulterfunktion (75,76). Sclamberg et. al analysierten MRT Bilder der Schulter 6 Monate nach arthroskopischer Naht und Xenograft Augmentation und stellten eine Versagensrate von 91% fest (77). Weiterhin wurden immunologische Reaktionen beobachtet (78–80). Von Xenografts wurde aus diesen Gründen Abstand genommen und Allografts und synthetische Grafts rücken zunehmend in den Fokus.

Synthetische Grafts bestehen aus verschiedenen Polymeren (81) und zeigten am Tiermodell teils verstärkte Gewebekonstruktion sowie Produktion von Kollagen II und Proteoglykanen im Sehnen/Knochen Übergang, jedoch keine Verbesserung der Funktion. Am Menschen zeigten Encalada-Diaz et. al und Ciampi et. al zufriedenstellende Ergebnisse nach Rekonstruktion vollständiger Rotatorenmanschettenrupturen mit synthetischen Scaffolds mit einer Heilungsrate von bis zu 90% bei Rupturgrößen von 1-4 cm (82,83). Eine Augmentation der Scaffolds mit Stammzellen zeigte eine vermehrte Kollagen I Produktion sowie eine erhöhte Belastbarkeit nach 16 Wochen (84). Die Ergebnisse einer zellulären Augmentation des Graftes zeigen demnach richtungsweisende und möglicherweise vielversprechende Ergebnisse. Pietschmann et. al verglichen die Histologie und biomechanischen Eigenschaften zwischen mit Stammzellen und Tenozyten augmentierten, sowie nativen Scaffolds. Eine Augmentation mit Tenozyten zeigte im Mausmodell biomechanisch und histologisch die besten Ergebnisse (85).

Allografts sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung im Bereich des Tissue Engineering. Im Bereich der vorderen Kreuzbandrekonstruktion wurde 2015 im

Rahmen einer Metaanalyse von Mascarenhas et. al (86) gezeigt, dass Allografts den Autografts nicht unterlegen sind. Studien mit dermalen extrazellulären Matrix Scaffolds, die im Rahmen arthroskopischer Rekonstruktion eingesetzt wurden, zeigten teilweise leichte funktionelle Verbesserungen. Barber et. al zeigten, dass Patienten nach arthroskopischer Single Row Naht und Augmentation mittels dermalen EZM Scaffolds nach 24 Monaten einen höheren Constant und ASES (American Shoulder and Elbow Surgeons) Score aufwiesen, sowie eine geringere Re-Ruptur Rate (87). Bond et. al berichten bei einem Follow-Up von 2 Jahren nach operativer Versorgung mit einem Graft Jacket Allograft einen mittleren Constant Score von 84, sowie eine Verbesserung der Außenrotation und Elevation und Linderung der Schmerzsymptomatik, beobachtet zu haben (88). Yoon et. al verglichen eine konventionelle Sehnennaht mit einer Patchaugmentation mit zusätzlicher Stimulation durch Stammzellen. Im Follow-Up nach einem Jahr zeigte sich hier lediglich eine geringere Re-ruptur Rate in der patchaugmentierten Gruppe, jedoch kein signifikanter Unterschied auf der visuellen Analogskala, im Simple Shoulder Test, UCLA (University of California Los Angeles) Score, ASES Score und Constant Score (89). Rhee et. al berichteten hingegen sogar von einer 75% Re-Ruptur Rate (90). Auch wenn vereinzelt gute Ergebnisse bei der Verwendung synthetischer Scaffolds in der Literatur beschrieben werden, konnte in randomisierten kontrollierten Studien noch kein signifikanter positiver Effekt durch dermale EZM Grafts bewiesen werden (48). Eine adäquate Versorgung von massiven Rotatorenmanschettendefekten bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen humane Supraspinatussehnen Allografts dezellularisiert und mit humanen Tenozyten rezellularisiert, sowie anschließend biomechanisch und histologisch untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass die Dezellularisierung und Rezellularisierung eines Supraspinatussehnen Allografts möglich ist. Die biomechanische Belastbarkeit der nativen, dezellularisierten und rezellularisierten Sehnen soll miteinander verglichen werden.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass rezellularisierte Sehnen biomechanisch belastbarer sind als dezellularisierte Sehnen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Sehnen

Die Sehnenpräparate wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Christian Braun am Institut für Rechtsmedizin der medizinischen Fakultät München entnommen. Das Alter der Spender wurde auf 18-60 Jahre festgelegt, um die Wahrscheinlichkeit bereits altersdegenerierter Sehnen zu minimieren. Alle Sehnenentnahmen erfolgten gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München und mit Einverständnis der Angehörigen der Spender.

| Geschlecht | Alter | PMI (h) | Größe (cm) | Gewicht (kg) | Serologie | SP |
|-------------------|--------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|-----------|
| W | 59 | 80 | 158 | 70 | negativ | SP1 |
| W | 52 | 41 | 168 | 60 | negativ | SP2 |
| M | 48 | 48 | 173 | 93 | negativ | SP3 |
| M | 28 | 56 | 187 | 75 | negativ | SP4 |
| W | 59 | 24 | 162 | 67 | negativ | SP5 |
| M | 40 | 29 | 190 | 70 | negativ | SP6 |
| M | 60 | 29 | 175 | 72 | negativ | SP7 |
| M | 29 | 65 | 187 | 75 | negativ | SP8 |
| M | 43 | 41 | 178 | 90 | negativ | SP9 |
| M | 53 | 27 | 177 | 86 | negativ | SP10 |

| | | | | | | |
|---|----|----|-----|-----|---------|------|
| W | 46 | 24 | 169 | 63 | negativ | SP11 |
| M | 31 | 44 | 171 | 77 | negativ | SP12 |
| M | 41 | 39 | 186 | 100 | negativ | SP13 |
| M | 51 | 58 | 167 | 103 | negativ | SP14 |
| W | 59 | 61 | 166 | 86 | negativ | SP15 |
| W | 41 | 63 | 174 | 78 | negativ | SP16 |
| M | 30 | 62 | 178 | 97 | negativ | SP17 |
| M | 32 | 54 | 186 | 98 | negativ | SP18 |
| M | 38 | 57 | 173 | 101 | negativ | SP19 |
| M | 47 | 60 | 190 | 75 | negativ | SP20 |
| W | 56 | 37 | 175 | 86 | negativ | SP21 |
| W | 51 | 31 | 177 | 74 | negativ | SP22 |
| M | 30 | 37 | 178 | 68 | negativ | SP23 |
| M | 53 | 52 | 178 | 124 | Negativ | SP24 |
| W | 24 | 40 | 170 | 46 | negativ | SP25 |

Tabelle 1: Sehnenkollektiv

3.1.2 Tenozyten

Die für die Besiedelung verwendeten humanen Tenozyten wurden bei der Firma BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland) gekauft und im Anschluss kultiviert. Sie stammen aus der Achillessehne eines 72-jährigen Donors und befanden sich vor der Kultivierung in Passage 2.

| | |
|-------------|-----------------|
| Cat# | TEN-F |
| Lot# | TENM021617C |
| Description | Human Tenocytes |
| Vials | 50 |
| Passage | 2 |
| Donor ages | 72 |
| Gender | M |
| Race | Caucasian |
| BMI | 30,54 |
| Diabetic | N |
| Smoker | N |
| Depot | Achilles |

Tabelle 2: Tenozyten Vial

3.2 Methoden

3.2.1 Studienkollektiv

Die Einschlusskriterien der entnommenen Sehnen für die Studie umfassten ein Spenderalter zwischen 18 und 60 Jahren, zur Minimierung degenerativer Schäden der Sehne, und ein maximales postmortales Intervall von 96h zum Ausschluss einer Verwesung des Gewebes. Des Weiteren waren eine negative HIV und Hepatitis Serologie des Spenderblutes, makroskopische Unversehrtheit der Sehne, Zustimmung der Spender zur Organspende für wissenschaftliche Zwecke und das Einverständnis der Angehörigen Voraussetzung zum Einschluss der Sehnen in die Studie.

Die Sehnen wurden in 3 Gruppen aufgeteilt: native Sehnen (Gruppe 1), dezellularisierte Sehnen (Gruppe 2) und rezellularisierte Sehnen (Gruppe 3). Um einen Vergleich der Gruppen mit Berücksichtigung eines möglichen Seitenunterschiedes zwischen linker und rechter Sehne zu gewährleisten, wurde die jeweiligen Gruppen nochmals wie in folgender Tabelle beschrieben aufgeteilt:

| Sehnenpaar | Nativ | Dezellularisiert | Rezellularisiert |
|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| SP1 | R | L | / |
| SP2 | R | L | / |
| SP3 | L | R | / |
| SP4 | L | R | / |
| SP5 | R | L | / |
| SP6 | L | R | / |

Material und Methoden

| | | | |
|------|---|---|---|
| SP7 | L | R | / |
| SP8 | R | L | / |
| SP9 | R | / | L |
| SP10 | L | / | R |
| SP11 | L | / | R |
| SP12 | R | / | L |
| SP13 | R | / | L |
| SP14 | L | / | R |
| SP15 | R | / | L |
| SP16 | L | / | R |
| SP17 | / | L | R |
| SP18 | / | L | R |
| SP19 | / | R | L |
| SP20 | / | L | R |
| SP21 | / | L | R |
| SP22 | / | R | L |
| SP23 | / | R | L |
| SP24 | / | R | L |

Tabelle 3: Analysegruppen im Seitenvergleich

Sehnenpaare 1-8 wurden randomisiert auf die Gruppen 1 und 2 aufgeteilt. Sehnenpaare 9-16 wurden in die Gruppen 1 und 3 aufgeteilt und Sehnenpaare 17-24 wurden in die Gruppen 2 und 3 aufgeteilt. Alle Parameter der Biomechanik und Histologie wurden für alle drei Gruppen einzeln analysiert und als gesamtes miteinander verglichen. Die Unterschiede zwischen den linken und rechten

Sehnen in den jeweiligen Gruppen wurden analysiert. Zudem erfolgte auch die Parameteranalyse zwischen Sehnen männlicher und weiblicher Probanden in den jeweiligen Gruppen. Im Verlauf wurden 5 Sehnen der rezellularisierten Gruppe aufgrund von Kontamination und 2 Sehnen der Kontrollgruppe aufgrund eines biomechanischen Testabbruchs ausgeschlossen.

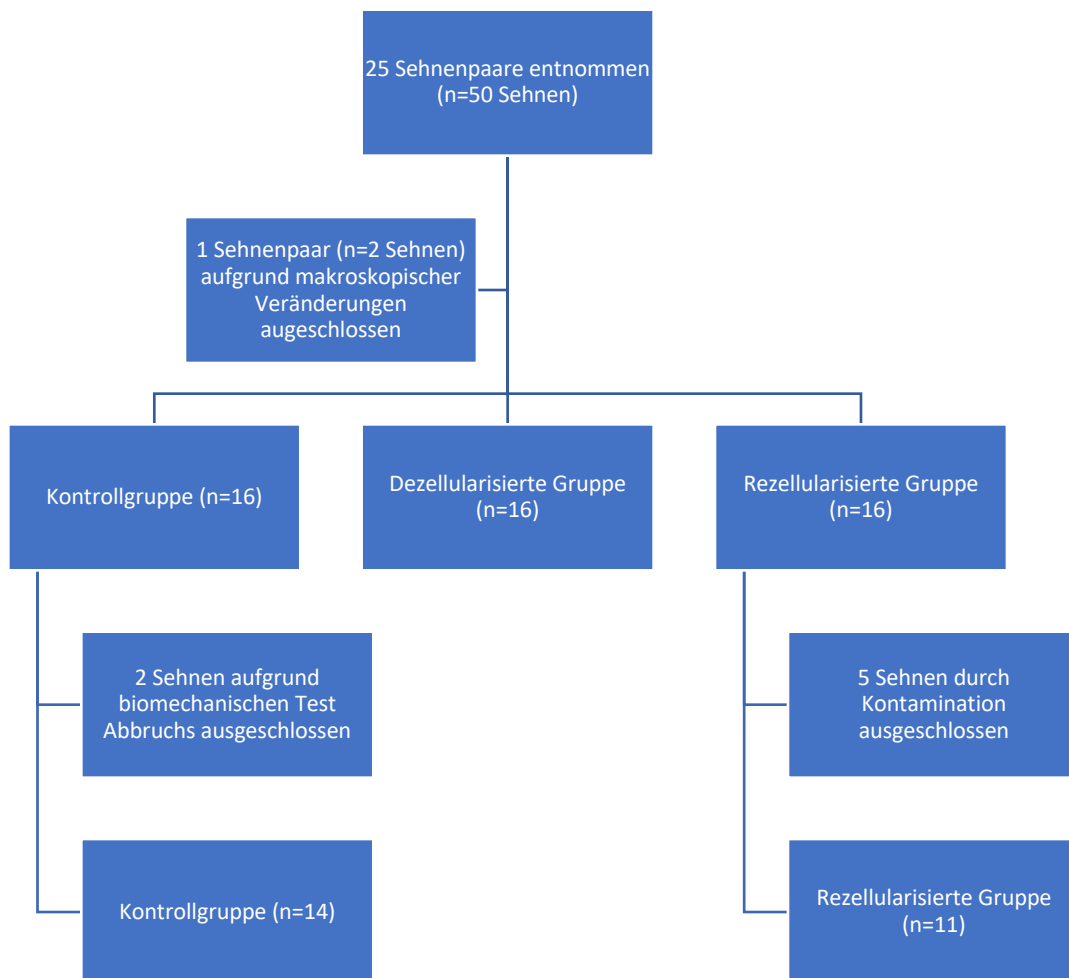


Abbildung 3 Flussdiagramm zur Entstehung des Studienkollektivs

3.2.2 Entnahme der Präparate

Ein anterolateraler Zugang wurde gewählt und der M. deltoideus schichtweise freipräpariert. Es erfolgte die Spaltung der Muskelfaszie und des M. deltoideus. Anschließend wurde das Lig. coracoacromiale durchtrennt und das

