

Aus dem  
Lehrstuhl für Neuroanatomie, Anatomische Anstalt II  
Institut der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Christoph Schmitz

# Behandlung von im Tierversuch experimentell induzierten Sehnenteilddefekten mit adulten, autologen und allogenen, aus Fettgewebe gewonnenen regenerativen Zellen

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

vorgelegt von

Tobias Würfel

aus

Starnberg

Jahr

2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Susanne Mayer

Prof. Dr. Günther Eißner

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2024

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	S. 3
Zusammenfassung	S. 5
Abstract	S. 6
Abkürzungsverzeichnis	S. 7
1. Einleitung	S. 8
1.1 Embryonale Stammzellen	S. 8
1.2 Reprogrammierte Zellen	S. 11
1.3 Kerntransfer-Stammzellen	S. 13
1.4 Sehr kleine embryonalähnliche Stammzellen	S. 13
1.5 Adulte Stammzellen	S. 14
1.6 Das Konzept der gefäßassoziierten pluripotenten Stammzellen	S. 15
1.7 Aus Fettgewebe gewonnene, regenerative Zellen	S. 15
1.8 Tendinopathie und assoziierte Stammzelltherapien	S. 18
2. Material und Methoden	S. 22
2.1 Versuch I: Behandlung von Sehnenteilrissen mittels allogener, unkultivierter, unmodifizierter, aus Fettgewebe gewonnener regenerativer Zellen im Tierversuch	S. 22
2.1.1 Versuchsaufbau	S. 22
2.1.2 Experimenteller Ablauf	S. 24
2.1.3 Histologie und stereologische Untersuchung	S. 31
2.1.4 Statistische Analyse	S. 37
2.1.5 Mikrofotografie der histologischen Schnitte	S. 38
2.2 Versuch II: Regeneration von Sehngewebe mittels autologer, unkultivierter, unmodifizierter, aus Fettgewebe gewonnener regenerativer Zellen im Tierversuch	S. 40
2.2.1 Versuchsaufbau	S. 40
2.2.2 Experimenteller Ablauf	S. 43
2.2.3 Histologie, Immunohistochemie und Auswertung (Versuchsgruppen I-IV)	S. 46
2.2.4 2.2.4 Nicht-destruktive biomechanische Untersuchungen (Versuchsgruppen V und VI)	S. 49
2.2.5 Statistische Analyse	S. 51
2.2.6 Mikrofotografie der histologischen Schnitte	S. 51

3.	Ergebnisse	S. 53
3.1	Ergebnisse von Versuch I (Behandlung von experimentell induzierten Sehnenteildefekten mit allogenen ADRCs im Tierversuch)	S. 53
3.1.1	Vorbemerkung	S. 53
3.1.2	Ergebnisse der Beweglichkeitsmessungen und der labor- medizinischen Untersuchungen	S. 53
3.1.3	Ergebnisse der Untersuchungen mittels Magnetresonanztomografie	S. 57
3.1.4	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	S. 69
3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch I	S. 79
3.2	Ergebnisse von Versuch II (Behandlung von experimentell induzierten Sehnenteildefekten mit autologen ADRCs im Tierversuch)	S. 80
3.2.1	Vorbemerkung	S. 80
3.2.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	S. 82
3.2.3	Ergebnisse der stereologischen Untersuchung	S. 86
3.2.4	Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen	S. 89
3.2.5	Ergebnisse der Evaluation des BONAR-Scores	S. 92
3.2.6	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	S. 93
3.2.7	Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen	S. 97
3.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch II	S. 101
4.	Diskussion	S. 102
4.1	Fehlende Regeneration von Sehnenteildefekten nach Injektion von allogenen ADRCs	S. 102
4.2	Regeneration von Sehngewebe mit autologen ADRCs	S. 103
4.3	Biomolekulare Wirkmechanismen von autologen ADRCs bei der Sehnenregeneration	S. 107
4.4	Vorteile von nicht-kultivierten ADRCs im Vergleich zu kultivierten Stammzellen	S. 110
4.5	Limitierungen	S. 111
4.6	Schlussfolgerungen	S. 112
	Literaturverzeichnis	S. 114
	Danksagung	S. 125
	Affidavit	S. 126
	Publikationsliste	S. 127

# Zusammenfassung

Aus Fettgewebe gewonnene regenerative Zellen (sogenannte *adipose-derived regenerative cells*; ADRCs) mit den darin enthaltenen Stammzellen stellen eine vielversprechende Therapiemethode zur Geweberegeneration dar. In zwei kürzlich publizierten klinischen Studien zur Behandlung von Teilrupturen der Supraspinatussehne (sogenannte *partial-thickness rotator cuff tears*) zeigte die intratendinöse Injektion autologer ADRCs einen deutlichen Therapieerfolg im Vergleich zur Injektion von Kortikosteroid zusammen mit einem Lokalanästhetikum; bei der intratendinösen Injektion von allogenen, aus ADRCs isolierten Stammzellen (sogenannte *cultured adipose-derived stem cells*; ADSCs) blieb der Therapieerfolg jedoch aus. Die biologischen Hintergründe dieser Phänomene sind weitgehend unklar. Daher wird in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, welche zellulären und molekularen Mechanismen hinter den beschriebenen Phänomenen stehen, und ob bei der Behandlung von Sehnenpathologien gegebenenfalls auch eine Transplantation von allogenen ADRCs sinnvoll ist, wie sie kürzlich in anderem klinischen Zusammenhang in der Literatur beschrieben wurde.

In zwei Versuchen wurden insgesamt 44 Kaninchen nach experimenteller Erzeugung eines partiellen Defekts der gemeinsamen Calcaneussehne (beim Menschen: Achillessehne) in verschiedene Gruppen eingeteilt, im Anschluss am Ort des Gewebedefekts mit allogenen ADRCs (Versuch I) bzw. autologen ADRCs (Versuch II) behandelt, und nach 12 Wochen (sowie in Versuch II zusätzlich nach 4 Wochen) zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung von Schnitten der behandelten Sehnen (beide Versuche) sowie zur biomechanischen Testung (Versuch II) euthanasiert.

Während sich in Versuch I nach Transplantation allogener ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung sogar ein tendenziell schlechteres histologisches Gewebebild zeigte, fand sich in Versuch II nach Transplantation autologer ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung ein deutlich verbessertes histologisches Gewebebild, eine erhöhte Expression von Prokollagen I, eine verringerte Expression von Kollagen Typ III, ein vermehrtes Auftreten des für Sehngewebe typischen „crimp pattern“, ein verstärktes Vorkommen von M2-Makrophagen, eine niedrigere Zellularität mit kontinuierlichem Abfall des Zellgehalts sowie biomechanische Eigenschaften von homogenem Sehngewebe.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass durch die Transplantation autologer ADRCs – nicht aber durch die Transplantation allogener ADRCs – ein Regenerationsprozess im Sehngewebe in Gang gesetzt wird, der der frühen postnatalen Sehnenreifung gleicht und ohne wesentliche Bildung von Narbengewebe stattfindet.

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse von erheblicher Bedeutung für die Behandlung von Sehnteilrupturen mit adulten, autologen, aus Fettgewebe gewonnenen regenerativen Zellen.

## Abstract

Adipose-derived regenerative cells (ADRCs) and the stem cells they contain represent a promising therapeutic means for tissue regeneration. In two recently published clinical studies on the treatment of partial-thickness rotator cuff tears, intratendinous injection of autologous ADRCs showed significant therapeutic success compared with corticosteroid injection, whereas intratendinous injection of allogeneic stem cells derived in cell culture from ADRCs (ADSCs) was not successful. The biological mechanisms behind these effects are largely unclear. Therefore, the present study addressed the question which cellular and molecular mechanisms are behind the described phenomena and whether, if applicable, transplantation of allogeneic ADRCs is also useful, as it has recently been described in the literature in a different clinical context.

In two experiments, a total of 44 rabbits were divided into different groups after experimental creation of a partial defect of the common calcaneus tendon (Achilles tendon in humans), and were subsequently treated with allogeneic ADRCs (experiment I) or autologous ADRCs (experiment II) at the site of the tissue defect, and euthanized after 12 weeks (and in experiment II additionally after 4 weeks) for histological and immunohistochemical examination of sections of the treated tendons (both experiments) and for biomechanical testing (experiment II).

Whereas in experiment I the histological picture after transplantation of allogeneic ADRCs tended to be worse than after sham treatment, in experiment II the histological picture after transplantation of autologous ADRCs was significantly better than after sham treatment. Specifically, the rabbits treated with autologous ADRCs showed an increased expression of type I procollagen and a decreased expression of type III collagen, an increased occurrence of the "crimp pattern" typical of tendon tissue, an increased occurrence of M2 tissue macrophages, a lower cellularity with a continuous decrease in cell content, and improved biomechanical properties.

These results suggest that transplantation of autologous ADRCs, but not transplantation of allogeneic ADRCs, initiates a regeneration process in tendon tissue that resembles early postnatal tendon maturation and occurs without substantial scar tissue formation.

In conclusion, these results are of considerable importance for the treatment of partial tendon ruptures with adult, autologous, adipose-derived regenerative cells.

### Abkürzungsverzeichnis

ADRCs	„adipose-derived regenerative cells“, aus Fettgewebe gewonnene Regenerativzellsuspension
ADSCs	„adipose-derived stem cells“, aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen
ASCs	„adult stem cells“, adulte Stammzellen
ASVF	allogene vaskuläre stromale Fraktion (entspricht allogenen ADRCs)
BMAC	„bone marrow aspirate concentrate“, Zellkonzentrat aus Knochenmark-aspirat
BM-MSCs	„bone marrow mesenchymal stem cells“, mesenchymale Stammzellen mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks
ESCs	Embryonale Stammzellen
EZM	Extrazellulärmatrrix
HE	Hämatoxilin-Eosin
HLA	„human leucocyte antigen“, Humane Leukozytenantigene
iPSCs	„induced pluripotent stem cells“, induziert pluripotente Stammzellen
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
MRT	Magnetresonanztomografie
MSCs	„mesenchymal stem cells“, mesenchymale Stammzellen
NTSCs	„nuclear transfer stem cells“, Kerntransfer-Stammzellen
RLL	Ringer-Lactat-Lösung
R(S)Cs	„reprogrammed stem cells“, reprogrammierte (Stamm-)zellen
VSEs	„very small embryonic like stem cells“, sehr kleine embryonalähnliche Stammzellen

# Einleitung

Vor etwa 50 Jahren wurden erstmalig Zellen beschrieben, welche sich fundamental von den bis dahin aus dem menschlichen Körper isolierten Zellen unterschieden: fibroblastische Vorläuferzellen konnten aus dem Knochenmarkstroma gewonnen werden (1). Dies markiert den Beginn der Verwendung von Stammzellen in der Medizin. Seit diesem Zeitpunkt sind zahlreiche Konzepte, Studien und bereits auch Therapien entwickelt worden, welche auf dem Prinzip der Stammzellen beruhen. Stammzellen sind definiert als Zellen, welche undifferenziert sind, sich jedoch durch äußere Reize zu verschiedenen Zellformen entwickeln können. Damit stellen sie eine sehr frühe Vorläuferstufe der differenzierten Körperzellen dar, welche ubiquitär im Körper in überwiegender Mehrheit im Vergleich zu weiteren Zellarten vorhanden sind und die Funktionen des jeweiligen Organs oder der jeweiligen Körperstruktur übernehmen. Die Stammzellen an sich sind jedoch eine sehr heterogene Gruppe; es bestehen massive Unterschiede im Grad der Differenzierung, der Herkunft und dem Entwicklungspotential zwischen den Stammzellarten. Liu et al. (2020) (2) teilten die Stammzellen in fünf Gruppen ein: (i) embryonale Stammzellen (sogenannte *embryonic stem cells*; ESCs), welche aus der embryonalen Blastozyste gewonnen werden können; (ii) sehr kleine embryonalähnliche Stammzellen (sogenannte *very small embryonic like stem cells*; VSELs) (iii) Kerntransfer-Stammzellen (sogenannte *nuclear transfer stem cells*; NTSCs); (iv) reprogrammierte Stammzellen (*reprogrammed stem cells*; RSCs); und (v) adulte Stammzellen (*adult stem cells*; ASCs) (2). Eine tabellarische Übersicht zu den verschiedenen Arten von Stammzellen findet sich in *Tabelle 1.1*. Innerhalb dieser Gruppen wird zudem häufig zwischen weiteren Untergruppen unterschieden, auf die an späterer Stelle zum Teil genauer eingegangen wird.

## 1.1 Embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESCs)

Embryonale Stammzellen können aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden, aus denen sich im weiteren Verlauf der Embryo entwickeln würde. Daher entsprechen sie pluripotenten Stammzellen, welche sich in nahezu alle Gewebearten des menschlichen Körpers differenzieren können (3). Bei der Erstbeschreibung der Isolierung embryonaler Stammzellen aus der Blastozyste kurz vor der Jahrtausendwende gelang es jedoch noch nicht, die Embryonen nach der Stammzellgewinnung überlebensfähig zu halten (4). Dies führte zu einer kontroversen Debatte in der breiten Öffentlichkeit über die Grenzen medizinischer Forschung. Bei den Unterstützern der Forschung mit ESCs wurde die Hoffnung beflügelt, bislang unheilbare Erkrankungen therapieren zu können oder zumindest durch Studien mit den ESCs die (genetische) Pathophysiologie besser zu verstehen. Dem gegenüber stand jedoch eine Gruppe von Kritikern dieser neuen Forschungsmethode, welche in der Forschung mit humanen Embryos den Tatbestand des Mordes erfüllt sahen. Die ethischen Bedenken der ESC-Gegner, welche oftmals aus religiösen Überzeugungen agierten, beruhten hauptsächlich darauf, dass sie den Beginn des menschlichen Lebens im Moment der Befruchtung der Eizelle definieren. Somit entsprach in deren Rechtsauffassung bereits der Embryo im blastozytären Frühstadium einer eigenständigen Person mit jeweiligen Persönlichkeitsrechten, und folglich galt jegliche Forschung mit dem Resultat der lebensverhindernden Schädigung des Embryos als Tötung eines Menschen (5). Diese ethische Problematik überschattet die Forschung, welche seit Anfang der 2000er-Jahre mit embryonalen Stammzellen durchgeführt wurde: aus den ESCs wurden



## Einleitung

oftmals Zelllinien mit genetischen Eigenschaften hereditärer Erkrankungen entwickelt, um damit grundlagenwissenschaftlich experimentieren zu können (6).

Tabelle 1.1: Verschiedene Arten von Stammzellen (modifiziert nach Liu et al., 2020 (2))

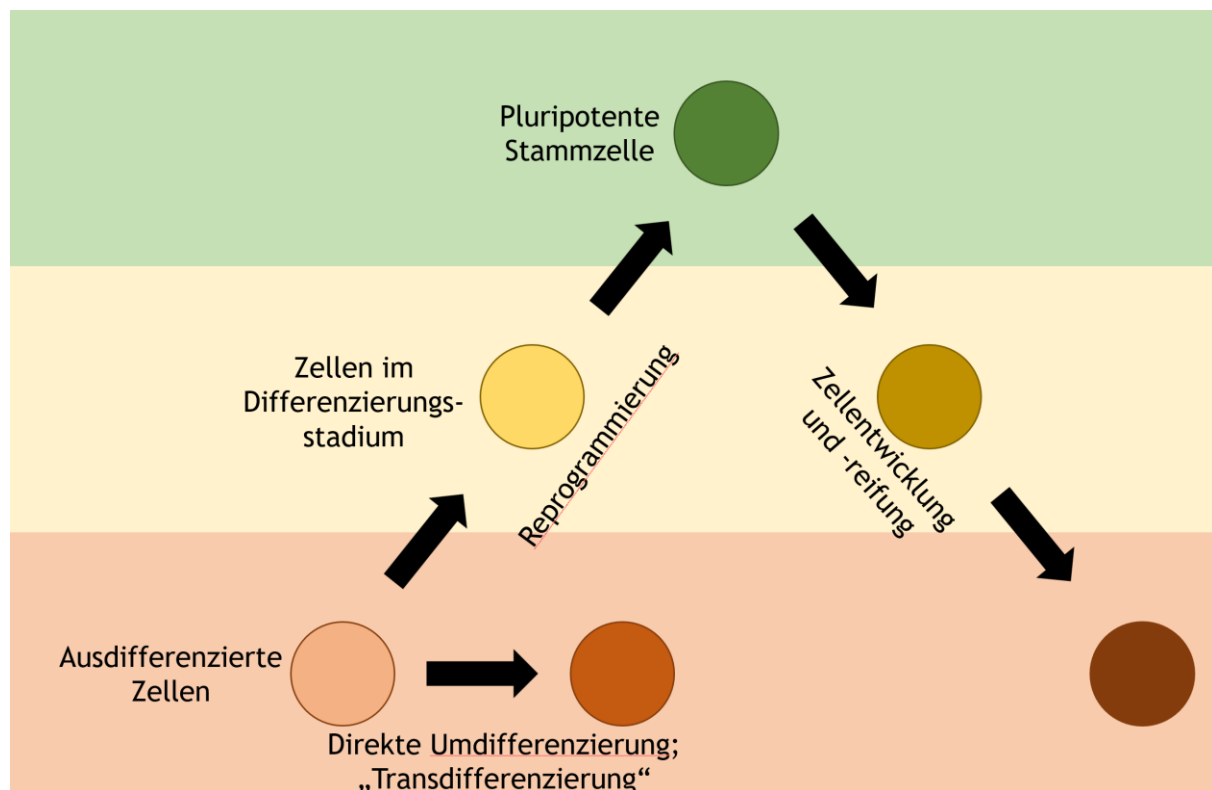
	<b>Embryonale Stammzellen (ESCs)</b>	<b>Sehr kleine embryonal-ähnliche Stammzellen (VSELs)</b>	<b>Kerntransfer-Stammzellen (NTSCs)</b>	<b>Reprogrammierte Stammzellen (RCs)</b>	<b>Adulte Stammzellen (ASCs)</b>
<b>Definition</b>	Pluripotente Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste (eines Embryos) gewonnen werden können	Pluripotente Stammzellen aus adulten Geweben	Eine neue Einzelzelle wird durch die Transplantation des Spenderkerns in eine entkernte Eizelle einer Spenderin erzeugt	Pluripotente Stammzellen, die durch Reprogrammierung adulter Zellen erzeugt werden. Gewonnen durch Anwendung manueller Labormethoden zur Reprogrammierung adulter Zellen. Zu den RCs gehören induzierte pluripotente Stammzellen und direkt reprogrammierte Zellen.	Ein Zelltyp, der sich in unmittelbarer Nähe zu einer nährstoffreichen Mikroumgebung wie Gefäßen, Knochenmark oder Organen (Herz und Gehirn usw.) im reifen oder erwachsenen Organismus befindet; sie sind in der Lage, auf gewebespezifische Stimulation zu reagieren und Stammzellen zu produzieren.
<b>Entwicklungsstadium</b>	Frühes Präimplantationsstadium des Embryos	Stammzellmasse in der frühen Entwicklungsphase in erwachsenem Gewebe	Frühes Embryonalstadium	Frühes Embryonalstadium einzelner / mehrerer Zellen oder Zellen mit einer bestimmten Gewebestruktur	Ausgereifte Stammzellen aus adulten Zellen (z. B. Nabelschnurblutzellen) oder erwachsenen Organen wie Herz und Gehirn
<b>Funktion</b>	Totipotenz: in der Lage, sich zu jeder Art von Zelle zu entwickeln	Unklare Totipotenz, jedoch Fähigkeit zur Ausdifferenzierung in zahlreiche Zelllinien	Einzelne Zelle erzeugt einen ganzen Organismus	Totipotenz: in der Lage, sich zu jeder Art von Zelle zu entwickeln	Entwickelt sich zu Zellen desselben systemischen Typs
<b>Wesentliche Hürden für die klinische Anwendung</b>	Zerstörung/ Abtreibung des Embryos; Immunabwehr und Erschöpfung der Zellressourcen	Bestimmung der allgemeinen Eigenschaften und Funktionen	Kann beim Klonen von Menschen missbraucht werden; hohe Anforderungen an Technologie, Einrichtung und Finanzen	Genomische Instabilität; kann geringe Wirksamkeit haben; Teratombildung	Invasive Chirurgie, Immunabstoßung (wenn es sich nicht um einen autologen Spender handelt), Kontamination und Infektion sowie keine natürliche Überwindung der genetischen Barrieren zur Differenzierung in eine andere Abstammungslinie

Etwa zehn Jahre nach Isolierung der ersten embryonalen Stammzellen wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem die ESCs aus der Blastozyste ohne Schädigung des Embryos gewonnen werden konnten (7, 8). Obwohl dies das ethische Hauptproblem des Einsatzes embryonaler Stammzellen löste, sank dennoch das Interesse an embryonalen Stammzellen rapide, denn nahezu zeitgleich wurden von zwei Forschungsgruppen aus somatischen Zellen pluripotente Stammzellen „reprogrammiert“ und somit Zellen mit vergleichbaren Fähigkeiten gänzlich ohne Notwendigkeit von Embryonen entwickelt (9, 10) (genauer im Abschnitt zu reprogrammierten Stammzellen). Es bleiben jedoch weiterhin Vorteile auf Seiten der Verwendung embryonaler Stammzellen, da diese aufgrund des fehlenden „reprogrammierenden“ Eingriffs weniger genetische Veränderungen aufweisen und daher homogener sind. Daher laufen noch weiterhin vereinzelte klinische Studien mit embryonalen Stammzellen bei Rückenmarksverletzung, Immuntherapien, Makuladegeneration, Diabetes mellitus Typ I und Herzinsuffizienz (3, 11). Bislang konnten jedoch keine größeren therapeutischen Erfolge mit ESCs erzielt werden. Die Haupteinschränkungen für die klinische Verwendung von ESCs sind die möglichen immunogenen Reaktionen, eine Vielzahl von nicht differenzierten Zelltypen und die mögliche teratogene Entartung (3). Da die reprogrammierten Stammzellen im Prinzip die gleichen Eigenschaften besitzen, sind jegliche Einschränkungen in der Nutzung von ESCs auch für sie anzunehmen. Embryonale Stammzellen exprimieren grundsätzlich die zellulären Oberflächenproteine MHC-I und im Verlauf bei weiterer Differenzierung zusätzlich MHC-II. Da über den MHC-II-Komplex das Immunsystem überprüft, ob eine Zelle körpereigen oder körperfremd ist, werden bei fehlender Übereinstimmung Immunreaktionen ausgelöst (12). Da jedoch von praktisch keinem Menschen vor der Geburt embryonale Stammzellen gewonnen wurden, würden nahezu alle Spender-Stammzellen eine sog. Host-vs.-Graft-Immunreaktion auslösen und die neu implantierten Stammzellen somit zerstören, sofern keine Immunsuppression erfolgt (vgl. (13)). In den entsprechenden Studien wurden die Stammzell-Empfänger dementsprechend stets immunsupprimiert, was jedoch gravierende systemische Nebenwirkungen mit sich bringt. Eine Lösung für dieses Problem könnten Spender-Datenbanken mit diversen MHC-Zelllinien darstellen, vergleichbar mit den aktuell bereits vorhandenen Datenbanken zur Stammzelltransplantation bei Leukämien. Dies wäre jedoch mit hohem Aufwand und Kosten verbunden. Problematisch für den Einsatz der embryonalen (und auch reprogrammierten) Stammzellen ist zudem die teilweise unvollständige oder fehlerhafte Ausdifferenzierung der Stammzellen: einerseits wurde das Risiko der Entstehung von Keimzelltumoren nach Transplantation von ESCs beschrieben (14); andererseits besteht bei unvollständiger Ausdifferenzierung die Gefahr, dass das ursprüngliche Stammzellgewebe die Funktionen des zu ersetzenden Gewebes nicht auf physiologische Weise übernimmt, wie z. B. in einer Studie bei Insertion von embryonalen Stammzellen in kardiales Gewebe, bei der nach Transplantation der Stammzellen eine irreguläre kardiale Erregungsweiterleitung festgestellt wurde (15). Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass für die erfolgreiche klinische Verwendung embryonaler Stammzellen weiterhin hohe Hürden bestehen. Die Tatsache, dass die reprogrammierten Stammzellen äquivalente Eigenschaften besitzen und keinerlei ethische Fragen aufwerfen, hat erheblich zum Bedeutungsverlust der embryonalen Stammzellen geführt und wird mutmaßlich auch in Zukunft die Verwendung von ESCs weiter limitieren.

## 1.2 Reprogrammierte Zellen (*reprogrammed stem cells*, RCs)

Die reprogrammierten (Stamm-) Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Abbildung 1.1):

- Transformierte Zellen mit pluripotenten Eigenschaften aus ursprünglich somatischen, ausdifferenzierten Zellen, die vor etwa 15 Jahren entwickelt wurden (9, 10). Zellen, welche mittels dieses Verfahrens hergestellt wurden, sind meist unter dem Namen „induziert pluripotente Stammzellen“ (sogenannte induced pluripotent stem cells; iPSCs) bekannt.
- Wenige Jahre später wurde ein weiteres reprogrammierendes Verfahren entwickelt, mit dem sich fibroblastische Zellen direkt in Kardiomyozyten (16) oder Hepatozyten (17) umprogrammieren ließen. Zellen dieser zweiten Gruppe sind sogenannte direkt reprogrammierte Stammzellen.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung reprogrammierter Stammzellen (modifiziert nach (18))

In der Forschung und Entwicklung liegt jedoch der Schwerpunkt eindeutig auf der ersten Gruppe, sodass die Begriffe „induziert pluripotente Stammzellen“ und „reprogrammierte (Stamm-)zellen“ häufig synonym verwendet werden. Die Entwicklung dieser Verfahren brach mit dem lange Zeit vorherrschenden Paradigma, dass die Differenzierung von Zellen ausschließlich unidirektional sei (19). Zudem wurden die embryonalen Stammzellen schlagartig als Forschungsschwerpunkt im Bereich der Stammzellforschung abgelöst, da bei dieser Methode Zellen mit ähnlichen Eigenschaften gänzlich ohne ethische Bedenken generiert und verwendet werden. Mittlerweile gibt es vier Verfahren, mit denen die zur Reprogrammierung

benötigten Faktoren in die ausdifferenzierte Ursprungszelle eingebracht werden können: entweder über virale Transfektion (jeweils in die DNA integrierend / nicht integrierend), über selbstschneidende Vektoren (also sich selbst in die DNA integrierend), oder direkte organische Materialien, welche in der Zelle entsprechende Signalwege aktivieren (2). Durch diesen Prozess wird jedoch maßgeblich in die Molekularbiologie der Ursprungszelle eingegriffen, was bei der Verwendung embryonaler Stammzellen nicht geschieht. Akkumulierte Mutationen in der DNA der adulten somatischen Vorläuferzelle führen zu einer genetischen Heterogenität der späteren iPSCs, welche die Funktion dieser Zellen erheblich beeinträchtigen können (20). Zudem ist die Vergleichbarkeit verschiedener Zelllinien bei gleichem Herstellungsverfahren eingeschränkt, da erworbene genetische Unterschiede zwischen den Spenderzellen Auswirkungen auf die spätere Funktionalität haben (21). Jedoch nicht nur die DNA an sich, sondern auch die Epigenetik kann den Zustand der reprogrammierten Zellen beeinflussen. Ein erhaltenes epigenetisches Gedächtnis in den reprogrammierten Zellen führt zu einer größeren Heterogenität der reprogrammierten Zellen (22). Zudem nehmen die Zellen oftmals im Reprogrammierungsvorgang sich stark von physiologischen Zellstadien unterscheidende Formen an, bei denen es zu einer veränderten epigenetischen Dynamik kommen kann (23). Diese ungleichmäßige Transformation der Epigenetik während des Reprogrammierungsverfahrens ist problematisch für die Qualitätssicherung (24).

Die Ursprungszellen für die Gewinnung von reprogrammierten Zellen können direkt aus differenzierten menschlichen Zellen gewonnen werden. Dafür werden häufig Fibroblasten der Haut, peripheres Blut oder Nabelschnurblut verwendet. Der einfachen Verfügbarkeit von Fibroblasten oder peripherem Blut steht jedoch der Nachteil von vermehrten erworbenen genetischen Mutationen entgegen, welche sich negativ auf die späteren reprogrammierten Zellen auswirken können. Das schwieriger zu gewinnende Nabelschnurblut hat zwar den Vorteil von weniger erworbenen Mutationen, jedoch ist zum Zeitpunkt der Gewinnung der spätere Gesundheitszustand des Spenders noch unbekannt (18). Auch wenn iPSCs nicht nur in regenerativer Hinsicht, sondern auch zur Untersuchung von Pathomechanismen und zum Screening nach wirksameren und sichereren Medikamenten verwendet werden (insbesondere, wenn die Spenderzellen von PatientInnen mit monogenen Erkrankungen stammen) (25, 26), bestehen für den klinischen Einsatz weitere Hürden. Dazu gehören die im Abschnitt zu den embryonalen Stammzellen bereits erläuterten, aber direkt auf reprogrammierte Zellen übertragbaren Einschränkungen wie die immunologischen Reaktionen, die unvollständige Differenzierung oder die Tumorentstehung. Hinsichtlich der Tumorentstehung bestehen im Vergleich zu den ESCs aufgrund des Reprogrammierungsvorgangs deutlich mehr Risiken. Zu den Risikofaktoren zählen z. B. das Verfahren der Reprogrammierung selbst, da die ins Erbgut integrierenden Methoden prinzipiell mit einem höheren Risiko einhergehen als die nicht-integrierenden Methoden, aber auch fehlerhafte Reprogrammierungsvorgänge, welche Schäden an Chromosomen auslösen können. Leider gibt es bislang keine Studien, welche die Tumorigenität von reprogrammierten Zellen mit der Tumorigenität von ESCs vergleicht (2, 27). Die Anzucht von Stammzellen unter zellkulturellen Bedingungen gestaltet sich außerdem als schwierig, wenn alle Bedenken hinsichtlich übertragbarer xenogener Krankheiten oder der Auslösung einer späteren Immunreaktion durch die eingesetzten Materialien ausgeräumt werden sollen (28). Eine spezifische Hürde lauert noch im Reprogrammierungsverfahren selber: die sehr kostspielige Erzeugung von induziert pluripotenten Stammzellen aus somatischen

Zellen dauert mindestens drei Monate und hätte daher möglicherweise zur Folge, dass das optimale therapeutische Zeitfenster bereits geschlossen ist. Mittels größeren „Zellbanken“, welche über HLA-gematchte allogene iPSCs verfügen, könnte man dieses Problem umgehen, für den Preis von größerem Aufwand und immunologischen Restrisiken (18). Trotz der großen Hoffnungen zu Beginn der Forschung mit reprogrammierten Zellen konnten die Hürden für eine therapeutische Verwendung von reprogrammierten Zellen im großen Stil bislang nicht ausgeräumt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass andere Stammzellformen einfacher in die klinische Anwendung integriert werden können, ist es nicht unwahrscheinlich, dass diese beeindruckende Technologie lediglich für die Grundlagenforschung relevant sein wird.

### 1.3 Kerntransfer-Stammzellen (*nuclear transfer stem cells*, NTSCs)

Die Stammzellen, welche mittels der sogenannten Kerntransfer-Technologie generiert werden, unterscheiden sich signifikant von den anderen Stammzellarten und werden daher in diesem Kontext nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Während sich pluripotente und differenzierte Stammzellen nur zu Zelllinien oder mehr oder weniger großen Teilen eines Gesamtorganismus ausdifferenzieren, wird die Kerntransfertechnik zur Erzeugung eines lebendigen, eigenständigen Organismus verwendet. Die Übertragung des Zellkerns inklusive des Genoms in einen zellkernlosen Oozyten führt zu einer genetischen Reprogrammierung des transferierten Genoms in ein embryonales Entwicklungsstadium. Danach kann die neu zusammengesetzte Zelle eine reguläre embryonale Entwicklung bis hin zum ausdifferenzierten Organismus durchlaufen (2). Diese Technologie kann folglich zu einer Klonung von Lebewesen verwendet werden, was zum ersten Mal erfolgreich im Jahr 1996 durchgeführt wurde (29). Über die Klonung des Schafs „Dolly“ wurde weltweit debattiert, und ethische Bedenken dieser Technologie schränken die entsprechende Forschung und Entwicklung deutlich ein. Ungeachtet dieses ethischen Aspekts wurden in einem weiteren Projekt über 20 Jahre nach dem Schaf „Dolly“ mittels der Kerntransfer-Technologie Makaken-Affen geklont (30). Somit kann mittlerweile davon ausgegangen werden, dass diese Technologie ebenfalls in der Lage wäre, eine Klonung von Menschen erfolgreich durchzuführen.

### 1.4 Sehr kleine embryonalähnliche Stammzellen (*very small embryonic-like stem cells*, VSELs)

Im Jahr 2006 konnten erstmalig Zellen beschrieben werden, welche in sehr geringer Anzahl im Knochenmark vorkommen und sowohl immunhistochemische als auch elektronenmikroskopische Merkmale pluripotenter Stammzellen sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in alle drei Keimbahnlinien besitzen (31). Aufgrund ihrer Eigenschaften und Größe erhielten diese Zellen den Namen *very small embryonic-like stem cells*, also übersetzt *sehr kleine embryonalähnliche Stammzellen*. Da in den darauffolgenden Jahren ebendiese Stammzellen von mehreren Forschungsgruppen in eigenen Versuchen nicht aufgefunden werden konnten, war die Existenz dieser Zellart zeitweilig stark umstritten (32, 33). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Grund für die fehlende Auffindbarkeit der VSELs technischer Natur in der Durchführung der Durchflusszytometrie war (34). Spätestens als weitere Forschungsgruppen ebendiese Stammzellen nachweisen konnten (35), galt die Existenz der sehr kleinen embryonalähnlichen Stammzellen als wissenschaftlicher Konsens. In Zukunft

sind diese Zellen vermutlich vergleichbar mit adulten, gewebsspezifischen Stammzellen hinsichtlich der klinischen Verwendbarkeit (36). Jedoch ist aktuell weitgehend unklar, ob die VSELs sich vollständig differenzieren und ihre Nachkommen sich in geschädigtes Gewebe integrieren können (37). Ein Vorteil dieser Zellen gegenüber den reprogrammierten Zellen ist jedoch eine mutmaßlich deutlich geringere Gefahr der Teratombildung sowie fehlende ethische Bedenken im Vergleich zu embryonalen Stammzellen (2). Insgesamt besteht noch zu wenig Evidenz über die genauen Eigenschaften der VSELs. Zudem gestaltet sich die Gewinnung von VSELs als schwierig, da nur ein sehr geringer Anteil der gesamten Zellen zu dieser Gruppe gehörig ist und die Isolierung kompliziert ist (38).

### 1.5 Adulte Stammzellen (*adult stem cells*, ASCs)

Adulte Stammzellen befinden sich zwar in geringer Anzahl, jedoch mutmaßlich nahezu ubiquitär im reifen Organismus und treiben Regenerationsprozesse an. Große Teile der Wissenschaft sind der Auffassung, dass ASCs sich in die Zellarten einer spezifischen Zelllinie differenzieren und abhängig vom Grad der Differenzierung als multipotent oder unipotent angesehen werden können: multipotente hämatopoetische Stammzellen haben ein größeres Potential zur Differenzierung in diverse Zelllinien des Blutes, und Zelllinien des Ektoderms als epidermale Stammzellen können sich ausschließlich zu Haut-spezifischen Zellen differenzieren (39). Allerdings sind multipotente Stammzellen an sich wiederum eine heterogene Gruppe. Die möglichen Differenzierungsmuster mesenchymaler Stammzellen (*mesenchymal stem cells*; MSCs) zum Beispiel, welche sich nach gängiger Definition in Zellen der mesenchymalen Linie differenzieren können, hängen im Wesentlichen von deren Gewebeherkunft ab. MSCs aus Nabelschnurblut sind zum Beispiel in der Lage, sich zu mehr Gewebearten zu differenzieren als etwa MSCs aus Synovialflüssigkeit (40). Folglich ist die Vergleichbarkeit von mehreren multipotenten Stammzelllinien eingeschränkt, da der Begriff „mesenchymale Stammzellen“ lediglich eine heterogene Gruppe von Stammzellen definiert, jedoch nicht eine explizite Zelllinie mit nahezu identischen Eigenschaften.