Acromioclaviculargelenk freigelegt. Im Rahmen einer Inzision der Gelenkkapsel wurden der M. biceps brachii ansatznah, proximal des Sulcus intertubercularis, und des M. subscapularis durchtrennt. Nach Freipräparieren des Humeruskopfes wurde die Sehne des M. supraspinatus am Ansatz des Tuberculum majus abgesetzt. Im folgenden Schritt wurde die Gelenkkapsel vom Glenoid getrennt und der M. supraspinatus zusammen mit dem M. infraspinatus an ihren Muskelbäuchen in der Tiefe durchtrennt. Der M. infraspinatus wurde anschließend vom M. supraspinatus getrennt. Die Präparate wurden in beschrifteten 50ml Falcons umgehend bei -80°C eingefroren und bis zum weiteren Vorgehen eingelagert. Das Freipräparieren der Sehnen von Fett und Muskel erfolgte unmittelbar vor den Versuchen nach dem Auftauen der Sehnen.



Abbildung 4 Schultergelenk nach Entnahme der Supraspinatussehne

3.2.3 Dezellularisierung

Die Vorbereitung auf die Dezellularisierung beinhaltete das Auftauen der Sehnen über Nacht in einem Kühlschrank bei +4°C. Dies erfolgte unter Hinzugabe von mit Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B versetzten Zellkulturmedium, um mögliche Erreger zu eliminieren. Die Dezellularisierung erfolgte adaptiert an ein publiziertes Protokoll (91). Die aufgetauten Sehnen wurden im ersten Schritt in 70% Ethanol gewaschen, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern und anschließend mit PBS wieder rehydriert. Danach erfolgten 5 Zyklen des Einfrierens und Auftauens. In jedem Zyklus wurden die Präparate 2 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend 10 Minuten in 37°C warmen PBS aufgetaut. Dies führt zur Auflockerung und zum Aufplatzen der Zellverbände und Zellmembranen. Das Einfrieren erfolgte in einem geeigneten Kryobehälter. Das PBS wurde in sterilen 250ml Labor-Glasflaschen in einem Wasserbad auf 37°C erhitzt. Im Folgenden erfolgte eine Inkubation der Sehnen in sterilen 500ml Labor-Glasflaschen bei Raumtemperatur auf einem Shaker (Certomat MO II, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) für 48h in sterilem destilliertem H₂O, gefolgt von einer Inkubation mit 1M NaCl Lösung für 72h bei gleichen Bedingungen. Anschließend erfolgte das Waschen der Sehnen mit PBS (2x 15 Minuten auf dem Shaker) und erneut zwei 24-stündige Inkubationsperioden jeweils mit Medium (DMEM + FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) und PBS. Die Sehnen wurden einzeln auf die sterilen Flaschen verteilt und von jeder Substanz wurden pro Flasche 50ml zur Inkubation hinzugegeben. Alle 24h wurden die Substanzen erneuert. Die Verwendung des Shakers spielt in diesem Schritt eine entscheidende Rolle, um die Zellen möglichst effizient aus dem Gewebe zu waschen.

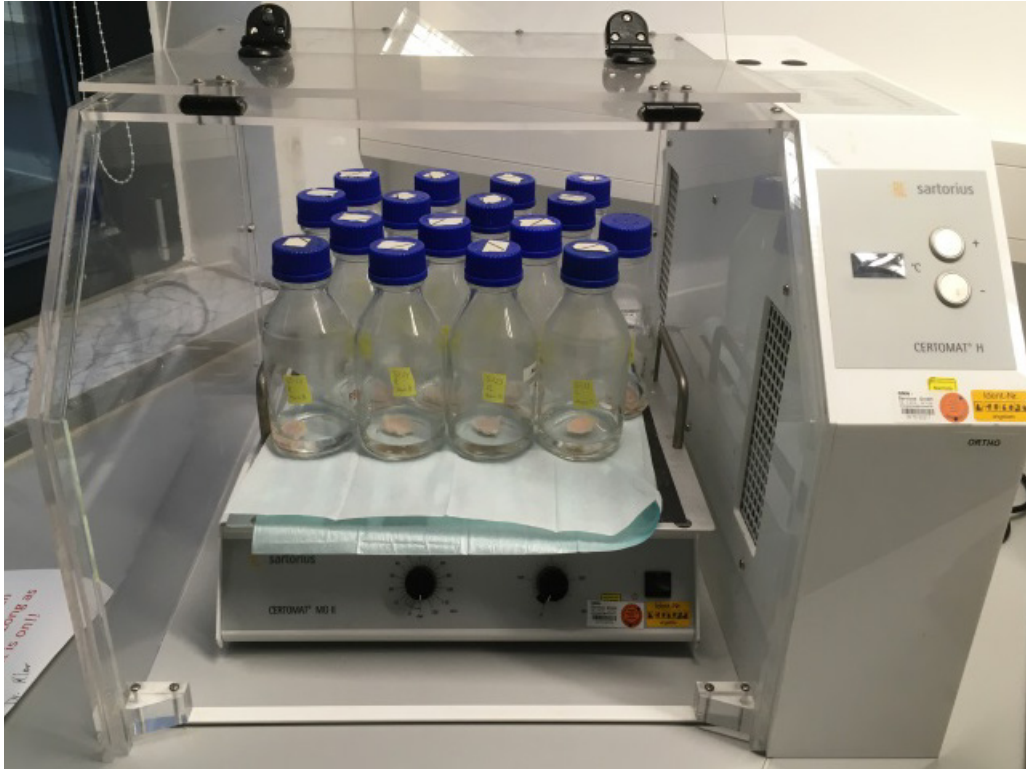


Abbildung 5 Inkubation der Sehnen auf dem Shaker

3.2.4 Zellkultur

Die in der Zellkultur angewandten Verfahren der Inkubation und Zentrifugation erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, immer unter den selben Bedingungen. Die Inkubation erfolgte stets bei 37°C, 5% CO₂ Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zentrifugation wurde stets mit 1500 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 5 Minuten durchgeführt. Die Kultivierung der Tenozyten und das Wechseln oder Hinzufügen von Medium oder anderen Substanzen erfolgte standardgemäß unter einer sterilen Werkbank.

Das zur Kultivierung der Tenozyten verwendete Medium war stets ein speziell für Tenozyten geeignetes Medium. Dieses wurde aus 500ml DMEM, 10% FCS, 3ml Penicillin/Streptomycin und 2mM L-Glutamin hergestellt.

Die gekauften und in Stickstoff (-195°C) gelagerten Tenozyten in Passage 2 wurden zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit Medium verdünnt. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert und die Überstandslösung verworfen. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde in Zellkulturflaschen (175 cm²) mit speziellem Medium für Tenozyten kultiviert. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums. Dabei wurde das alte Medium abpipettiert, die Zellen einmalig mit sterilem PBS gewaschen und anschließend neues Medium hinzugegeben. Alle 2 Tage erfolgte auch die lichtmikroskopische Kontrolle der Zelldichte in den Kulturflaschen. Anschließend wurde die Inkubation fortgesetzt. Ab einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, Trypsin/EDTA hinzugegeben und anschließend für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung führt zu einer enzymatischen Verdauung, wobei das Trypsin die Zell-Zell-Verbindung löst und das EDTA vorwiegend die Zellen vom Kulturflaschenboden ablöst (Detachment). Die Zellen lagen nach 5-minütiger Inkubation einzeln in der Lösung vor. Dieser Vorgang wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Im Folgenden wurde Medium hinzugefügt, um die enzymatische Reaktion zu unterbrechen. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein Gefäß pipettiert und bei 1500 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten abzentrifugiert. Die übrige Flüssigkeit wurde verworfen und das Zellpellet mit neuem Medium erneut in Kulturflaschen (175 cm²) ausgesät.

Die Bestimmung der Zellzahl/ml wurde mittels einer Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch durchgeführt. Hierzu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Die Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen erfolgte anhand der Farbstoffaufnahme. Vitale Zellen mit intakter

Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf, wohingegen tote Zellen mit defekter Zellmembran sich blau anfärben lassen. Die Zellen wurde in allen 4 sichtbaren Quadranten eines Hämozytometers gezählt und addiert und die Gesamtzahl mit folgender Formel berechnet: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl}/4 \times \text{Vf} \times 10^4$ (Vf = Verdünnungsfaktor = 2).

Das Einfrieren der Tenozyten erfolgte jeweils nach den oben beschriebenen Passagieren und Zentrifugieren. Dem übriggebliebenen Zellpellet wurden 1,5ml Einfriermedium, bestehend auf 70% Medium, 20 % FCS und 10% DMSO, hinzugefügt. Durch das DMSO wird die Bildung von Eiskristallen im Gefriervorgang verhindert. Die Suspension wurde in einem Kryogefäß für 24h bei -80 °C und anschließend langfristig bei -195°C im Stickstofftank gelagert.

3.2.5 Rezellularisierung

Die Wiederbesiedelung der zuvor dezellularisierten Sehnenpräparate erfolgte standardgemäß unter einer sterilen Werkbank. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank unter oben genannten Bedingungen (3.2.3).

Jedes Sehnenpräparat (n=20) wurde in einer Kulturflasche (175 cm²) platziert und Zellkulturmedium zugegeben, bis die Oberfläche der Sehne gerade noch unbedeckt war. Im nächsten Schritt wurden pro Sehne 1×10^6 Zellen auf die unbedeckte Oberfläche pipettiert und 1 Stunde gewartet, um das Anheften der Tenozyten zu gewährleisten. Dasselbe Procedere erfolgte nochmals nach Umdrehen der Sehne, um das Anheften auf der Rückseite zu fördern. Anschließend wurden die Kulturflaschen mit Medium aufgefüllt bis die Sehnen

vollständig von Medium umgeben waren und im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 14 Tage, alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.6 Biomechanische Testung

Alle Sehnen (n=41) wurden den biomechanischen Belastungstests unterzogen. Hierzu wurde zunächst eine Vorrichtung für ein optimiertes Einspannen der Sehne in die biomechanische Prüfmaschine Instron (ElectroPuls E10000) gebaut. Vier 1,5cm breite und 8cm lange Aluminiumplatten wurden gefräst und an den jeweiligen Enden Löcher gebohrt. Diese dienten dazu jeweils zwei Platten mit Schrauben und Kontermutter aneinander zu ziehen, um der Sehne Halt zu geben. Zusätzlich wurde mit doppelseitigem Klebeband eine Schmirgelpapieroberfläche angeheftet, um den Griff der Sehne zu verbessern und ein Verrutschen während des Versuches zu vermeiden.

Die Sehnen wurden in Zugrichtung mit je 0,5cm in die Platten eingespannt, die Schrauben festgedreht. Diese Vorrichtung wurde in der Instron eingespannt. Mittels 6,3-12,7mm 40 TPI Blöcke wurde die Vorrichtung mit 2bar komprimiert. Zu Beginn wurde eine Vordehnung mit 150 Zyklen bei 12N mit 0,1mm Amplitude und 0,5 Hz Frequenz durchgeführt. Anschließend wurde der Zug auf die Sehnenenden mit 0,05mm/s gesteigert, bis sich im Kraft-Zeit Diagramm ein definitiver Abfall der Newtonzahl zeigte. Ein Rutschen der Sehne aus der Vorrichtung wurde nicht beobachtet.

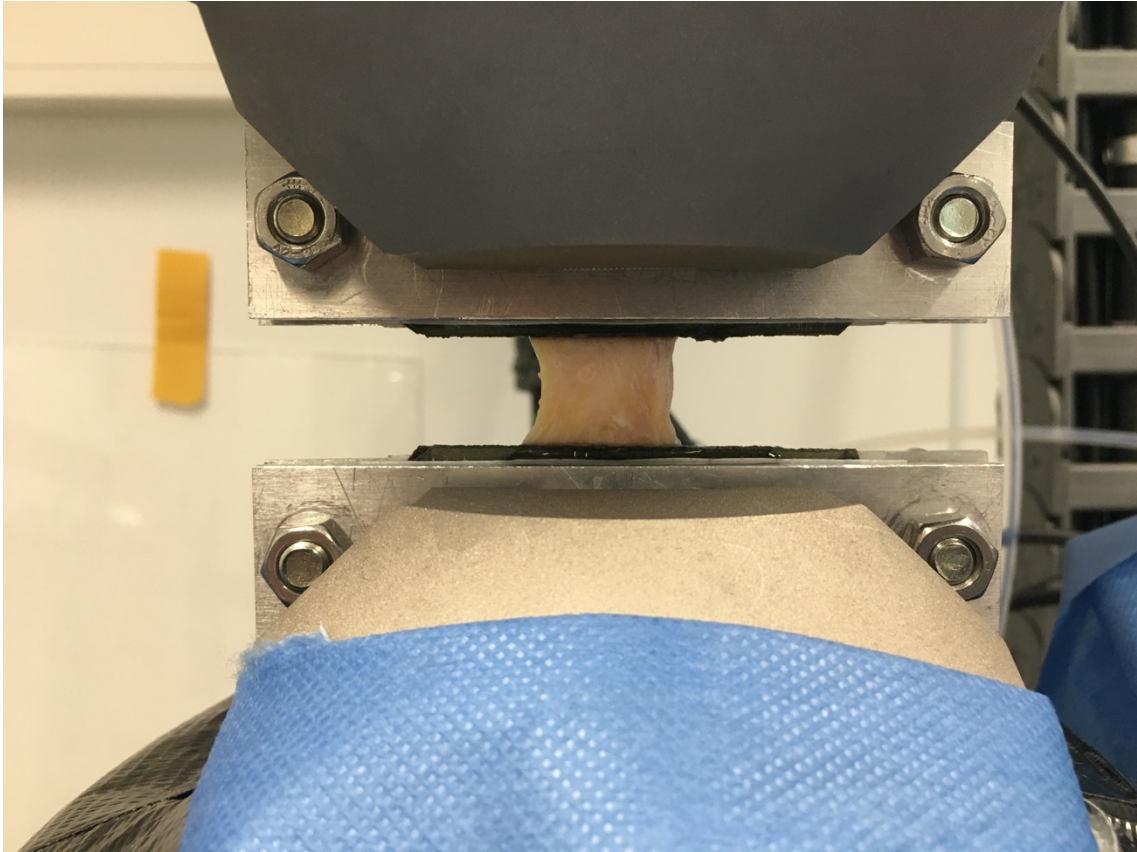


Abbildung 6 Biomechanische Testung an der Instron

Analysiert wurden der „Load to Failure“, definiert als die maximale Kraft in Newton, welcher eine Sehne standhält. Das Aufzeichnen der Diagramme und die Analyse erfolgten mittels des Programmes WaveMatrix (Instron), wie in Abbildung 7 zu sehen ist.

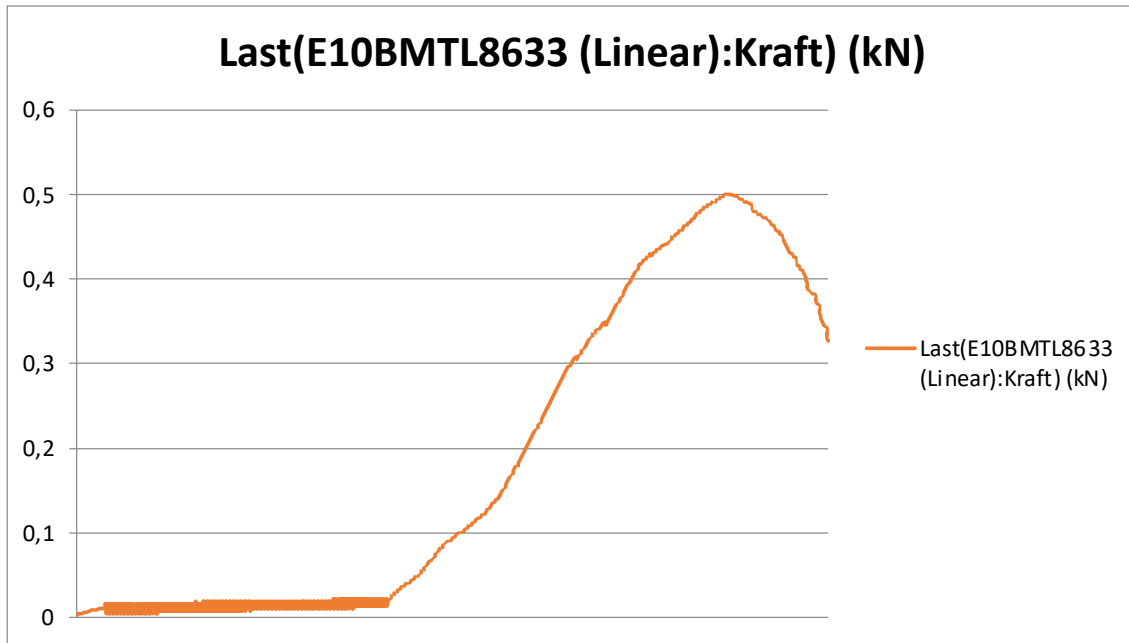


Abbildung 7 Beispiel eines Belastungsdiagramms „Load to failure“

3.2.7 Histologie (Hämatoxylin-eosin Färbung, Elastica-van-Gieson Färbung)

Die Histologie der Sehnen wurde jeweils nach erfolgter biomechanischer Testung untersucht. Es wurden von jedem Präparat zwei Blöcke angefertigt, jeweils einer in Quer- und in Längsrichtung der Sehne. Die Sehnen wurden auf eine adäquate Größe präpariert und mittels Spin Tissue Processor STP 120 (Especialidades Médicas MYR, S.L., Tarragona, Spanien) in auf- und absteigender Ethanolreihe (70%-100%), Histo SAV und Paraffin entwässert. An der Einbettungsstation (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Paraffinblöcke der Präparate angefertigt. Im Anschluss wurden 9 aufeinanderfolgende Schnitte je Präparat angefertigt und die Färbungen in HE und Elastica-van-Gieson durchgeführt. Die Bestimmung der Sehnenmorphologie, bezüglich ihrer Kollagenstruktur und der Zellanzahl erfolgte

über das Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Hierbei stellten sich in der Elastica-van-Gieson Färbung Kollagenfasern rot und Zytoplasma sowie Muskelgewebe gelb dar. In der Hämatoxylin Eosin Färbung kommen die extrazelluläre Matrix rosafarben und die Zellkerne blau-violett zur Darstellung. Die Präparate wurden alle eingescannt und digitalisiert. Die Zellzählung erfolgte unabhängig durch zwei wissenschaftliche Mitarbeiter mittels ViewPoint (PreciPoint GmbH).

3.2.8 Statistik

Die Statistik wurde mit der GraphPad Prism 9.4.0 Software gerechnet. Die Werte der biomechanischen und histologischen Ergebnisse wurden in einem ersten Schritt auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Die weiteren Analysen erfolgten bei vorliegender Normalverteilung in allen Gruppen mittels T-test und One-way ANOVA. Die post-hoc Analyse wurde mittels Turkey's multiple comparison Test durchgeführt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

Es wurde insgesamt 41 Sehnen von 24 Spendern analysiert (Kontrollgruppe n=14, dezellularisierte Gruppe n=16, rezellularisierte Gruppe n=11). 9 Spender waren weiblich, 15 waren männlich. Das mittlere Alter der Spender betrug $45,4 \pm 11,5$ Jahre in der nativen, $44,1 \pm 12,5$ Jahre in der dezellularisierten und $45,6 \pm 10,7$ Jahre in der rezellularisierten Gruppe. Die durchschnittliche Größe betrug $174,3 \pm 9,5$ cm in der nativen, $176,7 \pm 9,6$ cm in der dezellularisierten und $175,7 \pm 7,2$ cm in der rezellularisierten Gruppe. Das Durchschnittsgewicht der nativen, dezellularisierten und rezellularisierten Gruppen lag respektive bei $79,5 \pm 13,3$ kg, $78,4 \pm 18,5$ kg und $81,4 \pm 19,9$ kg. Das mittlere postmortale Intervall betrug in den jeweiligen Gruppen $46,9 \pm 17,3$ h (nativ), $46,3 \pm 15,4$ h (dezellularisiert) und $43,5 \pm 13,8$ h (rezellularisiert). Bezüglich des durchschnittlichen Alters, Größe, Gewichts und postmortalen Intervalls zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$). Hinsichtlich des Geschlechtes stammten in der nativen und dezellularisierten Gruppe jeweils 6 Sehnen von weiblichen und 10 Sehnen von männlichen Spendern und in der rezellularisierten Gruppe 6 Sehnen von weiblichen, sowie 5 Sehnen von männlichen Spendern.

| | Nativ | Dezellularisiert | Rezellularisiert |
|---------------|-----------------|------------------|------------------|
| Alter (Jahre) | $45,4 \pm 11,5$ | $44,1 \pm 12,5$ | $45,6 \pm 10,7$ |
| Größe (cm) | $174,3 \pm 9,5$ | $176,7 \pm 9,6$ | $175,7 \pm 7,2$ |

| | | | |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Gewicht (kg) | 79,5 ± 13,3 | 78,4 ± 18,5 | 81,4 ± 19,9 |
| Postmortales Intervall (h) | 46,9 ± 17,3 | 46,3 ± 15,4 | 43,5 ± 13,8 |

Tabelle 4 Übersicht der deskriptiven Statistik in den jeweiligen Gruppen

4.2 Histologie

4.2.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

In der histologischen Analyse der Präparate zeigte sich in der Hämatoxylin-eosin Färbung bei den nativen Sehnen eine typische Struktur eines zellreichen Sehngewebes. Die extrazelluläre Matrix stellt sich rosafarben dar, während die Zellen bläulich violett dargestellt sind. Das Gewebe ist stark mit Zellen durchsät mit einem mittleren Zellvorkommen von 156 Zellen / mm².

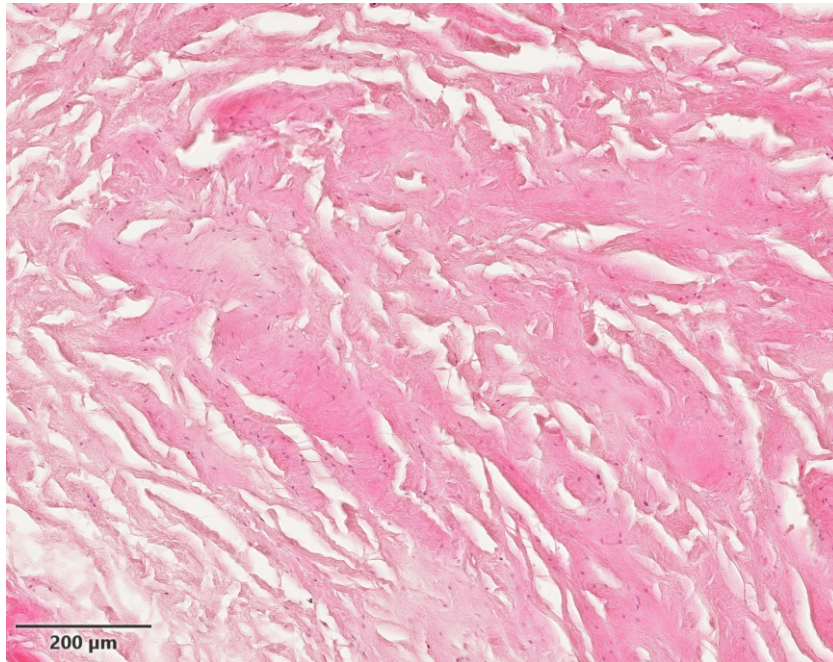


Abbildung 8 Hämatoxylin-eosin Färbung einer nativen Sehne

Die histologische Analyse der dezellularisierten Präparate zeigte keine Hinweise auf verbliebenes Zellmaterial und somit eine vollständige Dezellularisierung des Sehnengewebes. Die extrazelluläre Matrix zeigt sich im Vergleich zu dem nativen Sehnengewebe leicht gelockert, jedoch weitestgehend intakt ohne signifikante strukturelle Veränderungen.