Die Nutzung adulter Stammzellen ist in der Medizin keine Neuheit: seit mehreren Jahrzehnten werden bereits hämatopoetische Stammzellen zur Behandlung von Leukämie-PatientInnen mittels Stammzelltransplantation genutzt (41). Erst im Jahr 2015 wurde von der *European Medicines Agency (EMA)* mit Holoclar® die erste nicht-hämatopoetische Stammzelltherapie zugelassen, welche auf dem Prinzip der Transplantation kornealer Stammzellen zur Behandlung degenerativer Erkrankungen der Hornhaut des Auges beruht (42). In den letzten Jahren wurden viele weitere Indikationen für den Einsatz adulter Stammzellen – insbesondere mesenchymaler Stammzellen – in grundlagenwissenschaftlichen und klinischen Studien überprüft, darunter Knochen-, Knorpel- und muskuloskeletale Regeneration sowie die Reparatur von Nervengewebe, Herzmuskulatur und Leberparenchym (43). Wie für die anderen Arten von Stammzellen gilt auch für die optimale Verwendung adulter Stammzellen die Notwendigkeit einer Immunkompatibilität des Empfängers. Während die autologe Transplantation hierfür kein Problem darstellt, gestaltet sich eine allogene Transplantation schwieriger. Entscheidend für die Verträglichkeit der Stammzellen bei allogener Transplantation ist die Übereinstimmung der HLA-Merkmale. Die dadurch bei fehlendem HLA-Matching hervorgerufene Immunreaktion wird zwar schon seit längerer Zeit im Falle von Leukämien zur Eradikation maligner Zellen

genutzt (41); bei der Anwendung von regenerativen Stammzellprodukten ist dieser Mechanismus jedoch kontraproduktiv. Für die umfassende Verwendung adulter Stammzellen spricht, dass die Rate an schwerwiegenden Nebenwirkungen beim Einsatz von mesenchymalen Stammzellen sehr gering ist (44). Mögliche Komplikationen in Form von Gewebefibrosierung und sogar Tumorentstehung (43) wurden zwar beschrieben, sind jedoch offenbar sehr selten und sollten aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit der heterogenen Stammzellapplikationen in den Kontext der jeweiligen Therapiesituation gestellt werden. Wie bei den anderen Stammzellformen auch ist die Isolierung und die Kultivierung im Labor für die Anwendung adulter Stammzellen hinderlich, da durch diese Maßnahmen eine Kontamination der Stammzellen erfolgen oder der optimale Therapiezeitpunkt verpasst werden könnte.

### 1.6 Das Konzept der gefäß-assoziierten pluripotenten Stammzellen (*vascular-associated pluripotent stem cells, vaPS cells*)

Die weit verbreitete Annahme, dass sich adulte Stammzellen ausschließlich in gewebespezifische Zelllinien differenzieren können, ist insbesondere seit der Entdeckung der VSELs umstritten, da die VSELs sich ebenfalls im reifen Organismus befinden. Unsere Arbeitsgruppe konnte aus Gefäßwänden von Menschen Zellen isolieren, welche die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimschichtlinien besitzen (45). Bemerkenswert dabei ist, dass diese Zellen einerseits aus allen Blutgefäßen unabhängig von deren Gewebezugehörigkeit gewonnen werden können; andererseits konnte mittels verschiedener Experimente gezeigt werden, dass sich die Zellen unabhängig von der Gewebezugehörigkeit ihres ursprünglichen Blutgefäßes in Zellen der drei Keimschichten differenzieren können (45). Letztendlich ist es nicht geklärt, ob diese Zellen den VSELs entsprechen. Daher erhielten diese Stammzellen den Namen *vascular-associated pluripotent stem cells* (vaPS cells), also gefäß-assoziierte pluripotente Stammzellen. Denkbar ist auch, dass gefäß-assoziierte pluripotente Stammzellen längere Zeit fälschlicherweise für mesenchymale Stammzellen gehalten wurden und ihr vollständiges Differenzierungspotential nicht erkannt wurde. Interessant in diesem Zusammenhang ist zudem die wissenschaftliche Beschreibung der Fähigkeit zur pluripotenten Ausdifferenzierung von mikrovaskulären Perizyten (46), wobei hier viel eher die Fähigkeiten der vaPS fälschlicherweise aufgrund methodischer Mängel den Perizyten zugeschrieben wurden, die sich ebenfalls in unmittelbarer Nähe der Gefäßwände befinden. Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die vaPS cells die Eigenschaft haben, mit anderen Zellen zu kommunizieren und sich in jegliches Zielgewebe zu integrieren. Im Falle einer Immundefizienz ist sogar eine xenogene Integration in vivo von humanen Stammzellen in Maus-Gewebe beschrieben worden (45).

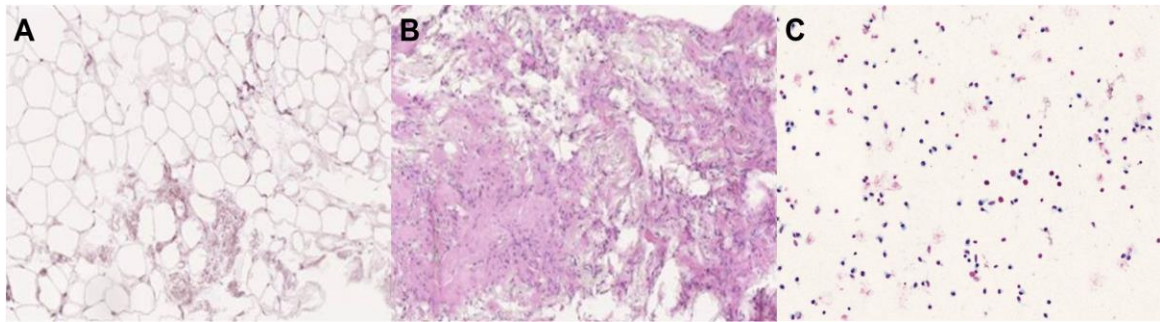
Die Risiken der Verwendung von vaPS cells in der Klinik sind mutmaßlich vergleichbar mit den Risiken der Transplantation adulter Stammzellen bzw. der VSELs. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die systemische Applikation von MSCs zu einem beschleunigten Tumorwachstum führen kann, da Malignome Zytokine und weitere Faktoren freisetzen, um zirkulierende Stammzellen an den Tumorort zu locken (47). Da jedoch bekannt ist, dass die vaPS explizit nicht isoliert werden müssen, entfallen die Risiken der Kultivierung der Stammzellen ((48); s. „ADRCs“), welche zumeist der weit verbreiteten Anwendung von Stammzellprodukten im Wege steht.

## 1.7 Aus Fettgewebe gewonnene regenerative Zellen (*adipose-derived regenerative cells*, ADRCs)

Das Prinzip der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stammzell-Applikation ist ausführlich in (48) beschrieben und entspricht einer Liposuktion von Fettgewebe, welches in einem point-of-care-Verfahren aufbereitet wird. Die aufbereitete Zellsuspension enthält spezielle Stammzellen und weitere Zellarten, und wird unmittelbar nach Isolierung der Zellen aus dem Lipoaspirat direkt an den Ort des Gewebeschadens injiziert. In den zugehörigen Grundlagenarbeiten (zusammengefasst in (48)) wurden drei entscheidende Punkte bezogen auf die Gewinnung und Anwendung der ADRCs herausgearbeitet:

1. Die für den Therapieeffekt entscheidenden Stammzellen (aller Wahrscheinlichkeit nach die vaPS) könnten auch aus jedem anderen Gewebe gewonnen werden; jedoch eignet sich Fettgewebe aufgrund der einfachen Zugänglichkeit, der Verzichtbarkeit dieses Gewebes für die meisten PatientInnen und die hohe Dichte an Gefäßen hierfür am besten.
2. Zur Gewinnung von ADRCs wird das Liposuktionsmaterial von Adipozyten und Bindegewebsanteilen getrennt. Dies impliziert jedoch, dass neben Stammzellen auch andere Zelltypen in der resultierenden Zellsuspension vorhanden sind. Das spezifische Isolierungsverfahren hat einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl und Lebensfähigkeit der gewonnenen Zellen und somit auf die Sicherheit und Wirksamkeit von ADRCs. Zu unterscheiden sind die aus Fettgewebe stammenden *adipose-derived regenerative cells* (ADRCs), bei denen nach der Liposuktion sowohl Adipozyten als auch Bindegewebe vollständig von den ADRCs abgetrennt werden, und sogenanntes „Nanofett“ und „Mikrofett“, bei denen der Gewebeverband des Fettgewebes nach Aufbereitung weitgehend erhalten bleibt bzw. das Bindegewebe von den Adipozyten separiert wird. „Nanofett“ und „Mikrofett“ zeichnen sich im Vergleich zu ADRCs durch eine geringe Dichte und Anzahl von Zellen bzw. lebender Stammzellen aus (vgl. *Abb. 1.2*). Zur speziellen Isolierung von ADRCs wird zudem zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Verfahren unterschieden. Enzymatische Aufbereitungsmethoden von Lipoaspirat verfügen normalerweise über eine deutlich höhere Zellausbeute als nicht-enzymatische Methoden. In der Literatur bestehen außerdem große Unsicherheiten über die Anzahl von nicht-lebenden Zellen in den nicht-enzymatisch generierten ADRC-Suspensionen. Folglich sind die enzymatischen Aufbereitungsmethoden zur Gewinnung der ADRCs den nicht-enzymatischen Aufbereitungsmethoden überlegen (49).





**Abbildung 1.2:** Mikroskopische Darstellung des aufbereiteten Lipoaspirats dreier Aufbereitungsmethoden: (A) Beim sog. „Mikrofett“ ist die zelluläre Struktur der Adipozyten weitgehend erhalten. (B) Nach Aufbereitung von „Nanofett“ sind nur noch sehr wenige Adipozyten vorhanden, und der Anteil von Stroma und Zellen ist im Vergleich zum „Mikrofett“ erhöht. (C) Ein mit Azan gefärbter Ausstrich von Zellen, die mit der enzymatischen Transpose RT/Matraxe-Technologie (InGeneron, Houston, TX, USA) aus Lipoaspirat isoliert wurden, zeigt keine Adipozyten und praktisch kein Bindegewebsstroma (modifiziert nach (50) und (51)).

- Die Stammzellen an sich, die sog. *adipose-derived stem cells* (ADSCs) (die die vaPS cells einschließen), können aus der ADRC-Suspension mittels Aufbereitung und Kultur gewonnen werden. Hierfür besteht allerdings aus mehreren Gründen keine Notwendigkeit. Unter anderen gehen bestimmte Zellen, welche offenbar förderlich für den Regenerationsvorgang sind, durch die Aufbereitung verloren. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die ADRCs den ADSCs nicht unterlegen, zum Teil sogar überlegen hinsichtlich ihrer Wirkung bei Herzmuskel-, Sehnen- oder Knochenregeneration sind (52-54). Der Vorteil einer fehlenden Kultivierung macht sich nicht nur in der zeitlichen Dimension aufgrund der Verfügbarkeit von ADRCs innerhalb von ca. 2 Stunden nach Liposuktion bemerkbar, sondern auch im fehlenden Risiko der Kontamination durch pathogene Erreger, Schadstoffe oder mechanischen und oxidativen Stress (55) während der Zeit der Kultur, während derer die Zellen besonders sensibel sind. In Kulturbedingungen zeigt sich ein verstärktes Wachstum der die Stammzellen begleitenden Zellen, wie z. B. Fibroblasten, während andere wichtige Vorläuferzellen verloren gehen.

An dieser Stelle sollte auch die Möglichkeit erwähnt werden, dass mesenchymale Stammzellen aus Zellmaterial des Knochenmarks gewonnen werden können: sogenannte *bone marrow mesenchymal stem cells* (BM-MSCs) bzw. *bone marrow aspirate concentrate* (BMAC). Abgesehen von geringeren, vermutlich individuellen Unterschieden sind sich mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und Fettgewebe hinsichtlich ihrer Morphologie, Oberflächeneigenschaften und ihrer Differenzierungskapazität weitgehend ähnlich (56). Da die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark bereits seit vielen Jahren bekannt sind, werden in der regenerativen Medizin aktuell häufiger Methoden mit BM-MSCs erforscht und klinisch angewandt (57). Die Gewinnung von Stammzellen aus Fettgewebe hat jedoch mehrere Vorteile: Fettgewebe ist einfach und meistens in größerer Menge verfügbar, außerdem kann das Fettgewebe mit minimalinvasiven Verfahren unkompliziert gewonnen werden. Zellen des Knochenmarks müssen hingegen in einer meist schmerzhaften und invasiven Prozedur mittels Aspiration gewonnen werden (56). Obwohl die Knochenmarksaspiration ein sicheres und nebenwirkungsarmes Verfahren darstellt, bestehen doch Nachteile bezüglich des Schmerzes,

Blutungsrisikos und der Morbidität der PatientInnen (56, 58). Der entscheidende Unterschied ist allerdings die Tatsache, dass der Anteil echter mesenchymaler Stammzellen am Knochenmarksaspirat sehr niedrig ist (<0.1 % aller aspirierten Zellen), während der Anteil von mesenchymalen Stammzellen in aspiriertem Fettgewebe um ein Vielfaches höher liegt (56, 59). Um im applizierbaren Stammzellprodukt also auf relevante Konzentrationen echter Stammzellen zu kommen, müssten die BM-MSCs zunächst isoliert und kultiviert werden. Dieser Prozess geht allerdings – wie weiter oben bereits ausführlich diskutiert – mit Zeitverlusten, Risiken der Kontamination sowie zellulärer Stressbelastung einher. Es wurden zwar Methoden etabliert, das Knochenmarksaspirat zum *bone marrow aspirate concentrate* (BMAC) zu konzentrieren, jedoch ist hierbei der Anteil mesenchymaler Stammzellen im Vergleich zu ADRCs mutmaßlich geringer und die bislang kommerziell erhältlichen Aufbereitungsmethoden sind schlecht verstanden und zu inhomogen: es bestehen starke Schwankungen in der Qualität des Aspirationskonzentrats sowie hinsichtlich des Stammzellen-Anteils (60).

In der klinischen Forschung zeigten erste Studien insbesondere bei der Therapie von *partial-thickness rotator cuff tears* einen deutlichen Therapieerfolg bei Injektion von ADRCs im Vergleich zur Injektion von Kortikosteroid (der Standardtherapie von *partial-thickness rotator cuff tears* in den USA) (61, 62).

## 1.8 Tendinopathien und assoziierte Stammzelltherapie

Erkrankungen und Verletzungen von Sehnen werden zwar immer besser erforscht, allerdings präsentiert sich bereits die Terminologie nicht nur im klinischen Alltag, sondern auch in der wissenschaftlichen Literatur sehr heterogen. Inzwischen scheint die Begrifflichkeit der „Tendinopathie“ in der Fachwelt als geklärt, seitdem der *International Scientific Tendinopathy Symposium Consensus* veröffentlicht wurde (63). Tendinopathie ist die bevorzugte Bezeichnung für anhaltende Sehnenschmerzen und Funktionsverluste im Zusammenhang mit mechanischer Belastung, und muss als rein klinische Diagnose folglich nicht zwangsläufig durch bildgebende Verfahren gesichert werden. Während vor etwa 20 Jahren der Begriff der „Tendinose“ histopathologisch durch Zeichen der Sehnendegeneration mit Alterationen der Kollagenstruktur und der Extrazellulärmatrix sowie abnormaler Struktur und abnormaler Anzahl von Tenozyten definiert wurde (64), ist die Tendinose nun wissenschaftlich umstritten, da histologische Gewebeveränderungen eine Momentaufnahme einer Reihe von morphologischen Prozessen mit unsicherer klinischer Relevanz und unter Umständen sogar eher physiologischer als pathologischer Natur sind (64). Dieser heterogene und umstrittene Erkenntnisstand zur Histopathologie bei Tendinopathien erschwert die Forschung zur Ätiopathogenese von Sehnenerkrankungen, die bislang ohnehin nur unzureichend verstanden sind. Während bereits zahlreiche Risikofaktoren definiert werden konnten, lässt sich die Tendinopathie mutmaßlich auf biomechanische und molekularbiologische Vorgänge zurückführen. Diverse Studien konnten Fehl- und Überlastungen von Sehnen, vor allem im Rahmen von zyklischen Belastungen, als Einflussfaktor bei Tendinopathien belegen (65-68). Weitere Grundlagenstudien beschrieben Einflüsse auf molekularer Ebene in Tenozyten als mitverursachend für tendinopathische Beschwerden: einerseits sind mittlerweile diverse genetische Faktoren bekannt (69-71); andererseits spielt offenbar die Interaktion mit dem Immunsystem (72, 73) und die Nährstoffversorgung eine Rolle, was ebenfalls die volle

Funktionsfähigkeit der Tenozyten beeinflusst (74-77). Die Tendinopathie ist insgesamt ein sehr häufiges Krankheitsbild; die Inzidenz der Tendinopathie der Rotatorenmanschette liegt beispielsweise im Bereich von 0,2 - 5,5 % und die Prävalenz etwa zwischen 0,5 - 7,4 % (78). Dass Tendinopathien vermehrt mit Sport assoziiert sind, ergibt sich daraus, dass ca. 20 % aller Sportverletzungen zu den Tendinopathien (v. a. Tendinopathien der Patellar- und Achillessehne) zu zählen sind (79) und ca. 35 % aller Tendinopathien im Zusammenhang mit Sport stehen (80).

Von der klinisch diagnostizierten Tendinopathie zu unterscheiden ist der Sehnenriss bzw. die Sehnenruptur, welche als makroskopische Diskontinuität einer tragenden Sehne zu betrachten ist (63). Bereits vor 20 Jahren wurden Stimmen laut, die forderten, der Begriff der (partiellen) Sehnenruptur sollte einem makroskopisch erfassbaren (Teil-) Riss der Sehne aufgrund (sub-) akuter Läsion vorenthalten bleiben, da der Begriff häufig fälschlicherweise mit der degenerativen Tendinopathie gleichgesetzt wird (64). Die exakte Trennung zwischen Sehnenriss und -degeneration wird allerdings von zwei Umständen erschwert: Obwohl es naheliegend wäre, dass Sehnen wie andere anatomische Strukturen durch ein Trauma ohne jegliche Vorschädigung bei ausreichend hohen einwirkenden Kräften reißen können, scheinen Sehnenrupturen nur bei bereits vorgeschädigten, degenerativ veränderten Sehnen aufzutreten (81). Außerdem gestaltet sich die korrekte Diagnosestellung eines Sehnenrisses in der standardmäßigen Bildgebung, der Magnetresonanztomografie (MRT), als schwierig. Sowohl degenerative Veränderungen als auch Risse können ein hyperintensives Signal in der T2-Wichtung innerhalb der Sehnenstruktur generieren, und können dadurch nicht zweifelsfrei voneinander unterschieden werden (82). In Anbetracht der Tatsache, dass insbesondere die mukoide Sehnedegeneration mit einer Rissbildung assoziiert ist und beide Pathologien sich mutmaßlich gegenseitig bedingen, ist eine eindeutige Zuteilung einer intratendinösen Läsion im MRT ohne histopathologische Analyse kaum möglich (82). Erschwert wird die radiologische Einteilung durch die Tatsache, dass anatomisch physiologische Strukturen im MRT hyperintens erscheinen können und somit mit Pathologien verwechselt werden können (83). Die Befunde in der Bildgebung korrelieren zudem nicht zwingend mit klinischen Beschwerden: bei einem großen Teil der Bevölkerung (bis zu etwa einem Fünftel) konnten mittels MRT pathologische Veränderungen der Rotatorenmanschette nachgewiesen werden, wobei die Probanden jedoch meist keine klinischen Symptome zeigten (84, 85).

Bislang bestand die Therapie von Tendinopathien oftmals aus konservativen Therapiemethoden wie der Pausierung sportlicher Aktivitäten, Physiotherapie mit dem Fokus auf exzentrischen Kräftigungsübungen, der Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) bzw. Antiphlogistika) oder Injektionstherapien (86-88). Bei Versagen konservativer Methoden konnte ein operatives Débridement oder eine Sehnenrefixation erwogen werden (86-88). Ein mittlerweile etabliertes Therapieverfahren zur Behandlung von Tendinopathien stellt die extrakorporale Stosswellentherapie dar (89). Der Therapieerfolg lässt sich unter anderem durch die Überaktivierung der Substanz P-Ausschüttung aus C-Nervenfasern, was den neurogenen Entzündungskreislauf durchbricht, und der verstärkten Expression von Lubricin als Gleitsubstanz für die Sehne im Peritendineum erklären (90).

In den letzten Jahren fand zunehmend auch die Applikation von Stammzellen in der klinischen Forschung zu Tendinopathien Beachtung. Bisher sind allerdings nur wenige klinische Studien

über Stammzelltherapien zur Behandlung von Sehnendefekten publiziert worden, und die publizierten Studien unterscheiden sich immens hinsichtlich der verwendeten Stammzellen (*adipose-derived mesenchymal stem cells, bone-marrow derived mesenchymal stem cells, bone-marrow mononuclear cells, adipose-derived stromal vascular fraction* etc.), ihrer Studienqualität (randomisiert-kontrollierte Studien / Studien mit nicht-randomisierter Kontrollgruppe / Fallserien) und in der Immunogenität der verwendeten Stammzellen (allogen / autolog) 91, 92). Es sollte hier zudem beachtet werden, dass die jeweiligen Stammzellarten innerhalb ihrer Gruppe aufgrund unterschiedlicher Methodik in Gewinnung, Aufbereitung und Transplantation nicht ohne weiteres verglichen werden können. Insgesamt lassen sich also keine generalisierten Aussagen zur Wirksamkeit von Stammzellprodukten bei der Sehnenregeneration treffen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Technologie „Transpose Ultra System“ (InGeneron, Houston, TX, USA) zur enzymatischen Isolierung von ADRCs aus Lipoaspirat wurde bereits in den zuvor erwähnten klinischen Studien (61, 62) verwendet. In diesen randomisiert-kontrollierten Studien erhielten PatientInnen mit symptomatischen Teilrupturen der Rotatorenmanschette nach Versagen konservativer Therapiemethoden über mindestens 6 Wochen eine Injektion von autologen ADRCs an die Stelle der Teilruptur (n=11; ADRC-Gruppe) oder aber eine Injektion von Kortikosteroid zusammen mit einem Lokalanästhetikum (n=4; Kortikosteroid-Gruppe). Der mittlere *American Shoulder and Elbow Surgeons Standardized Shoulder Assessment Form* (ASES) Score als klinischer Maßstab der Funktionalität der Schulter betrug bei der ADRC-Gruppe  $58.7 \pm 19.2$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts) vor Intervention,  $86.1 \pm 4.9$  24 Wochen nach der Injektion sowie  $89.4 \pm 4.9$  ein Jahr nach der Injektion (ein ASES-Score von 100 bedeutet völlige Schmerzfreiheit sowie volle Beweglichkeit und Nutzbarkeit der Schulter im Alltag). Der mittlere ASES-Score der Kortikosteroid-Gruppe betrug  $50.6 \pm 6.7$  vor Intervention,  $60.8 \pm 6.2$  24 Wochen nach Injektion und  $68.4 \pm 4.4$  ein Jahr nach der Injektion (61). Diese Studie konnte den klinischen Erfolg der Behandlung von *partial-thickness rotator cuff tears* mit ADRCs, die mit dem Transpose Ultra System (InGeneron) aus Lipoaspirat isoliert wurden, belegen.

Bislang ist jedoch unklar, welche biologischen Prozesse innerhalb des Gewebes in den genannten klinischen Studien (61, 62) stattgefunden hatten und ob tatsächlich neues, echtes Sehngewebe gebildet wurde. Da wie oben beschrieben das MRT nur unzureichend zur Beurteilung der Sehnenstruktur und -integrität geeignet ist, ist eine histologische Untersuchung des Gewebes für diese Fragestellung notwendig. Zur Anfertigung histologischer Schnitte ist jedoch eine invasive Maßnahme, mindestens eine Biopsie der Sehne, notwendig. Es wäre allerdings ethisch nicht vertretbar, bei einer Gruppe von PatientInnen mit einem Sehnendefekt, welcher mit ADRCs erfolgreich behandelt wurde, im Anschluss an die „Sehnenheilung“ eine Biopsie zu entnehmen, da dieser Eingriff die Therapie konterkarieren würde. Eine Ausnahme bildet der medizinische Selbstversuch, der nicht von einer Ethikkommission beurteilt werden muss: ein Mitglied unserer Forschungsgruppe erlitt selbst einen Sehnenriss und erhielt therapeutisch eine Injektion autologer ADRCs an den Ort des Sehnendefekts (93). Nach 10 Wochen wurde die betroffenen Sehne biopsiert, und es wurden histologische und immunohistochemische Schnitte angefertigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ADRCs zu einer narbenfreien Sehnenheilung führten, was normalerweise ausschließlich in fetalen Sehnen beobachtet wurde (vgl. (94)).

Vor wenigen Jahren wurde in einem Case Report die Verwendung allogener ADRCs beim Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom beschrieben (95). Dies führt unmittelbar zu der Frage, ob die Transplantation allogener ADRCs eine generelle Therapieoption in der Medizin ist. Die Verwendung allogener ADRCs hätte den Vorteil, dass bei den PatientInnen selber keine Intervention zur Gewinnung der Zellen (Lipoaspiration) notwendig wäre, um das Stammzellprodukt zu generieren. Es könnte jeweils von wenigen Spendern gewonnen werden und anschließend in größere Marge skaliert werden, was erhebliche wirtschaftliche Vorteile mit sich bringen würde. Wie weiter oben beschrieben, muss an dieser Stelle aber auf die Problematik bei der Transplantation allogener Stammzellprodukte hingewiesen werden, vor allem in Hinblick auf mögliche Abstoßungsreaktionen der körperfremden Zellen. Allerdings enthält das in der vorliegenden Arbeit verwendete Präparat der ADRCs nicht nur reine Stammzellen, sondern auch die zelluläre Umgebung mit trophischen Faktoren. Dieses sogenannte zelluläre „Sekretom“ verfügt selbst über die Fähigkeit, die Regeneration von residenten Körperzellen anzuregen (96). Die vorliegende Arbeit hat unter anderem zum Ziel, in einem grundlagenwissenschaftlichen Tiermodell die Anwendung allogener ADRCs auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen. Da sich die Transplantation autologer ADRCs bei Sehnendefekten bereits erfolgreich gezeigt hat (61, 62), stellt die Behandlung von einem partiellen Sehnendefekt mit allogenen ADRCs ein sinnvolles Modell dar, um die Effektivität der allogenen ADRCs zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur weiteren Erforschung dieser Thematik zwei Tierversuchsreihen zur histologischen und immunhistochemischen Evaluation der Regeneration von partiellen Sehnendefekten mittels ADRCs initiiert: In Versuch I wurde der Regenerationsprozess mittels allogenen transplantierten ADRCs histologisch und MR-tomografisch untersucht, während Versuch II den Regenerationsprozess mittels autolog transplantierten ADRCs histologisch und immunhistochemisch analysierte. In den Versuchshypothesen wurde angenommen, dass jeweils allogenen bzw. autolog gewonnene und lokal an den Sehnendefekt applizierte ADRCs die Regeneration des partiellen Sehnendefekt verbessern.

## Material & Methoden

Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei Versuche. Jeder Versuch wurde jeweils separat durchgeführt; der Ablauf und die Ergebnisse von Versuch II wurden bereits auf einen Preprint server hochgeladen (97).

Einige der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Schritte wurden nicht vom Autor der vorliegenden Arbeit selbst durchgeführt. Die entsprechenden Beschreibungen sind im folgenden Text durch Kursivschrift hervorgehoben.

Bei Versuch I wurde die Sehnenregeneration mit allogenen ADRCs untersucht, und bei Versuch II die Sehnenregeneration mit autologen ADRCs. Beide Arten von Zellen wurden auf dieselbe Art und Weise gewonnen und aufbereitet; lediglich der ursprüngliche Organismus der Zellen unterschied sich.

### 2.1 Versuch I: Behandlung von experimentell induzierten Sehnenteildefekten mit allogenen ADRCs im Tierversuch

#### 2.1.1 Versuchsaufbau

##### Erklärung der Ethikkommission

Die in Abschnitt 2.1 der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durchgeführt und erhielten am 3. Mai 2019 vom *Institutional Animal Care and Use Committee* der Colorado State University die Genehmigung mit der Protokoll-Nummer A3572-01.

##### Für den Versuch verwendete Tiere

Aufgrund der besonderen biologischen Eignung (98) wurden für die Versuchsdurchführung Tiere der Art *Oryctolagus cuniculus* (auch unter dem Namen „Wildkaninchen“ im deutschsprachigen Raum bekannt) verwendet.

*Zwölf etwa 14-16 Wochen alte, skelettreife Weibchen dieser Art wurden dafür von der Firma Western Oregon Rabbit Co. (Philomath, OR, USA) bezogen. Die im Versuch verwendeten Tiere waren zuvor für keine vorherigen / anderen Versuche verwendet worden. Um auszuschließen, dass die Durchführung oder die Ergebnisse der Studie durch mögliche Vorerkrankungen der Tiere beeinträchtigt wurde, wurden die verwendeten Tiere von einem Tierarzt vor Versuchsbeginn körperlich untersucht. Alle im Versuch verwendeten Tiere zeigten einen akzeptablen Gesundheitszustand, ein akzeptables Alter und Gewicht und waren frei von Krankheiten oder anderen abnormen Körperfunktionen. Im Verlauf der gesamten Studiendauer wurde das Körpergewicht der Tiere alle zwei Wochen überprüft. Die Tiere erhielten zur Unterscheidung eine studienspezifische Nummerierung. Um ideale Studienbedingungen zu gewährleisten, wurden die Tiere unter Imitierung des natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten; die durchschnittliche Raumtemperatur der luftfeuchtigkeits- und temperaturkontrollierten Stallräumlichkeiten betrug ca. 25° Celsius. Die entsprechenden Räumlichkeiten befanden sich auf dem Gelände der Colorado State University im Gebäude für*

Versuchstierressourcen (Fort Collins, CO, USA). Die Betreuung der Tiere erfolgte durch dort ansässige KollegInnen. Während des gesamten Studienablaufs wurden die Standardarbeitsanweisungen der Abteilung für Versuchstierressourcen der Colorado State University streng eingehalten. In Standard-Kaninchenkäfigen mit glatten Spaltenböden und darunterliegenden Auffangwannen für Kot/Urin wurden die Versuchstiere jeweils einzeln und mindestens sieben Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung gehalten, um eine mögliche Beeinträchtigung des Versuchsablaufs durch äußere Umstände in der Stallhaltung zu reduzieren. Zur Aufrechterhaltung der Stallhygiene wurden die jeweiligen Käfigeinstreuungen täglich ausgetauscht und die gesamten Käfige alle zwei Wochen gewechselt. Die Fütterung der Kaninchen erfolgte mittels einer Mischung bestehend aus handelsüblichem Laborkaninchenfutter (Envigo Teklad 2031; Envigo, Indianapolis, IN, USA) sowie Heu aus einer Gräserzubereitung. Sowohl die Nahrungsaufnahme als auch die Trinkwasserzufuhr über Leitungswasser erfolgten ad libitum, folglich nach Belieben der Tiere.

Aufbau der Versuchsgruppen und Einteilung der Versuchstiere

Zu Beginn der Studie wurden  $n=12$  Kaninchen nach dem Zufallsprinzip in eine der drei in Tabelle 2.1 genannten Gruppen eingeteilt.

**Tabelle 2.1:** Einteilung der nummerierten Kaninchen in die Versuchsgruppen.

allogene-ADRCs-Gruppe	RLL-Gruppe	Kontrollgruppe
T7876	T7878	T7877
T7880	T7882	T7879
T7881	T7885	T7884
T7883	T7887	T7886

Gruppe I: Behandlung mit allogenen ADRCs (allogene-ADRCs-Gruppe)

Zur Generierung eines experimentell induzierten Sehnenteildefekts fand eine operative Durchtrennung der rechtsseitigen Sehnen der *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis* auf mittlerer Höhe der gemeinsamen *Calcaneusehne* statt. Eine Woche nach dem Eingriff wurden im operierten Bereich die allogenen ADRCs injiziert.

Gruppe II: Ringer-Laktat-Lösungs- (RLL-) Gruppe

Bei gleichem Operationsablauf wie bei den Kaninchen in der allogenen-ADRCs-Gruppe wurden zu Beginn die rechtsseitigen Sehnen der *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis* auf mittlerer Höhe der gemeinsamen *Calcaneusehne* durchtrennt. Anschließend wurde jedoch eine Woche postoperativ anstatt der allogenen ADRCs eine Ringer-Lactat-Lösung in die Läsion injiziert.

Gruppe III: Kontrollgruppe

Eine dritte Gruppe von Kaninchen erhielt weder eine operative Sehnendurchtrennung noch eine Injektion und diente als Kontrollgruppe.

## Verblindung der an der Studie beteiligten Personen

Während des Zeitraums der Studie wurde darauf verzichtet, die an der Durchführung beteiligten Personen, Versuchsleitende sowie Forschende zu verblinden. Eine Ausnahme hiervon bestand für diejenigen Personen, welche die quantitativen Analysen durchführten. Dies traf auf einen radiologischen Facharzt zu, der die Intensitätswerte der MRT-Aufnahmen auswertete, sowie auf den Autor der vorliegenden Arbeit, der die histologischen Schnitte des neu entstandenen Gewebes an der Läsionsstelle stereologisch untersuchte.