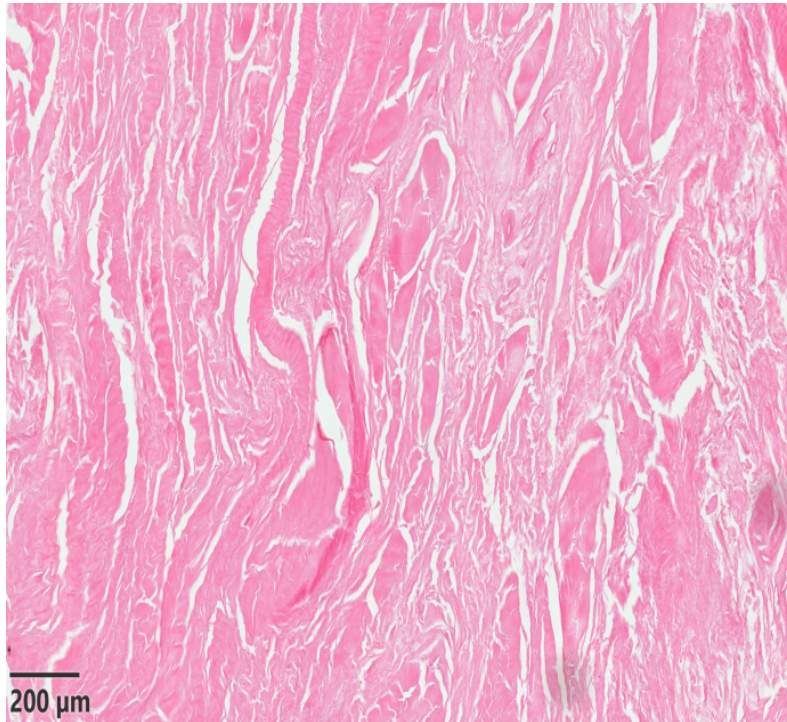


Abbildung 9 Hämatoxylin-eosin Färbung einer dezellularisierten Sehnen

Die rezellularisierten Sehnen weisen in der Struktur der extrazellulären Matrix keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen auf. Eine Wiederbesiedelung der Oberfläche der Präparate war nach 14 Tagen zu beobachten. Ein Einwandern der Zellen in die Binnenstruktur der Sehne ist nicht beobachtet worden. Die mittlere Zellzahl auf den Sehnen nach Besiedelung mit 1 Million Tenozyten pro Sehne und 14-tägiger Bebrütung betrug 2 Zellen / mm².

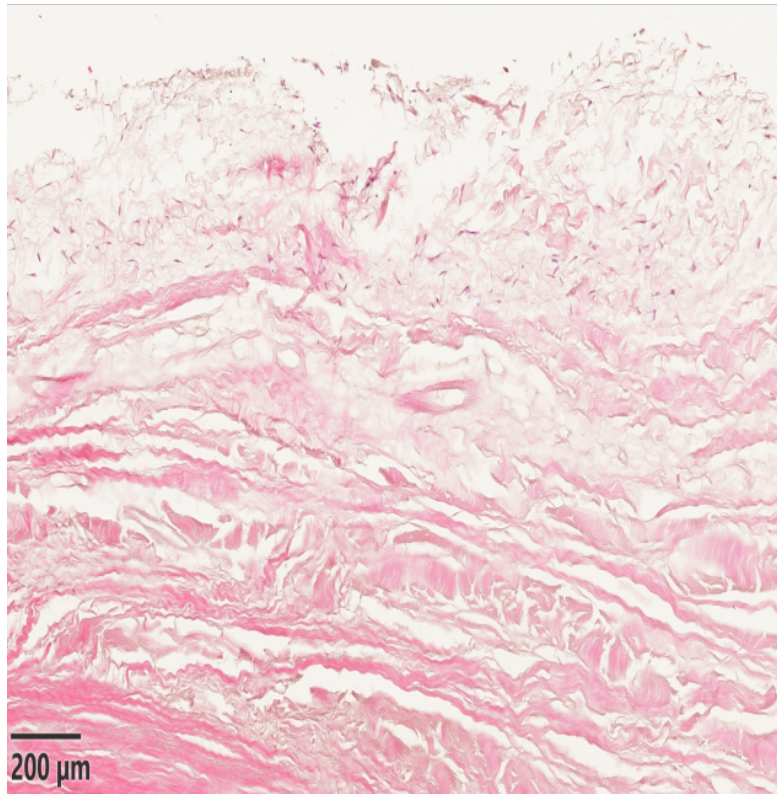


Abbildung 10 Hämatoxylin-eosin Färbung einer rezellularisierten Sehne

Der Unterschied zu den nativen und den dezellularisierten Präparaten ist damit statistisch signifikant. Die nativen Präparate weisen eine statistisch signifikant höhere Zellzahl auf als die dezellularisierten und rezellularisierten Präparate ($p < 0,01$). Die rezellularisierten Präparate weisen eine statistisch signifikant höhere Zellzahl als die dezellularisierten Präparate auf ($p < 0,01$).

4.2.2 Elastica-van-Gieson Färbung

In der histologischen Analyse der Elastica-van-Gieson Färbung zeigt sich das Kollagen rot und das umgebende Gewebe gelb. Eine leichte Auflockerung der Struktur in der dezellularisierten und rezellularisierten Gruppen sind zu

beobachten. Eine vermehrter Kollagenanteil nach Rezellularisierung lässt sich anhand der histologischen Bilder nicht identifizieren.



Abbildung 11 Elastica-van-Gieson Färbung einer nativen Sehne



Abbildung 12 Elastica-van-Gieson Färbung einer dezellulierten Sehne

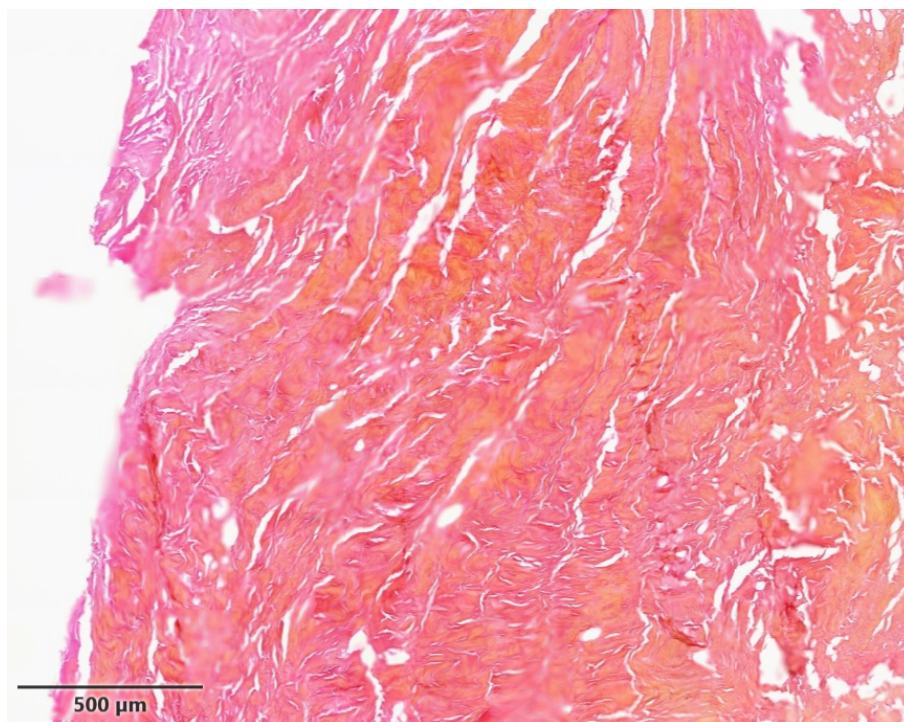


Abbildung 13 Elastica-van-Gieson Färbung einer rezellulierten Sehne

4.3 Biomechanik

4.3.1 Load to Failure

Der „Load to failure“ ist die Maximallast, die eine Sehne aushält. Der Maximalwert über alle Gruppen hinweg betrug 661 N, der Minimalwert 82 N. Der durchschnittliche „Load to failure“ betrug 446N (± 137 N) in der nativen Gruppe, 361N (± 156 N) in der dezellularisierten Gruppe und 406N (± 113 N) in der rezellularisierten Gruppe.

In der einfaktoriellen ANOVA Analyse der drei Gruppen im Vergleich zeigte sich in den einzelnen Unteranalysen keine Signifikanz zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

| | p-Wert |
|---------------------------------------|--------|
| Nativ und Dezellularisiert | 0,23 |
| Nativ und Rezellularisiert | 0,75 |
| Dezellularisiert und Rezellularisiert | 0,70 |

Tabelle 5 p-Werte der Vergleichsanalysen „Load to failure“ zwischen allen 3 Gruppen

Load to failure Übersicht

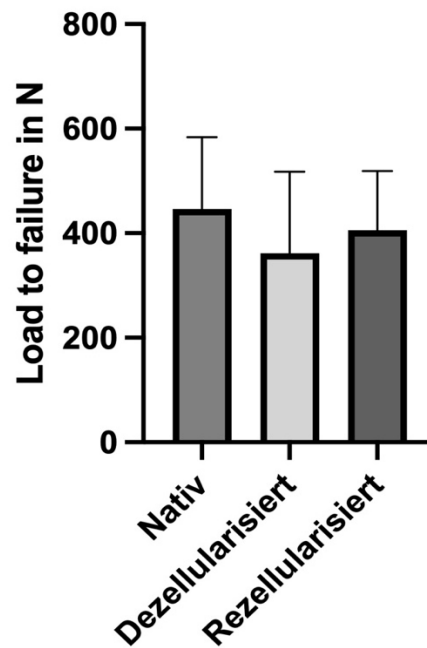


Abbildung 14 Übersicht Maximallast in allen 3 Gruppen ($p =$ nicht signifikant (n.s.))

| | Nativ | Dezellularisiert | Rezellularisiert |
|--------------------|-------|------------------|------------------|
| Mittelwert | 446,2 | 361,3 | 405,5 |
| Standardabweichung | 137,2 | 156,1 | 113,5 |
| Minimalwert | 255,0 | 82,21 | 238,8 |
| Maximalwert | 661,2 | 657,0 | 567,5 |
| n-Zahl | 14 | 16 | 11 |

Tabelle 6 Maximallast der Sehnen in allen 3 Gruppen ($p =$ n.s.)

In der Vergleichsanalyse zwischen Sehnen weiblicher und männlicher Spender zeigte sich gruppenübergreifend ein Durchschnittswert der Maximallast von 438,4N ($\pm 153,6N$) bei Sehnen männlicher Spender und 351,0N ($\pm 104,5N$) bei Sehnen weiblicher Spender. Aufgeteilt in die drei Gruppen zeigte sich bei Sehnen weiblicher Spender in der nativen Gruppe ein Mittelwert von 346,7N ($\pm 87,3N$), in der dezellularisierten Gruppe 297,6N ($\pm 80,0N$) und in der rezellularisierten Gruppe 420,4N ($\pm 125,7N$). Bei Sehnen männlicher Spender 520,9N ($\pm 121,0N$) in der nativen, 399,6N ($\pm 181,0N$) in der dezellularisierten und 393,1N ($\pm 112,8N$) in der rezellularisierten Gruppe. Eine Übersicht ist in Tabelle 7 aufgeführt.

| | Weiblich | Männlich |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| Nativ | 346,7N ($\pm 87,3N$) | 520,9N ($\pm 121,0N$) |
| Dezellularisiert | 297,6N ($\pm 80,0N$) | 399,6N ($\pm 181,0N$) |
| Rezellularisiert | 420,4N ($\pm 125,7N$) | 393,1N ($\pm 112,8N$) |
| Gesamt | 351,0N ($\pm 104,5N$) | 438,4N ($\pm 153,6N$) |

Tabelle 7 Mittelwerte Maximallast Sehnen weiblicher/männlicher Spender (Gesamt p = 0,049)

Ein gruppenübergreifender Vergleich zwischen den Sehnen männlicher und weiblicher Spender wurde mittels t-test durchgeführt. Dieser ergab eine statistisch signifikant höhere Maximallast der Sehnen männlicher Spender (p=0,049).

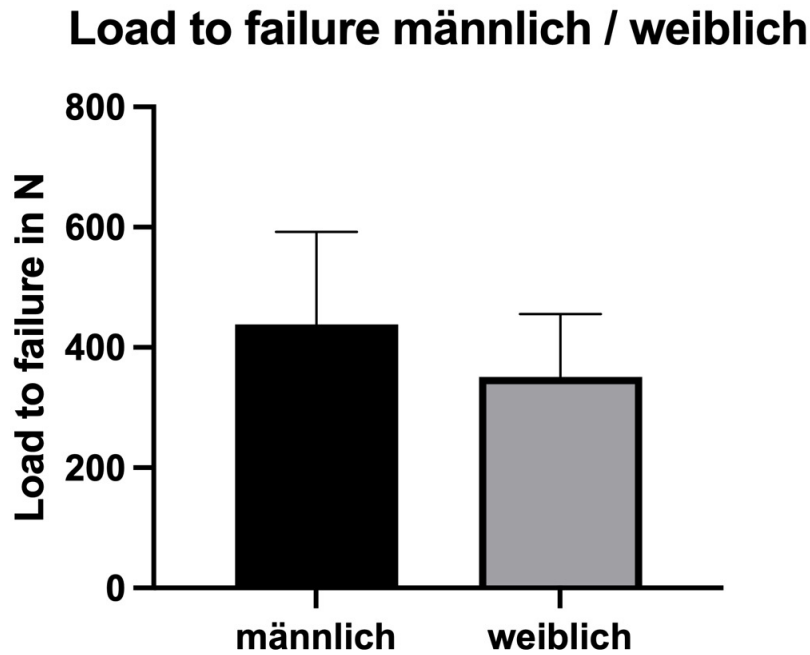


Abbildung 15 Maximallast Sehnen männlicher/weiblicher Spender ($p = 0,049$)

In der Vergleichsanalyse zwischen linken und rechten Sehnen zeigte sich gruppenübergreifend ein Durchschnittswert der Maximallast von 366,1N ($\pm 131,3N$) bei rechten und 436,5N ($\pm 144,1N$) bei linken Sehnen. Aufgeteilt in die drei Gruppen zeigte sich bei Sehnen der rechten Schulter in der nativen Gruppe ein Mittelwert von 424,1N ($\pm 140,1N$), in der dezellularisierten Gruppe 310,3N ($\pm 122,2N$) und in der rezellularisierten Gruppe 374,2N ($\pm 118,8N$). Bei Sehnen der linken Schulter 468,4N ($\pm 141,5N$) in der nativen, 412,3N ($\pm 177,1N$) in der dezellularisierten und 431,12N ($\pm 112,7N$) in der rezellularisierten Gruppe. Eine Übersicht ist in Tabelle 8 aufgeführt.

| | Rechts | Links |
|------------------|-------------------------|--------------------------|
| Nativ | 424,1N ($\pm 140,1N$) | 468,4N ($\pm 141,5N$) |
| Dezellularisiert | 310,3N ($\pm 122,2N$) | 412,3N ($\pm 177,1N$) |
| Rezellularisiert | 374,2N ($\pm 118,8N$) | 431,12N ($\pm 112,7N$) |
| Gesamt | 366,1N ($\pm 131,3N$) | 436,5N ($\pm 144,1N$) |

Tabelle 8 Mittelwerte Maximallast rechter/linker Sehnen ($p = n.s.$).