### 2.1.2 Experimenteller Ablauf

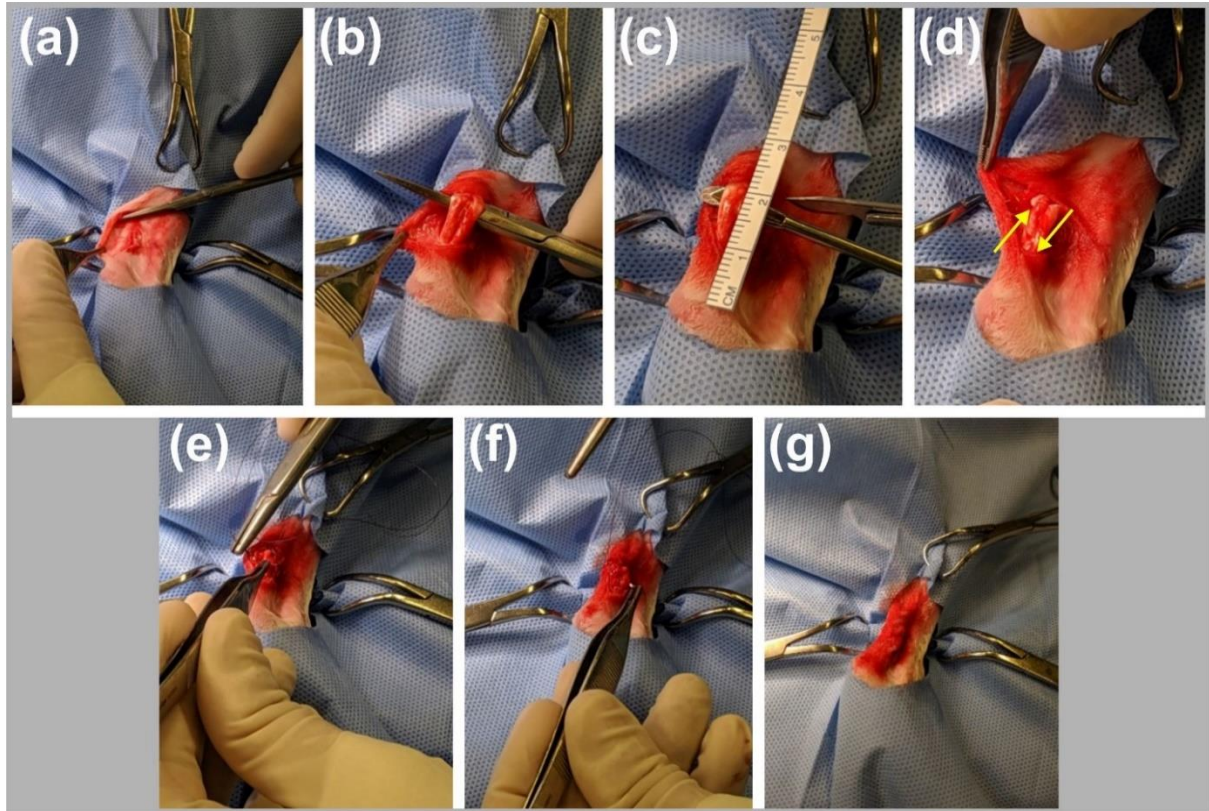
#### Operative Erzeugung eines experimentell induzierten Sehnenteildefekts

*Der gesamte chirurgische Eingriff fand in den Labors der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch dort ansässige KollegInnen statt. Die Operation wurde ausschließlich an Kaninchen der allogenen-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe vollzogen; die Kaninchen in der Kontrollgruppe erhielten keinen Eingriff. Für den Ablauf der Operation wurden die Kaninchen auf einem Operationstisch in linksseitiger Liegeposition gelagert. Während des gesamten Operationszeitraums wurden die Kaninchen in Allgemeinanästhesie gehalten. Dabei wurden sie etwa alle fünf Minuten mit den Schwerpunkten Atmung und Bewegungsausmaß auf eine ausreichende Narkotisierung überwacht. Das Protokoll der anästhesiologischen Operationsunterstützung bestand präoperativ aus einer subkutanen Injektion von Buprenorphin (0,03 mg/kg Körpergewicht; Par Pharmaceutical, Chestnut Ridge, NY, USA), Glycopyrrolat (0,005 mg/kg Körpergewicht; Somerset Therapeutics, Hollywood, FL, USA), Ketamin (25 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products, Overland Park, KS, USA) und Dexmedetomidin (0,02 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products). Die Aufrechterhaltung der Allgemeinanästhesie wurde durch kontinuierliche Inhalation von Isofluran (1-5%; VetOne, Boise, ID, USA) während des chirurgischen Eingriffs gewährleistet.*

*Vor Operationsbeginn wurde das rechte Hinterbein des jeweiligen Kaninchens mittels Rasur von Fell befreit; das jeweils linke Hinterbein wurde nicht operiert. Anschließend wurde das rasierte Hautareal abwechselnd mit Povidon-Jod und Alkohol desinfiziert, um aseptische Bedingungen für den Eingriff herzustellen. Zusätzlich wurde eine sterile Folie mit runder Öffnung (Lochtuch) um den Operationsbereich aufgelegt. Zur Definition des exakten Operationsareals wurde die rechte gemeinsame Calcaneussehne aufgesucht (99) und an deren posterioren Seite ein etwa ein bis drei Zentimeter langer Hautschnitt vollzogen (Abb. 2.1A). Von der daraufhin sichtbaren Sehne wurde das Peritendineum operativ eröffnet (Abb. 2.1B) und anschließend die Sehnen der Mm. gastrocnemii medialis und lateralis auf mittlerer Höhe der gemeinsamen Calcaneussehne vollständig durchtrennt. Dafür wurde ein chirurgisches Lineal verwendet, um einen möglichst genauen Abstand von etwa zwei Zentimetern zum Calcaneus gleichermaßen bei jedem Versuchstier zu garantieren (Abb. 2.1C, D). Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die Sehnen des Musculus soleus, Musculus plantaris, Musculus flexor digitorum superficialis und der calcaneale Sehnenanteil des Musculus semimembranosus nicht beschädigt wurden (vgl. 100). Anschließend wurde das Peritendineum mit einem 4-0-Monofilament-Nahtmaterial (Biosyn; Medtronic, Minneapolis, MN, USA) vernäht (Abb. 2.1E). Die Haut wurde mit einer nicht resorbierbaren monofilen Nylonnaht (Covidien, Mansfield, MA, USA) standardmäßig verschlossen*



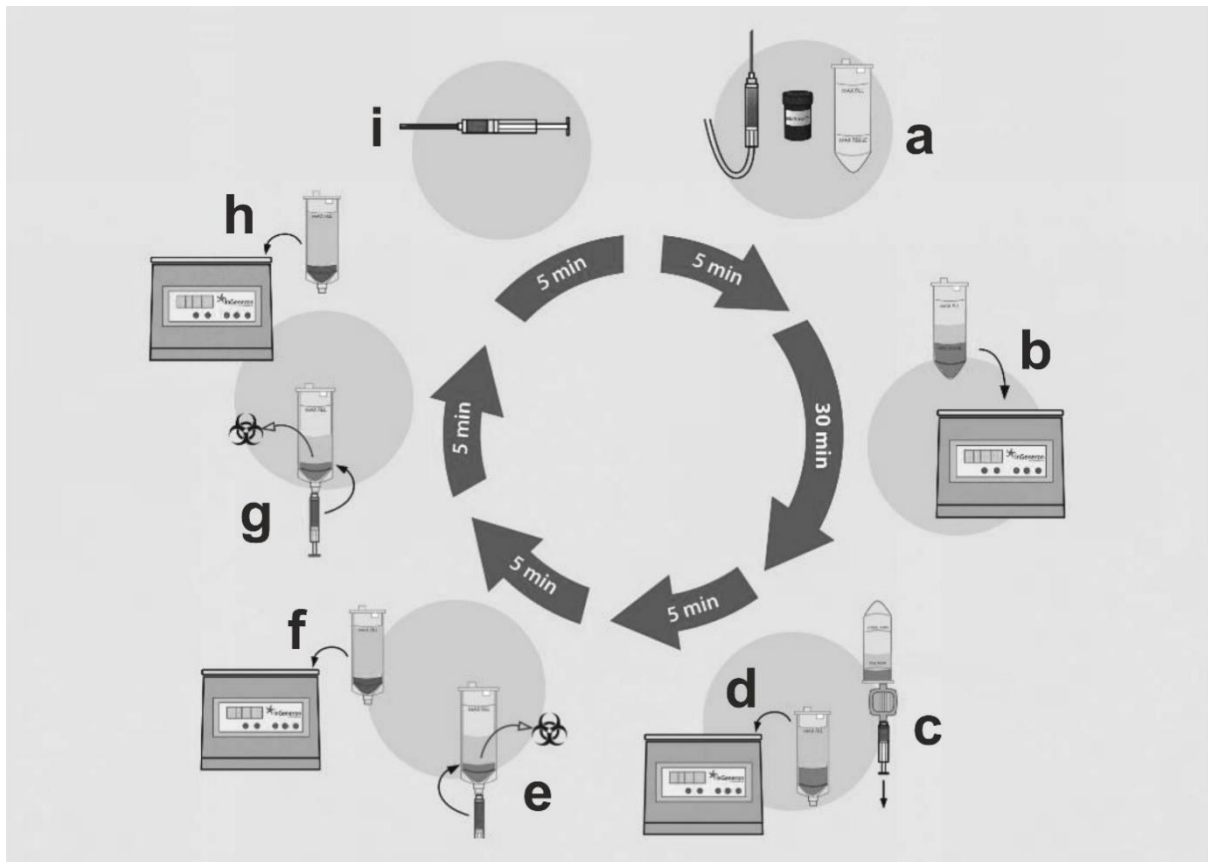
(Abb. 2.1F, G). Zur postoperativen Schmerzreduktion wurde den Tieren 24 Stunden nach dem Eingriff Meloxicam (1mg/kg Körpergewicht; VetOne) subkutan verabreicht. Zudem erhielten die Versuchstiere diese Schmerzmedikation alle drei Tage bei entsprechendem Bedarf.



**Abbildung 2.1:** Operative Erzeugung eines experimentell induzierten Sehnenrissdefekts der gemeinsamen Calcaneusehne beim Kaninchen: (a) Hautschnitt; (b) Eröffnung des Peritendineums; (c) Abmessung des exakten Durchtrennungsbereichs; (d) durchtrennte Sehnen der Mm. gastrocnemii medialis und lateralis (die gelben Pfeile zeigen die jeweiligen Sehnenstümpfe an); (e) Naht des Peritendineums; (f) Hautnaht; (g) Verschluss der Haut.

Injektion von allogenen ADRCs (allogene-ADRCs-Gruppe)

Direkt nach Erstellung einer ersten MRT-Schnittbildserie wurde sieben Tage nach dem chirurgischen Eingriff den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe eine Injektion mit allogenen ADRCs verabreicht. Die Isolierung der allogenen ADRCs erfolgte aus dem Fettgewebe nicht an der Studie teilnehmender Kaninchen, welche als Spender von Fettgewebe dienten. Zu diesem Zweck wurden vier weitere Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) nach den Richtlinien der American Veterinary Medical Association (AVMA) am Tag vor der geplanten Injektion euthanasiert. Dies geschah mittels einer Injektion von überdosiertem Natrium-Pentobarbital (88mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products). Zuvor erhielten die Kaninchen ebenso wie die Studien-Kaninchen eine individuelle Nummerierung zur Identifikation: 6379, 6380, 6390 und 6392. Aus dem periliinalen, intraperitonealen Fettpolster der Spender-Kaninchen wurde Fettgewebe entnommen und in einem Kühlschrank bei 4° Celsius über Nacht eingelagert. Zur Isolierung der allogenen ADRCs vom am Vortrag resezierten Fettgewebe wurde das Transpose Ultra System (InGeneron, Houston, TX, USA) verwendet.



**Abbildung 2.2:** Separierung der Stromalen vaskulären Fraktion aus Fettgewebe (modifiziert nach (49)).

In (49) wurde der Ablauf des Isolationsvorgangs von ADRCs aus Fettgewebe mittels des Transpose Ultra Systems (InGeneron) detailliert beschrieben:

1. Das gewonnene Fettgewebe wurde mit einem Zehntel seines Volumens enzymatischer Matraxe-Reagenz und auf 39° Celsius vorgewärmter Ringer-Lactat-Lösung in ein Verarbeitungsröhrchen gefüllt (Abb. 2.2a).
2. Anschließend wurde die Mixtur im umgekehrt positionierten Röhrchen in der Processing Unit des Transpose RT-Systems 30 Minuten lang bei 39 °C wiederholt beschleunigt und abgebremst (Abb. 2.2b).
3. Die verarbeitete Lösung wurde durch einen 200 µm-Filter geleitet und in ein Waschröhrchen überführt (Abb. 2.2c).
4. Das Waschröhrchen wurde mit Kochsalzlösung aufgefüllt; danach wurden die Röhrchen bei 600 G und Raumtemperatur für fünf Minuten in der Processing Unit des Transpose Ultra Systems zentrifugiert, was zu einer Trennung der Zellen vom restlichen Gewebe führte (Abb. 2.2d).
5. Das etwa zwei Milliliter betragende Gemisch aus regenerativen Zellen wurde durch einen Luer-Adapter extrahiert, während die Restsubstanz bestehend aus Fett, Geweberesten und Flüssigkeit verworfen wurde (Abb. 2.2e).
6. Das Zellgemisch wurde zusammen mit frischer Kochsalzlösung erneut in das Waschröhrchen gefüllt und für fünf Minuten in der Processing Unit des Transpose Ultra Systems zentrifugiert (Abb. 2.2f); dieser Waschvorgang wurde wiederholt (Abb. 2.2f,h).

7. Zuletzt wurde das nun etwa drei Milliliter betragende Gemisch von ADRCs über einen Luer-Adapter in eine sterile Injektionsvorrichtung gedrückt. In der klinischen Anwendung könnten die ADRCs jetzt bei der Patientin / dem Patienten angewendet werden ( Abb. 2.2i).

Die Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität der isolierten ADRCs erfolgte mit einem Nucleocounter NC-200 Gerät (Chemometec, Allerød, Dänemark). Die erste Zählung („Zählung 1“ in Tabelle 2.2) erfolgte unmittelbar nach der Isolierung der Zellen; die zweite Zählung zur Kontrolle erfolgte am darauffolgenden Tag bei InGeneron („Zählung 2“ in Tabelle 2.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

**Tabelle 2.2:** Zelleigenschaften der in der vorliegenden Arbeit verwendeten allogenen stromalen vaskulären Fraktion.

<b>Kaninchen-Nummer (Spender von allogenen ADRCs)</b>	<b>6379</b>	<b>6380</b>	<b>6390</b>	<b>6392</b>
Gewicht des Gewebes [g]	9,21	9,96	11,29	10,39
Lebende Zellen ; Zählung 1 [x10 <sup>7</sup> /ml]	1,69	3,41	6,09	5,78
Lebende Zellen; Zählung 2 [x10 <sup>7</sup> /ml]	2,28	3,02	5,32	4,58
Lebende Zellen; Durchschnitt [x10 <sup>7</sup> /ml]	1,99	3,21	5,71	5,18
Abgestorbene Zellen; Zählung 1 [x10 <sup>6</sup> /ml]	0,90	1,88	1,20	2,18
Abgestorbene Zellen; Zählung 2 [x10 <sup>6</sup> /ml]	0,53	1,95	1,50	2,18
Abgestorbene Zellen; Durchschnitt [x10 <sup>6</sup> /ml]	0,71	1,91	1,35	2,18
Zellviabilität [%]	96,4	94,0	97,6	95,8
Gesamtvolumen [ml]	3	3	3	3
Gesamtanzahl lebender Zellen [x10 <sup>7</sup> ]	5,96	9,94	17,1	15,5
Lebende Zellen/g [x10 <sup>6</sup> ]	6,47	9,68	15,2	15,0
Mit den ADRCs behandelte Versuchstiere	T7876	T7881	T7883	T7880

Zur Injektion der allogenen ADRCs wurde unter allgemeiner Anästhesie der Sehnenteildefekt zuerst palpirt und anschließend unter sonografischer Kontrolle die Injektionsnadel am korrekten Ort platziert. Für die Sonografie wurde das Gerät „LOGIQ Vet ultrasound system“ (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) verwendet. Die Injektionslösung bestand aus  $5 \times 10^6$  allogenen ADRCs in 0,5 ml Ringer-Laktat-Lösung (B. Braun Medical, Bethlehem, PA, USA); die Konzentration der allogenen ADRCs betrug somit  $10 \times 10^6$  allogene ADRCs/ml). Abweichend davon erhielt Versuchstier Nr. T7881 lediglich 0,48 ml mit  $10 \times 10^6$  allogenen ADRCs/ml.

Sowohl die Generierung und Charakterisierung der allogenen ADRCs als auch die Injektion derselben wurde in den Labors der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch KollegInnen vor Ort durchgeführt.

### Injektion von Ringer-Lactat-Lösung in der RLL-Gruppe

Anstelle der allogenen ADRCs erhielten die Kaninchen in der RLL-Gruppe eine einzige Injektion von 0,5 ml Ringer-Laktatlösung. Dies fand unter den gleichen Bedingungen und am gleichen Ort wie die Injektion bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe statt (7 Tage postoperativ; ultraschallgestützt).

### Durchführung von Magnetresonanztomographie

Zur genaueren Beurteilung des Heilungsverlaufs wurde eine Woche postoperativ direkt vor der Injektion der allogenen ADRCs bzw. der Ringer-Lactat-Lösung (bereits in Allgemeinanästhesie) bei den Kaninchen dieser beiden Versuchsgruppen eine Magnetresonanztomographie (MRT) der operierten Gliedmaße in Rückenlage durchgeführt. Dazu wurde ein Magnetresonanztomograph der Art „3T MAGNETOM Skyra“ (Siemens, Erlangen, Deutschland) in den Labors der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) von den KollegInnen vor Ort verwendet. Die entsprechenden Geräteeinstellungen finden sich in Tabelle 2.3 (allgemeine Einstellungen) und Tabelle 2.4 (Versuchstier-spezifische Einstellungen).

**Tabelle 2.3:** Allgemeine Einstellungen des 3T MAGNETOM Skyra (Siemens), Woche 1, vor Injektion. Abkürzungen: PD proton density; PDW proton density weighted; TSE turbo spin echo; T1W T1-weighted; ETL echo train length; sag sagittal; tra transversal. Die Werte für (a)-(c) sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Einstellungen	PD TSE sag	PDW TSE tra	T1W tra	T2 TSE
Matrix	320 × 320	384 × 384	320 × 320	384 × 384
Slice thickness [mm]	2.0	2.5	2,5	2,5
Echo time (TE) [ms]	39	35	13	(b)
Repetition time (TR) [ms]	2550	(a)	682	(c)
ETL	7 k-space	7 k-space	3 k-space	14 k-space

**Tabelle 2.4:** Individuelle Einstellungen des 3T MAGNETOM Skyra (Siemens), Woche 1, vor Injektion. (a) Individuelle Time-of-repetition in der transversalen PDW-TSE-Sequenz. (b) Individuelle Time-of-echo in der T2-TSE-Sequenz. (c) Individuelle Time-of-repetition in der T2-TSE-Sequenz. Alle gezeigten Daten in [ms].

Versuchstier-Nr.	7885	7882	7887	7878	7880	7883	7881	7876
(a)	2820	2700	2810	2830	2980	3190	3040	2550
(b)	94	99	99	99	94	94	94	94
(c)	4850	5860	5860	5860	4850	4850	4850	4850

In der 13. Versuchswoche wurde direkt vor Euthanasie der Kaninchen eine erneute Magnetresonanztomographie zur Beurteilung des Heilungsverlaufs durchgeführt. Die Durchführung dieser Magnetresonanztomographie erfolgte auf dieselbe Weise wie bei der Magnetresonanztomographie in der ersten postoperativen Woche, also in Allgemeinanästhesie und Rückenlage mit einem 3T MAGNETOM Skyra Gerät (Siemens) in den Labors der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch die KollegInnen vor Ort. Die entsprechenden

Geräteeinstellungen finden sich in Tabelle 2.5 (allgemeine Einstellungen) und Tabelle 2.6 (individuelle Einstellungen).

**Tabelle 2.5:** Allgemeine Einstellungen des 3T MAGNETOM Skyra (Siemens), Woche 13, vor Euthanasie. Abkürzungen: PD proton density; PDW proton density weighted; TSE turbo spin echo; T1W T1-weighted; ETL echo train length; NEX number of excitations; sag sagittal; tra transversal. Die Werte für (a)-(f) sind in Tabelle 2.6 angegeben.

Einstellungen	PD TSE sag	PDW TSE tra	T1W tra	T2 TSE
Matrix	256 x 256	320 x 320	320 x 320	320 x 320
Slice thickness [mm]	2	2.5	2.5	2.5
Echo time (TE) [ms]	(a)	(b)	13	(e)
Repetition time (TR) [ms]	2500	(c)	(d)	(f)
ETL	7 k-space	7 k-space	3 k-space	14 k-space
NEX	1.00	2.00	2.00	2.00

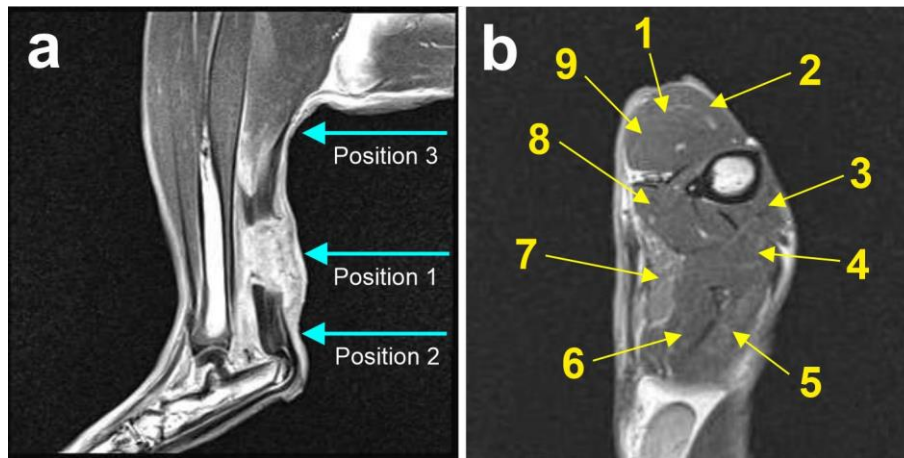
**Tabelle 2.6:** Individuelle Einstellungen des 3T MAGNETOM Skyra (Siemens), Woche 1, vor Injektion. (a) ) Individuelle Time-of-echo in der sagittalen PD-TSE-Sequenz. (b) Individuelle Time-of-echo in der transversalen PDW-TSE-Sequenz. (c) ) Individuelle Time-of-repetition in der transversalen PDW-TSE-Sequenz. (d) Individuelle Time-of-repetition in der transversalen T1W-Sequenz. (e) Individuelle Time-of-echo in der T2-TSE-Sequenz. (f) Individuelle Time-of-repetition in der T2-TSE-Sequenz.

Versuchstier-Nr.	7885	7882	7887	7878	7880	7883	7881	7876
(a)	44	44	44	43	44	44	44	39
(b)	26	26	26	26	26	26	26	31
(c)	2810	2810	2810	2810	2810	2810	2810	3110
(d)	834	682	682	682	688	682	682	682
(e)	90	90	90	90	90	90	90	94
(f)	5340	5340	5340	5340	5340	5340	5340	6040

Die Analyse der MRT-Schnittbilder erfolgte durch einen Facharzt für Radiologie, den Autor der vorliegenden Arbeit sowie den Berichtersteller der vorliegenden Arbeit.

Der Facharzt für Radiologie führte eine quantitative Analyse der MRT-Schnittbilder durch. Diese Analyse umfasste eine Bestimmung der Intensitätswerte in den folgenden Bereichen der transversalen PD-TSE-MRT-Schnittbilder (in Abb. 2.3a ist die Höhe der jeweiligen Transversalschnitte in der Sagittalebene dargestellt):

- an der proximalen Läsionsseite des Sehnendefekts (d.h. an den deshiszierten Enden der Sehnen der Mm. gastrocnemii medialis und lateralis) (vgl. Abb 2.3: Position 1),
- an der distalen Läsionsseite des Sehnendefekts (d.h. am Stumpf der Calcaneusehne) (vgl. Abb 2.3: Position 2), sowie
- innerhalb der Mm. gastrocnemii medialis und lateralis, soleus, plantaris und flexor digitorum longus (vgl. Abb. 2.3: Position 3).



**Abbildung 2.3:** Positionen der untersuchten transversalen MRT-Querschnitte im sagittalen MRT-Schnitt. (a) Position der untersuchten Transversalschnitte in der Sagittalebene. (b) Transversale 3.0 T PD-TSE MRT-Aufnahme an Position 3 (Nummerierung deutet auf den jeweiligen Muskel): 1) M. extensor digitorum longus, 2) M. tibialis anterior, 3) M. extensor hallucis longus, 4) M. plantaris, 5) M. gastrocnemius medialis, 6) M. gastrocnemius lateralis, 7) M. soleus, 8) M. flexor digitorum lonus, 9) Mm. peronei.

#### Prüfung der Beweglichkeit

In der 13. Versuchswoche wurde vor der Euthanasie der Kaninchen eine Messung des Bewegungsmaßes der hinteren Gliedmaßen in allgemeiner Anästhesie durchgeführt. Dazu wurde mittels eines Goniometers die passive Plantarflexion, die passive Dorsalextension sowie der Ruhewinkel des Sprunggelenks an beiden Hinterbeinen gemessen (jede Messung wurde drei Mal wiederholt). Die Messungen erfolgten mit der Neutral-Null-Methode (vgl. (101)), bei der sich die Längsachse des Fußes im rechten Winkel zur Längsachse des Schienbeins in der 0°-Stellung befindet. Anschließend wurde ein Durchschnittswert aus den jeweils drei ermittelten Werten gebildet. Die Beweglichkeitsprüfung wurde an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch die KollegInnen vor Ort durchgeführt.

#### Bestimmung von hämatologischen und klinisch-chemischen Laborwerten

Den Kaninchen wurde zwischen der Beweglichkeitsprüfung und der Euthanasie in Allgemeinanästhesie eine Blutprobe entnommen (mindestens zwei Milliliter Vollblut und Blutserum). Von dem entnommenen Blut wurde ein Differentialblutbild angefertigt. Darüber hinaus wurden die folgende Laborwerte bestimmt: Glukose (mg/dl), Harnstoff (mg/dl), Kreatinin (mg/dl), Gesamtcholesterin (mg/dl), Creatinkinase (IU/L), Bilirubin gesamt (mg/dl), Eiweiß gesamt (G/dl), Albumin (G/dl), Globulin (G/dl), Albumin/Globulin-Ratio (Verhältnis), Calcium (mg/dl), Phosphat(mg/dl), Alkalische Phosphatase (IU/L), ALT (IU/L), AST (IU/L), Gamma-GT (IU/L), Natrium (mEQ/L), Kalium (mEQ/L), Chlorid (mEQ/L), Bicarbonat / HCO<sub>3</sub> (mEQ/L), Anionenlücke (mmol/L) und Osmolalität (mOsm/Kg).

#### Euthanasie der Versuchstiere

Nach der in Allgemeinanästhesie durchgeführten Magnetresonanztomografie, der Beweglichkeitsprüfung und der Blutentnahme erfolgte die Euthanasie der Kaninchen in der 13. Versuchswoche. Um eine humane Euthanasie zu gewährleisten, wurden die Kaninchen nach den

*Richtlinien der American Veterinary Medical Association euthanasiert. Dies geschah durch die KollegInnen an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch eine tödliche, intravenöse Injektion einer Überdosis Natrium-Phenobarbital (88mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products).*

### 2.1.3 Histologie und stereologische Untersuchung

#### Anfertigung der histologischen Schnitte

*Um das zu untersuchende Gewebe der rechten Hinterbeine der Kaninchen möglichst schonend zu behandeln, wurden Muskeln, Sehnen und Knochen zunächst in ihrer Gesamtheit entnommen. Dieses sog. „En bloc“-Verfahren diente dazu, eine mögliche Verzerrung der Studienergebnisse aufgrund von Artefakten durch postmortale Beschädigungen des Gewebes zu vermeiden.*

*Nach der Gewebeentnahme wurden die gemeinsamen Calcaneussehnen vorsichtig vom restlichen Gewebe getrennt und mit 10% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden ca. 3 cm lange Gewebeblöcke aus den fixierten Sehnen herauspräpariert, in deren Mitte sich jeweils die Stelle der Injektion befand. Diese Gewebeblöcke wurden zur weiteren Fixierung erneut in 10% neutral gepuffertes Formaldehyd eingelegt, bis die Fixierung abgeschlossen war.*

*Zur Anfertigung von Serienschritten entlang der Längsachse der Sehnen wurden die fixierten Gewebeblöcke in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 µm dicke Serienschritte angefertigt, von denen pro Kaninchen je ein Schnitt mit Azan, Safranin O / Fast Green bzw. Picrosirius-Rot gefärbt wurde. Die histologische Aufarbeitung des Gewebes, einschließlich der Anfertigung und Färbung der Schnitte, erfolgte in den Labors der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch die KollegInnen vor Ort. Anschließend erfolgte der Versand der Schnitte an den Lehrstuhl für Anatomie II der LMU München.*

Im Labor des Lehrstuhls für Anatomie II der LMU München wurde jeweils ein weiterer Schnitt pro Kaninchen mit einer routinemäßigen Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Diese Schnitte wurden bei der stereologischen Analyse verwendet.

#### Analyse der histologischen Schnitte

In einem ersten Schritt wurden die angefertigten Schnitte auf Integrität und Vollständigkeit überprüft. Anschließend wurden die Sehnenpräparate in Hinblick auf ihre morphologischen Eigenschaften begutachtet. Dies hatte zum Ziel, den Heilungsprozess nach dem induzierten Sehndefekt bei den Kaninchen in den beiden Versuchsgruppen (allogene-ADRCs-Gruppe und RLL-Gruppe) zu evaluieren, sowie Unterschiede zwischen diesen zu detektieren. Dazu wurde insbesondere die Anordnung, Anfärbung und Konfiguration neu gebildeter Kollagenfasern in der Umgebung der Läsionsstelle betrachtet, welche essenziell für die biomechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Bindegewebes sind (102). Aufgrund des hohen Anteils an Kollagenfasern im Sehngewebe ist zudem deren Anordnung relevant für die mikroskopische Gesamterscheinung des Gewebes. Aus der Literatur ist bekannt, dass beim physiologischen Heilungsprozess von Sehngewebe auch nach vielen Monaten ein Unterschied zum ursprünglichen Gewebe verbleibt. Konkret erscheinen die Kollagenfasern im Vergleich zur ursprünglichen Anordnung aufgelockerter und weniger dicht gepackt, und die Kollagenfibrillen haben einen geringeren Durchmesser (103). Neben der Struktur der

Kollagenfasern gibt es auch Unterschiede bezüglich der Vaskularisation zwischen gesundem Sehngewebe und neu entstandenem Sehngewebe nach einer Läsion. Während im histologischen Schnitt von gesundem Sehngewebe so gut wie keine Blutgefäße oder Kapillaren erscheinen, bleiben auch nach mehreren Wochen im Heilungsverlauf Kapillaren und Gefäße sichtbar (104). Die Morphologie der zellulären Anteile im Sehngewebe hingegen ist recht heterogen und zudem abhängig vom biologischen Alter: parallel liegen im Gewebe rundlich geformte Tenoblasten (=Fibroblasten) sowie längliche, spindelartig geformte Tenozyten (=Fibrozyten) vor. Im Verlauf der Alterung findet eine zunehmende Transformation von Tenoblasten hin zu Tenozyten statt (105). Auch bei der Heilung von Sehngewebe findet ein relativer Anstieg der Anzahl von Tenoblasten sowie eine während der Regenerationszeit zunehmende Differenzierung der Tenoblasten zu Tenozyten statt (104).

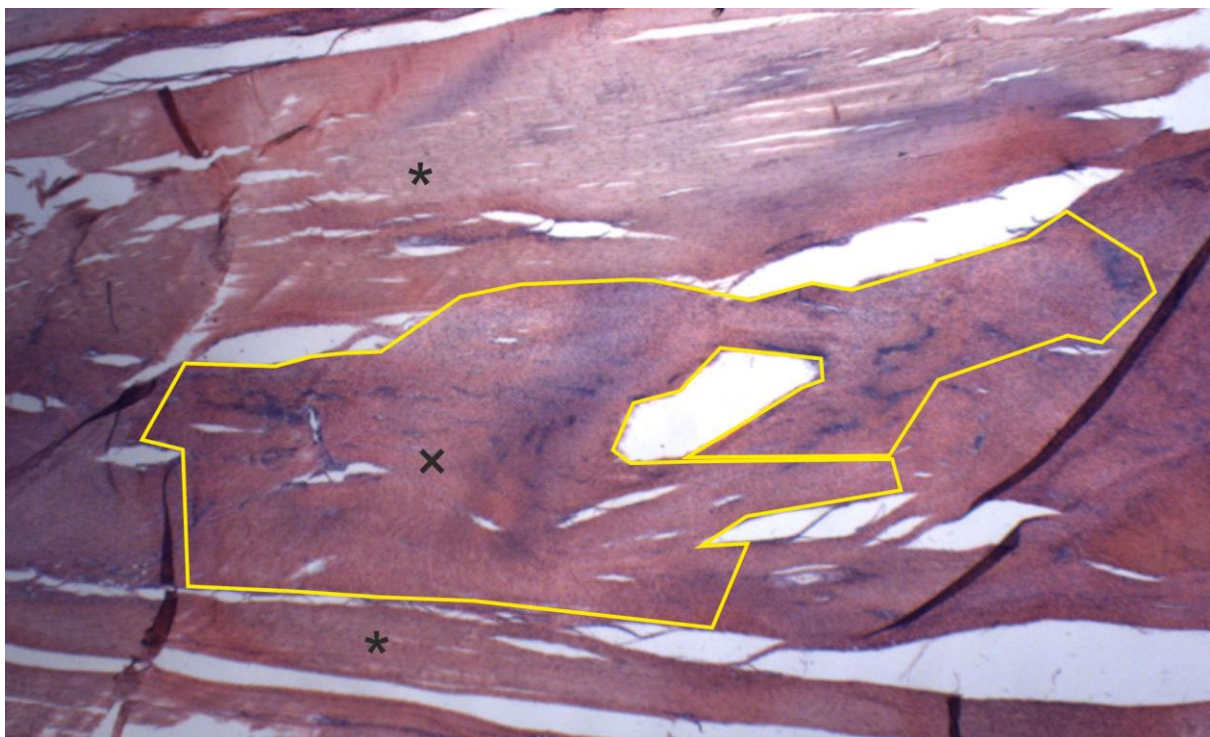
Um die Analyse der histologischen Schnitte weiter zu objektivieren, wurde eine stereologische Quantifizierung durchgeführt. Konkret wurde an den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten eine Punkt-Zähl-Methode angewandt: im neu gebildeten Bindegewebe wurde die relative Fläche ausgewertet, welche jeweils von Zellen, extrazellulärer Matrix und Blutgefäßen eingenommen wurde. Diese Analysemethode stellt ein Standardverfahren stereologischer Untersuchungen dar (106). Bei diesem Verfahren wurde zuerst eine „region of interest“ (ROI) innerhalb des histologischen Schnittes definiert, welche quantitativ analysiert werden sollte. Anschliessend wurde ein Gitternetz mit festen Abständen zwischen den Kreuzungspunkten der Gitternetzlinien in X- und Y-Richtung zufällig auf die ROI aufgelegt. Der Abstand zwischen den Gitternetzlinien wurde so gewählt, dass eine möglichst hohe Anzahl von Kreuzungspunkten der Gitternetzlinien auf der ROI zu liegen kam. Schließlich wurde für jeden Kreuzungspunkt der Gitternetzlinien ermittelt, über welcher mikroskopischen Struktur der Kreuzungspunkt lag (in der vorliegenden Arbeit Zellen, extrazelluläre Matrix, Blutgefäß oder Gewebeartefakte). Die Verteilung der Anzahl der Kreuzungspunkte der Gitternetzlinien über den entsprechenden mikroskopischen Strukturen entsprach dann dem relativen Anteil der jeweiligen mikroskopischen Struktur am untersuchten Gewebe.

In diesem Versuch bestand die technische Ausstattung für das stereologische Verfahren aus einem modifizierten Lichtmikroskop (Axioskop; Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland) mit Plan-Neofluar-Objektiven 1,25× (numerische Apertur [NA] = 0,03), 2,5× (NA = 0,085), Plan-Apochromat-Objektiven 5× (NA = 0,16), 10× (NA = 0,45), 20× (NA = 0,8) und 40× (NA = 0,95) (Carl Zeiss Mikroskopie). Das Mikroskop war mit einem motorisierten Objektträgtisch (MBF Bioscience, Williston, VT, USA), einer elektronischen Steuerung (MAC 6000 XY; Ludl Electronics, Hawthorne, NY, USA) und einem Fokus-Encoder (MT 1271; Heidenhain, Traunreut, Deutschland) ausgestattet. Das Setup der Hardware vervollständigte eine CCD-Farbvideokamera (1.600 x 1.200 Pixel; MBF Bioscience) zur zeitgleichen Aufnahme und Digitalisierung der mikroskopischen Ansicht des histologischen Schnitts. Dieser stereologische Arbeitsplatz war mit einem Computer verbunden. Mittels einer speziellen Analyse-Software (Stereo Investigator Version 10 für Windows; MBF Bioscience) konnten nun die folgenden Analyseschritte durchgeführt werden.

Zunächst wurde der jeweils zu untersuchende Gewebeschnitt auf den motorisierten Objektträgtisch gelegt, die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) gestartet und das 1,25x Objektiv in den Strahlengang eingebracht, um einen möglichst großen Flächenanteil des



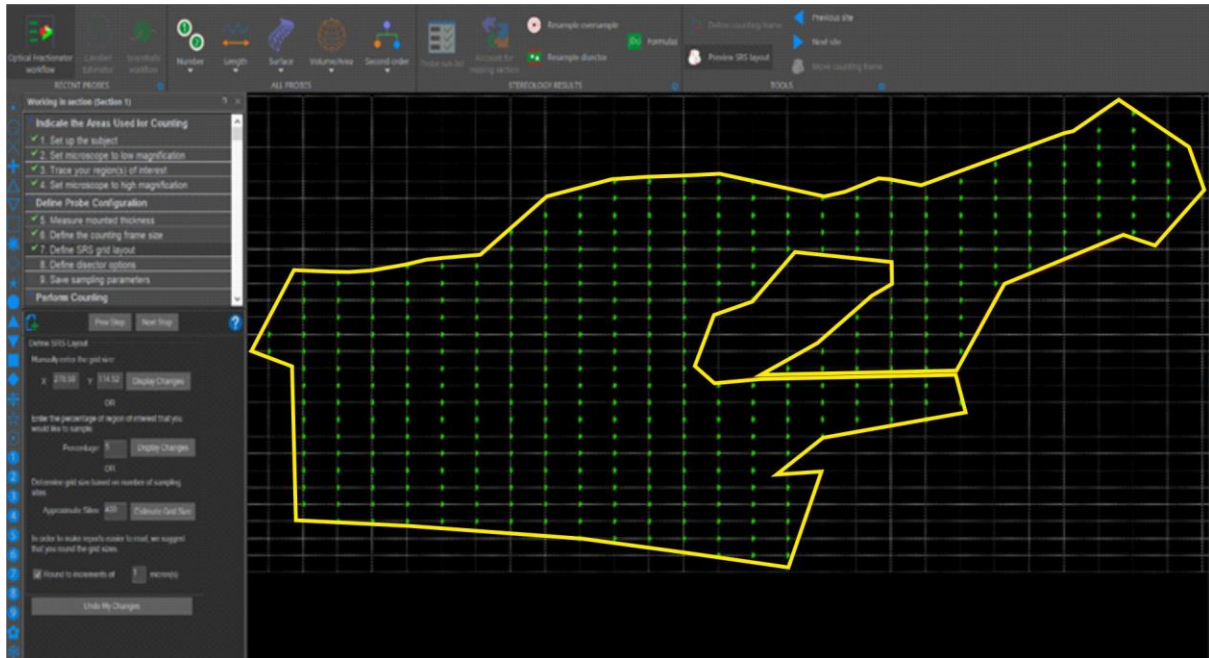
Gesamtpräparats begutachten zu können. Anschließend wurde die ROI, welche die Reparaturvorgänge der Sehne nach der induzierten Läsion zeigte, großzügig abgegrenzt (sog. „Tracing“ in der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience); vgl. Abb. 2.4). Dieser Sehnenbereich unterschied sich insofern vom intakten Sehnenewebe, dass hier einerseits die Anordnung der Kollagenfasern in der Extrazellulärmatrix nicht gleichmäßig unidirektional und parallel verlief, sondern multidirektional und ungeordnet vorlag. Zudem machten die rundlichen Tenoblasten den größten Anteil von allen vorliegenden Zellen aus, welche bei tendinösen Heilungs- und Reparaturvorgängen vorwiegend aktiviert werden. Im gesunden, reifen Sehnenewebe fanden sich hingegen spindelförmige und länglichere Tenozyten. Bei der Analyse zeigte sich diese Charakterisierung bei allen untersuchten Gewebeschnitten; es konnte also aufgrund der morphologischen Erscheinung keine Zuweisung eines Sehnenchnitts zu einer Versuchsgruppe erfolgen.



**Abbildung 2.4:** Beispielhafte Abgrenzung ("Tracing") eines quantitativ zu untersuchenden Sehnenareals. Beachtenswert hier ist zudem das Erscheinungsbild des neu gebildeten Bindegewebes: während im Bereich innerhalb der gelben Abgrenzungslinie das Gewebe (markiert durch ein Kreuz) unstrukturiert und mit hohem zellulärem Anteil erscheint, zeigt das ältere, gesunde Sehnenewebe (mit Sternen markiert) im oberen und unteren Bildbereich eine gänzlich unterschiedliche morphologische Erscheinung. Hier sind die Kollagenfasern der Extrazellulärmatrix parallel ausgerichtet; die Zellen verfügen über eine längliche Spindelform und sind zudem in geringerer Anzahl vorhanden.

Nach der Abgrenzung der ROI wurde mithilfe der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) ein digitales Punktzählraster (sog. „Grid“; oben im Detail beschrieben) auf die ROI aufprojiziert (vgl. Abb. 2.5). Die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) unterstützt verschiedene Möglichkeiten, die Anzahl der Kreuzungspunkte der Gitternetzlinien, die über der ROI zu liegen kommen, zu bestimmen. In diesem Versuch wurde für jede ROI eine Anzahl von 500

Kreuzungspunkten definiert; aus dieser Vorgabe errechnete die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) dann die jeweiligen Abstände der Gitternetzlinien in X- und Y-Richtung, abhängig von der Größe der jeweiligen ROI.

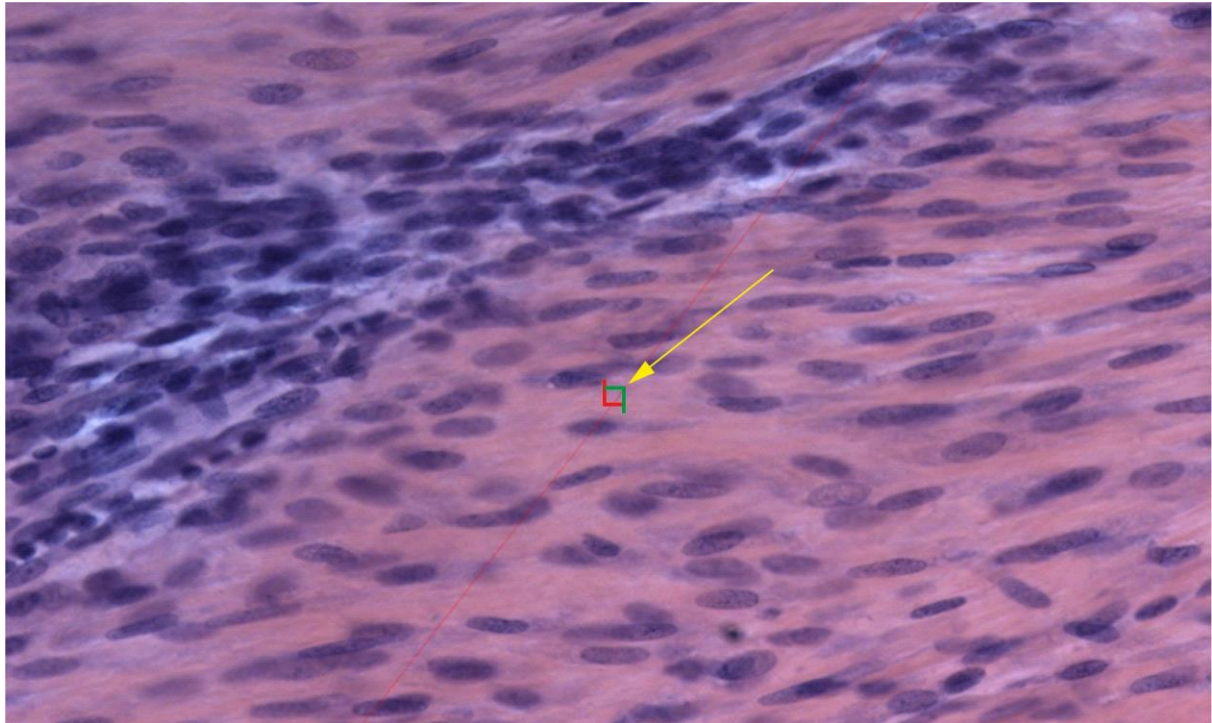


**Abbildung 2.5:** Beispielhafte Darstellung eines Punktzählrasters ("Grids") in der verwendeten Software (Stereo Investigator; MBF Bioscience). In Abhängigkeit der definierten Parameter erscheint eine Vorschau der Lage der Kreuzungspunkte der Gitternetzlinien innerhalb der abgegrenzten ROI (bei dieser Abbildung z.B. nach Eingabe der gewünschten Anzahl von 400 Kreuzungspunkten). Zur besseren Sichtbarkeit wurde die Abgrenzung der ROI nachgezeichnet; die ROI entspricht der in Abbildung 2.4 gezeigten Abgrenzung.

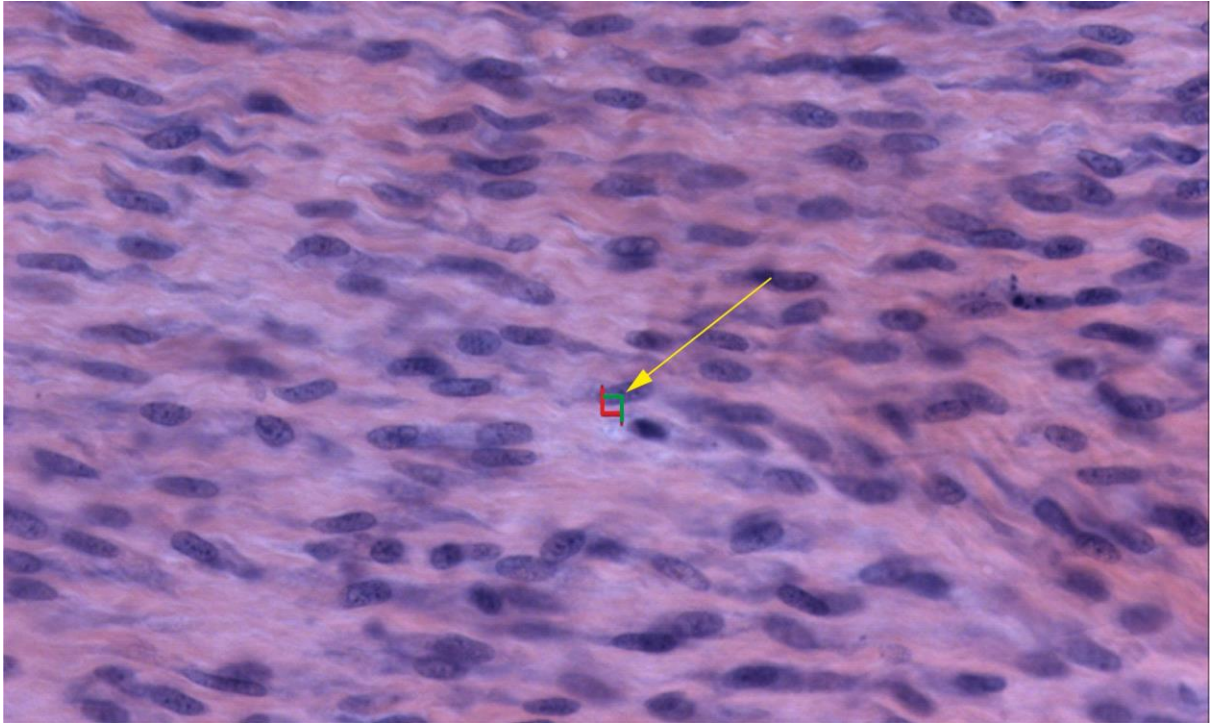
Die Einstellung auf 500 Kreuzungspunkte pro ROI bedeutet nicht, dass bei der konkreten Analyse auch immer genau 500 Kreuzungspunkte auf der ROI zu liegen kamen. Vielmehr bedeutet dieser Wert, dass im statistischen Mittel 500 Kreuzungspunkte auf der ROI zu liegen kommen würden, wenn das Zählgitter unendlich oft jeweils zufällig auf die ROI aufgelegt würde. Die genauen Anzahlen von in diesem Versuch untersuchten Kreuzungspunkten lagen zwischen 481 (Kaninchen T7878) und 505 (Kaninchen T7880).

Im Anschluss an die Erstellung des Punktzählrasters und der Bestimmung der Referenzpunkte wurde nun die Lage der Referenzpunkte über den vorliegenden Gewebeararten analysiert. Dafür wurden zuerst vier Kategorien definiert, über denen die Referenzpunkte liegen konnten: Extrazellulärmatrix, Bindegewebszellen, Gefäßstrukturen sowie die Kategorie „Artefakt“, bei der keine Zuordnung zu einer der anderen drei Kategorien getroffen werden konnte. Danach wurde auf das 20× Objektiv gewechselt, um die Lage der Referenzpunkte exakt darstellen zu können. Aufgrund der oft sehr ungenauen Übergänge zwischen den einzelnen Gewebetypen wurde dem Referenzpunkt immer das Gewebe zugeordnet, welches unter der rechten oberen Ecke des Referenzquadrats erkennbar war (Abb. 2.6 – 2.8). Zudem wurde bei Unsicherheiten

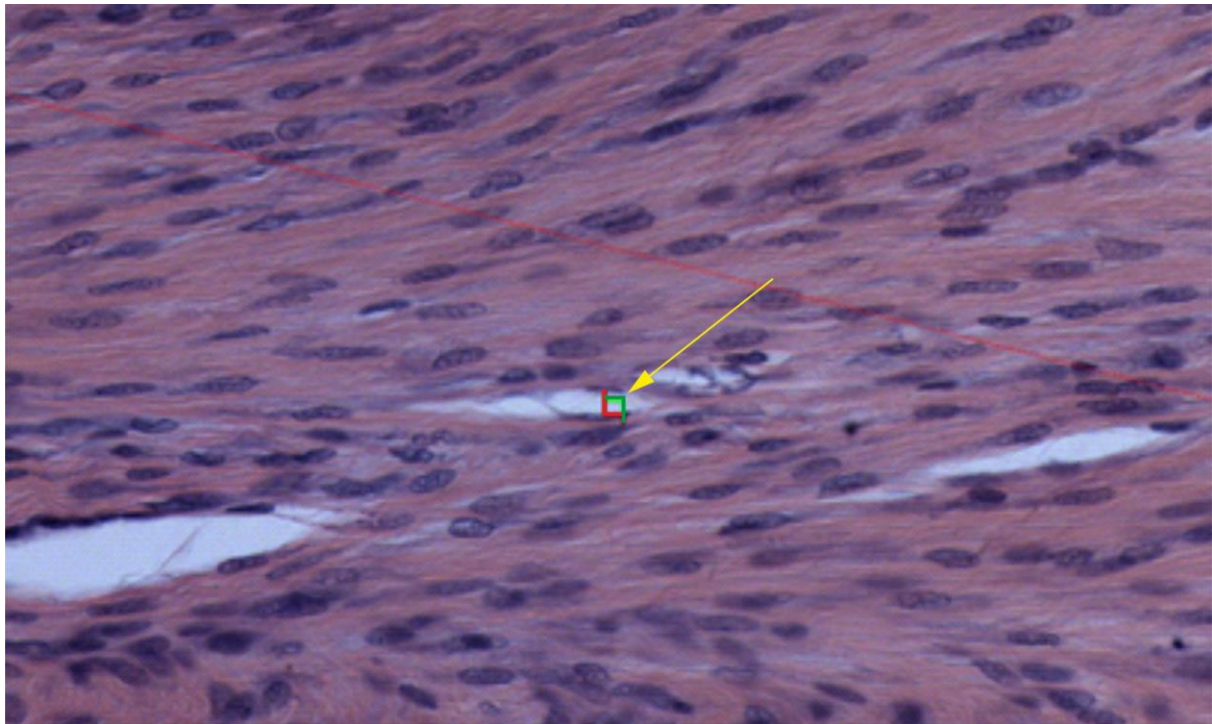
bezüglich der genauen Lage des Referenzpunktes im Gewebe die Vergrößerung auf das 40× Objektiv umgestellt, damit die Strukturen besser beurteilt werden konnten.



**Abbildung 2.6:** Erstes Beispiel der stereologischen Analyse der untersuchten Gewebeschnitte. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der in Abbildung 2.4 gezeigten Region des neu gebildeten Bindegewebes (in Abbildung 2.4 durch ein Kreuz markiert), der wie in Abbildung 2.5 gezeigt mit der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) durch ein Punktzählraster ausgewählt wurde. Der Ausschnitt wurde bei hohem Abbildungsmaßstab (40× Objektiv) analysiert; dabei wurde durch die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) in der Bildmitte ein Referenzquadrat erzeugt. In diesem Ausschnitt befand sich die rechte obere Ecke des Referenzquadrates (markiert durch den gelben Pfeil) über der extrazellulären Matrix, und der Referenzpunkt wurde der Kategorie „Extrazellulärmatrix“ zugeordnet.



**Abbildung 2.7:** Zweites Beispiel der stereologischen Analyse der untersuchten Gewebeschnitte. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der in Abbildung 2.4 gezeigten Region des neu gebildeten Bindegewebes (in Abbildung 2.4 durch ein Kreuz markiert), der wie in Abbildung 2.5 gezeigt mit der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) durch ein Punktzählraster ausgewählt wurde. Der Ausschnitt wurde bei hohem Abbildungsmaßstab (40× Objektiv) analysiert; dabei wurde durch die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) in der Bildmitte ein Referenzquadrat erzeugt. In diesem Ausschnitt befand sich die rechte obere Ecke des Referenzquadrates (markiert durch den gelben Pfeil) über einer zellulären Struktur, und der Referenzpunkt wurde der Kategorie „Bindegewebszellen“ zugeordnet.



**Abbildung 2.8:** *Drittes Beispiel der stereologischen Analyse der untersuchten Gewebeschnitte. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der in Abbildung 2.4 gezeigten Region des neu gebildeten Bindegewebes (in Abbildung 2.4 durch ein Kreuz markiert), der wie in Abbildung 2.5 gezeigt mit der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) durch ein Punktzählraster ausgewählt wurde. Der Ausschnitt wurde bei hohem Abbildungsmaßstab (40× Objektiv) analysiert; dabei wurde durch die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) in der Bildmitte ein Referenzquadrat erzeugt. In diesem Ausschnitt befand sich die rechte obere Ecke des Referenzquadrates (markiert durch den gelben Pfeil) über einer Gefäßstruktur, und der Referenzpunkt wurde der Kategorie „Gefäßstrukturen“ zugeordnet.*

Während der gesamten quantitativen Analyse war die durchführende Versuchsperson (d.h. der Autor der vorliegenden Arbeit) verblindet. Es war nicht bekannt, welcher zu analysierende Schnitt zu welcher Gruppe von Kaninchen gehörte, damit eine subjektive Verzerrung der Zählung ausgeschlossen werden konnte.

### 2.1.4 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen erfolgten durch den Autor der vorliegenden Arbeit.

Für die Ergebnisse zur Prüfung der Beweglichkeit, der Untersuchungen mittels Magnetresonanztomografie und der stereologischen Untersuchung wurden jeweils gruppenspezifische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte berechnet.

Bei den Ergebnissen zur Prüfung der Beweglichkeit erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mit zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung mit den Faktoren "Gruppe" und "Seite", wobei die jeweiligen Ergebnisse des linken und des rechten Hinterlaufs jedes Kaninchens als Messwiederholung gewertet wurden, gefolgt von Bonferroni-korrigierten post-

hoc Tests zum Vergleich "links vs. rechts" jeweils bei der allogene-ADRCs-Gruppe, der RLL-Gruppe und der Kontrollgruppe.

Bei den Ergebnissen der labormedizinischen Untersuchungen erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse, gefolgt von Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zum Vergleich zwischen der allogene-ADRCs-Gruppe, der RLL-Gruppe und der Kontrollgruppe.

Bei den Ergebnissen der Untersuchungen mittels Magnetresonanztomografie erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mit zweifaktorieller Varianzanalyse mit den Faktoren "Behandlung" und "Zeit", gefolgt von Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zum Vergleich "allogene-ADRCs-Gruppe vs. RLL-Gruppe".

Bei den Ergebnissen der stereologischen Untersuchung erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels Student T-Test zum Vergleich "allogene-ADRCs-Gruppe vs. RLL-Gruppe".

Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt; d.h. statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war. Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 10.2.1 für Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

### 2.1.5 Mikrofotografie der histologischen Schnitte

Alle Mikrofotografien wurden durch digitale Fotografie erstellt. Zur Aufnahme wurde ein automatisierter Rastermikroskopie-Arbeitsplatz verwendet, der aus einem M2 Axiomager Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland), einem 10× Plan-Apochromat-Objektiv (Zeiss), einem computergesteuerten Schrittmotorsystem (4" × 3" XY; Prior Scientific, Cambridge, UK), einem Fokus-Encoder (Heidenhain, Traunreut, Deutschland) und einer digitalen Farbkamera (AxioCam MRc; 2/3" CCD-Sensor, 1388 × 1040 Pixel; Zeiss) bestand. Die Software Stereo Investigator (Version 11.06.2; MBF Bioscience) wurde zur Gerätesteuerung genutzt. Mit diesem System wurden dreidimensionale "virtuelle Gewebeschnitte" (*virtual slides*) von allen Azan-gefärbten Schnitten (sowie einem Safranin O / Fast Green-gefärbten Schnitt von Tier T7878) erstellt. Die Teilaufnahmen wurden im Virtual Slide-Modul der Stereo Investigator-Software (MBF Bioscience) zu Gesamtmontagen der Schnitte zusammengesetzt. Für Abbildung 3.10 wurden Teilaufnahmen anhand virtueller Gewebeschnitte in der Software Biocuda Viewer (Version 2019.3.4; MBF Bioscience) erstellt.

Die Abbildungen 3.11 bis 3.15 wurden mit einem Zeiss Axiophot-Mikroskop (ausgestattet mit einer AxioCam HRc-Digitalkamera; 2/3"-CCD-Sensor, 1388 × 1040 Pixel; Zeiss) aufgenommen, das durch die Software Zeiss Axiovision SE64 (Rel. 4.9.1 SP2) gesteuert wurde. Die Aufnahmen wurden mit Zeiss Plan-Neofluar Objektiven 2,5× (NA = 0,075), 5× (NA = 0,15) und 10× (NA = 0,3) durchgeführt. Die Abbildungen 3.14 und 3.15 wurden im Durchlichtmodus ohne polarisiertes Licht aufgenommen, während die Abbildungen 3.11 bis 3.13 unter Verwendung polarisierten Lichts (und im Schwarz-Weiß-Modus der Digitalkamera) erstellt wurden. Die Beleuchtungseinstellungen wurden mithilfe der automatischen Messfunktion der Axiovision-Software (Zeiss) vorgenommen.

Die finalen Abbildungen wurden unter Verwendung von Corel Photo-Paint X7 und Corel Draw 2021 (beide in der Version 23.1.0.389; Corel, Ottawa, Kanada) erstellt. Dabei wurden in Corel Photo-Paint lediglich Kontrast- und Helligkeitsanpassungen vorgenommen, ohne das Erscheinungsbild der Originalmaterialien zu verändern.

## 2.2 Versuch II: Behandlung von experimentell induzierten Sehnenteildefekten mit autologen ADRCs im Tierversuch

### 2.2.1 Versuchsaufbau

#### Erklärung der Ethikkommission

Die in Abschnitt 2.2 der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durchgeführt und erhielten am 1. Februar 2021 vom *Institutional Animal Care and Use Committee* der Colorado State University die Genehmigung mit der Protokoll-Nummer 1473. Diese Genehmigung wurde am 1. Februar 2022 erweitert und verlängert.

#### Für den Versuch verwendete Tiere

*Es wurden 32 weibliche, skelettreife Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) verwendet, die etwa 11-15 Monate alt waren und ein Körpergewicht von etwa 4-6 Kilogramm aufwiesen. Die im Versuch verwendeten Tiere waren zuvor für keine vorherigen / anderen Versuche verwendet worden. Voraussetzung für die Teilnahme an den Versuchen war, dass jedes Kaninchen einen akzeptablen Gesundheitszustand, das richtige Alter und ein angemessenes Gewicht hatte, frei von Krankheiten war und keine Einschränkungen aufwies, die den Versuchsablauf oder das Ziel beeinträchtigen konnten. Vor Studienbeginn wurden alle Tiere von einem Tierarzt der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) auf ihre physische Eignung überprüft. Die Kaninchen wurden in den Tierhaltungseinrichtungen der Colorado State University untergebracht, im gleichen Gebäude wie die Tiere des ersten Versuchs, und unter denselben Bedingungen betreut.*

#### Randomisierte Einteilung der Versuchstiere in Gruppen und Verblindung

Zu Beginn der Studie wurden die insgesamt 32 Kaninchen nach dem Zufallsprinzip in folgende vier Versuchsgruppen eingeteilt (vgl. Abb. 2.9):

##### Gruppe I (n=4):

- Gewinnung von Fettgewebe und Isolierung von ADRCs mit dem Transpose Ultra System (InGeneron)
- Erzeugung eines Sehnendefektmodells mittels Stanzung eines durchgehenden Lochs (Durchmesser 3 mm) in die Mittelsubstanz der rechten Gastrocnemius-Sehne
- Injektion der zuvor isolierten autologen ADRCs an den Sehnendefekt und das umgebende Gewebe
- Euthanasie ca. vier Wochen (+/-vier Tage) nach dem Eingriff
- Anfertigung histologisch und immunhistochemisch aufgearbeiteter Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne

##### Gruppe II (n=4):

- Wie Versuchsgruppe I, aber
- Euthanasie ca. zwölf Wochen (+/-vier Tage) nach dem Eingriff



### Gruppe III (n=4):

- Erzeugung eines Sehnendefektmodells mittels Stanzung eines durchgehenden Lochs (Durchmesser 3 mm) in die Mittelsubstanz der rechten Gastrocnemius-Sehne
- Injektion von Ringer-Laktat-Lösung (RLL) an den Sehnendefekt und das umgebende Gewebe
- Euthanasie ca. vier Wochen (+/-vier Tage) nach Eingriff
- Anfertigung histologisch und immunhistochemisch aufgearbeiteter Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne

### Gruppe IV (n=4):

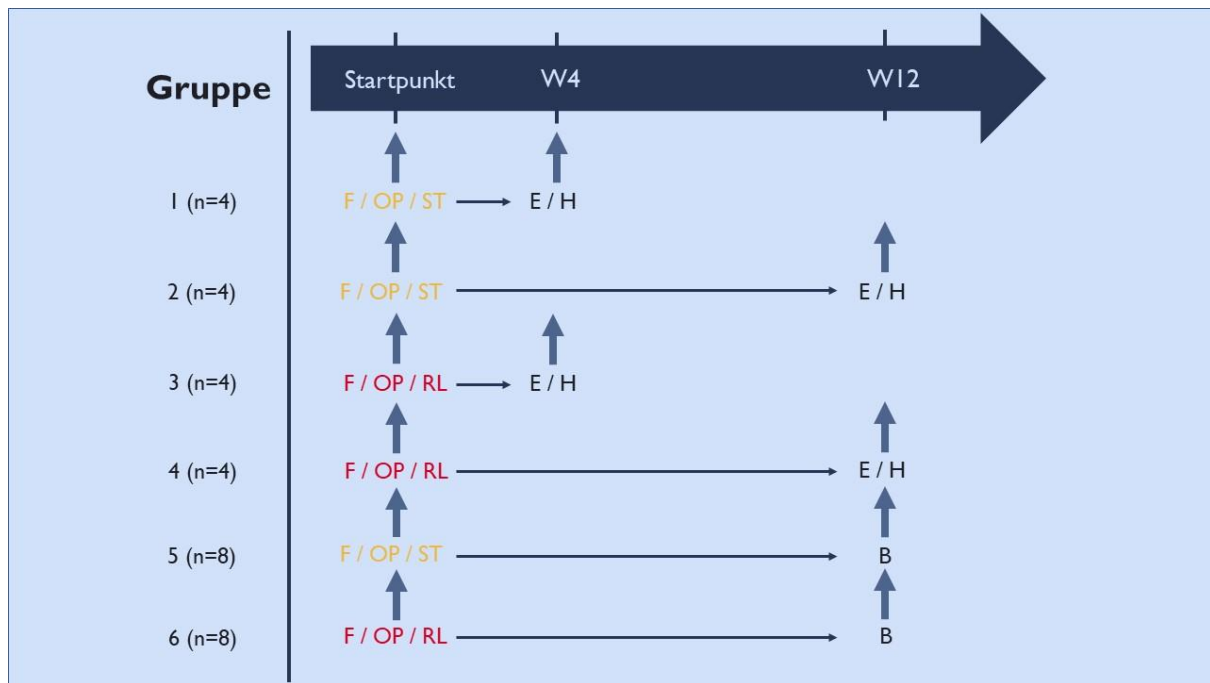
- Wie Versuchsgruppe III, aber
- Euthanasie ca. zwölf Wochen (+/-vier Tage) nach dem Eingriff

### Gruppe V (n=8):

- Gewinnung von Fettgewebe und Isolierung von autologen ADRCs mit dem Transpose Ultra System (InGeneron)
- Erzeugung eines Sehnendefektmodells mittels Stanzung eines durchgehenden Lochs (Durchmesser 3 mm) in die Mittelsubstanz der rechten Gastrocnemius-Sehne
- Injektion der zuvor isolierten autologen ADRCs an den Sehnendefekt und das umgebende Gewebe
- Euthanasie ca. zwölf Wochen (+/-vier Tage) nach dem Eingriff
- Durchführung einer nicht-destruktiven biomechanischen Analyse beider gemeinsamer Calcaneussehnen (rechts / links)
- Anfertigung histologisch und immunhistochemisch aufgearbeiteter Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne

### Gruppe VI (n=8):

- Wie Versuchsgruppe V, aber
- Keine Gewinnung von Fettgewebe und keine Isolierung von ADRCs; stattdessen
- Injektion von Ringer-Laktat-Lösung (RLL) an den Sehnendefekt und das umgebende Gewebe



**Abbildung 2.9:** Schematische Darstellung des Studienablaufs der einzelnen Versuchsgruppen. Abk.: n, Anzahl der Versuchstiere; W4, vierte Woche des Versuchs; W12, zwölfte Woche des Versuchs; F, Gewinnung von Fettgewebe und Isolierung von autologen ADRCs mit dem Transpose Ultra System (InGeneron); OP, operative Erzeugung eines Sehnendefekts; ST, Injektion der zuvor isolierten autologen ADRCs; RL, Injektion von Ringer-Laktat-Lösung; E, Euthanasie; H, Anfertigung histologisch und immunhistochemisch aufgearbeiteter Schnitte der gemeinsamen Calcaneusehne; B, nicht-destruktive biomechanische Analyse der gemeinsamen Calcaneusehne.

Die an der Durchführung der Studie beteiligten Personen wurden nicht verblindet. Jedes Kaninchen erhielt eine individuelle Nummer, mit welcher das Tier in eine der Gruppen eingeteilt wurde (vgl. Tabelle 2.7).

**Tabelle 2.7:** Einteilung der Kaninchen in die Gruppen I-VI von Versuch II.

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe V	Gruppe VI
U5092	U0296	U0358	U0311	V0019	U9094
U0310	U0374	U0347	U0298	V1039	V0001
U0381	U6100	U0289	U4536	V1040	V0023
U5480	U5079	U5067	U0318	V1179	V1038
				V1180	V1181
				V1182	V1183
				V1186	V1184
				V1188	V1185

### 2.2.2 Experimenteller Ablauf

Der tierexperimentelle Versuchsteil wurde an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch die dort ansässige Forschungsgruppe durchgeführt.

#### Anästhesie

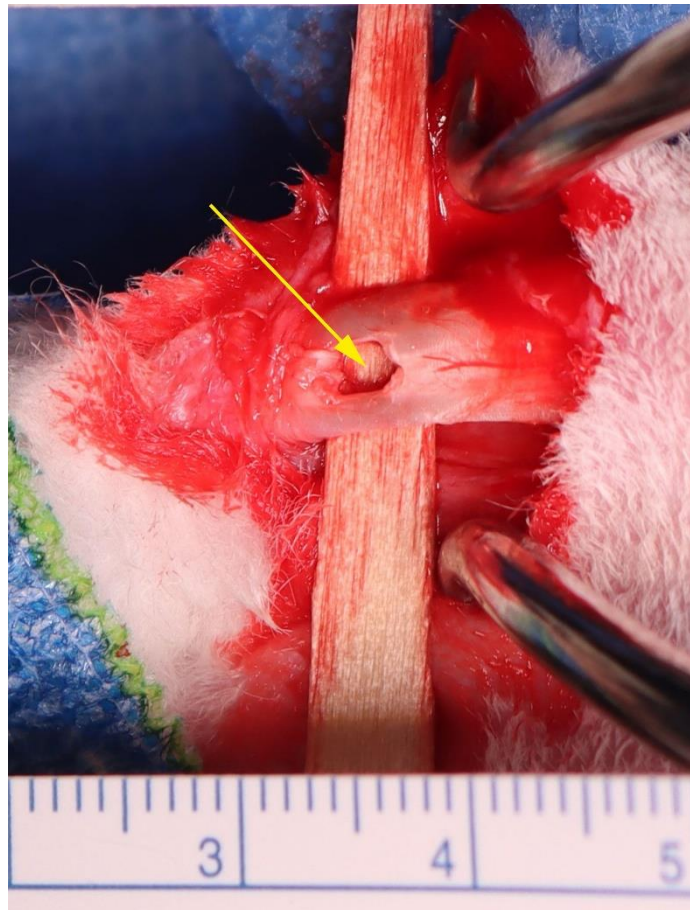
Für die Gewinnung von Fettgewebe (Gruppen I, II und V) und die Erzeugung des experimentellen Sehnendefekts erhielten die Kaninchen eine Allgemeinanästhesie. Die Kaninchen der Gruppen I, II und V wurden für die Fettgewebsentnahme in sternaler Liegeposition auf dem Operationstisch platziert, während sie für die Stanzung eines Lochs in der Sehne des rechten *M. gastrocnemius* in linksseitiger Rückenlage fixiert wurden. Während des gesamten Prozesses der Fettgewinnung und der Operation wurde die Allgemeinanästhesie kontinuierlich überwacht, einschließlich Messungen der Herz- und Atemfrequenz, Sauerstoffsättigung, CO<sub>2</sub>-Exhalation, Reflexstatus und EKG-Ableitungen alle fünf Minuten. Wie bei Versuch I umfasste das Anästhesieprotokoll präoperativ subkutane Injektionen von Buprenorphin (0,03 mg/kg Körpergewicht; Par Pharmaceutical), Glycopyrrolat (0,005 mg/kg Körpergewicht; Somerset Therapeutics), Ketamin (25 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products) und Dexmedetomidin (0,02 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products). Die Allgemeinanästhesie wurde durch kontinuierliche Inhalation von Isofluran (1-5%; VetOne) während des Operationszeitraums aufrechterhalten.

#### Gewinnung der autologen ADRCs

Um autologe ADRCs zu gewinnen, wurde zunächst das Fell der interskapulären Region der Kaninchen aus den Gruppen I und II rasiert. Der zuvor rasierte Bereich wurde dann abwechselnd mit Povidon-Iod und Alkohol gereinigt, um sterile Operationsbedingungen zu schaffen. Gemäß früherer Beschreibungen in der Literatur (107) wurden nach einem etwa zwei Zentimeter langen Hautschnitt Gewebestücke aus dem interskapulären Fettdepot sorgfältig entfernt, wobei im Durchschnitt  $21,1 \pm 5,3$  Gramm Fettgewebe (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) gewonnen wurden (Median 21,5 Gramm; Bereich 11,6-30,5 Gramm). Das gewonnene Fettgewebe wurde in einem sterilen Behälter aufbewahrt und sofort weiterverarbeitet. Der Hautschnitt wurde mit nicht resorbierbarem Nylon-Nahtmaterial verschlossen. Das gewonnene Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen wie in Versuch I beschrieben mit dem Transpose RT / Matrase System (InGeneron) prozessiert und die gewonnenen ADRCs charakterisiert. Durchschnittlich wurden  $14,5 \times 10^5 \pm 7,1 \times 10^5$  Zellen pro Gramm Fettgewebe (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) gewonnen (Median  $13,2 \times 10^5$  Zellen pro Gramm Fettgewebe; Bereich  $3,6 \times 10^5$ - $22,3 \times 10^5$  Zellen pro Gramm Fettgewebe), wobei die durchschnittliche Zellebensfähigkeit bei  $82,6\% \pm 5,4\%$  (Median 83,1; Bereich 75,0%-89,9%) und die durchschnittliche Lebendzellenausbeute bei  $11,8 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^5$  Zellen pro Gramm Fettgewebe (Median  $10,8 \times 10^5$  Zellen pro Gramm Fettgewebe; Bereich  $3,6 \times 10^5$ - $22,3 \times 10^5$  Zellen pro Gramm Fettgewebe) lag. Der gesamte Vorgang sowie die Lagerung der Zellen bis zur Implantation erfolgten unter sterilen Bedingungen. Jede Fettcharge (von jedem einzelnen Versuchstier) wurde zur Vermeidung von Kontaminationen mit einer individuellen Identifikationsnummer gekennzeichnet und separat verarbeitet.