Ein gruppenübergreifender Vergleich zwischen rechten und linken Sehnen wurde mittels t-test durchgeführt. Dieser zeigte keine statistische Signifikanz zwischen beiden Gruppen ($p=0,11$)

Load to failure rechts / links

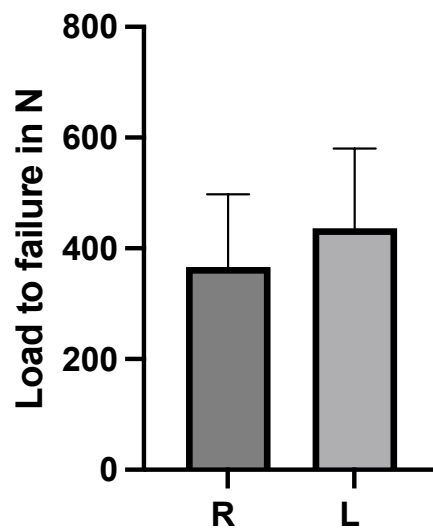


Abbildung 16 Maximallast rechter/linker Sehnen ($p = n.s.$)

5 Diskussion

Die Versorgung von massiven vor allem degenerativen Rotatorenmanschettendefekten ist trotz fortschreitender Technik, Wissenschaft und Operationsmethoden nach wie vor eine große Herausforderung. Das Tissue Engineering ist einer der wichtigsten und vielversprechendsten Ansätze zum Erreichen einer adäquaten Versorgung von großen Rotatorenmanschettendefekten. Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Engineering von humanen Allografts. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Dezellularisierung und Rezellularisierung von humanen Supraspinatussehnenallografts durchgeführt werden. Dies diente der Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften von nativen, dezellulierten und mit humanen Tenozyten rezellulierten Sehnen.

Im Rahmen der histologischen Auswertung konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass eine vollständige Dezellularisierung der Allografts mit gutem Erhalt der extrazellulären Matrix möglich ist. Die histologische Auswertung zeigte zudem eine oberflächliche Rezellularisierung der Sehne, jedoch ohne Eindringen der Zellen in die Tiefen. Insgesamt zeigt sich eine geringe Zellzahl und Dichte der rezellulierten Sehnen. Biomechanisch waren die rezellulierten Sehnen im Mittelwert tendenziell belastbarer als die dezellulierten Sehnen. Im Mittelwert waren die nativen Sehnen tendenziell am belastbarsten. Diese Unterschiede waren aber nicht statistisch signifikant. Sehnen von männlichen Spendern waren biomechanisch signifikant belastbarer als Sehnen von weiblichen Spendern.

5.1 Diskussion der Methoden

Ein wichtiger zu berücksichtigender Aspekt dieser Studie ist die Verwendung von humanen Supraspinatussehnen Allografts. In der Literatur sind ähnliche Versuche hinsichtlich der Dezellularisierung und Revitalisierung mit anschließenden biomechanischen und histologischen Auswertungen beschrieben (91–94), welche meist mit langen Flexorensehnen durchgeführt wurden. Diese sind hinsichtlich Größe und Faserverlauf einfacher zu standardisieren. Die Supraspinatussehne lässt sich aufgrund der Konfluenz mit der Gelenkkapsel und der Infraspinatussehne nicht eindeutig isoliert entnehmen, was eine Standardisierung der Präparate hinsichtlich der Größe und Länge erschwert.

Um eine humane zur Transplantation geeignete azelluläre EZM herzustellen, muss diese zunächst dezellularisiert werden, ohne die Architektur der EZM zu gefährden (95). Die biomechanischen Eigenschaften des Allografts sind maßgeblich von dem bestmöglichen Erhalt der EZM durch den Dezellularisierungsprozess abhängig, weshalb dieser Schritt eine große Rolle in der Herstellung von biologischen Scaffolds einnimmt. In einem systematischen Review zu Dezellularisierungsmethoden von Blaudez et al. fällt auf, dass in den meisten Studien chemische Substanzen wie SDS (Sodium dodecyl Sulfat) oder enzymatische Substanzen wie Trypsin EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) zum Einsatz kommen (96–98). Die Substanzen entfernen effizient und vollständig Zellen aus dem Sehnengewebe, jedoch schädigen sie durch ihre Toxizität die GAG's und die Kollagenstruktur der EZM (96). In Studien zeigte sich eine anschließende Rezellularisierung von Allografts durch mögliche toxische

Reste der Substanz und Zerstörung der Struktur und Bindungsintegrität erschwert (99). Enzymatische Substanzen wie Trypsin oder Nucleasen führen zu einer teilweise bis vollständigen Dezellularisierung mit gutem Erhalt der Matrix (100) müssen jedoch häufig mit chemischen Substanzen kombiniert werden um die Zellmembran zu brechen (101). Weiterhin können bei längerer Exposition auch enzymatische Substanzen die EZM beschädigen (102). Physikalische Prozesse wie das wiederholte Auftauen und Einfrieren von Gewebe zerstört zwar die Zellarchitektur und führt zur Zellyse (103), muss jedoch mit einer Chemikalie oder enzymatischen Substanz kombiniert werden, um die Zellen aus dem Gewebe auszuschwemmen (104). Roth et al. (105) führten eine Kombination aus chemischen und thermischen Methoden durch. Die thermische Methode erzielte hierbei eine Zerstörung der Zellarchitektur ohne starke Schädigung der EZM. Das Ausschwemmen der Zellen erfolgte im Anschluss mit chemischen Substanzen. In einer Studie von Aeberhard et al. (91) wurden an equinen Flexorensehnen Zellen mittels hypermolarer Salzlösung ausgeschwemmt. Die Zellen wurden nahezu vollständig ausgeschwemmt und die EZM, im Vergleich zur Anwendung chemischer Substanzen, geschont. Die vorliegende Arbeit kombinierte die thermische Methode zum Aufplatzen der Zellverbände mit der Ausschwemmung der Zellen mittels hypermolarer Salzlösung, was eine effektive Zerstörung der Zellarchitektur und gründliche Ausschwemmung der Zellen bei gleichzeitiger Schonung der extrazellulären Matrix ermöglichte. Ein Einsatz chemischer und enzymatischer Substanzen, welche der extrazellulären Matrix schaden und bei einer Wiederbesiedelung zytotoxisch wirken können, wurde dadurch vollständig umgangen.

Die Revitalisierung kann mit verschiedenen Zellen erfolgen, unter anderem mit Tenozyten, Fibroblasten und Stammzellen. In einer Studie von Pietschmann et al. konnte die Überlegenheit von Tenozyten gegenüber Fibroblasten und Stammzellen bewiesen werden (85). Weiterhin ist bei Tenozyten die Differenzierung bereits abgeschlossen. Fibroblasten hingegen sind stark teilungsaktiv und einfach zu generieren, müssen jedoch ähnlich wie die mesenchymalen Stammzellen, die Differenzierung noch durchlaufen. Aus diesem Grund wurden Tenozyten für die Rezellularisierung verwendet. Das Alter der gespendeten Tenozyten spielt eine wesentliche Rolle, da Tenozyten junger Spender eine höhere metabolische Aktivität aufweisen und dadurch vermehrt extrazelluläre Matrix produzieren als alte Tenozyten (4). Die in dieser Studie verwendeten Tenozyten stammen von einem 72-jährigen Donor und weisen somit eine geringe metabolische Aktivität auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Rezellularisierung mittels oberflächlicher Besiedelung der Sehnen mit 1×10^6 Zellen/cm² und einer Bebrütungszeit von 14 Tagen durchgeführt, was zu einem adäquaten, jedoch oberflächlichen Anheften der Zellen führt (94). Bei Sehngewebe handelt es sich um eine sehr dichte Struktur, was ein Einwachsen der Zellen in die Tiefe erschwert. Alternativen mittels Hydrogelinjektion ins Gewebe sind in der Literatur bereits beschrieben, diese führten jedoch nur zu einer punktuellen Anreicherung der Zellen in der Sehne (96). Eine geeignete Methode die Zellen flächendeckend in der Sehnenstruktur unterzubringen, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Zur biomechanischen Testung der Sehnen wurden eigens für diese Arbeit Aluminiumplatten mit einer rauen Oberfläche entworfen, um einen besseren Halt

der Sehne zu gewährleisten und ein Rutschen der Sehnen zu vermeiden. Die Supraspinatussehne hat einen sehr kurzen Faserverlauf und somit wenig Verankerungstrecke, weshalb herkömmliche Verfahren nicht zuverlässig umzusetzen sind. In der Literatur werden Sehnen zur biomechanischen Testung in den meisten Studien in Aluminiumklemmen eingespannt und auf Zug gebracht. Viele zu diesem Thema durchgeführten Studien befassen sich jedoch mit langen Sehnen, welche eine entsprechend lange Verankerungstrecke aufweisen (91,106–108). Eine weitere mögliche Methode zum Einspannen von Sehnen, stellt die thermische Befestigung an Klemmen mit Stickstoff dar. Biomechanisch zeigten Schöttle et al. eine erhöhte Belastbarkeit der Sehnen im Vergleich zu einer Naht oder Aluminiumklemmen, jedoch auch eine erhöhte Versagensrate (107). Des Weiteren ist ein Einspannen der Sehnen mittels Nähten in der Literatur beschrieben, welches jedoch zu einem früheren Ausreißen der Sehnen führt (107). Zusammenfassend ist denkbar, dass die Methodik des Einspannens der Sehnen die biomechanischen Ergebnisse beeinflussen kann.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Histologisch zeigte sich in der HE-Färbung eine vollständige Dezellularisierung der Supraspinatussehnenpräparate mit leichter Auflockerung jedoch ohne Schädigung der Sehnenstruktur. Dies ist durch die oben beschriebene schonende Dezellularisierungsmethode zu erklären. Vorausgesetzt die DNA ist dadurch vollständig eliminiert, wovon bei den angewandten Methoden auszugehen ist, würden sich die Supraspinatussehnen Scaffolds theoretisch als humane Supraspinatussehnen Allografts eignen. In der Literatur zeigen sich

vergleichbare gute Ergebnisse nach Dezellularisierung mit oben genannten Methoden. Aeberhard et al. führten eine Kombination aus thermischer sowie enzymatischer Dezellularisierung mittels hypermolarer Salzlösung an equinen langen Flexorensehnen durch mit ähnlichem gutem Ergebnis (91). Roth et al. wiesen ebenfalls ähnlich gute histologische Ergebnisse nach thermischer Dezellularisierung auf, verwendeten jedoch zusätzlich Chemikalien, was die Rezellularisierung erschweren kann (105). Quirk et al. hingegen zeigten nach ähnlicher thermischer Dezellularisierung eine signifikante Beschädigung der EZM (109). Allerdings erfolgte dies an Achillessehnen der Ratte, welche signifikant kleiner sind und ohne Applikation der hypermolaren Salzlösung.

Hinsichtlich der Revitalisierung der Allografts konnten wir zeigen, dass diese grundsätzlich an einem Supraspinatussehnen Allograft möglich ist. In den histologischen Analysen ist eine oberflächliche Besiedelung erzielt worden. Ein Einwandern der Zellen in die Tiefe der EZM wurde nicht beobachtet. Dies ist auf die dichte Gewebestruktur von Sehnen zurückzuführen und deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen mit ähnlichen Versuchen. Chong et al. beispielweise führte eine Wiederbesiedelung an langen Flexorensehnen von Hasen durch und zeigte ebenfalls eine gute oberflächliche Adhärenz und Wachstum der Zellen auf dem Scaffold, aber ohne Infiltration der tiefen Schichten (92). Bei weiteren Arbeitsgruppen zeigten sich unabhängig von der verwendeten Sehne ähnliche Ergebnisse (91,96). Woon et al. erzielte durch longitudinales Anritzen der Oberfläche zwar ein flächendeckenderes Anheften der Zellen, jedoch mit Beschränkung auf die eingekerbten Stellen (94).