### Erzeugung eines experimentell induzierten Sehnenteildefekts und Injektion der autologen ADRCs

*Das rechte Hinterbein der Kaninchen wurde rasiert und dann abwechselnd mit Povidon-Iod und Alkohol gereinigt, um aseptische Bedingungen für den folgenden Eingriff zu gewährleisten. Das linke Hinterbein blieb unberührt, um die anatomischen Strukturen dieser Körperseite intakt zu lassen. Anschließend wurde ein steriles Tuch mit einer runden Öffnung über dem Bereich platziert. Ein Hautschnitt von etwa 1-3 Zentimetern Länge wurde durchgeführt, um Zugang zur gemeinsamen Calcaneusehne zu erhalten. Zunächst wurde das Peritendineum von der Sehne entfernt, dann wurde die Gastrocnemiussehne vom M. flexor digitorum superficialis getrennt (vgl. (99)). Mittels eines chirurgischen Lineals wurde eine Stelle 2,5 Zentimeter entlang der Gastrocnemiussehne vom Calcaneus entfernt identifiziert. Dort wurde ein Defekt in der gesamten Sehnendicke mit einem Durchmesser von 3 Millimetern erzeugt, indem ein Loch in die Mittelsubstanz der Gastrocnemiussehne gestanzt wurde (vgl. (100); Abb. 2.10). Das restliche Peritendineum wurde teilweise mit resorbierbarem 4-0-Monofilament-Nahtmaterial (Biosyn; Medtronic) verschlossen. In die neu geschaffene Defektregion und das angrenzende Sehnengewebe wurden bei den Kaninchen in den Gruppen I, II und V im Mittel  $28,3 \times 10^6 \pm 11,6 \times 10^6$  autologe ADRCs in 0,5 mL Ringer-Lactat-Lösung injiziert (Median  $27,5 \times 10^6$  autologe ADRCs; Bereich  $10,9 \times 10^6$ - $58,5 \times 10^6$  autologe ADRCs in 0,5 mL Ringer-Lactat-Lösung). Den Kaninchen in den Gruppen III, IV und VI wurde lediglich 0,5 mL Ringer-Lactat-Lösung ohne Zusätze an die gleiche Stelle injiziert. Danach wurde das restliche Peritendineum, das noch offen war, routinemäßig mit nicht resorbierbarem monofilem Nylonfaden (Covidien) vernäht. Die postoperative Schmerzbehandlung umfasste Buprenorphin (0,03 mg/kg Körpergewicht; Par Pharmaceutical) als subkutane Injektion alle 12 und 24 Stunden nach der Operation sowie Meloxicam (1 mg/kg Körpergewicht; VetOne) einmal täglich über sieben Tage.*



**Abbildung 2.10:** Generierung eines Defekts in der gesamten Sehrendicke mit einem Durchmesser von 3 mm in der Mittelsubstanz der Gastrocnemiussehne eines Kaninchens. Der Defekt (gelber Pfeil) wurde mit einer Stanze etwa 2,5 cm vom Calcaneus entfernt erzeugt.

### Euthanasie der Versuchstiere

Vier Wochen (+/- vier Tage) nach der Operation wurden die Kaninchen in den Gruppen I und III euthanasiert, während die Kaninchen in den Gruppen II, IV, V und VI weitere acht Wochen später, also zwölf Wochen (+/- vier Tage) nach dem Eingriff, euthanasiert wurden. Die Euthanasie erfolgte gemäß den Richtlinien der American Veterinary Medical Association (AVMA) an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch dort ansässige KollegInnen. Zur Sedierung erhielten die Versuchstiere Ketamin (5-30 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products) und Dexamedetomidin (0,05-0,125 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products) oder Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht; VetOne). Anschließend wurden sie mit 4-5% Isofluran (VetOne) inhalativ betäubt, bis ein Anästhesie-Niveau vergleichbar mit chirurgischen Eingriffen erreicht wurde. Die Anästhesie wurde dann mittels 2-3%iger Isofluran-Inhalation gehalten, bis die Kaninchen durch eine intravenöse Überdosierung von Natrium-Phenobarbital (88 mg/kg Körpergewicht; Dechra Veterinary Products) human euthanasiert wurden.

### 2.2.3 Histologie, Immunohistochemie und Auswertung (Versuchsgruppen I-IV)

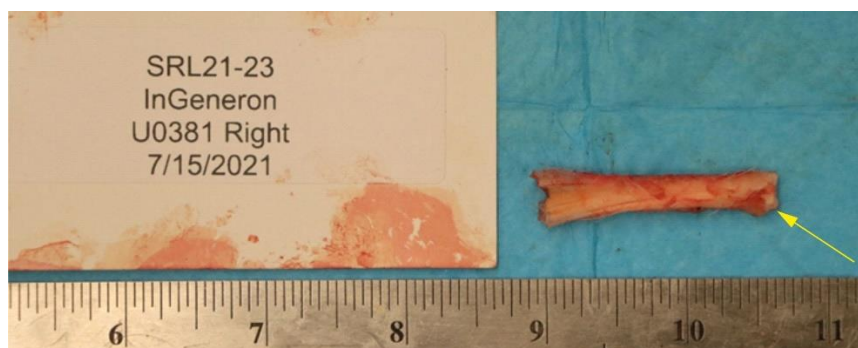
#### Anfertigung der histologischen Schnitte

Im Vergleich zu Versuch 1 wurden an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch die dortige Forschungsgruppe beide Hinterbeine der Kaninchen *post mortem en bloc* entfernt (Abb. 2.11).



**Abbildung 2.11:** Präparat der hinteren Gliedmaße eines Kaninchens mit Präparation der gemeinsamen Calcaneussehne (Pfeil), in der sich der behandelte Sehrendefekt befand. Die Maßeinheit des verwendeten Lineals war Zoll.

Um die zu untersuchende Region, die gemeinsame Calcaneussehne, zu isolieren, wurden die Gliedmaßen sorgfältig von überschüssigem Muskel- und Weichteilgewebe befreit, um den Ansatzbereich der distalen gemeinsamen Calcaneussehne am Calcaneus darzustellen. Anschließend wurden Sehnenproben aus der gemeinsamen Calcaneussehne entnommen (Abb. 2.12).



**Abbildung 2.12:** Vom umliegenden Gewebe abgetrenntes Stück der gemeinsamen Calcaneussehne eines Kaninchens. Der Pfeil zeigt auf den Calcaneus. Die Maßeinheit des verwendeten Lineals war Zoll.

*Die Länge und die Querschnittsfläche (cross sectional area, CSA) der Sehnenproben wurden mit einem Messschieber bestimmt, unter Annahme einer rechteckigen Geometrie. Die Sehnenproben wurden vollständig in 10 % neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert. Für die weitere Verarbeitung und die Anfertigung von Gewebeschnitten wurde ein Gewebeblock mit etwa 3 Zentimeter Länge um die Injektionsstelle herum präpariert. Zur Anfertigung der ca. 5 Mikrometer dicken Schnitte wurden Standardparaffintechniken verwendet. Die Schnitte wurden auf positiv geladene Glasträger montiert, mit Azan-Trichrom, Safranin O / Fast Green oder Picrosirius-Rot gefärbt und mit DPX-Montiermittel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) abgedeckt. Drei Schnitte pro Gliedmaße wurden separiert und gefärbt; weitere Schnitte wurden hergestellt, aber nicht gefärbt, um später zusätzliche histologische Färbungen und immunhistochemische Analysen durchführen zu können. Sowohl die gefärbten als auch die ungefärbten Schnitte wurden zur Analyse an das Labor des Lehrstuhls für Anatomie II der LMU München geschickt.*

*Auch von den Kaninchen in den Gruppen V und VI wurden Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne angefertigt, wobei die Anfertigung dieser Schnitte prinzipiell genauso wie die Anfertigung der Schnitte der Kaninchen in den Gruppen I-IV erfolgte. Allerdings wurde der Teil des Calcaneus, der der gemeinsamen Calcaneussehne anhing, vor der Einbettung des Gewebes in Paraffin mit 5% Methansäure entkalkt; die vollständige Entkalkung wurde radiologisch dokumentiert.*

Die histologische und immunhistochemische Untersuchung der Gewebeschnitte der Kaninchen in den Gruppen V und VI war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im Labor des Lehrstuhls für Anatomie II der LMU München wurde jeweils ein weiterer Schnitt pro Kaninchen in den Gruppen I-IV mit einer routinemäßigen Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Diese Schnitte wurden bei der stereologischen Analyse verwendet.

### Ablauf der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Verfahren wurden am Lehrstuhl Anatomie II der LMU München durchgeführt. Dazu wurden die zuvor hergestellten Schnitte entparaffiniert, rehydriert und mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) mit Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) gereinigt. Nach spezifischen Vorbehandlungsschritten wurden die Objektträger bei Raumtemperatur zwischen 15 und 60 Minuten blockiert und dann mit den entsprechenden Antikörpern für Prokollagen Typ I, Kollagen Typ III und CD 163 inkubiert (die genaue Vorgehensweise ist in Tabelle 2.8 beschrieben). Die Darstellung der Antikörperbindung erfolgte nach Inkubation über Nacht mit einem sekundären Antikörper und der Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (HRP) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die Peroxidaseaktivität wurde mit Diaminobenzidin (Vector Impact DAB Chromogenlösung; Vector Laboratories) visualisiert; anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Spezifität der Reaktion wurde an separaten Gewebeschnitten durch den Ersatz der primären Antikörper durch phosphatgepufferte Kochsalzlösung überprüft (Negativkontrolle).

**Tabelle 2.8:** Charakterisierung des immunohistochemischen Verfahrens

<sup>a</sup> DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, gegründet vom Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development der National Institutes of Health der Vereinigten Staaten, und unterhalten von der University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA

<sup>b</sup> Hersteller: Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

Prokollagen I	
Immunglobulin-Isotyp / Klon-Status	IgG1 / Maus, monoklonal
Katalog-Nr. / Anbieter	SP1.D8 / DSHB <sup>a</sup>
Demaskierung des Antigens	Sieden in Citratpuffer (pH 6)
Blockierung	Vector Bloxall SP-6000 <sup>b</sup> , LOT ZG1216 vom 04. April 2021, und normales Pferdeserum-Blockierlösung 2,5% (S-2012-50) <sup>b</sup>
Verdünnungs- und Inkubationsparameter	1:10, 4 °C, über Nacht
Verwendete sekundäre Antikörper	Pferd-Anti-Maus-IgG BA-2000 <sup>b</sup> , 1:200
Kollagen Typ III	
Immunglobulin-Isotyp / Klon-Status	FH-7A1gG1 / Maus, monoklonal
Katalog-Nr. / Anbieter	C 7805 / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Demaskierung des Antigens	Protease XIV
Blockierung	Vector Bloxall SP-6000 <sup>b</sup> , LOT ZG1216 vom 04. April 2021, und normales Pferdeserum-Blockierlösung 2,5% (S-2012-50) <sup>b</sup>
Verdünnungs- und Inkubationsparameter	1:150, 4 °C, über Nacht
Verwendete sekundäre Antikörper	Pferd-Anti-Maus-IgG BA-2000 <sup>b</sup> , 1:200
CD 163	
Immunglobulin-Isotyp / Klon-Status	IgG1 / Maus, monoklonal
Katalog-Nr. / Anbieter	5C6 FAT BMA Biomedicals (Augst, Schweiz)
Demaskierung des Antigens	Nicht anwendbar
Blockierung	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol
Verdünnungs- und Inkubationsparameter	1:400, 4 °C, über Nacht
Verwendete sekundäre Antikörper	Pferd-Anti-Maus-IgG BA-2000 <sup>b</sup> , 1:200

## Analyse der histologischen Schnitte

Mit dem gleichen Verfahren, das in Versuch 1 ausführlich beschrieben wurde, wurde vom Autor der vorliegenden Arbeit eine Bestimmung der relativen Mengen (Fläche/Fläche) von Zellen, extrazellulärer Matrix und Gefäßen im neu gebildeten Bindegewebe durchgeführt. Insgesamt wurden 16 Gewebeschnitte quantitativ analysiert; die durchschnittliche Anzahl von Referenzpunkten im Punktzählraster betrug 500 (Spannweite, 490-512).

## Evaluation und Klassifikation histomorphologischer Veränderungen mittels des Bonar Scores

Um mögliche histomorphologische Unterschiede zu erfassen, die durch die rein quantitative Analyse nicht erfasst werden konnten, wurde eine zusätzliche qualitative Untersuchung der Gewebeschnitte durchgeführt. Hierbei wurde eine modifizierte Version des Bonar Scores (108), der ursprünglich zur Analyse histologischer Veränderungen in tendinopathischem Sehngewebe entwickelt worden war (109), verwendet. Die evaluierten Kategorien *Zellmorphologie*, *Zellularität*, *Vaskularität* und *Grundsubstanz* wurden bei diesem Versuch



angewendet, um grundlegende Unterschiede in der Sehnenmorphologie zu erfassen und qualitative Gewebeeränderungen im Rahmen regenerativer Prozesse zu analysieren.

Der Bonar Score für die Kategorien *Zellmorphologie*, *Zellularität*, *Vaskularität* und *Grundsubstanz* wurde mittels Lichtmikroskopie an mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitten im Bereich des neu gebildeten Gewebes an der rechten gemeinsamen Calcaneusehne bestimmt, und der Bonar Score für die Kategorie *Kollagenanordnung* mittels Polarisationsmikroskopie an mit Picrosirius-Rot gefärbten Gewebeschnitten.

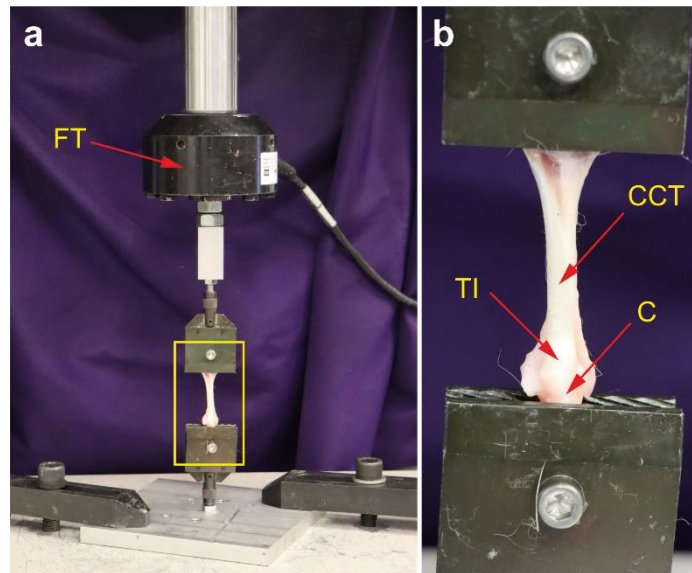
### 2.2.4 Nicht-destruktive biomechanische Untersuchungen (Kaninchen in den Gruppen V und VI)

#### Präparation der untersuchten Sehnen

*Nach der Euthanasie ca. 12 Wochen nach dem Eingriff erfolgte eine die Sehnenintegrität erhaltende biomechanische Testung beider gemeinsamer Calcaneusehnen (rechts / links) der Kaninchen in den Gruppen V und VI. Dazu wurden die entsprechenden Hinterläufe jeweils en bloc entnommen und anschließend von überschüssigem Muskel- und Weichteilgewebe befreit, um die gemeinsame Calcaneusehne und die zugehörige Behandlungsregion zu isolieren. Die Abtrennung der Sehne mit den Resten der angrenzenden Muskulatur (lateraler Kopf des M. gastrocnemius, medialer Kopf des M. gastrocnemius und oberflächlicher digitaler Flexor) sowie die Abtrennung des Calcaneus erfolgte im Anschluss. Danach wurden die Länge und Querschnittsfläche der Sehnenpräparate unter Annahme einer rechteckigen Geometrie ohne Anwendung von die Sehnenproben verformenden Kräften mit einer Messhilfe bestimmt.*

#### Durchführung der biomechanischen Analyse

*Die biomechanische Analyse erfolgte mittels eines servohydraulischen Materialprüfsystems (MiniBionix 858; MTS, Eden Prairie, MN, USA). Dazu wurde der Calcaneus starr in den Rahmen des Materialprüfsystems eingespannt, so dass die physiologische Belastungsrichtung der gemeinsamen Calcaneusehne axial mit dem Stellglied des Materialprüfsystems ausgerichtet war (Abb. 2.13). Zur Fixation des proximalen Endes des Präparats wurde die Sehne in eine Klemme eingespannt, die starr mit einem Kraftaufnehmer und dem Stellglied verbunden war. Um eine Dehydratation der Sehnenproben zu verhindern, wurden während der gesamten Analyse die Sehnenproben in ca. zehnmütigen Abständen mit physiologischer Kochsalzlösung besprüht.*



**Abbildung 2.13:** Darstellung des servohydraulischen Materialtestungssystems (MiniBionix 858; MTS, Eden Prairie, MN, USA) mit eingespanntem Sehnenpräparat zur biomechanischen Analyse. Das gelbe Rechteck in (a) zeigt die Position des in (b) dargestellten, vergrößerten Ausschnitts aus (a). Abkürzungen: FT: Kraftaufnehmer (force transducer); C: Calcaneus; CCT: gemeinsame Calcaneussehne (common calcaneus tendon); TI: Sehneninsertion (tendon insertion).

Die biomechanische Testung erfolgte in der folgenden, chronologischen Reihenfolge:

1. Zweiminütige statische Vorbelastung mit 2 Newton (N)
2. Messung der Referenzmesslänge der Sehne und Aufzeichnung der Werte als Abstand zwischen den Greifflächen des servohydraulischen Testsystems zur Bestimmung der effektiven Verschiebung in den Vorkonditionierungszyklen und dem Spannungsrelaxationstest
3. 10 Zyklen Vorkonditionierung mit technischer Dehnung zwischen 0% und 2%
4. Spannungs-Relaxationsversuch mit technischer Dehnung von 5% konstant über eine Relaxationszeit von 100 s und Geschwindigkeit von 5 mm / s; Zeitgleiche Erfassung der Kraft- und Verschiebungsdaten.

Aus den Kraft- und Verschiebungsdaten des Spannungs-Relaxationsversuchs im biomechanischen Testverfahren konnten die Spitzenlast (N) (die maximale Kraft während des Tests) und die Gleichgewichtsbelastung (N) (die Kraft am Ende der 100-s-Relaxationsperiode) errechnet werden. Diese physikalischen Parameter repräsentieren das mechanische Verhalten des Sehnenproben. Aus der Normierung der berechneten physikalischen Parameter auf die ausgemessene Querschnittsfläche der Sehnenproben wurden zudem die Spitzenspannung (MPa) (die maximale Spannung während der Prüfung), die Gleichgewichtsspannung (N) (die Spannung am Ende der 100-s-Relaxationszeit) und die prozentuale Relaxation (%) (die prozentuale Differenz zwischen der Spitzenspannung und der Gleichgewichtsspannung) ermittelt. Der Vorgang der biomechanischen Analyse mit vorangehender Sehnenpräparation wurde an der Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) durch die KollegInnen vor Ort durchgeführt.

### 2.2.5 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen erfolgten durch den Autor der vorliegenden Arbeit.

Für die Ergebnisse der stereologischen und der biomechanischen Untersuchungen wurden jeweils gruppenspezifische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte berechnet, und für die Ergebnisse der Evaluation des Bonar Scores gruppenspezifische Medianwerte.

Bei den Ergebnissen der stereologischen Untersuchung erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit den Faktoren "Behandlung" und "Zeit", gefolgt von Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zum Vergleich "Behandlung mit autologen ADRCs vs. Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung" an W4 und an W12.

Bei den Ergebnissen der Evaluation der Bonar Scores erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels Mann-Whitney Test ebenfalls zum Vergleich "Behandlung mit autologen ADRCs vs. Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung" an W4 und an W12 (es gibt kein nicht-parametrisches Pendant zur zweifaktorieller Varianzanalyse, und die zweifaktorieller Varianzanalyse wäre für die erhobenen Bonar Score Daten ungeeignet gewesen).

Bei den Ergebnissen der biomechanischen Untersuchung erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse, gefolgt von Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zum Vergleich aller Gruppen untereinander (linke und rechte Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 5 und 6). Weiterhin wurde für alle untersuchten Parameter und alle untersuchten Gruppen mittels Korrelationsanalyse und linearer Regressionsanalyse getestet, ob es statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern und der Querschnittsfläche der untersuchten Sehnen gab. Schließlich wurde ebenfalls mittels Korrelationsanalyse getestet, ob es nach Behandlung mit autologen ADRCs statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern und der Anzahl der injizierten autologen ADRCs gab.

Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt; d.h. statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war. Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 10.2.1 für Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

### 2.2.6 Mikrofotografie der histologischen Schnitte

Alle mikrofotografischen Aufnahmen wurden mit denselben Verfahren und unter Verwendung derselben technischen Ausrüstung wie in Versuch I beschrieben erstellt. Die Bilder in den Abbildungen 3.17 bis 3.20 und 3.25 bis 3.27 entstanden durch virtuelle Mikroskopie, wie bereits in Versuch I beschrieben, wobei die Dateigrößen der virtuellen 3D-Schnittbilder zwischen 67 und 359 MB lagen. Die Bilder in den Abbildungen 3.22 und 3.23 wurden direkt mit einer Axiocam HRc-Digitalkamera an einem Zeiss Axiophot-Mikroskop sowohl im Durchlicht- als auch im Polarisationsmodus erstellt (vgl. Versuch I). Die finalen Abbildungen wurden unter Verwendung von Corel Photo-Paint X7 und Corel Draw 2021 (beide in der Version 23.1.0.389; Corel, Ottawa, Kanada) erstellt. Dabei wurden in Corel Photo-Paint lediglich Kontrast- und

Helligkeitsanpassungen vorgenommen, ohne das Erscheinungsbild der Originalmaterialien zu verändern.

# Ergebnisse

## 3.1 Ergebnisse von Versuch I (Behandlung von experimentell induzierten Sehnenteildefekten mit allogenen ADRCs im Tierversuch)

### 3.1.1 Vorbemerkung

Im gesamten Kapitel 3.1 werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

- **W1:** Eine Woche nach vollständiger Durchtrennung der Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis auf mittlerer Höhe der gemeinsamen Calcaneussehne.
- **W13:** 13 Wochen nach vollständiger Durchtrennung der Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis auf mittlerer Höhe der gemeinsamen Calcaneussehne.
- **D/B:** vollständige Durchtrennung der Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis auf mittlerer Höhe der gemeinsamen Calcaneussehne, gefolgt von Behandlung mit Injektion von allogenen ADRCs
- **D/S:** vollständige Durchtrennung der Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis auf mittlerer Höhe der gemeinsamen Calcaneussehne, gefolgt von Scheinbehandlung mit Injektion von Ringer-Laktat-Lösung
- **ØD/ØB/ØS:** keine Durchtrennung der Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis; weder Behandlung noch Scheinbehandlung.

Darüber hinaus sind (wenn nicht anders angegeben) alle quantitativen Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

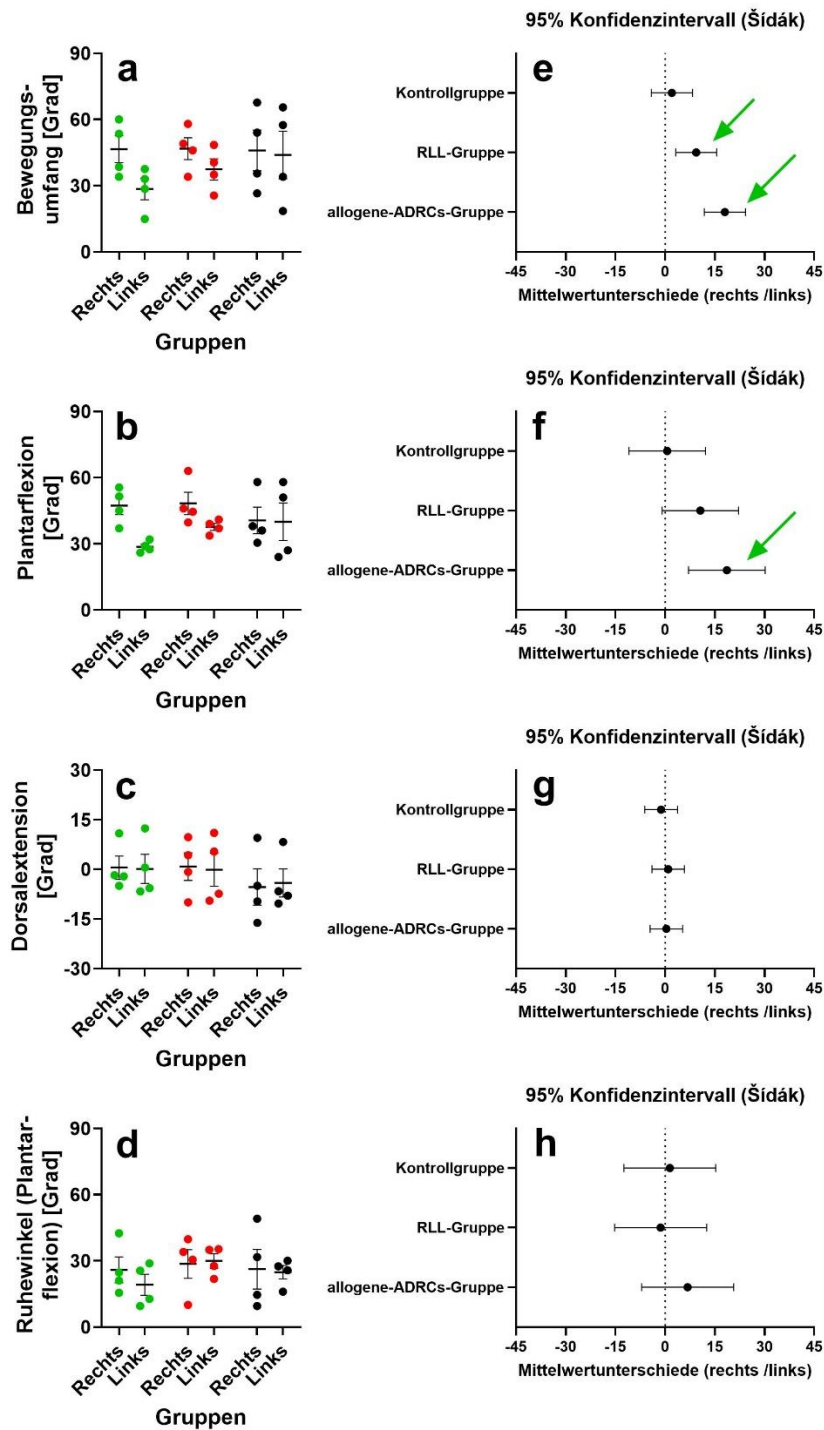
### 3.1.2 Ergebnisse der Beweglichkeitsmessungen und der labormedizinischen Untersuchungen

Sowohl die Kaninchen in der allogenen-ADRCs-Gruppe als auch die Kaninchen in der RLL-Gruppe zeigten an W13 vor der Euthanasie, aber bereits in Narkose, einen statistisch signifikant größeren mittleren passiven Bewegungsumfang des rechten Sprunggelenks (D/B bzw. D/S) im Vergleich zum jeweils linken Sprunggelenk (ØD/ØB/ØS) (Abbildung 3.1a,e und Tabelle 3.1).

Darüber hinaus zeigten die Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe an W13 vor der Euthanasie, aber bereits in Narkose, eine statistisch signifikant größere mittlere passive Plantarflexion des rechten Sprunggelenks (D/B) im Vergleich zum jeweils linken Sprunggelenk (ØD/ØB/ØS) (Abbildung 3.1b,f und Tabelle 3.1).

Für die mittlere passive Dorsalextension sowie den mittleren passiven Ruhewinkel des Sprunggelenks wurde bei keiner der Gruppen von Kaninchen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den rechten und linken Hinterläufen gefunden (Abbildung 3.1c,d,g,h und Tabelle 3.1).

Die Ergebnisse der labormedizinischen Untersuchungen der Blutproben, die an W13 vor der Euthanasie, aber bereits in Narkose, entnommen wurden, sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Bis auf wenige Ausnahmen (in Tabelle 3.2 erläutert) fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen von Kaninchen.



**Abbildung 3.1:** Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und individuelle Werte des passiven Bewegungsumfanges (a), der passiven Plantarflexion (b), der passiven Dorsalextension (c) und des Ruhewinkels des Sprunggelenks (d) (gemäß der Neutral-Null-Methode (z.B. (110)) der jeweils rechten und linken Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (grüne Punkte), der RLL-Gruppe (rote Punkte) und der Kontrollgruppe (schwarze Punkte) an W13, sowie die 95 %-Konfidenzintervalle der Differenz zwischen den jeweiligen Mittelwerten (e-h). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweils rechten und linken Hinterläufe sind durch grüne Pfeile markiert.

## Ergebnisse

**Table 3.1:** P-Werte der statistischen Analyse der in Abbildung 3.1 gezeigten Ergebnisse der Beweglichkeitsmessungen an W13. P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

P <sub>zweifaktorieller Varianzanalyse</sub>	Behandlung	Seite	Behandlung × Seite	Subjekt
Passiver Bewegungsumfang des Sprunggelenks	0,765	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>
Passive Plantarflexion des Sprunggelenks	0,754	<b>0,002</b>	<b>0,032</b>	<b>0,009</b>
Passive Dorsalextension des Sprunggelenks	0,658	0,973	0,664	<b>&lt;0,001</b>
Ruhewinkel des Sprunggelenks	0,674	0,424	0,494	<b>0,013</b>

P <sub>Bonferroni-korrigierte post-hoc Test (rechts vs. links)</sub>	allogene-ADRCs-Gruppe	RLL-Gruppe	Kontrollgruppe
Passiver Bewegungsumfang des Sprunggelenks	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>	> 0,999
Passive Plantarflexion des Sprunggelenks	<b>0,003</b>	0,073	> 0,999
Passive Dorsalextension des Sprunggelenks	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Ruhewinkel des Sprunggelenks	0,556	> 0,999	> 0,999

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse der labormedizinischen Untersuchungen der Blutproben, die an W13 vor der Euthanasie, aber bereits in Narkose, entnommen wurden. Die P-Werte repräsentieren die Ergebnisse der einfaktoriellem Varianzanalyse. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen von Kaninchen sind fett gedruckt.

<sup>a</sup>  $p=0.034$  beim Vergleich der allogene-ADRCs-Gruppe mit der Kontrollgruppe

<sup>b</sup>  $p=0.039$  beim Vergleich der allogene-ADRCs-Gruppe mit der Kontrollgruppe

<sup>c</sup>  $p=0.035$  beim Vergleich der allogene-ADRCs-Gruppe mit der Kontrollgruppe

<sup>d</sup>  $p=0,032$  beim Vergleich der RLL-Gruppe mit der Kontrollgruppe

Parameter	allogene-ADRCs-Gruppe		RLL-Gruppe		Kontrollgruppe		P-Wert
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
Hämoglobin (G/dl)	13,3	0,7	10,9	3,9	13,9	n = 1	0,246
Hämoglobin zellulär (G/dl)	13	0,8	11,1	4,1	13,8	n = 1	0,361
Hämatokrit (%)	37,8	2,1	31,5	10,6	40	n = 1	0,267
Erythrozyten ( $10^6/uL$ )	6,1	0,3	5,1	1,6	6,2	n = 1	0,213
MCV (fl)	61,5	1,3	62,5	0,7	66	n = 1	0,381
RDW (%)	14,1	0,8	13,1	2,1	13	n = 1	0,398
MCHC (G/dl)	35	0	34,5	0,7	34	n = 1	0,178
Thrombozyten ( $10^3/uL$ )	437,8	164,6	168,5	214,3	325	n = 1	0,156
Mittl. Thrombozytenvolumen (fl)	7,8	0,7	14,3	8	7,2	n = 1	0,136
Kernhaltige Zellen ( $10^3/uL$ )	2,9	0,7	2,2	2,1	3,3	n = 1	0,544
Neutrophile (%)	27,1	4,8	16,3	6,9	30,3	n = 1	0,083
Lymphozyten (%)	62,9	6,3	62,6	8,9	57,5	n = 1	0,963
Monozyten (%)	0,7	0,1	0,9	0,9	0,5	n = 1	0,734
Eosinophile (%)	3,8	0,1	15,4	16,6	3,7	n = 1	0,182
Basophile (%)	5,3	2,1	4	0	8	n = 1	0,464
LUC (%)	0,2	0,2	0,6	0,3	0,2	n = 1	0,102
Neutrophile ( $10^3/uL$ )	0,8	0,3	0,5	0,5	1	n = 1	0,31
Lymphozyten ( $10^3/uL$ )	1,8	0,3	1,5	1,5	1,9	n = 1	0,633
Monozyten ( $10^3/uL$ )	0	0	0,1	0,1	0	n = 1	0,178
Eosinophile ( $10^3/uL$ )	0,1	0	0,2	0,1	0,1	n = 1	0,178
Basophile ( $10^3/uL$ )	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	n = 1	0,471
LUC ( $10^3/uL$ )	0	0	0	0	0	n = 1	N/A
Glukose (mg/dl)	176,3	9	175	32,1	162,5	18,9	0,638
Blut-Harnstoff-Stickstoff (mg/dl)	20,3	1,7	20,5	2,6	21,5	2,7	0,31
Kreatinin (mg/dl)	1,1	0,2	1,1	0,2	1,2	0,2	0,679
Cholesterin (mg/dl)	56,3	11,8	63,3	28,9	42,3	6,9	0,309
Creatinkinase (IU/L)	1034,8	656,2	1096,8	1095,9	734	177,8	0,768
Bilirubin gesamt (mg/dl)	0	0	0	0	0	0,1	0,405
<b>Gesamteiweiß (G/dl)</b>	<b>5,3</b>	0,2	5,1	0,3	<b>4,8</b>	0,3	0,038a
<b>Albumin (G/dl)</b>	<b>3,8</b>	0,1	3,7	0,3	<b>3,4</b>	0,2	0,039b
Globulin (G/dl)	1,5	0,1	1,4	0,2	1,4	0,1	0,494
Albumin-Globulin-Verhältnis	2,6	0,1	2,7	0,4	2,5	0,3	0,589
Calcium (mg/dl)	12,8	0,1	12,9	0,1	12,4	0,6	0,2
<b>Phosphor (mg/dl)</b>	<b>4,9</b>	<b>0,4</b>	<b>5,7</b>	<b>0,3</b>	<b>6,1</b>	<b>0,8</b>	0,038c
Alkalische Phosphatase (IU/L)	53,8	9,6	80,8	20,9	68,5	4,1	0,056
ALT (IU/L)	67	17,6	45,5	9,1	47,3	18,2	0,149
AST (IU/L)	45,3	37,3	19,8	6,3	16,8	1	0,183
GGT (IU/L)	7,8	2,6	6,3	1	7,3	1	0,479
Natrium (mEQ/L)	145,3	1,9	147	2,2	146	1,8	0,48
Kalium (mEQ/L)	4,3	0,5	4,1	0,2	4,2	0,3	0,633
Chlorid (mEQ/L)	104	2	102,7	2,5	104	2,1	0,657
Bicarbonat ( $HCO_3^-$ ) (mEQ/L)	25,4	1,8	<b>29,6</b>	2,5	<b>27,6</b>	1,1	0,039d
Anionenlücke (mmol/L)	20,3	1,5	19	0,8	18,5	2,7	0,411
Osmolalität (mOsm/Kg)	295,3	4	298	2,7	296	4,2	0,573



### 3.1.3 Ergebnisse der Untersuchungen mittels Magnetresonanztomografie

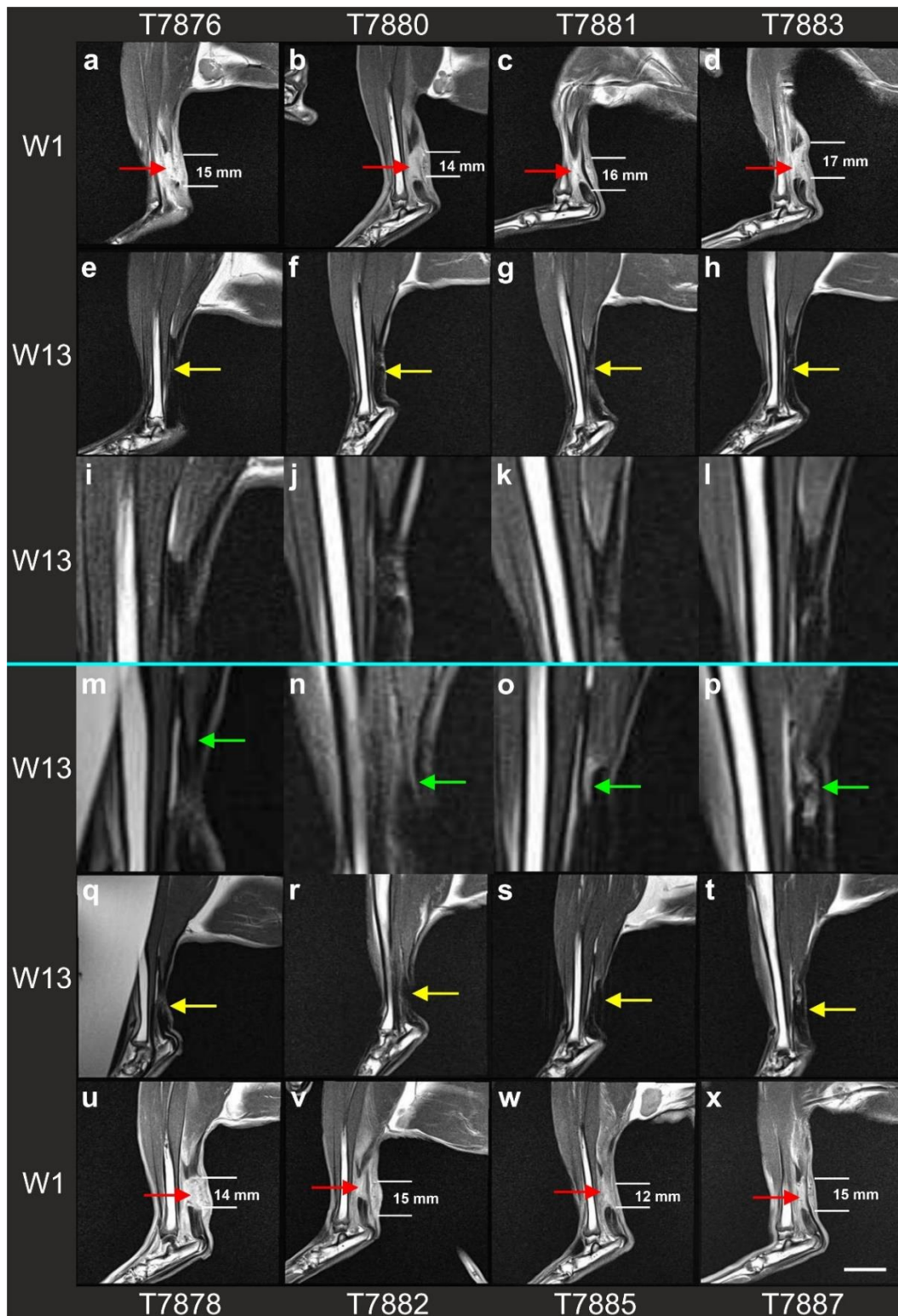
#### Ergebnisse der sagittalen MRT-Aufnahmen

Die Abbildungen 3.2 und 3.3 zeigen repräsentative sagittale MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe aller untersuchten Kaninchen.