Biomechanisch waren die Mittelwerte der revitalisierten Sehnen höher als die der dezellularisierten Sehnen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Sehnen männlicher Spender zeigten biomechanisch eine signifikant höhere Maximallast als Sehnen weiblicher Spender ($p = 0,049$). In der Gruppe der revitalisierten Sehnen war der Anteil an männlichen Spendersehnen geringer als in den beiden Vergleichsgruppen was möglicherweise die Ergebnisse negativ beeinflusst hat. Ein größerer gegebenenfalls auch signifikanter Unterschied ist bei gleicher Anzahl an männlichen Spendern denkbar.

Die oberflächliche Besiedelung der Sehnenmatrix mit Tenozyten scheint bereits einen möglichen leichten positiven Effekt auf die biomechanische Stabilität des Allografts zu haben. Man kann hypothetisieren, dass eine vollständige Infiltration der Zellen im Allograft zu einer großflächigeren Aktivität der Tenozyten führt. Hierdurch wäre von einer vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix auszugehen, was sich in der Elastica-van-Gieson Färbung zeigen und sich voraussichtlich auch entscheidend positiv auf die maximal tragbare Last der Sehne auswirken würde. Die biomechanischen Ergebnisse nach Rezellularisierung von Sehnenpräparaten sind in der Literatur uneinheitlich. Chong et al. berichtet eine geringere Zugfestigkeit von rezellularisierten flexoren Sehnengrafts von Hasen ($66,01 \pm 20,79$ MPa) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($50,09 \pm 14,62$ MPa) festgestellt zu haben (92). Der Inkubationszeitraum der Rezellularisierung betrug allerdings lediglich 4 Tage. Woon et al. konnte zwischen angeritzten und nicht angeritzten rezellularisierten Sehnengrafts eine signifikante bessere biomechanische Belastbarkeit zugunsten der angeritzten Sehnen feststellen. Ein Vergleich zu den dezellularisierten und nativen Sehnen wird jedoch nicht durchgeführt (94). Güngörmus et al. führten an Achillessehnen von Mäusen ein

ähnliches Experiment durch und verglichen Kontrollgruppen mit dezellularisierten und rezellularisierten Grafts. Die Arbeitsgruppe ging einen Schritt weiter und implantierte die Grafts in vivo und resezierte sie nach 24 Wochen wieder zur Reevaluation. Hier wurde ein signifikanter Unterschied zugunsten der rezellularisierten Gruppe ($99,61 \pm 3,08$ N; Kontrollgruppe $78,89 \pm 4,05$ N) nach 24 Wochen in vivo festgestellt ($p < 0,05$) (110). Diese Ergebnisse konnten wir in einem in vitro Modell hinsichtlich der humanen Supraspinatussehne nicht erzielen, eine leichte Tendenz zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften nach Rezellularisierung lässt sich jedoch vermuten.

5.3 Limitation der Studie

Für biomechanische Untersuchungen von Sehnenallografts werden meist lange Flexorensehnen verwendet aufgrund der einfacheren Möglichkeit diese auf eine Länge zu standardisieren und in den Klemmen zu verankern. Da Supraspinatussehnen kurz sind und mit der Gelenkkapsel verwachsen, ist eine Standardisierung auf eine Länge und Isolierung der Supraspinatussehnen von der Gelenkkapsel nicht genauestens möglich, was zu einer erschwerten Vergleichbarkeit führt.

Durch die bei unserer Einspannmethode notwendige starke Kompression der Sehne in den Klemmen kommt es am Übergang zwischen dem eingespannten Teil und dem freiliegenden Teil der Sehne möglicherweise zu einem nicht unerheblichen Schaden und einer möglichen Schwächung des Sehngewebes. Aeberhard et al. entwickelten zur besseren Fixierung und somit Reduktion der

benötigten Kompression Klemmen mit einer gezackten Oberfläche (91). Dies erscheint aktuell einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen Methoden zu haben und wäre in Folgestudien zu berücksichtigen. Ob diese Methode bei kurzen und breiten Sehnen wie der Supraspinatussehne ebenso applikabel ist muss geprüft werden.

Eine weitere Limitation ist wie oben bereits erwähnt die Verwendung von Tenozyten eines 72-jährigen Donors. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivität dieser Tenozyten deutlich geringer ist als die Zellen eines jüngeren Donors. Dies kann die fehlende statistische Signifikanz zwischen den dezellularisierten und rezellularisierten Gruppen erklären.

In unserer Studie erfolgte die Wiederbesiedelung der Scaffolds in vitro mit Tenozyten über 14 Tage, wie in anderen Studien zuvor beschrieben (94). Güngörmüs et al. (110) hingegen führten eine in vivo Inkubation über 24 Wochen durch und erzielte gute Ergebnisse. Somit ist die Inkubationszeit von 14 Tagen in vitro als methodische Limitation in Erwägung zu ziehen. Eine längere Inkubation, auch in vitro, könnte möglicherweise zu einer verbesserten Rezellularisierung und biomechanischen Eigenschaften führen.

Zuletzt spielt die Fallzahl ebenfalls eine entscheidende Rolle. Viele Studien, die eine statistische Signifikanz aufweisen führten die Experimente mit Xenografts durch und haben dadurch höhere Fallzahlen erzielen können als unsere Arbeitsgruppe (92,110).

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

An einer geeigneten Therapie ausgedehnter degenerativer Rotatorenmanschettendefekte bei Patienten im hohen Alter mit schlechter Geweberegenerationsfähigkeit wird nach wie vor geforscht. Bisherige konservative und operative Ansätze bringen nicht das gewünschte Outcome. Die Defektdeckung mittels Allografts, welche mit patienteneigenen Zellen revitalisiert wurden, könnte eine gute therapeutische Möglichkeit darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Dezellularisierung und eine Rezellularisierung von humanen Supraspinatussehnenallografts erfolgreich durchgeführt werden. Biomechanisch zeigten sich die rezellularisierten Sehnen im Mittelwert belastbarer als die dezellularisierten Sehnen, diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Dies zeigt, dass die Dezellularisierung und Rezellularisierung auch in Supraspinatussehnen technisch möglich ist, dass jedoch weitere Studien für den Transfer zum Patienten notwendig sind.

Zur weiteren Verbesserung der Allografts wird an einer Revitalisierung mittels Bioreaktoren geforscht. Die zyklische mechanische Stimulation soll einen positiven Effekt auf die EZM Bildung der vorhandenen Zellen aufweisen (96). Saber et al. konnten zeigen, dass revitalisierte Allografts, die einer zyklischen mechanischen Stimulation ausgesetzt sind, eine höhere Zugfestigkeit aufweisen als die Kontrollgruppen. In vitro konnten GÜNGÖRMÜS et al. bereits eine erfolgreiche Implantation einer revitalisierten Achillessehne im Tiermodell durchführen. Diese Ergebnisse müssten zunächst mit Folgestudien reproduziert werden, lassen jedoch auf eine positive Entwicklung hoffen. Es ist nicht

undenkbar, dass mit humanen Präparaten in der Zukunft ähnliche Ergebnisse im Tissue Engineering von Sehnen erzielt werden können.

Als Alternative wird auch weiterhin an der Verbesserung synthetischer Scaffolds geforscht, welche mit patienteneigenen Zellen besiedelt werden. Diese bieten den Vorteil, dass keine Fremd-DNA vorhanden ist, welche durch chemische, enzymatische oder thermische Prozesse eliminiert werden muss. Eine Immunkompatibilität ist durch synthetische Scaffolds am ehesten zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind vielversprechend (84,85).

Tissue Engineering von Sehnen ist ein sehr komplexes und facettenreiches Thema. Die Auswahl des Allografts, die verschiedenen Dezellarisierungs- und Rezellularisierungsmethoden, sowie die Zellauswahl und die anschließende Methode der biomechanischen Testung sind alle gleichwertig wichtige zu berücksichtigende Faktoren, die zum Erfolg oder Versagen eines Allograftes führen. Ein ideales Allograft zur Deckung massiver Supraspinatussehnenendefekte gibt es noch nicht. Insgesamt zeigen sich jedoch in den letzten Jahren zunehmende Fortschritte und eine positive Entwicklung im Tissue Engineering von Sehnen.

6 Zusammenfassung

Das Vorkommen massiver degenerativer Rotatorenmanschettendefekte ist vor allem im hohen Alter häufig. Die herkömmliche Therapie besteht aus konservativen Maßnahmen wie Physiotherapie und NSAR, sowie operativen Maßnahmen, wie die Rekonstruktion mittels Naht. Probleme hinsichtlich des Outcomes beinhalten eine auf Grund des oft hohen Patientenalters vorliegende fortgeschrittene Degeneration der Sehnen. Daher wird versucht durch Tissue Engineering alternative Therapiemöglichkeiten zu erforschen. Ein Therapieansatz ist die Rezellularisierung von Sehnenallografts, mit dem Ziel diese zur Defektdeckung wieder in den Patienten einzusetzen. Im Tiermodell konnte dies bereits teilweise erfolgreich durchgeführt werden. Eine Rezellularisierung wurde auch an humanen Präparaten mit teils guten biomechanischen Ergebnissen durchgeführt.

Unser Ziel war die Dezellularisierung und Revitalisierung von humanen Supraspinatussehnen Allografts mit humanen Tenozyten sowie die anschließende biomechanische und histologische Auswertung. Es sollte gezeigt werden, dass Supraspinatussehnen Allografts biomechanisch belastbarer sind, wenn diese durch humane Tenozyten wiederbesiedelt wurden.

Im Rahmen der Studie konnten wir zeigen, dass eine schonende Dezellularisierung der Supraspinatussehnenallografts ohne starke Beschädigung der extrazellulären Matrix möglich ist. Eine Revitalisierung der Oberfläche der Sehnen war zu beobachten. Eine Infiltration der Zellen in die Tiefe wurde nicht beobachtet. Biomechanisch zeigte sich bei den rezellularisierten Allografts im

Mittelwert eine Belastbarkeit im Vergleich zu den dezellularisierten Allografts ohne statistische Signifikanz.

Im Vergleich zur vorliegenden Literatur decken sich die histologischen Ergebnisse der De- und Rezellularisierung. Andere Arbeitsgruppen erzielten ebenfalls eine auf die Allograftoberfläche begrenzte Rezellularisierung der Präparate. Hinsichtlich der Biomechanik gehen die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen weit auseinander. Es werden sowohl bessere als auch schlechtere biomechanische Eigenschaften von rezellularisierten im Vergleich zu dezellularisierten Allografts beschrieben.

Zusammenfassend konnte eine Dezellularisierung und eine Rezellularisierung von humanen Supraspinatussehnenallografts erzielt werden. Eine Tendenz zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften lässt sich erkennen. Um in Zukunft ein transplantierfähiges Supraspinatussehnenallograft zu erhalten, muss jedoch hinsichtlich der Zellauswahl, Entwicklung der Methodik und Immunkompatibilität weiter geforscht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Birk DE, Trelstad RL. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: Collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J Cell Biol.* 1986;103(1):231–40.
2. Andarawis-puri N, Flatow EL, Soslowsky LJ, Gustave O, Place LL, Sun HB, et al. Tendon Basic Science. *J Orthop Res.* 2015;33(6):780–4.
3. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sport.* 2000;10(6):312–20.
4. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sport.* 1997;7(2):55–61.
5. Milz S, Ockert B, Putz R. Tenozyten und extrazelluläre Matrix. Eine wechselseitige Beziehung. *Orthopade.* 2009;38(11):1071–9.
6. Zschäbitz A. [Structure and behavior of tendons and ligaments]. *Orthopade.* 2005 Jun;34(6):516–25.
7. Yadav H, Nho S, Romeo A, MacGillivray JD. Rotator cuff tears: Pathology and repair. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2009;17(4):409–21.
8. Galloway MT, Lalley AL, Shearn JT. The role of mechanical loading in tendon development, maintenance, injury, and repair. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2013;95(17):1620–8.
9. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech.* 2003;36(10):1529–53.
10. Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel).* 1991;142(4):306–12.
11. DeFranco MJ, Cole BJ. Current Perspectives on Rotator Cuff Anatomy. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2009;25(3):305–20.
12. Vosloo M, Keough N, De Beer MA. The clinical anatomy of the insertion of the rotator cuff tendons. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2017;27(3):359–66.
13. Kelkar R, Wang VM, Flatow EL, Newton PM, Ateshian GA, Bigliani LU, et al. Glenohumeral mechanics: A study of articular geometry, contact, and kinematics. *J Shoulder Elb Surg.* 2001;10(1):73–84.
14. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH. 2.4 Schultergelenkmuskulatur: Rotatorenmanschette. In: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH, editors. 5., vollst. Georg Thieme Verlag KG; 2018.
15. Gomoll AH, Katz JN, Warner JJP, Millett PJ. Rotator cuff disorders: Recognition and management among patients with shoulder pain. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3751–61.
16. Oh JH, Park MS, Rhee SM. Treatment strategy for irreparable rotator cuff tears. *CiOS Clin Orthop Surg.* 2018;10(2):119–34.
17. Schmidt CC, Jarrett CD, Brown BT. Management of rotator cuff tears. *J Hand Surg Am.* 2015;40(2):399–408.
18. Moosmayer S, Smith H-J, Tariq R, Larmo A. Prevalence and characteristics of asymptomatic tears of the rotator cuff: AN ULTRASONOGRAPHIC AND CLINICAL STUDY. *J Bone Jt Surg - Br Vol.* 2009;91-B(2):196–200.
19. Tempelhof S, Rupp S, Seil R. Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders. *J Shoulder Elb Surg.* 1999;8(4):296–9.
20. Minagawa H, Yamamoto N, Abe H, Fukuda M, Seki N, Kikuchi K, et al.