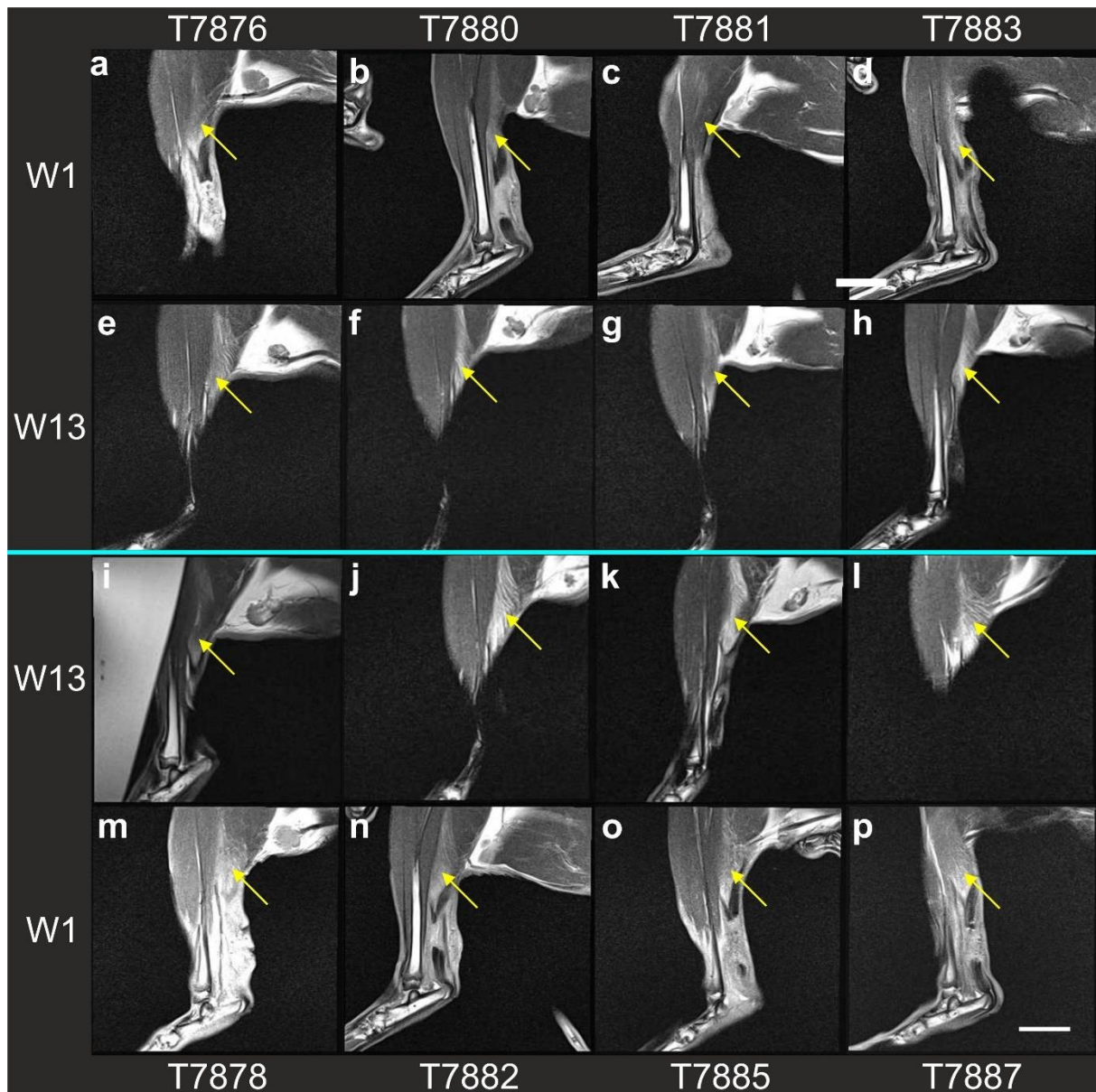
An W1 zeigten die sagittalen PD-TSE MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) bei allen Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe ein hyperintenses Signal im Bereich der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennten Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis (rote Pfeile in Abbildung 3.2a-d und u-x). Die mittlere axiale Ausdehnung dieses hyperintenses Signals unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (allogene-ADRCs-Gruppe:  $15,5 \pm 0,6$ ; RLL-Gruppe:  $14,0 \pm 0,7$ ; pT-Test = 0,168).

An W13 war bei allen Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe das hyperintense Signal im Bereich der Dehiszenz durch ein hypointenses Signal ersetzt (gelbe Pfeile in Abbildung 1e-h und q-t). Darüber hinaus zeigten alle Kaninchen in der RLL-Gruppe, aber kein Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe, Strukturen mit höherer Intensität im hypointensen Bereich an der Position der Dehiszenz (grüne Pfeile in Abbildung 1m-p; die größte dieser Strukturen mit höherer Intensität wurde bei den Kaninchen T7885 (Abbildung 1o) und T7887 (Abbildung 1p) gefunden. Die Identität dieser Strukturen konnte anhand der MRT-Aufnahmen jedoch nicht geklärt werden.

Darüber hinaus zeigten die sagittalen PD-TSE MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) bei allen Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe ein „Fischgrätenmuster“ (mit höherer Intensität an W13 als an W1) (Abbildung 3.3), das in der Literatur auf eine überanstrengungsbedingte Muskelstörung zurückgeführt wird (111).



**Abbildung 3.2:** Sagittale 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-l) und der RLL-Gruppe (m-x) an W1 (a-d und u-x) und W13 (e-l und m-t). Die MRT Aufnahmen zeigen das jeweils maximale Ausmaß der Dehiscenz der Sehnenstümpfe, das bei dem jeweiligen Kaninchen beobachtet wurde. Die Pfeile werden im Text erläutert. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils am oberen bzw. unteren Rand der Abbildung angegeben. Der Maßstabsbalken in (x) entspricht 20 mm in a-h und q-x sowie 6,7 mm in i-p.



**Abbildung 3.3:** Sagittale 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-h) und der RLL-Gruppe (i-p) an W1 (a-d und m-p) und an W13 (e-h und i-l). Die MRT Aufnahmen zeigen das jeweils maximale Ausmaß des "Fischgrätenmusters", das im Soleusmuskel bei dem entsprechenden Kaninchen beobachtet wurde (gelbe Pfeile). Die Nummern der Kaninchen sind jeweils am oberen bzw. unteren Rand der Abbildung angegeben. Der Maßstabsbalken in (p) entspricht 20 mm.

## Ergebnisse der transversalen MRT-Aufnahmen

Die Abbildungen 3.4 bis 3.6 zeigen repräsentative transversale MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe aller untersuchten Kaninchen.

An W1 konnten bei allen Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe in den transversalen MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennten Sehnen der rechten *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis*) diejenigen Teile der gemeinsamen Calcaneussehne identifiziert werden, die nicht durchtrennt worden waren (Sehnen des *M. soleus*, *M. plantaris*, *M. semitendinosus* und *M. flexor digitorum superficialis*; gelbe Pfeile in Abbildung 3.4a-av). Diese Sehnen waren von einem unterschiedlich starken hyperintensiven Signal umgeben, das insbesondere in den T2-gewichteten TSE MRT-Aufnahmen sichtbar war (rote Pfeile in Abbildung 3.4q-x).

Dieses hyperintense Signal wurde an W1 an der in Abbildung 2.3. gezeigten Position 2 (d.h. caudal der Dehiszenz) nicht gefunden, an der die gemeinsame Calcaneussehne und die Sehne des *M. flexor digitorum superficialis* bei allen Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe deutlich unterschieden werden konnten (in Abbildung 3.2y-av zeigen die blauen Pfeile auf die gemeinsame Calcaneussehne und die gelben Pfeile auf die Sehne des *M. flexor digitorum superficialis*).

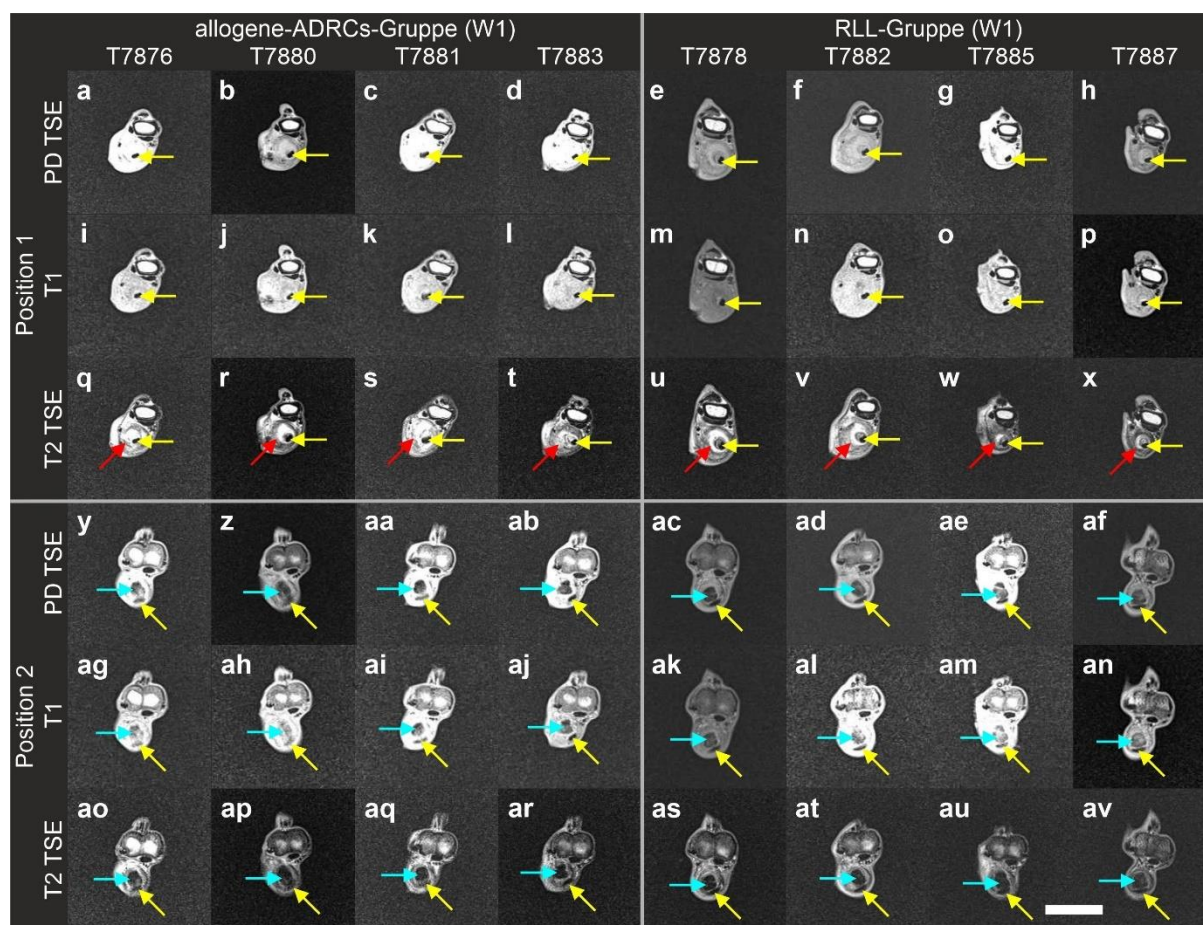
Auch an W13 konnten bei allen Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe in den transversalen MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz) diejenigen Teile der gemeinsamen Calcaneussehne identifiziert werden, die nicht durchtrennt worden waren (gelbe Pfeile in Abbildung 3.5a-p). Da das hyperintense Signal, das an W1 an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz) gefunden wurde, an W13 nicht mehr vorhanden war, konnte die gemeinsame Calcaneussehne in den T2-gewichteten TSE MRT-Aufnahmen an W13 nicht mehr identifiziert werden (Abbildung 3.5q-x).

Andererseits zeigten an W13 alle Kaninchen in der RLL-Gruppe, aber kein Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe, an den in Abbildung 2.3 gezeigten Positionen 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz) und 2 (d.h., caudal der Dehiszenz) ein hyperintenses Signal (grüne Pfeile in Abbildung 3.5e-h, m-p, u-x, as-av). An der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz) wurden die größten dieser hyperintensiven Strukturen bei den Kaninchen T7885 (Abbildung 3.5g, o, w) und T7887 (Abbildung 3.5h, p, x) gefunden, und an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 2 (d.h. caudal der Dehiszenz) bei den Kaninchen T7878 (Abbildung 3.5as) und T7887 (Abbildung 3.5av). Die Identität dieser Strukturen konnte anhand der MRT-Aufnahmen jedoch nicht geklärt werden.

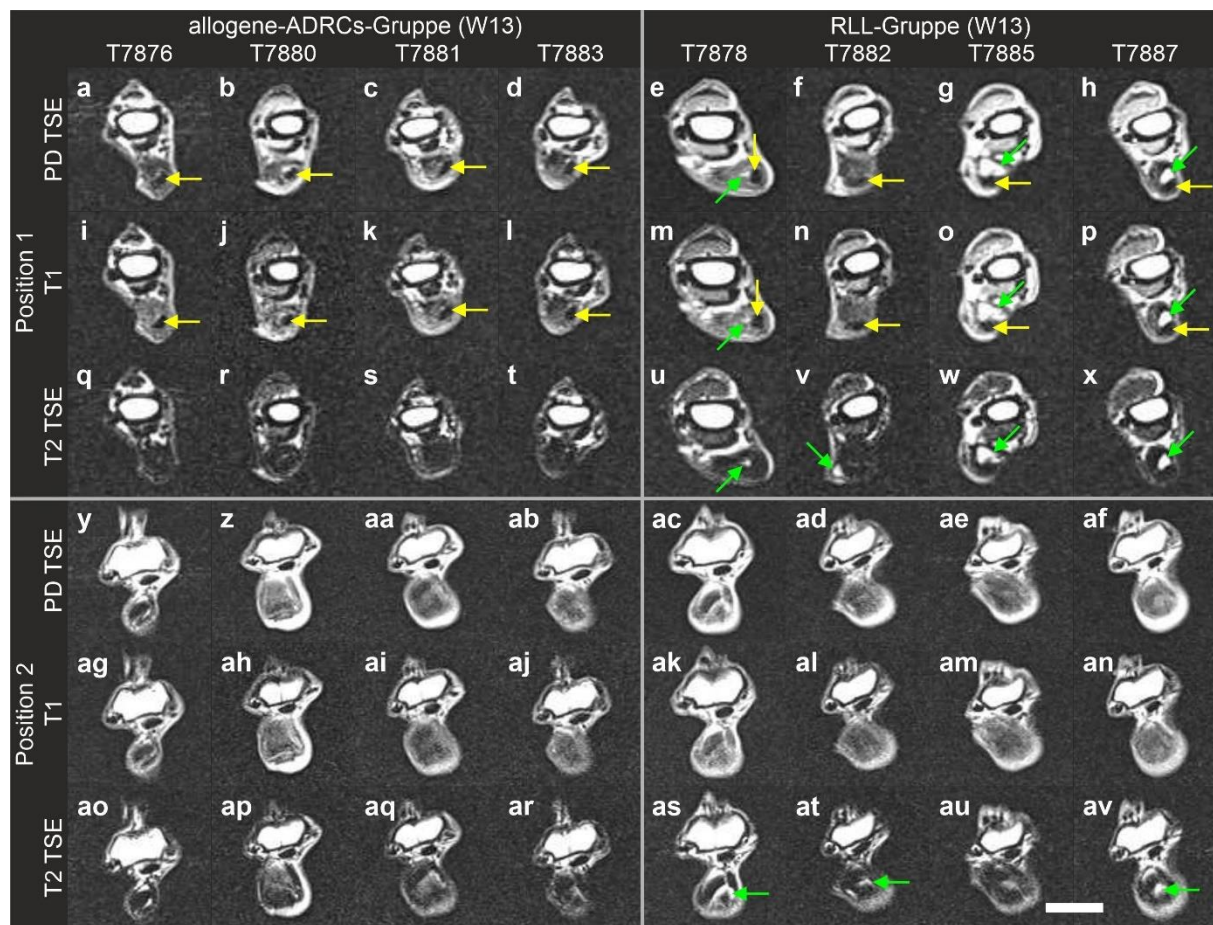
Sowohl an W1 als auch an W13 zeigten alle Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe in den transversalen MRT-Aufnahmen der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 3 (d.h. im Bereich der Muskeln oberhalb der Dehiszenz) eine höhere Intensität im *M. soleus* als in den anderen Muskeln (*M. gastrocnemius medialis*, *M. gastrocnemius lateralis*, *M. plantaris* und *M. flexor digitorum longus*) (gelbe Pfeile in Abbildung 3.6a-av).

Die mittleren absoluten Intensitätswerte der Signale, die an W1 und W13 in den transversalen 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz) gefunden wurden, zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.5a und Tabelle 3.3).

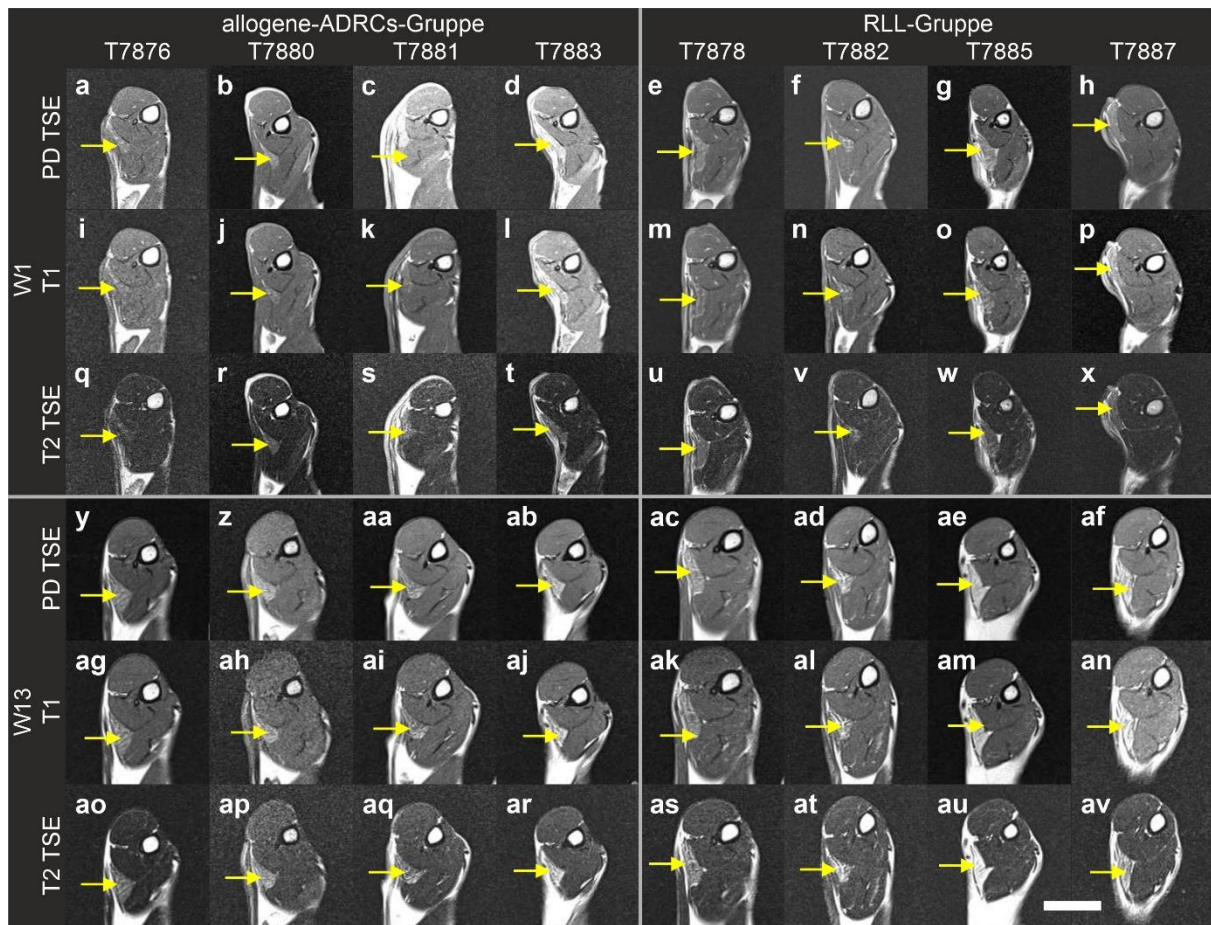
Darüber hinaus zeigten weder die mittleren absoluten Intensitätswerte noch die mittleren relativen Intensitätswerte (bezogen auf die jeweiligen Intensitätswerte des M. flexor digitorum longus), die an W1 und W13 in den transversalen 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 3 (d.h. im Bereich der Muskeln oberhalb der Dehiszenz) gefunden wurden, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildungen 3.7b-f und 3.8a-d sowie Tabellen 3.3 und 3.4).



**Abbildung 3.4:** Transversale 3,0 T MRT-Aufnahmen (a-h und y-af: PD TSE; i-p und ag-an: T1; q-x und ao-av: T2 TSE) der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d, i-l, q-t, y-ab, ag-aj, ao-ar) und der RLL-Gruppe (e-h, m-p, u-x, ac-af, ak-an, as-av) an W1 an den in Abbildung 2.3 gezeigten Positionen 1 (im Bereich der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennen Sehnen der rechten Mm. gastrocnemii medialis und lateralis; a-x) und 2 (caudal der Dehiszenz; y-av). Die Pfeile sind im Text erklärt. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils am oberen Rand der Abbildung angegeben. Der Maßstabsbalken in (av) entspricht 20 mm in a-av.

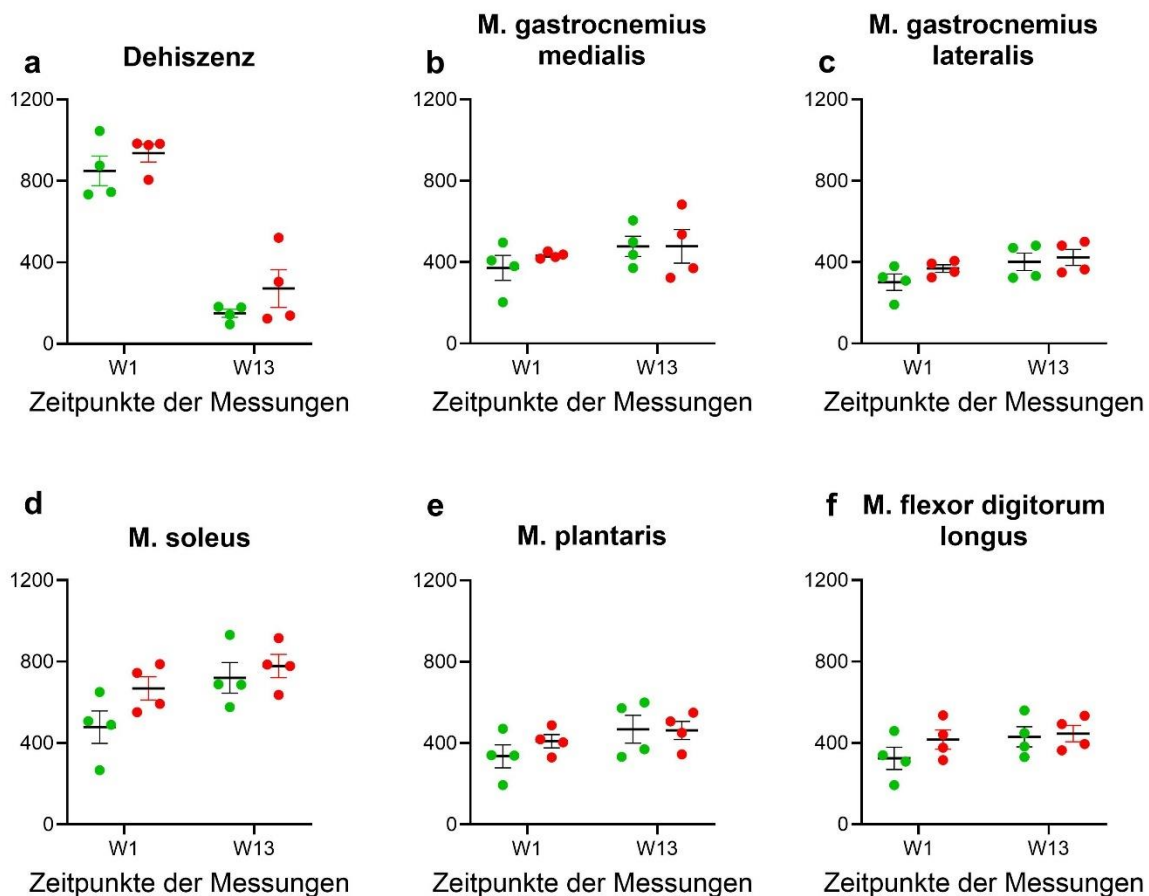


**Abbildung 3.5:** Transversale 3,0 T MRT-Aufnahmen (a-h und y-af: PD TSE; i-p und ag-an: T1; q-x und ao-av: T2 TSE) der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d, i-l, q-t, y-ab, ag-aj, ao-ar) und der RLL-Gruppe (e-h, m-p, u-x, ac-af, ak-an, as-av) an W13 an den in Abbildung 2.3 gezeigten Positionen 1 (im Bereich der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennen Sehnen der rechten *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis*; a-x) und 2 (caudal der Dehiszenz; y-av). Die Pfeile sind im Text erklärt. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils am oberen Rand der Abbildung angegeben. Der Maßstabsbalken in (av) entspricht 20 mm in a-av.



**Abbildung 3.6:** Transversale 3,0 T MRT-Aufnahmen (a-h und y-af: PD TSE; i-p und ag-an: T1; q-x und ao-av: T2 TSE) der rechten Hinterläufe (D/B bzw. D/S) der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d, i-l, q-t, y-ab, ag-aj, ao-ar) und der RLL-Gruppe (e-h, m-p, u-x, ac-af, ak-an, as-av) an W1 (a-x) sowie an W13 (y-av) an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 3 (d.h. im Bereich der Muskeln oberhalb der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennen Sehnen der rechten *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis*). Die Pfeile sind im Text erklärt. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils am oberen Rand der Abbildung angegeben. Der Maßstabsbalken in (av) entspricht 20 mm in a-av.

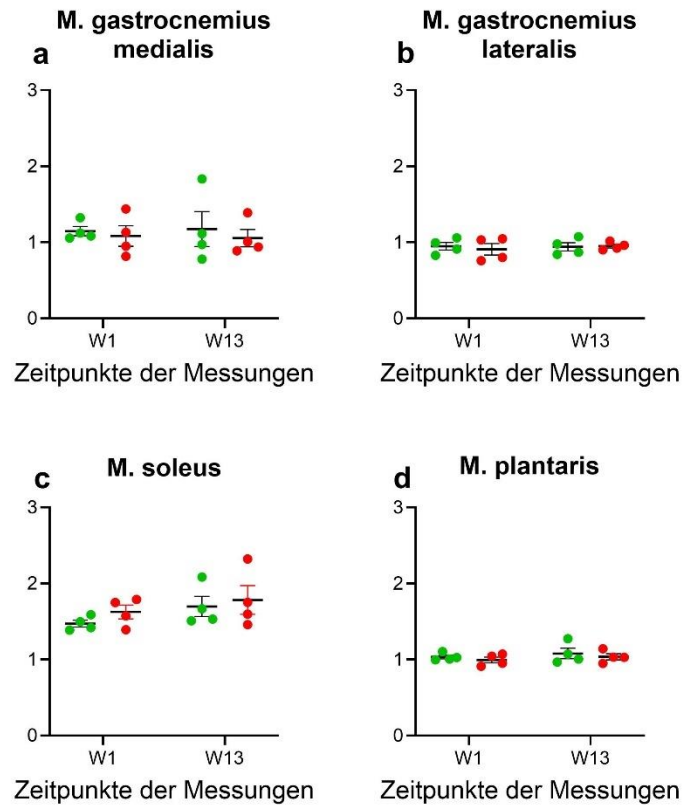




**Abbildung 3.7:** Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und individuelle Werte der absoluten Intensitätswerte, die an W1 und W13 bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (grüne Punkte) und den Kaninchen in der RLL-Gruppe (rote Punkte) in den transversalen 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen an den in Abbildung 2.3 gezeigten Positionen 1 (d.h. im Bereich der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennten Sehnen der rechten *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis*) (a) und 2 (d.h. im Bereich der Muskeln oberhalb der Dehiszenz) (b-f) gefunden wurden.

**Table 3.3:** P-Werte der statistischen Analyse der in Abbildung 3.7 gezeigten Ergebnisse der Analyse der transversalen 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen. P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

P <sub>zweifaktorielle Varianzanalyse</sub>	Behandlung	Zeit	Behandlung × Zeit	Subjekt
Dehiszenz	0,073	<b>&lt;0,001</b>	0,825	0,855
M. gastrocnemius medialis	0,471	0,324	0,679	0,902
M. gastrocnemius lateralis	0,309	0,052	0,504	0,296
M. soleus	0,088	0,055	0,406	0,674
M. plantaris	0,577	0,087	0,415	0,283
M. flexor digitorum longus	0,387	0,108	0,324	0,131
P <sub>Bonferroni-korrigierter post-hoc Test (allogene-ADRCs-Gruppe vs. RLL-Gruppe)</sub>		W1	W13	
Dehiszenz		0,705	0,399	
M. gastrocnemius medialis		0,927	>0,999	
M. gastrocnemius lateralis		0,428	>0,999	
M. soleus		0,141	> 0,999	
M. plantaris		0,671	> 0,999	
M. flexor digitorum longus		0,400	> 0,999	



**Abbildung 3.8:** Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und individuelle Werte der relativen Intensitätswerte (bezogen auf die jeweiligen Intensitätswerte des *M. flexor digitorum longus*), die an W1 und W13 bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (grüne Punkte) und den Kaninchen in der RLL-Gruppe (rote Punkte) in den transversalen 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen an der in Abbildung 2.3 gezeigten Position 2 (d.h. im Bereich der Muskeln oberhalb der Dehiszenz der Stümpfe der vollständig durchtrennten Sehnen der rechten *Mm. gastrocnemii medialis* und *lateralis*) gefunden wurden.

**Table 3.4:** P-Werte der statistischen Analyse der in Abbildung 3.8 gezeigten Ergebnisse der Analyse der transversalen 3,0 T PD-TSE MRT-Aufnahmen. P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

P <sub>two-way ANOVA</sub>	Behandlung	Zeit	Behandlung × Zeit	Subjekt
M. gastrocnemius medialis	0,467	0,999	0,877	0,818
M. gastrocnemius lateralis	0,784	0,774	0,674	0,598
M. soleus	0,425	0,140	0,770	0,305
M. plantaris	0,382	0,389	0,972	0,601
P <sub>Bonferroni-korrigierte post-hoc Test (allogene-ADRCs-Gruppe vs. RLL-Gruppe)</sub>		W1	W13	
M. gastrocnemius medialis		0,946	0,824	
M. gastrocnemius lateralis		0,850	0,989	
M. soleus		0,650	0,873	
M. plantaris		0,805	0,773	

### 3.1.4 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Abbildung 3.9 zeigt repräsentative Übersichtsaufnahmen von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe von Kaninchen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Abbildung 3.10 zeigt repräsentative Mikrofotografien von mit Azan gefärbten Schnitten, die Abbildungen 3.11 bis 3.13 repräsentative Polarisations-Mikrofotografien von mit Picrosirius-Rot gefärbten Schnitten, und die Abbildungen 3.14 und 3.15 repräsentative Mikrofotografien von mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe aller untersuchter Kaninchen.

Die mit Azan gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe zeigten am proximalen Ende Anschnitte des M. gastrocnemius (die Schnitte erlaubten es nicht, zu entscheiden, ob der M. gastrocnemius medialis oder der M. gastrocnemius lateralis angeschnitten war), Anschnitte des M. soleus, der Sehne des M. soleus, des Paratenon der Sehne des M. soleus sowie (bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe) neu gebildetes Bindegewebe neben dem ursprünglichen Gewebe der Sehne des M. soleus (Abbildungen 3.9a,b und 3.10a-l). Dieses neu gebildete Bindegewebe neben dem ursprünglichen Gewebe der Sehne des M. soleus war bei den Kaninchen in der RLL-Gruppe deutlich ausgeprägter als bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (Abbildung 3.10a-h).

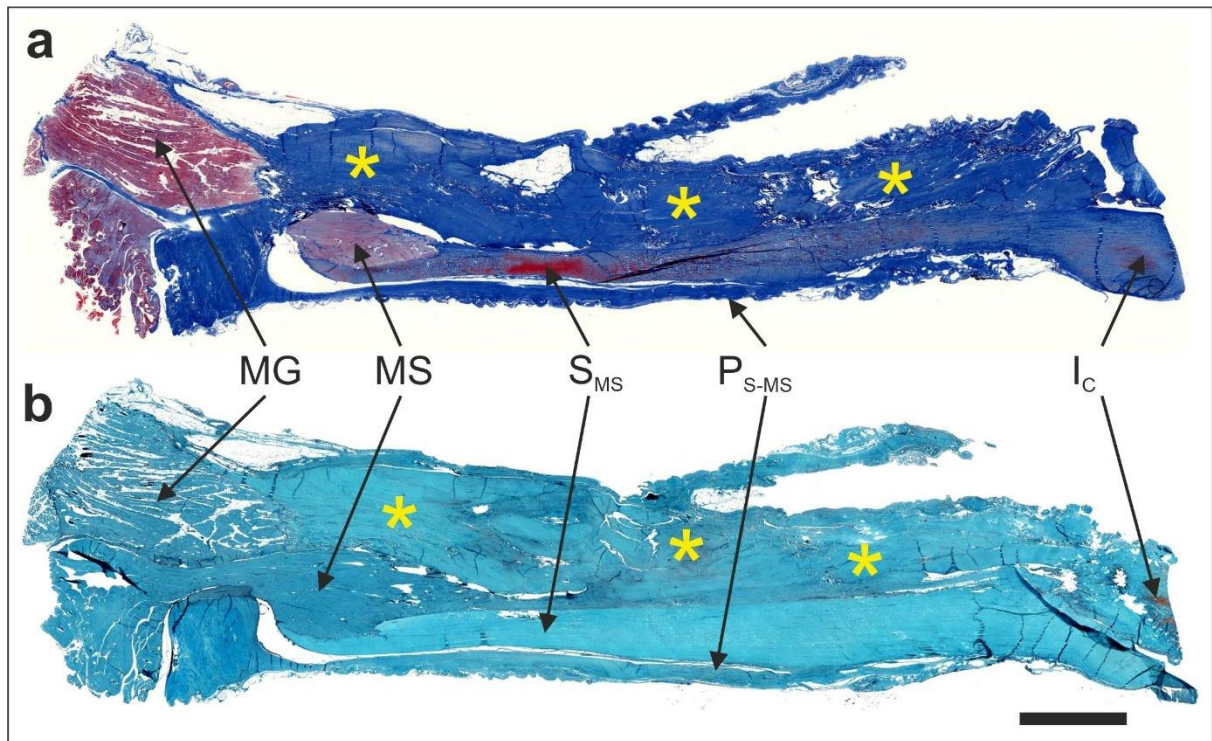
Mittels Polarisationsmikroskopie konnte in den mit Picrosirius-Rot gefärbten Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe das ursprüngliche Gewebe der Sehne des M. soleus anhand seiner dichten, geordneten Kollagenfibrillen eindeutig identifiziert werden (Abbildungen 3.11a-l, 3.12a-h und 3.13a-l). Die Schnitte der Kaninchen in der RLL-Gruppe zeigten neben dem ursprünglichen Gewebe der Sehne des M. soleus neu gebildetes, organisiertes, festes Bindegewebe (gelbe Pfeile in Abbildung 3.12e-h). Im Gegensatz dazu zeigten die Schnitte der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe neu gebildetes, unorganisiertes Bindegewebe neben dem ursprünglichen Gewebe der Sehne des M. soleus (gelbe Sternchen in Abbildung 3.12a-d). Darüber hinaus wurde am distalen Rand der Schnitte aller Kaninchen das typische Kreuzmuster der Kollagenfasern am Ansatz der gemeinsamen Calcaneussehne am Calcaneus gefunden (Abbildung 3.13a-l).

Die mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe zeigten das ursprüngliche Gewebe der Sehne des M. soleus, charakterisiert durch eine dichte, geordnete Struktur und die Präsenz nur sehr weniger Zellen (schwarze Sternchen in Abbildung 3.14a-h). Im Gegensatz dazu wies das neu gebildete Bindegewebe eine viel höhere Zelldichte auf (schwarze Kreuze in Abbildung 3.14a-h). Bei keinem der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe und der RLL-Gruppe wurden Fettzellen im neu gebildeten Bindegewebe beobachtet. Wie bei den mit Picrosirius-Rot gefärbten Schnitten erschien das neu gebildete Bindegewebe in den mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitten bei den Kaninchen in der RLL-Gruppe organisierter und fester (Abbildung 3.14e-h) als bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (Abbildung 3.14a-d). Darüber hinaus schien die Grenze zwischen dem ursprünglichen Gewebe der Sehne des M. soleus und dem neu gebildeten Bindegewebe in den Schnitten der Kaninchen in der RLL-Gruppe zusammenhängend zu sein (schwarze Pfeile in Abbildung 3.14e-h), in den Schnitten der

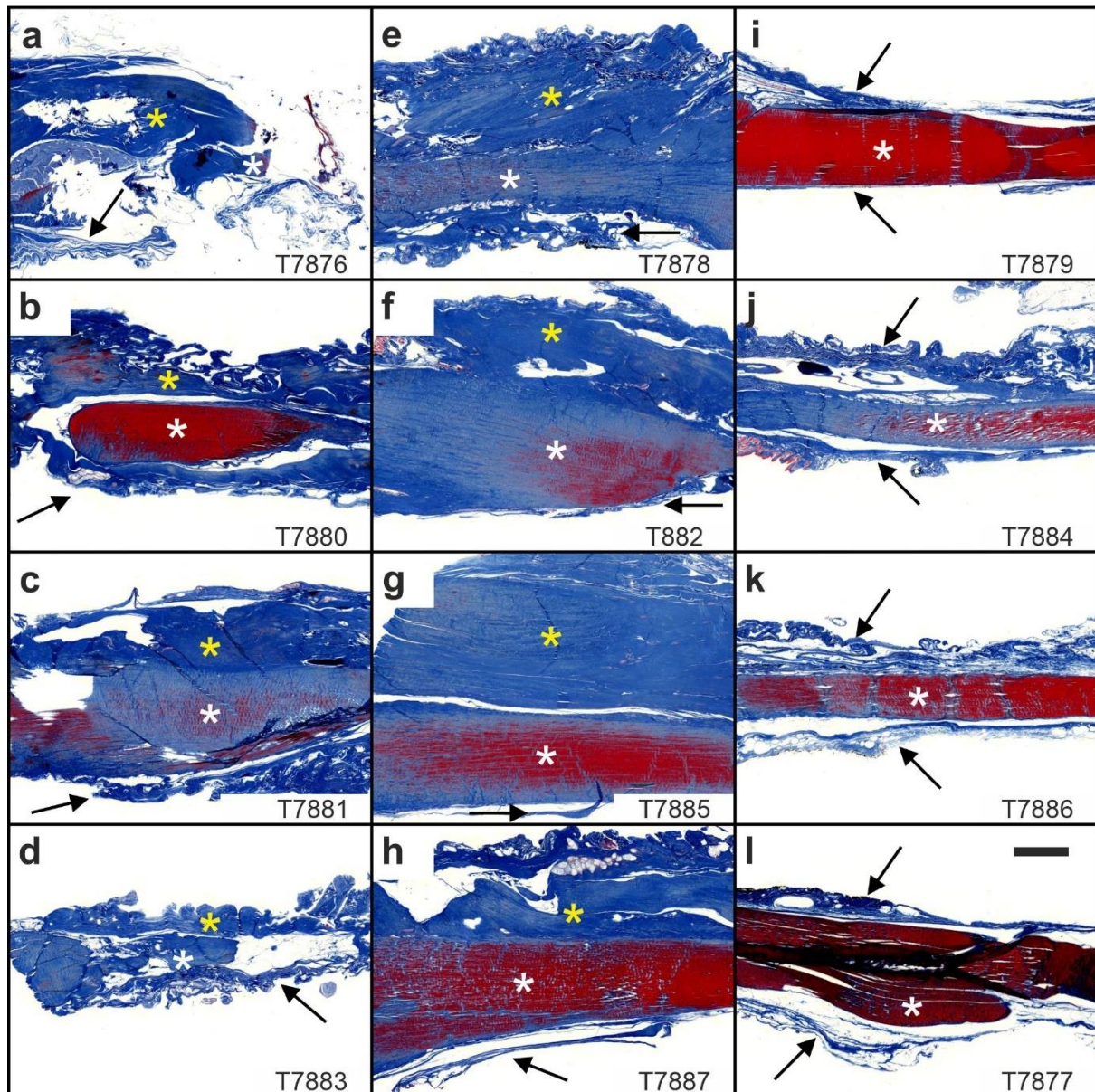
Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe hingegen locker und unverbunden (schwarze Pfeile in Abbildung 3.14a-d).

Am distalen Ende der mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe fand sich für alle Kaninchen in der Kontrollgruppe, drei Kaninchen in der RLL-Gruppe und kein Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe eine Proteoglycan-Färbung damit Faserknorpel am Ansatz der gemeinsamen Calcaneusehne am Calcaneus (schwarze Pfeile in Abbildung 3.15e,f,h und i-l).

Die stereologische Quantifizierung ergab für das neu gebildete Bindegewebe in den mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe einen statistisch signifikant niedrigeren mittleren relativen Flächenanteil von Zellen bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe im Vergleich zu den Kaninchen in der RLL-Gruppe ( $10,8\% \pm 0,4\%$  gegenüber  $15,8\% \pm 1,5\%$ ) sowie einen statistisch signifikant höheren mittleren relativen Flächenanteil von extrazellulärer Matrix bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe im Vergleich zu den Kaninchen in der RLL-Gruppe ( $86,3\% \pm 0,4\%$  gegenüber  $81,1\% \pm 1,1\%$ ) (Abbildung 3.16).

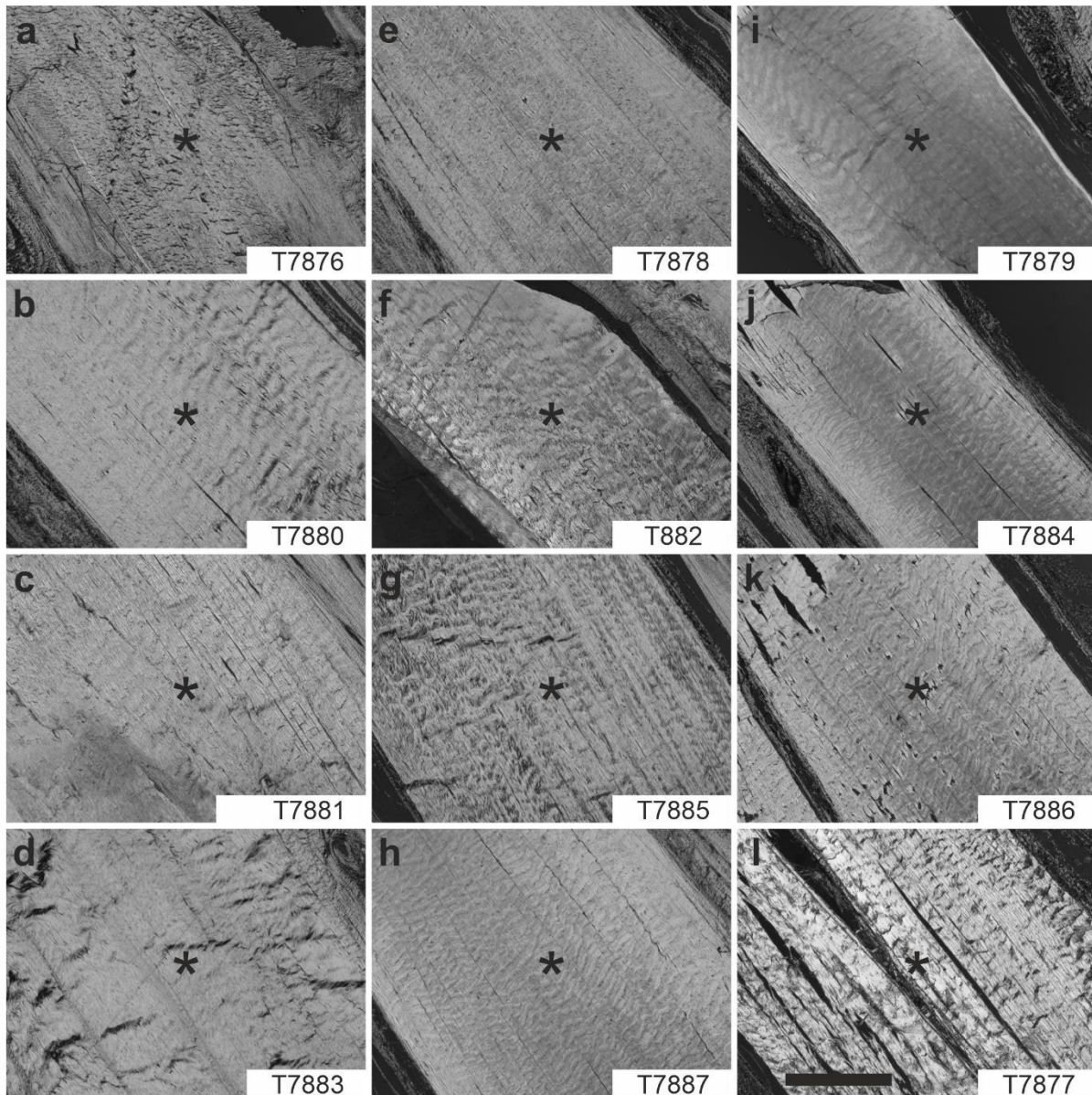


**Abbildung 3.9:** Repräsentative Übersichtsaufnahmen von sagittalen, 5  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe von Kaninchen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (die hier gezeigten Schnitte stammen von Kaninchen T7878 in der RLL-Gruppe). (a) Azan-Färbung; (b) Safranin O / Fast Green-Färbung. Abkürzungen: MG: M. gastrocnemius (die gezeigten Schnitte erlauben es nicht, zu entscheiden, ob der M. gastrocnemius medialis oder der M. gastrocnemius lateralis angeschnitten ist); MS: M. soleus;  $S_{MS}$ : Sehne des M. soleus;  $P_{S-MS}$ : Peritenon der Sehne des M. soleus;  $I_C$ : Insertion der gemeinsamen Calcaneusehne am Calcaneus. Der Maßstabsbalken entspricht 5 mm in a,b.

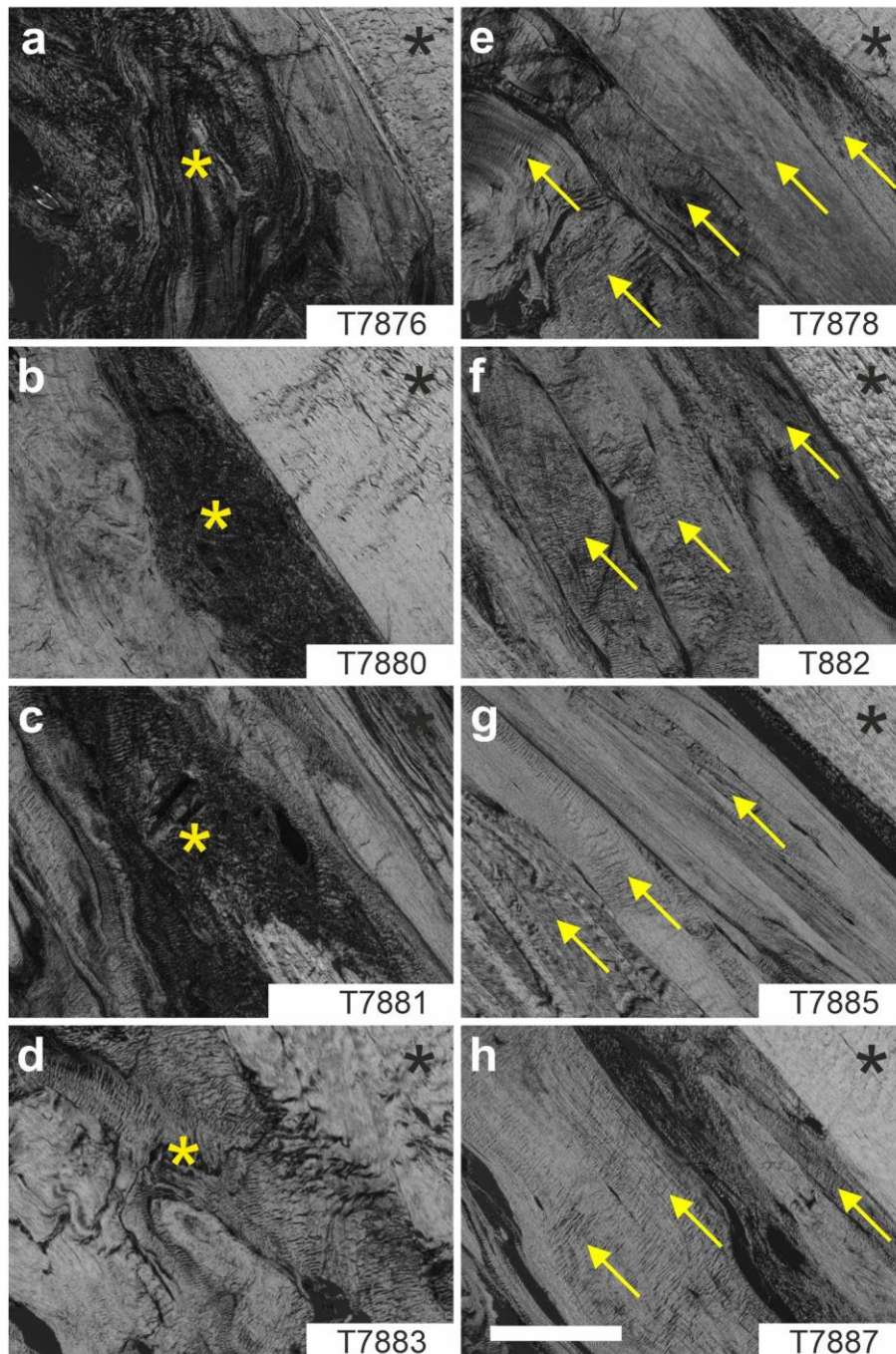


**Abbildung 3.10:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten (gefärbt mit Azan) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d), der RLL-Gruppe (e-h) und der Kontrollgruppe (i-l) an W13. Die weißen Sternchen kennzeichnen das ursprüngliche Gewebe der Sehne des M. soleus (diese Sehne wurde nicht durchtrennt), die gelben Sternchen neu gebildetes Bindegewebe und die schwarzen Pfeile das Peritenon der Sehne des M. soleus. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 1 mm in a-l.

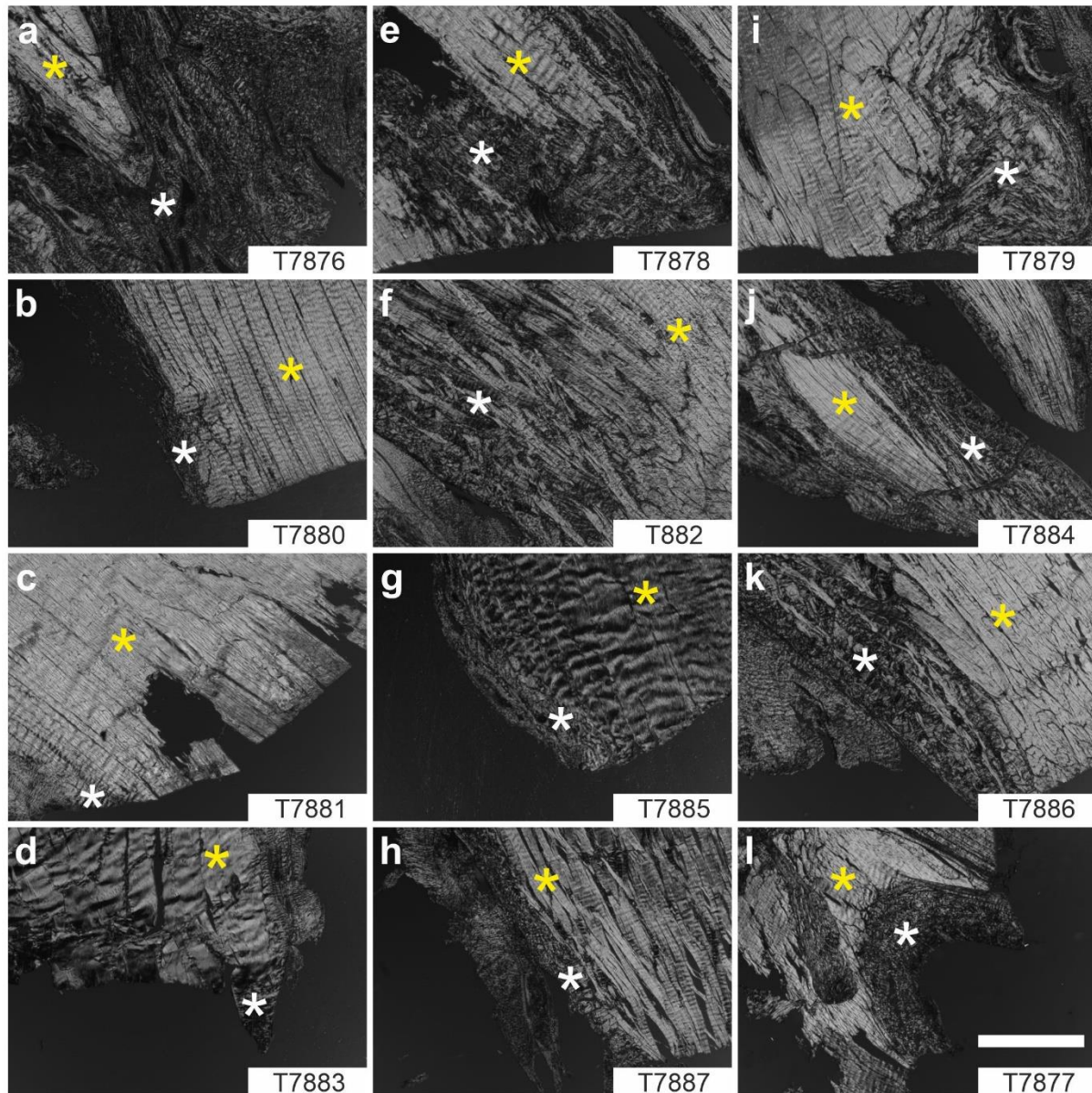




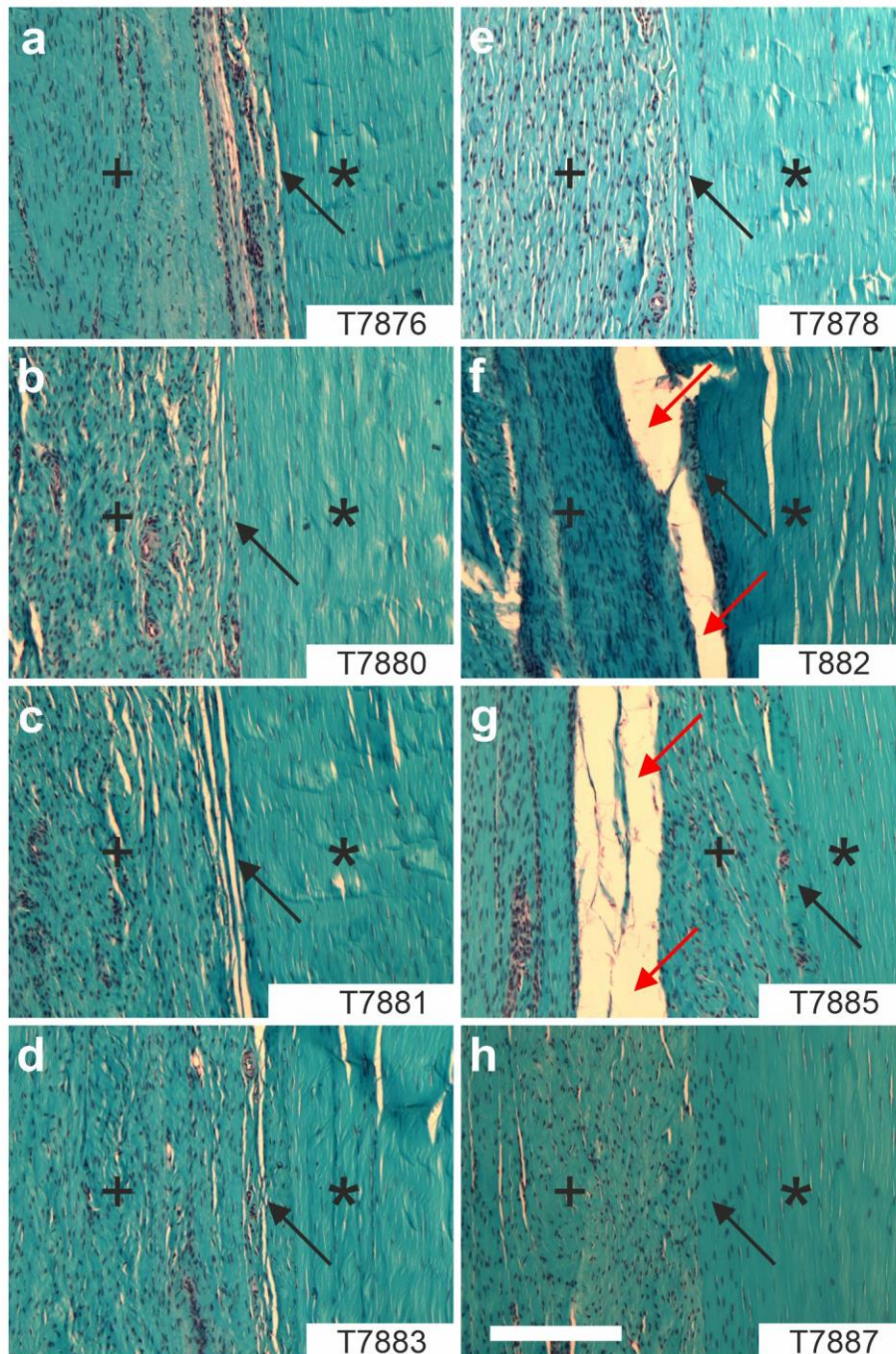
**Abbildung 3.11:** Repräsentative Polarisations-Mikrografien von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten (gefärbt mit Picrosirius-Rot) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d), der RLL-Gruppe (e-h) und der Kontrollgruppe (i-l) an W13. Die schwarzen Sternchen kennzeichnen das ursprüngliche Gewebe der Sehne des M. soleus (diese Sehne wurde nicht durchtrennt). Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 1 mm in a-l.



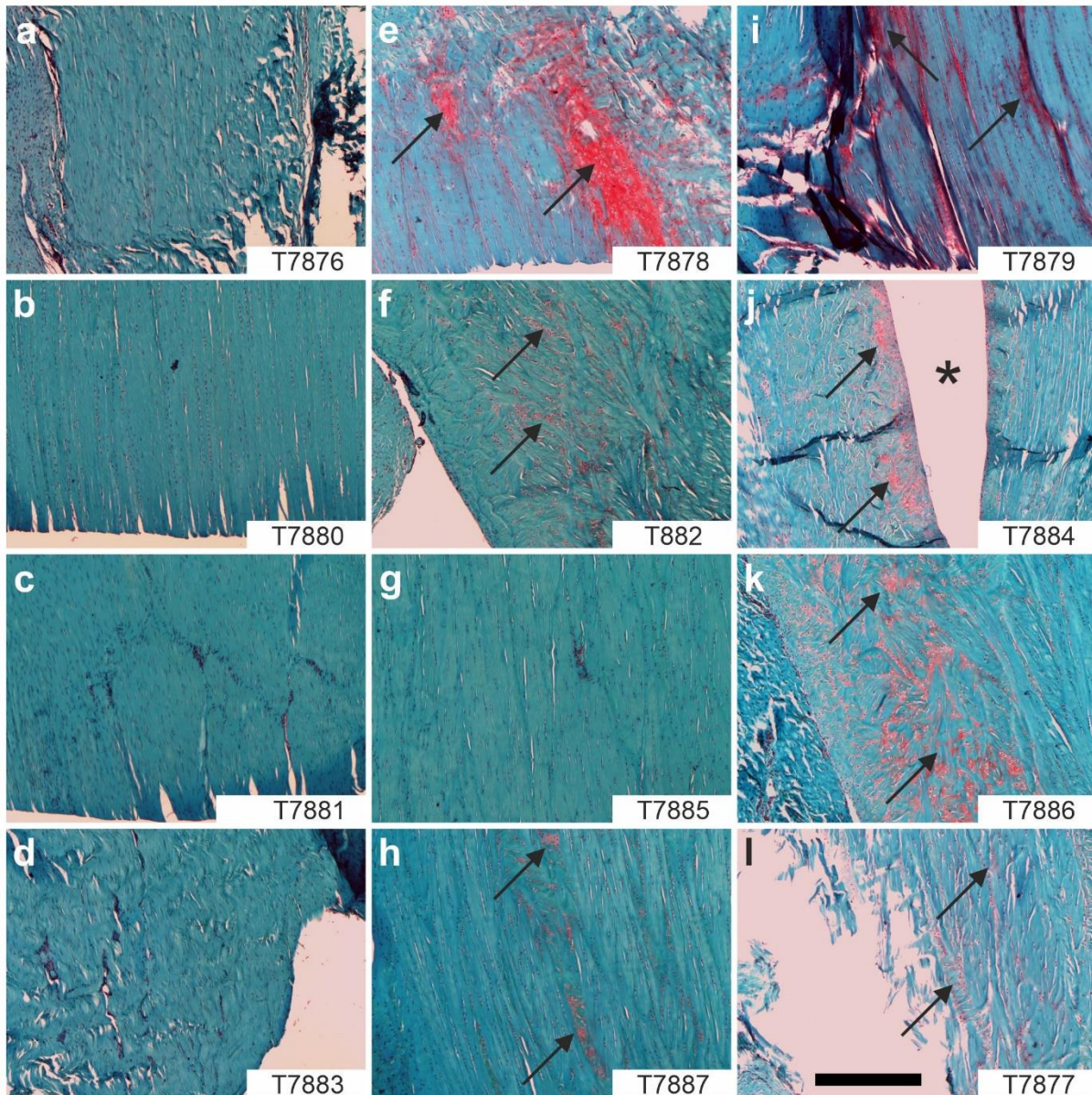
**Abbildung 3.12:** Repräsentative Polarisations-Mikrografien von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten (gefärbt mit Picrosirius-Rot) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d) und der RLL-Gruppe (e-h) an W13. Die schwarzen Sternchen in der jeweils oberen rechten Ecke kennzeichnen das ursprüngliche Gewebe der Sehne des M. soleus (diese Sehne wurde nicht durchtrennt), die gelben Sternchen in (a-d) neu gebildetes, unorganisiertes Bindegewebe und die gelben Pfeile in (e-h) neu gebildetes, organisiertes Bindegewebe. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (h) entspricht 1 mm in a-h.



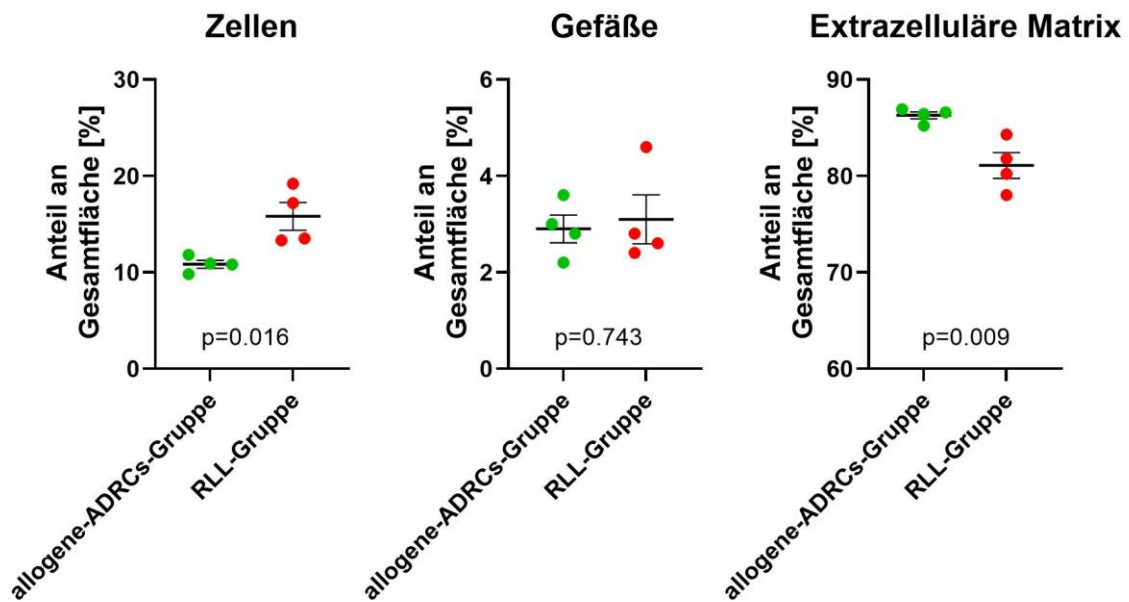
**Abbildung 3.13:** Repräsentative Polarisations-Mikrografien von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten (gefärbt mit Picrosirius-Rot) der gemeinsamen Calcaneusesehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d), der RLL-Gruppe (e-h) und der Kontrollgruppe (i-l) an W13. Die gelben Sternchen kennzeichnen das ursprüngliche Gewebe der Sehne des M. soleus (diese Sehne wurde nicht durchtrennt), und die weißen Sternchen das typische Kreuzmuster der Kollagenfasern am Ansatz der gemeinsamen Calcaneusesehne am Calcaneus. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 1 mm in a-l.



**Abbildung 3.14:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten (gefärbt mit Safranin O / Fast Green) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d) und der RLL-Gruppe (e-h) an W13. Die schwarzen Sternchen jeweils auf der rechten Seite kennzeichnen das ursprüngliche Gewebe der Sehne des *M. soleus* (diese Sehne wurde nicht durchtrennt), die schwarzen Kreuze auf der jeweils linken Seite neu gebildetes Bindegewebe, die schwarzen Pfeile die Grenze zwischen dem ursprünglichen Gewebe der Sehne des *M. soleus* und dem neu gebildeten Bindegewebe, und die roten Pfeile Artefakte, die durch die histologische Aufarbeitung verursacht wurden. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (h) entspricht 500 µm in a-h.



**Abbildung 3.15:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Schnitten (gefärbt mit Safranin O / Fast Green) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (a-d), der RLL-Gruppe (e-h) und der Kontrollgruppe (i-l) an W13. Die schwarzen Pfeile zeigen Proteoglykan (rot gefärbt mit Safranin O) und damit Faserknorpel am Ansatz der gemeinsamen Calcaneusehne am Calcaneus. Das Sternchen in (j) weist auf ein Artefakt hin, das durch die histologische Bearbeitung verursacht wurde. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 500 µm in a-l.



**Abbildung 3.16:** Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und individuelle Werte der relativen Flächenanteile [%] von Zellen (a), Gefäßen (b) und extrazellulärer Matrix (c) im neu gebildeten Bindegewebe (schwarze Kreuze in Abbildung 3.14) in mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe (grüne Punkte) und der RLL-Gruppe (rote Punkte). Die Ergebnisse der statistischen Analyse mittels unpaarem t-Test sind jeweils unten in den Diagrammen angegeben.

### 3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch 1

In der gemeinsamen Beurteilung aller erhobenen Befunde von Versuch 1 unterschied sich das neu gebildete Bindegewebe im Bereich der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der untersuchten Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe qualitativ und quantitativ deutlich von den Kaninchen in der RLL-Gruppe. Die fehlende Proteoglycan-Färbung am distalen Ende der mit Safranin O / Fast Green gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe im Vergleich zu den Kaninchen in der RLL-Gruppe und der Kontrollgruppe deutete darauf hin, dass das neu gebildete Bindegewebe bei den Kaninchen in der allogene-ADRCs-Gruppe funktionell minderwertiger war als bei den Kaninchen in der RLL-Gruppe.

Somit musste die Hypothese für Versuch 1 (allogene, lokal an den Sehnendefekt applizierte ADRCs verbessern die Regeneration des partiellen Sehnendefekts) verworfen werden.

## 3.2 Ergebnisse von Versuch II (Behandlung von experimentell induzierten Sehnteildefekten mit autologen ADRCs im Tierversuch)

### 3.2.1 Vorbemerkung

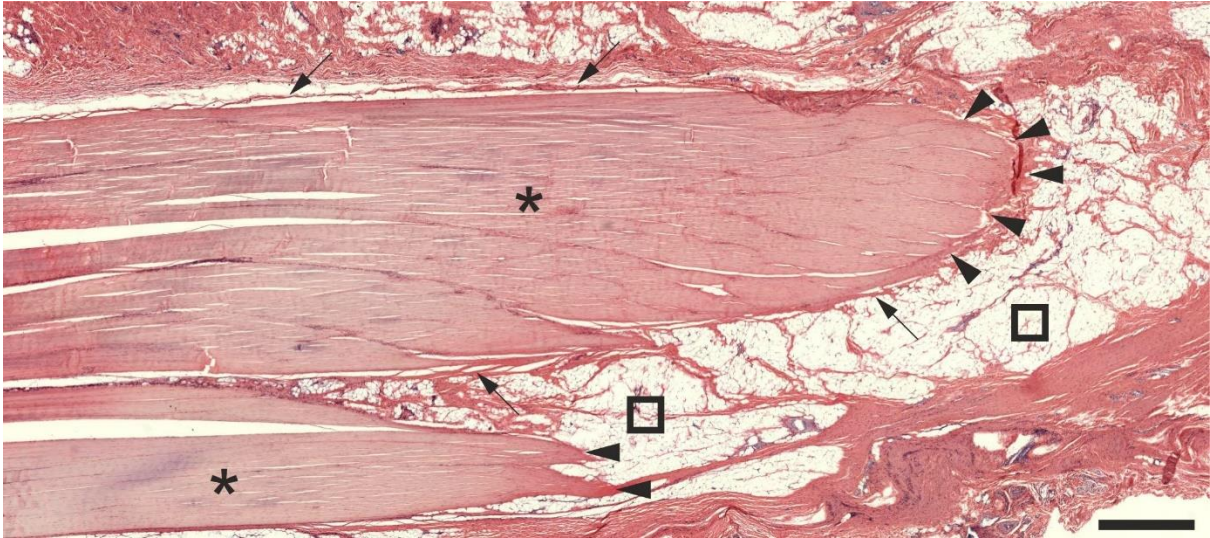
Im gesamten Kapitel 3.2 werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

- **W4:** Vier Wochen nach operativer Erzeugung eines Sehnteildefekts der rechten gemeinsamen Calcaneusehne durch Ausstanzen eines Lochs mit 3 Millimeter Durchmesser in der Mittelsubstanz der Gastrocnemiussehne.
- **W12:** 12 Wochen nach operativer Erzeugung eines Sehnteildefekts der rechten gemeinsamen Calcaneusehne durch Ausstanzen eines Lochs mit 3 Millimeter Durchmesser in der Mittelsubstanz der Gastrocnemiussehne.
- **STD/B:** operative Erzeugung eines Sehnteildefekts der rechten gemeinsamen Calcaneusehne, gefolgt von Behandlung mit Injektion von autologen ADRCs.
- **STD/SB:** operative Erzeugung eines Sehnteildefekts der rechten gemeinsamen Calcaneusehne, gefolgt von Scheinbehandlung mit Injektion von Ringer-Laktat-Lösung.
- **ØSTD/ØB:** keine operative Erzeugung eines Sehnteildefekts der rechten gemeinsamen Calcaneusehne; keine Behandlung.
- **ØSTD/ØSB:** keine operative Erzeugung eines Sehnteildefekts der rechten gemeinsamen Calcaneusehne; keine Scheinbehandlung.

Darüber hinaus sind (wenn nicht anders angegeben) alle quantitativen Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen von Versuch 2 zeigt Abbildung 3.17 einen Ausschnitt aus einem 5  $\mu$ m dicken Sagittalschnitt der gemeinsamen Calcaneusehne eines linken Hinterlaufs ( $\emptyset$ STD/ $\emptyset$ B) eines Kaninchens in der in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppe 1. Wichtig ist dabei, dass ein "Sehnenstumpf" in den Abbildungen 3.18 bis 3.20, 3.22 und 3.23 sowie 3.25 bis 3.27 nicht automatisch mit einem operativ erzeugten Sehnteildefekt der gemeinsamen Calcaneusehne gleichgesetzt werden darf. Vielmehr war es durch die Schnittführung durchaus möglich, dass die Sehne im gezeigten Bildausschnitt einfach die Schnittebene verließ, ohne dass sich daraus irgendeine Konsequenz für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergab.





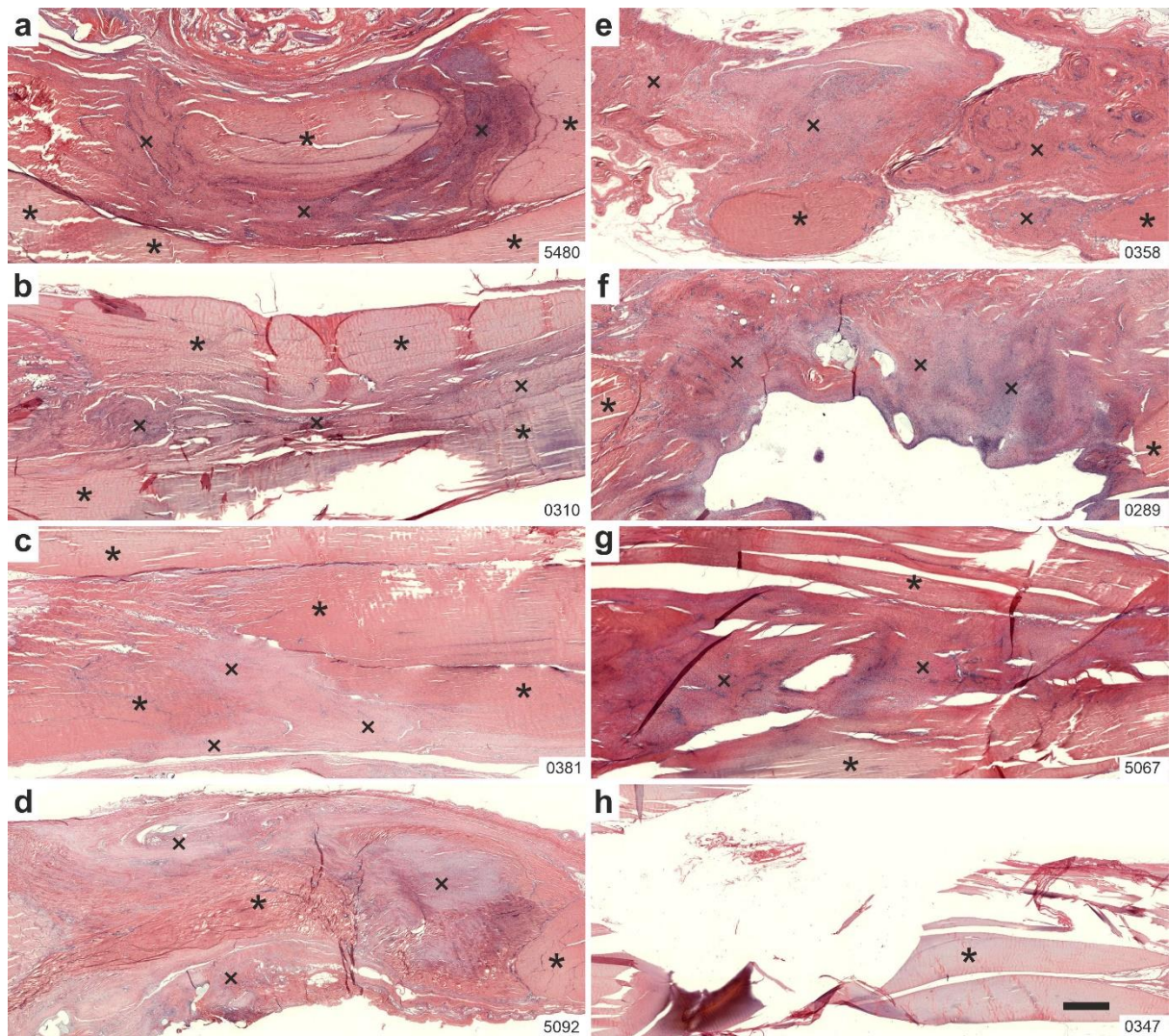
**Abbildung 3.17:** Repräsentative Mikrofotografie eines sagittalen, 5  $\mu\text{m}$  dicken Schnittes (gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin) der gemeinsamen Calcaneussehne eines linken Hinterlaufs ( $\emptyset\text{STD}/\emptyset\text{B}$ ) eines Kaninchens in der in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppe 1. Die Sternchen kennzeichnen Sehngewebe, die Pfeile das Peritenon, die Pfeilspitzen diejenigen Stellen, an denen die Sehne im gezeigten Bildausschnitt die Schnittebene verlässt, und die Rechtecke Fettgewebe neben der Sehne. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

### 3.2.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

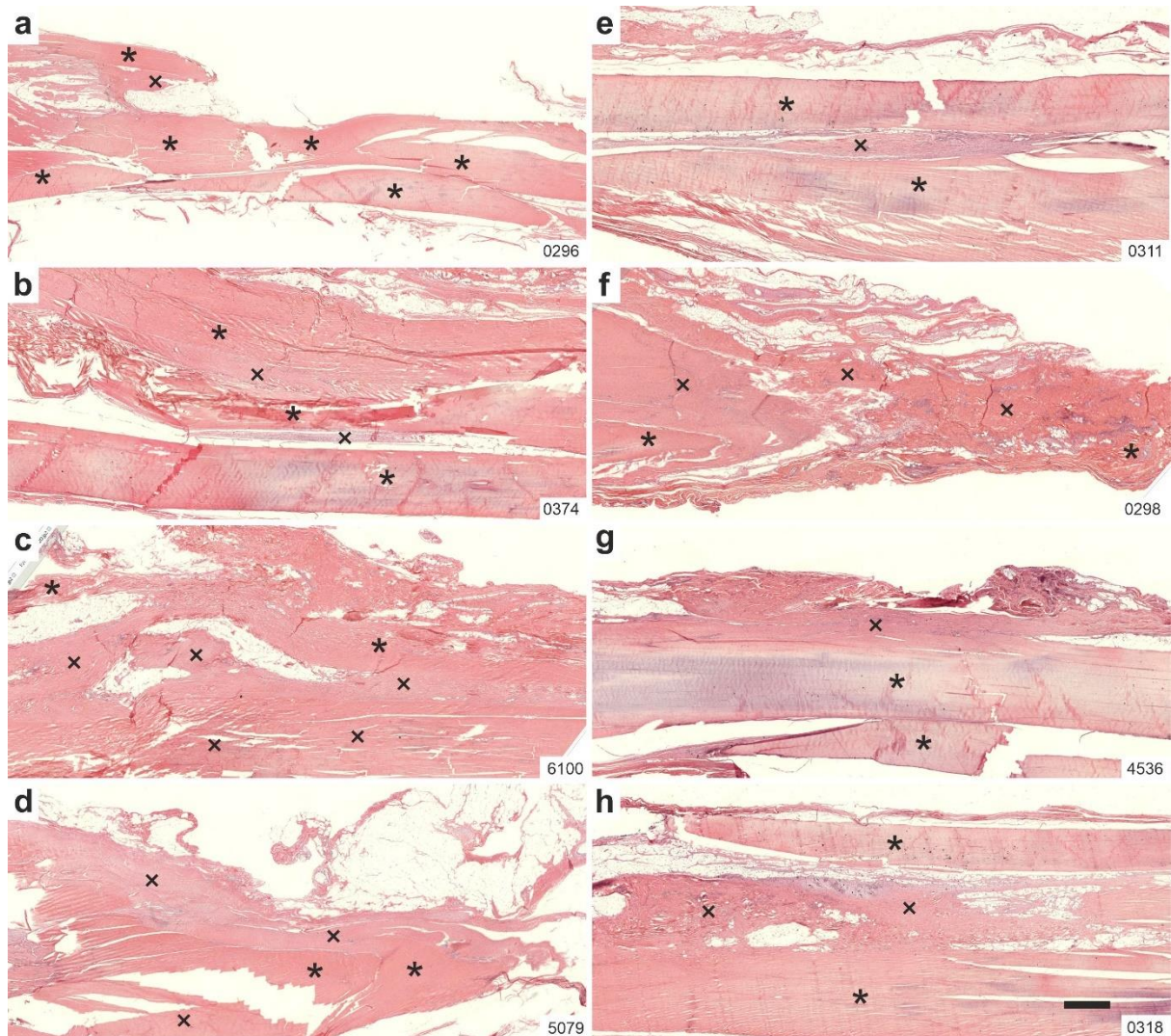
Die Abbildungen 3.18 und 3.19 zeigen repräsentative Mikrofotografien mit niedrigem Abbildungsmaßstab der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe aller Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (Abbildung 3.18a-d), 3 (W4/STD/SB) (Abbildung 3.18e-h), 2 (W12/STD/B) (Abbildung 3.19a-d) und 4 (W12/STD/SB) (Abbildung 3.19e-h). Vier Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs (Gruppe 1) fand sich neu gebildetes Bindegewebe, das die Lücken zwischen den Stümpfen der ursprünglichen Sehne vollständig ausfüllte und sich homogen in die Längsstruktur der Sehne einfügte (Abbildung 3.18a-d). Im Gegensatz dazu fand sich vier Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung (Gruppe 3) neu gebildetes Bindegewebe, das die Lücken zwischen den Stümpfen der ursprünglichen Sehne nicht vollständig ausfüllte und nicht homogen in die Längsstruktur der Sehne eingebunden war (Abbildung 3.18e-h). Zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs (Gruppe 2) war es schwierig, zwischen dem ursprünglichen Sehnengewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe zu unterscheiden; beide Gewebe standen in engem Kontakt zueinander (Abbildung 3.19a-d). Dies war zwölf Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung (Gruppe 4) nicht der Fall, wo es viel einfacher war, zwischen dem ursprünglichen Sehnengewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe zu unterscheiden (Abbildung 3.19e-h).

Abbildung 3.20 zeigt repräsentative Mikrofotografien mit höherem Abbildungsmaßstab der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe aller Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a,b), 2 (W12/STD/B) (c,d), 3 (W4/STD/SB) (e,f) und 4 (W12/STD/SB) (g,h). Sowohl vier als auch zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs fand sich ein enger Kontakt zwischen dem ursprünglichen Sehnengewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe, ohne dass sich an der Grenze zwischen diesen beiden Geweben Blutgefäße bildeten (Abbildung 3.20a-d). Im Gegensatz dazu fanden sich vier Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung Blutgefäße an der Grenze zwischen dem ursprünglichen Sehnengewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe (Abbildung 3.20e,f), sowie zwölf Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung Fettgewebe an der Grenze zwischen dem ursprünglichen Sehnengewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe (Abbildung 3.20g,h), ohne dass es zu engem Kontakt zwischen den letztgenannten Geweben kam.

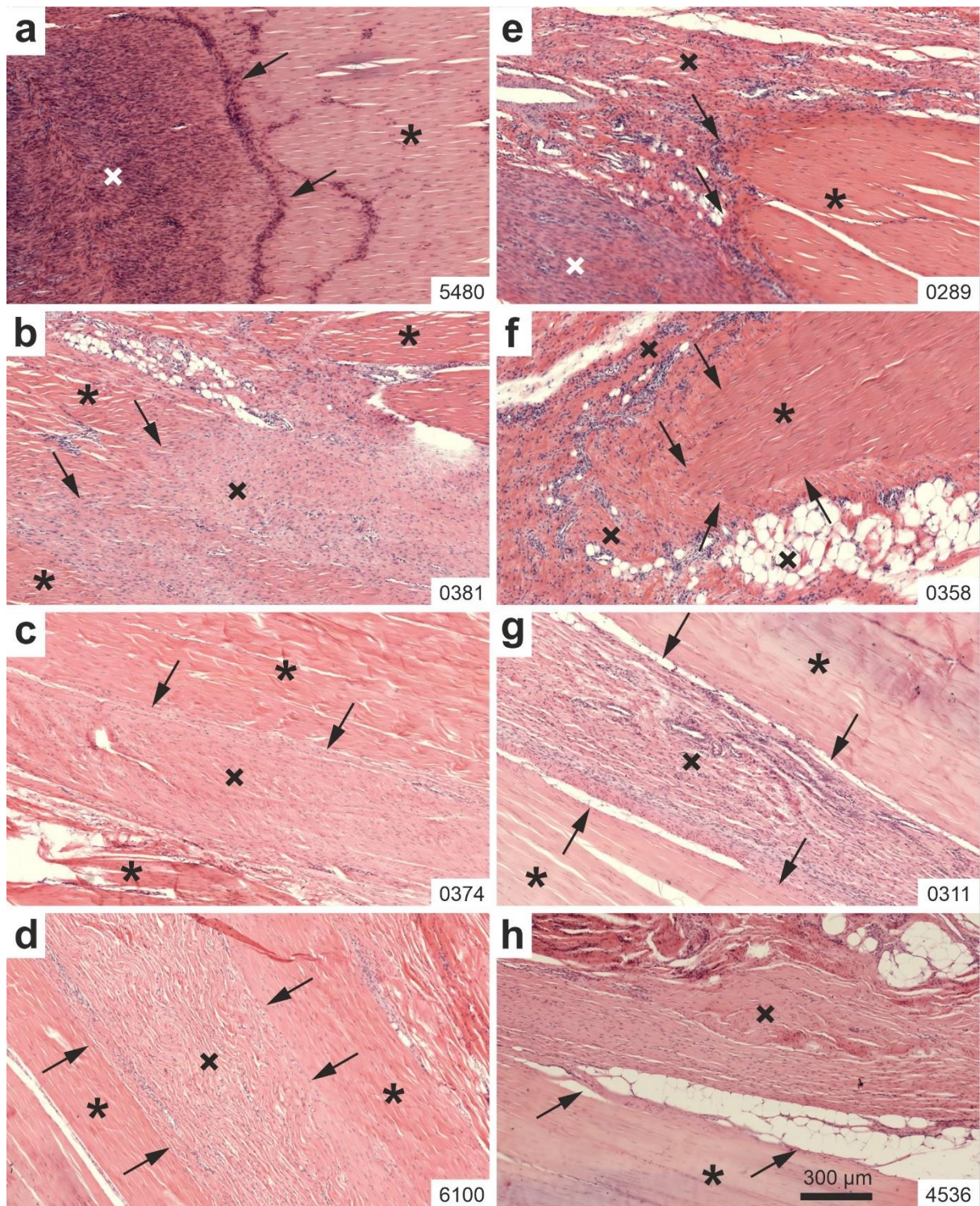
Darüber hinaus ähnelte nach der Behandlung mit autologen ADRCs die Ausrichtung der Zellen und der extrazellulären Matrix im neu gebildeten Bindegewebe der Ausrichtung der Zellen und der extrazellulären Matrix im ursprünglichen Sehnengewebe. Im Gegensatz dazu zeigte das neu gebildete Bindegewebe nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung keine klare Ausrichtung der Zellen und der extrazellulären Matrix.



**Abbildung 3.18:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin) der gemeinsamen Calcaneuse Sehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a-d) und 3 (W4/STD/SB) (e-h). Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe, und die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 1 mm in a-l.



**Abbildung 3.19:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin) der gemeinsamen Calcaneusesehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 2 (W12/STD/B) (a-d) und 4 (W12/STD/SB). Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe, und die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 1 mm in a-l.



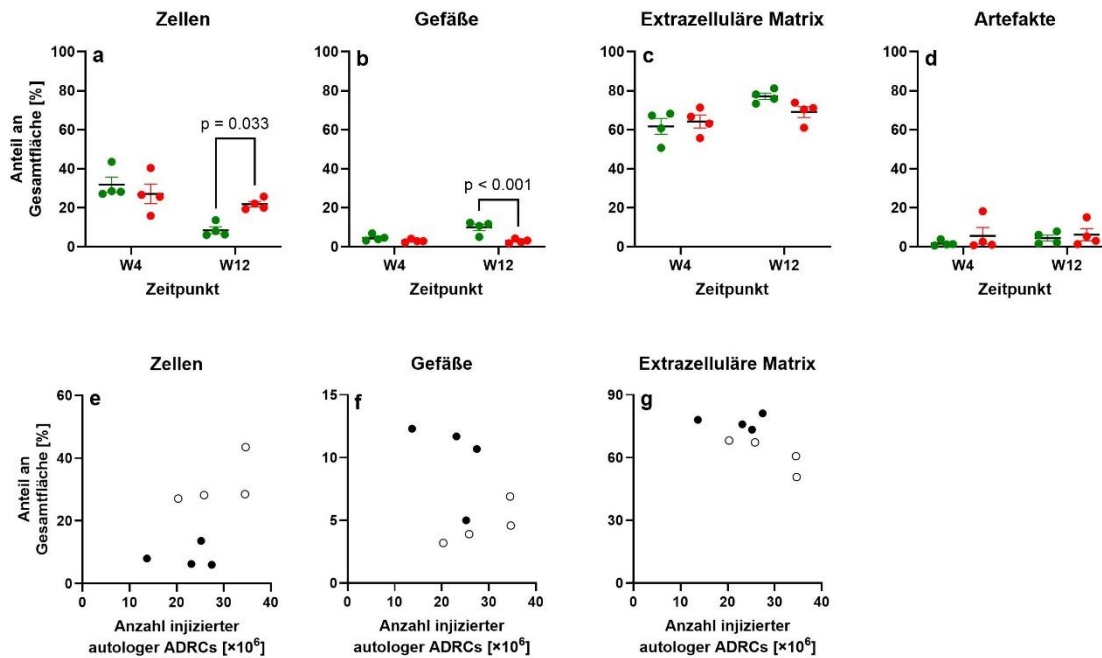
**Abbildung 3.20:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin) der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe von Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a,b), 2 (W12/STD/B) (c,d), 3 (W4/STD/SB) (e,f) und 4 (W12/STD/SB) (g,h). Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe, die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe, und die Pfeile die Grenze zwischen dem ursprünglichen Sehngewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 300 µm in a-l.

### 3.2.3 Ergebnisse der stereologischen Untersuchung

Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse der stereologischen Untersuchung des neu gebildeten Bindegewebes in den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe aller Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B), 2 (W12/STD/B), 3 (W4/STD/SB) und 4 (W12/STD/SB); die Ergebnisse (P-Werte) der statistischen Analyse dieser Daten sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Vier Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs bzw. Scheinbehandlung mit Ringer-Laktatlösung fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern. Im Gegensatz dazu fand sich zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs ein statistisch signifikant kleinerer relativer Flächenanteil von Zellen sowie ein statistisch signifikant größerer relativer Flächenanteil von Gefäßen im neu gebildeten Bindegewebe als zwölf Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktatlösung (Abbildung 3.21a,b).

Weder vier Wochen noch zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs fand sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den relativen Flächenanteilen von Zellen, Gefäßen und extrazellulärer Matrix im neu gebildeten Bindegewebe und der Anzahl der injizierten autologen ADRCs (Abbildung 3.21e-g).



**Abbildung 3.21:** Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und individuelle Werte der relativen Flächenanteile [%] von Zellen (a), Gefäßen (b), extrazellulärer Matrix (c) und Artefakten (d) im neu gebildeten Bindegewebe (Kreuze in den Abbildungen 3.18-3.20) in mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (grüne Punkte bei W4), 2 (W12/STD/B) (grüne Punkte bei W12), 3 (W4/STD/SB) (rote Punkte bei W4) und 4 (W12/STD/SB) (rote Punkte bei W12), sowie individuelle Werte der relativen Flächenanteile [%] von Zellen (e), Gefäßen (f) und extrazellulärer Matrix (g) als Funktion der Anzahl injizierter autologer ADRCs in denselben Schnitten der Kaninchen in den Gruppen 1 (W4/STD/B) (weiße Punkte) und 2 (W12/STD/B) (schwarze Punkte). Ergebnisse der Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests mit  $p < 0,05$  sind in den Diagrammen angegeben.

**Table 3.5:** P-Werte der statistischen Analyse der in Abbildung 3.21 gezeigten Ergebnisse der stereologischen Untersuchung. P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

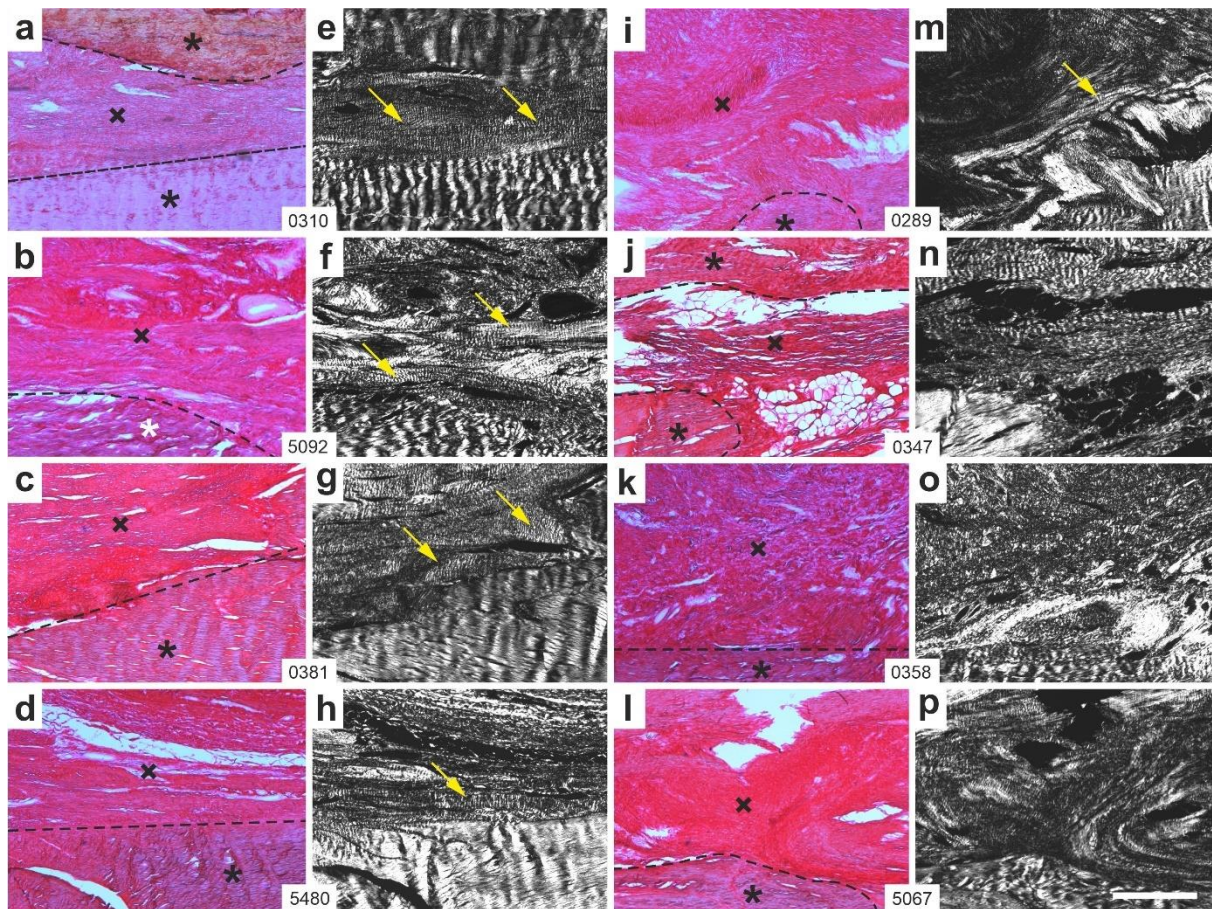
<b>P<sub>zweifaktorielle Varianzanalyse</sub></b>	<b>Behandlung</b>	<b>Zeit</b>	<b>Behandlung × Zeit</b>
Zellen	0,228	<b>0,001</b>	<b>0,021</b>
Gefäße	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,019</b>
Extrazelluläre Matrix	0,385	<b>0,006</b>	0,122
Artefakte	0,324	0,567	0,705
<b>P<sub>Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests (STD/B vs. STD/SB)</sub></b>		<b>W4</b>	<b>W12</b>
Zellen		0,691	<b>0,033</b>
Gefäße		0,534	<b>&lt; 0,001</b>
Extrazelluläre Matrix		> 0,999	0,178
Artefakte		0,673	> 0,999



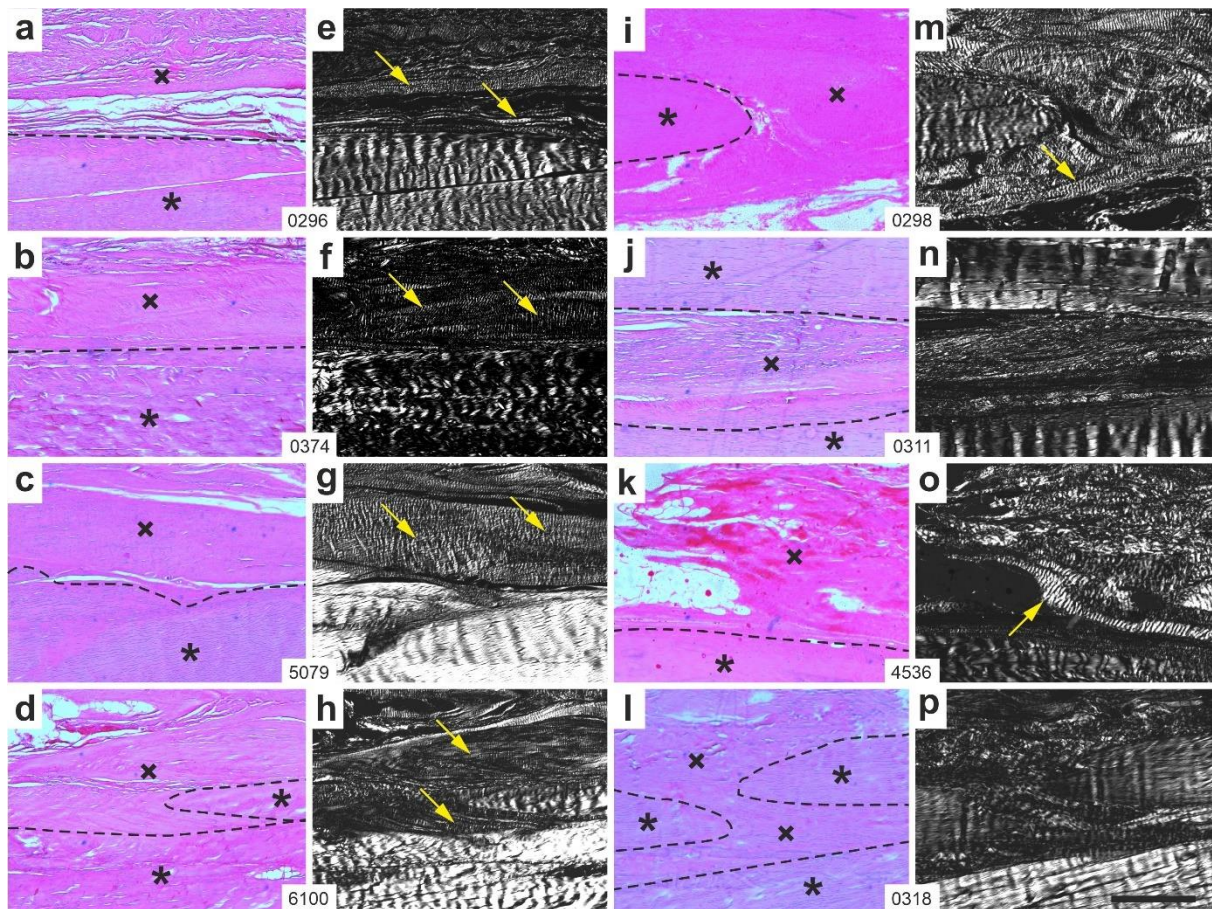
### 3.2.4 Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen

Die Abbildungen 3.22 und 3.23 zeigen repräsentative polarisationsmikroskopische Mikrofotografien (sowie lichtmikroskopische Mikrofotografien derselben Bildausschnitte bei gleichem Abbildungsmaßstab) der mit Picrosirius-Rot gefärbten Schnitte der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe aller Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (Abbildung 3.21a-h), 3 (W4/STD/SB) (Abbildung 3.21i-p), 2 (W12/STD/B) (Abbildung 3.22a-h) und 4 (W12/STD/SB) (Abbildung 3.22i-p). Sowohl vier als auch zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs fand sich bei allen untersuchten Kaninchen neu gebildetes, organisiertes, festes Bindegewebe mit erkennbarer Kräuselanordnung ("crimp") (Abbildung 3.22e-h und Abbildung 3.23e-h). Dagegen fand sich neu gebildetes, organisiertes, festes Bindegewebe mit erkennbarer Kräuselanordnung ("crimp") nur bei einem von vier untersuchten Kaninchen vier Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung, und nur bei zwei von vier untersuchten Kaninchen zwölf Wochen nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung.

Insgesamt war die Bildung von neu gebildetem, organisiertem, festem Bindegewebe mit erkennbarer Kräuselanordnung ("crimp") nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung deutlich weniger ausgeprägt als nach Behandlung mit autologen ADRCs.



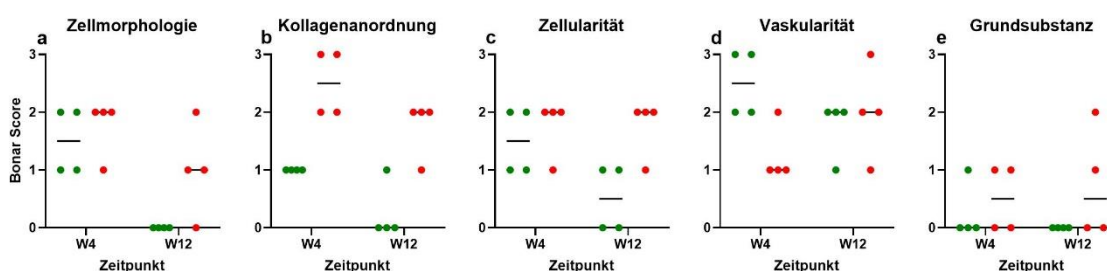
**Abbildung 3.22:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (gefärbt mit Picosirius-Rot) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a-h) und 3 (W4/STD/SB) (i-p). Die gezeigten Bildausschnitte wurden jeweils mit Lichtmikroskopie (a-d und i-l) und anschließend mit Polarisationsmikroskopie (e-h und m-p) fotografiert. Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe, die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe, die gestrichelten Linien die Grenze zwischen dem ursprünglichen Sehngewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe, und die gelben Pfeile organisiertes, festes Bindegewebe mit erkennbarer Kräuselanordnung ("crimp") innerhalb des neu gebildeten Bindegewebes. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils unten zwischen den beiden Bildausschnitten desselben Kaninchens angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 500 µm in a-p.



**Abbildung 3.23:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (gefärbt mit Picosirius-Rot) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 2 (W12/STD/B) (a-h) und 4 (W12/STD/SB) (i-p). Die gezeigten Bildausschnitte wurden jeweils mit Lichtmikroskopie (a-d und i-l) und anschließend mit Polarisationsmikroskopie (e-h und m-p) fotografiert. Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe, die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe, die gestrichelten Linien die Grenze zwischen dem ursprünglichen Sehngewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe, und die gelben Pfeile organisiertes, festes Bindegewebe mit erkennbarer Kräuselanordnung ("crimp") innerhalb des neu gebildeten Bindegewebes. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils unten zwischen den beiden Bildausschnitten desselben Kaninchens angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 500 µm in a-p.

### 3.2.5 Ergebnisse der Evaluation des Bonar Scores

Die mittleren Bonar Scores für das neu gebildete Bindegewebe in den Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen von Kaninchen (Abbildung 3.24 und Tabelle 3.6).



**Abbildung 3.24:** Median und individuelle Werte der Bonar Scores in den Kategorien "Zellmorphologie" (a), "Kollagenanordnung" (b), "Zellularität" (c), "Vaskularität" (d) und "Grundsubstanz" (e) für das neu gebildete Bindegewebe (Kreuze in den Abbildungen 3.18-3.20) in mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten (alle Kategorien bis auf "Kollagenanordnung") bzw. mit Pikrosirius-Rot gefärbten Schnitten (Kategorie "Kollagenanordnung") der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (grüne Punkte bei W4), 2 (W12/STD/B) (grüne Punkte bei W12), 3 (W4/STD/SB) (rote Punkte bei W4) und 4 (W12/STD/SB) (rote Punkte bei W12).

**Tabelle 3.6:** P-Werte der statistischen Analyse der in Abbildung 3.24 gezeigten Ergebnisse der Evaluation des Bonar Scores mittels Mann-Whitney Test (jeweils STD/B im Vergleich zu STD/SB).

Zellmorphologie		Kollagen-Anordnung		Zellularität		Vaskularität		Grundsubstanz	
W4	W12	W4	W12	W4	W12	W4	W12	W4	W12
0,486	0,143	0,086	0,086	>0,999	0,086	0,086	>0,999	0,429	0,143