- Prevalence of symptomatic and asymptomatic rotator cuff tears in the general population: From mass-screening in one village. *J Orthop.* 2013;10(1):8–12.
21. Weber S, Chahal J. Management of Rotator Cuff Injuries. *J Am Acad Orthop Surg.* 2020;28(5):e193–201.
 22. Bigliani LU, Ticker JB, Flatow EL, Soslowky LJ, Mow VC. The relationship of acromial architecture to rotator cuff disease. *Clin Sports Med.* 1991 Oct;10(4):823–38.
 23. McLean A, Taylor F. Classifications in Brief: Bigliani Classification of Acromial Morphology. *Clin Orthop Relat Res.* 2019;477(8):1958–61.
 24. Neer CS. Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res.* 1983 Mar;(173):70–7.
 25. ARMSTRONG JR. Excision of the acromion in treatment of the supraspinatus syndrome; report of 95 excisions. *J Bone Joint Surg Br.* 1949 Aug;31B(3):436–42.
 26. Löhr JF, Uhthoff HK. Epidemiologie und pathophysiologie der rotatorenmanschettenrupturen. *Orthopade.* 2007;36(9):788–95.
 27. Pandey V, Jaap Willems W. Rotator cuff tear: A detailed update. *Asia-Pacific J Sport Med Arthrosc Rehabil Technol.* 2015;2(1):1–14.
 28. Craig R, Holt T, Rees JL. Acute rotator cuff tears. *BMJ.* 2018;359(December):1–5.
 29. Shin SJ, Yun YH, Kim DJ, Yoo JD. Treatment of traumatic anterior shoulder dislocation in patients older than 60 years. *Am J Sports Med.* 2012;40(4):822–7.
 30. Simank HG, Dauer G, Schneider S, Loew M. Incidence of rotator cuff tears in shoulder dislocations and results of therapy in older patients. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2006;126(4):235–40.
 31. Uhthoff HK, Sano H. Pathology of failure of the rotator cuff tendon. *Orthop Clin North Am.* 1997;28(1):31–41.
 32. Karthikeyan S, Griffin DR, Parsons N, Lawrence TM, Modi CS, Drew SJ, et al. Microvascular blood flow in normal and pathologic rotator cuffs. *J Shoulder Elb Surg.* 2015;24(12):1954–60.
 33. Lohr JF, Uhthoff HK. The microvascular pattern of the supraspinatus tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 1990 May;(254):35–8.
 34. Codman EA, Akerson IB. The pathology associated with rupture of the Supraspinatus tendon. *Ann Surg.* 1931 Jan;93(1):348–59.
 35. Bayne O, Bateman JE, Welsch RP. Long term results of surgical repair of full thickness rotator cuff tears. *Surg Shoulder.* 1984;167–71.
 36. Snyder SJ. Arthroscopic classification of rotator cuff lesions and surgical decision making. *Shoulder Arthrosc 2nd ed Philadelphia Lippincott Williams Wilkins.* 2003;201–7.
 37. Ellman H, Gartsman GM. Arthroscopic shoulder surgery and related procedures. In 1993.
 38. Patte D. Classification of rotator cuff lesions. *Clin Orthop Relat Res.* 1990 May;(254):81–6.
 39. Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clin Orthop Relat Res.* 1994 Jul;(304):78–83.
 40. Fuchs B, Weishaupt D, Zanetti M, Hodler J, Gerber C. Fatty degeneration of the muscles of the rotator cuff: assessment by computed tomography versus magnetic resonance imaging. *J shoulder Elb Surg.* 1999;8(6):599–

- 605.
41. Thomazeau H, Rolland Y, Lucas C, Duval JM, Langlais F. Atrophy of the supraspinatus belly. Assessment by MRI in 55 patients with rotator cuff pathology. *Acta Orthop Scand*. 1996 Jun;67(3):264–8.
 42. Keener JD, Patterson BM, Orvets N, Chamberlain AM. Degenerative rotator cuff tears: Refining surgical indications based on natural history data. *J Am Acad Orthop Surg*. 2019;27(5):156–65.
 43. Cvetanovich GL, Waterman BR, Verma NN, Romeo AA. Management of the Irreparable Rotator Cuff Tear. *J Am Acad Orthop Surg*. 2019;27(24):909–17.
 44. Yian EH, Sodl JF, Dionysian E, Schneeberger AG. Anterior deltoid reeducation for irreparable rotator cuff tears revisited. *J shoulder Elb Surg*. 2017 Sep;26(9):1562–5.
 45. Kuhn JE, Dunn WR, Sanders R, An Q, Baumgarten KM, Bishop JY, et al. Effectiveness of physical therapy in treating atraumatic full-thickness rotator cuff tears: A multicenter prospective cohort study. *J Shoulder Elb Surg*. 2013;22(10):1371–9.
 46. Levy O, Mullett H, Roberts S, Copeland S. The role of anterior deltoid reeducation in patients with massive irreparable degenerative rotator cuff tears. *J shoulder Elb Surg*. 2008;17(6):863–70.
 47. Dunn WR, Kuhn JE, Sanders R, An Q, Baumgarten KM, Bishop JY, et al. 2013 Neer Award: predictors of failure of nonoperative treatment of chronic, symptomatic, full-thickness rotator cuff tears. *J shoulder Elb Surg*. 2016 Aug;25(8):1303–11.
 48. Deprés-tremblay G, Chevrier A, Snow M, Hurtig MB, Rodeo S, Buschmann MD. Rotator cuff repair: a review of surgical techniques, animal models, and new technologies under development. *J Shoulder Elb Surg*. 2016;25(12):2078–85.
 49. Colvin AC, Harrison AK, Flatow EL, Egorova N, Moskowitz A. National trends in rotator cuff repair. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2012;94(3):227–33.
 50. Lapner PLC, Sabri E, Rakhra K, Mcrae S, Leiter J, Bell K, et al. Comparing Single-Row with Double-Row Fixation. 2012;1249–57.
 51. Xu C, Zhao J, Li D. Meta-analysis comparing single-row and double-row repair techniques in the arthroscopic treatment of rotator cuff tears. *J shoulder Elb Surg*. 2014 Feb;23(2):182–8.
 52. Namdari S, Donegan RP, Chamberlain AM, Galatz LM, Yamaguchi K, Keener JD. Factors affecting outcome after structural failure of repaired rotator cuff tears. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2014;96(2):99–105.
 53. Iannotti JP, Deutsch A, Green A, Rudicel S, Christensen J, Marraffino S, et al. Time to failure after rotator cuff repair: A prospective imaging study. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2013;95(11):965–71.
 54. Neri BR, Chan KW, Kwon YW. Management of massive and irreparable rotator cuff tears. *J shoulder Elb Surg*. 2009;18(5):808–18.
 55. Lo IKY, Burkhart SS. Arthroscopic Revision of Failed Rotator Cuff Repairs: Technique and Results. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2004;20(3):250–67.
 56. Burkhart SS, Danaceau SM, Pearce CE. Arthroscopic rotator cuff repair: Analysis of results by tear size and by repair technique-margin convergence versus direct tendon-to-bone repair. *Arthroscopy*. 2001;17(9):905–12.
 57. Jo CH, Shin JS, Lee YG, Shin WH, Kim H, Lee SY, et al. Platelet-rich

- plasma for arthroscopic repair of large to massive rotator cuff tears: A randomized, single-blind, parallel-group trial. *Am J Sports Med.* 2013;41(10):2240–8.
58. Gerber C, Krushell RJ. Isolated rupture of the tendon of the subscapularis muscle. Clinical features in 16 cases. *J Bone Joint Surg Br.* 1991 May;73(3):389–94.
 59. Uthoff HK, Trudel G, Himori K. Relevance of pathology and basic research to the surgeon treating rotator cuff disease. *J Orthop Sci Off J Japanese Orthop Assoc.* 2003;8(3):449–56.
 60. Kim KC, Lee WY, Shin HD, Joo YB, Han SC, Chung HJ. Repair integrity and functional outcomes of arthroscopic repair for intratendinous partial-thickness rotator cuff tears. *J Orthop Surg.* 2019;27(2):536–41.
 61. Shon MS, Koh KH, Lim TK, Kim WJ, Kim KC, Yoo JC. Arthroscopic Partial Repair of Irreparable Rotator Cuff Tears: Preoperative Factors Associated with Outcome Deterioration over 2 Years. *Am J Sports Med.* 2015;43(8):1965–75.
 62. Galasso O, Riccelli DA, De Gori M, De Benedetto M, Orlando N, Gasparini G, et al. Quality of Life and Functional Results of Arthroscopic Partial Repair of Irreparable Rotator Cuff Tears. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2017;33(2):261–8.
 63. Oh JH, Tilan J, Chen Y-J, Chung KC, McGarry MH, Lee TQ. Biomechanical effect of latissimus dorsi tendon transfer for irreparable massive cuff tear. *J shoulder Elb Surg.* 2013 Feb;22(2):150–7.
 64. Gerber C, Rahm SA, Catanzaro S, Farshad M, Moor BK. Latissimus Dorsi Tendon Transfer for Treatment of. *J Bone Jt Surg.* 2013;95(21):1920–7.
 65. Resch H, Povacz P, Ritter E, Matschi W. Transfer of the pectoralis major muscle for the treatment of irreparable rupture of the subscapularis tendon. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2000;82(3):372–82.
 66. Chung SW, Kim JY, Kim MH, Kim SH, Oh JH. Arthroscopic repair of massive rotator cuff tears: Outcome and analysis of factors associated with healing failure or poor postoperative function. *Am J Sports Med.* 2013;41(7):1674–83.
 67. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502–8.
 68. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2259–72.
 69. Chahal J, Van Thiel GS, Mall N, Heard W, Bach BR, Cole BJ, et al. The role of platelet-rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: A systematic review with quantitative synthesis. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2012;28(11):1718–27.
 70. Warth RJ, Dornan GJ, James EW, Horan MP, Millett PJ. Clinical and structural outcomes after arthroscopic repair of full-thickness rotator cuff tears with and without platelet-rich product supplementation: A meta-analysis and meta-regression. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2015;31(2):306–20.
 71. Barber FA, Hrnack SA, Snyder SJ, Hapa O. Rotator cuff repair healing influenced by platelet-rich plasma construct augmentation. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2011;27(8):1029–35.
 72. Bergeson AG, Tashjian RZ, Greis PE, Crim J, Stoddard GJ, Burks RT.

- Effects of platelet-rich fibrin matrix on repair integrity of at-risk rotator cuff tears. *Am J Sports Med.* 2012;40(2):286–93.
73. Pandey V, Bandi A, Madi S, Agarwal L, Acharya KK V, Maddukuri S, et al. Does application of moderately concentrated platelet-rich plasma improve clinical and structural outcome after arthroscopic repair of medium-sized to large rotator cuff tear? A randomized controlled trial. *J Shoulder Elb Surg.* 2016 Aug;25(8):1312–22.
74. Hernigou P, Flouzat Lachaniette CH, Delambre J, Zilber S, Duffiet P, Chevallier N, et al. Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: A case-controlled study. *Int Orthop.* 2014;38(9):1811–8.
75. Metcalf MH, Savoie FH, Kellum B. Surgical technique for xenograft (SIS) augmentation of rotator-cuff repairs. *Oper Tech Orthop.* 2002;12(3):204–8.
76. Bryant D, Holtby R, Willits K, Litchfield R, Drosdowech D, Spouge A, et al. A randomized clinical trial to compare the effectiveness of rotator cuff repair with or without augmentation using porcine small intestine submucosa for patients with moderate to large rotator cuff tears: a pilot study. *J Shoulder Elb Surg.* 2016;25(10):1623–33.
77. Sclamberg SG, Tibone JE, Itamura JM, Kasraeian S. Six-month magnetic resonance imaging follow-up of large and massive rotator cuff repairs reinforced with porcine small intestinal submucosa. *J Shoulder Elb Surg.* 2004;13(5):538–41.
78. Walton JR, Bowman NK, Khatib Y, Linklater J, Murrell GAC. Restore orthobiologic implant: Not recommended for augmentation of rotator cuff repairs. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2007;89(4):786–91.
79. Iannotti JP, Codsi MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears: A randomized, controlled trial. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2006;88(6):1238–44.
80. Malcarney HL, Bonar F, Murrell GAC. Early inflammatory reaction after rotator cuff repair with a porcine small intestine submucosal implant: A report of 4 cases. *Am J Sports Med.* 2005;33(6):907–11.
81. Ricchetti ET, Aurora A, Iannotti JP, Derwin KA. Scaffold devices for rotator cuff repair. *J Shoulder Elb Surg.* 2012;21(2):251–65.
82. Ciampi P, Scotti C, Nonis A, Vitali M, Di Serio C, Peretti GM, et al. The benefit of synthetic versus biological patch augmentation in the repair of posterosuperior massive rotator cuff tears: A 3-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 2014;42(5):1169–75.
83. Encalada-Diaz I, Cole BJ, MacGillivray JD, Ruiz-Suarez M, Kercher JS, Friel NA, et al. Rotator cuff repair augmentation using a novel polycarbonate polyurethane patch: Preliminary results at 12 months' follow-up. *J Shoulder Elb Surg.* 2011;20(5):788–94.
84. Yokoya S, Mochizuki Y, Natsu K, Omae H, Nagata Y, Ochi M. Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 2012;40(6):1259–68.
85. Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Sievers B, Jansson V, et al. Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(1):211–20.

86. Mascarenhas R, Erickson BJ, Sayegh ET, Verma NN, Cole BJ, Bush-Joseph C, et al. Is there a higher failure rate of allografts compared with autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: A systematic review of overlapping meta-analyses. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2015;31(2):364–72.
87. Barber FA, Burns JP, Deutsch A, Labbé MR, Litchfield RB. A prospective, randomized evaluation of acellular human dermal matrix augmentation for arthroscopic rotator cuff repair. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2012;28(1):8–15.
88. Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, Burns J, Snyder SJ. Arthroscopic Replacement of Massive, Irreparable Rotator Cuff Tears Using a GraftJacket Allograft: Technique and Preliminary Results. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2008;24(4):403.e1-403.e8.
89. Yoon JP, Chung SW, Kim JY, Lee BJ, Kim HS, Kim JE, et al. Outcomes of Combined Bone Marrow Stimulation and Patch Augmentation for Massive Rotator Cuff Tears. *Am J Sports Med.* 2016;44(4):963–71.
90. Rhee SM, Oh JH. Bridging graft in irreparable massive rotator cuff tears: Autogenic biceps graft versus allogenic dermal patch graft. *CiOS Clin Orthop Surg.* 2017;9(4):497–505.
91. Aeberhard PA, Grognez A, Peneveyre C, McCallin S, Hirt-Burri N, Antons J, et al. Efficient decellularization of equine tendon with preserved biomechanical properties and cytocompatibility for human tendon surgery indications. *Artif Organs.* 2020;44(4):E161–71.
92. Chong AKS, Riboh J, Smith RL, Lindsey DP, Pham HM, Chang J. Flexor tendon tissue engineering: Acellularized and reseeded tendon constructs. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(6):1759–66.
93. Saber S, Zhang AY, Ki SH, Lindsey DP, Smith RL, Riboh J, et al. Flexor tendon tissue engineering: Bioreactor cyclic strain increases construct strength. *Tissue Eng - Part A.* 2010;16(6):2085–90.
94. Woon CYL, Farnebo S, Ph D, Schmitt T, Kraus A, Megerle K, et al. Human Flexor Tendon Tissue Engineering: Revitalization of Biostatic Allograft Scaffolds. 2012;18:2406–17.
95. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(12):3233–43.
96. Blaudez F, Ivanovski S, Hamlet S, Vaquette C. An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. *Methods.* 2019;(April):0–1.
97. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res.* 2000 Jan;49(1):134–40.
98. Harrison RD, Gratzer PF. Effect of extraction protocols and epidermal growth factor on the cellular repopulation of decellularized anterior cruciate ligament allografts. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2005;75(4):841–54.
99. Gratzer PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2975–83.
100. Ning LJ, Zhang Y, Chen XH, Luo JC, Li XQ, Yang ZM, et al. Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2012;100 A(6):1448–56.
101. Whitlock PW, Smith TL, Poehling GG, Shilt JS, Van Dyke M. A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon

- and ligament regeneration. *Biomaterials*. 2007;28(29):4321–9.
102. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, Van Munsteren CJ, Gittenberger-De Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2005;27(4):566–71.
103. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675–83.
104. Roth SP, Erbe I, Burk J. Decellularization of large tendon specimens: Combination of manually performed freeze-thaw cycles and detergent treatment. *Methods Mol Biol*. 2018;1577:227–37.
105. Roth SP, Erbe I, Burk J. Decellularization of Large Tendon Specimens: Combination of Manually Performed Freeze-Thaw Cycles and Detergent Treatment. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017. p. 227–37.
106. Pridgen BC, Woon CYL, Kim M, Thorfinn J, Lindsey D, Pham H, et al. Flexor tendon tissue engineering: Acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2011;17(8):819–28.
107. Schöttle P, Goudakos I, Rosenstiel N, Hoffmann J-E, Taylor WR, Duda GN, et al. A comparison of techniques for fixation of the quadriceps muscle-tendon complex for in vitro biomechanical testing of the knee joint in sheep. *Med Eng Phys*. 2009 Jan;31(1):69–75.
108. Wren TAL, Lindsey DP, Beaupré GS, Carter DR. Effects of creep and cyclic loading on the mechanical properties and failure of human Achilles tendons. *Ann Biomed Eng*. 2003;31(6):710–7.
109. Quirk NP, Lopez De Padilla C, De La Vega RE, Coenen MJ, Tovar A, Evans CH, et al. Effects of freeze-thaw on the biomechanical and structural properties of the rat Achilles tendon. *J Biomech*. 2018;81:52–7.
110. Güngörmüş C, Kolankaya D, Aydin E. Histopathological and biomechanical evaluation of tenocyte seeded allografts on rat Achilles tendon regeneration. *Biomaterials*. 2015;51:108–18.

8 Anhang: Material

8.1.1 Medien

Zellkulturmedium für Tenozyten:

DMEM/Ham's F12

+ 10% FCS

+ 2 mM L-Glutamin

+ 1250 µg/ml Ascorbinsäure (140 µM)

+ Aminosäuren (L-Arginin HCL: 6,3 mg/ml, L-Cystin: 1,2 mg/ml,

L-Histidin HCL H₂O: 2,1 mg/ml, L-Isoleucin: 2,6 mg/ml, L-Leucin: 2,6

mg/ml, L- Lysin HCL: 3,65 mg/ml, L-Methionin: 0,75 mg/ml, L-

Phenylalanin: 1,6 mg/ml, L- Threonin: 2,4 mg/ml, L-Tryptophan: 0,5

mg/ml, L-Valin: 2,3 mg/ml, L-Tyrosin: 1,8 mg/ml)

+ 60 U/ml Penicillin/Streptomycin (60 µg/ml)

+ 27 nM Amphotericin B (25 ng/ml)

8.1.2 Material der Sehnenentnahme:

| | |
|------------------------------|---|
| Gefrierschrank -80C | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Pinzette chirurgisch | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| Pinzette anatomisch | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| Skalpell | Feather, Japan |
| Desinfektionsmittel | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| Handschuhe Peha-soft nitrile | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |

8.1.3 Material Dezellularisierung:

| | |
|------------------------------|--|
| Accu-jet Pro | Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland |
| Destilliertes Wasser | |
| Flüssigstickstoff | Linde, Deutschland |
| Kryobehälter | |
| Kulturflaschen Nunclon Delta | Nunc A/S, Roskilde Dänemark |
| Mixer IKA RH basic 2 | IKA-Werke GmbH & CO KG, Deutschland |
| NaCl | |
| PBS | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Pinzetten | Sigma-Aldrich, USA |
| Shaker Certomat MO II | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Steriles Falcon 50ml | Corning Sciene México S.A. de C.V., México |
| Timer | TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Wasserbad | Julabo, Seelbach |

8.1.4 Material Zellkultur

| | |
|----------------------------|---|
| Accu-jet Pro | Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland |
| Brutschrank | Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland |
| Cryogefäße | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| DMEM/F12 (1:1) (1X) (+) L- | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Glutamine | |
| Desinfektionsmittel | Schülke&Mayr, Deutschland |

| | |
|------------------------------|--|
| DMSO | Sigma-Aldrich, USA |
| FCS | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Gigasept | Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt |
| Handschuhe Peha-soft nitrile | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| Humane Tenozyten | BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Kryotubes | Nunc A/S, Roskilde Dänemark |
| Kulturflaschen Nunclon Delta | Nunc A/S, Roskilde Dänemark |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Pen/Strep | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Pinzetten | Sigma-Aldrich, USA |
| Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Steriles Falcon 50ml | Corning Sciene México S.A. de C.V., México |
| Steriles Falcon 5ml | Corning Sciene México S.A. de C.V., México |
| Sterilwerkbank | Weiss Pharmatechnik GmbH, Oldenburg |
| Tiefkühlschrank -20°C | Herauer, Hanau |
| Tripanblau | Sigma-Aldrich, USA |
| Trypsin/EDTA | Biochrom Seromed, Berlin |
| Wasserbad | Julabo, Seelbach |
| Zentrifuge | Heraeus, Hanau |

8.1.5 Material Biomechanik

| | |
|------------------------------|---|
| Aluminiumplatten | |
| Desinfektionsmittel | Schülke&Mayr, Deutschland |
| Handschuhe Peha-soft nitrile | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| Instron ElectroPuls 10000 | Instron, Massachusetts, USA |
| Muttern | |
| Pinzetten | Sigma-Aldrich, USA |
| Schmirgelpapier | |
| Schrauben | |
| TPI Blöcke 6.3-12.7mm 40 | Instron, Massachusetts, USA |
| WaveMatrix | Instron, Massachusetts, USA |

8.1.6 Material Histologie

| | |
|------------------------------|---|
| Desinfektionsmittel | Schülke&Mayr, Deutschland |
| Ethanol 70%-100% | Apotheke LMU Klinikum, München |
| Eukitt | Electron Microscopy Sciences, USA |
| Färbungen | Morphisto GmbH, Deutschland |
| Handschuhe Peha-soft nitrile | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| HistoCore Arcadia | Leica GmbH, Deutschland |
| Klinge | Leica GmbH, Deutschland |
| Mikroskop und Scanner | Precipoint GmbH, Deutschland |
| Mikrotom RM2255 | Leica GmbH, Deutschland |
| Objektträger Superfrost Plus | Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Deutschland |
| Paraffin | |
| Paraffin-Streckbad 1052 | GFL mbH, Deutschland |
| Spin Tissue Processor 120 | Especialidades Médicas MYR, S.L., Spanien |
| Wärmeplatte | Medax GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Xylol | Merck, Deutschland |

8.1.7 Programme

Graph Pad Prism 9.4.0

Prism GmbH

ViewPoint

Precipoint GmbH, Deutschland

9 Danksagung

In besonderem Maße danke ich Herrn Professor Dr. Müller für die Überlassung des spannenden Themas, die Möglichkeit dieser Arbeit und für die fortwährende Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Niethammer für die exzellente Betreuung und stetige Unterstützung. Mein Dank geht ebenfalls an Herrn Dr. Winter für die gute Betreuung und Frau Dr. Stock, die nach der Übernahme frische Energie und Unterstützung mit in das Projekt brachte.

Ein besonderer Dank geht an das gesamte Team der Biomechanik im Labor für Biomechanik des Muskuloskeletalen Universitätszentrums München, insbesondere an Herrn PD Dr. Dipl.-Ing. Woiczinski für die stetige und exzellente Betreuung, gute Zusammenarbeit und viele konstruktive Diskussionen.

Mein weiterer Dank geht an das gesamte Team aus dem Labor, insbesondere Frau Schmitt für die gute Einarbeitung und Betreuung und Herrn Dr. Klar für die Betreuung des Projektes im Bereich der Zellbiologie. Vielen Dank an alle wissenschaftlichen Mitarbeiter und Doktoranden für das gute Arbeitsklima und die unkomplizierte gegenseitige Unterstützung.

Herrn Dr. Christian Braun danke ich für Unterstützung und gute Kooperation.

Ein Dank an das FöFoLe Stipendium (Förderprogramm für Forschung und Lehre) für die Förderung dieses Projektes und die wissenschaftliche Ausbildung im Verlauf.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne die Alles nicht möglich gewesen wäre.

10 Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Dootz, Felix

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

Zellbesiedelung von humanen Supraspinatussehnen Allografts mit humanen Tenozyten

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.

Mannheim, den 15. Juni 2024

Felix Dootz

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand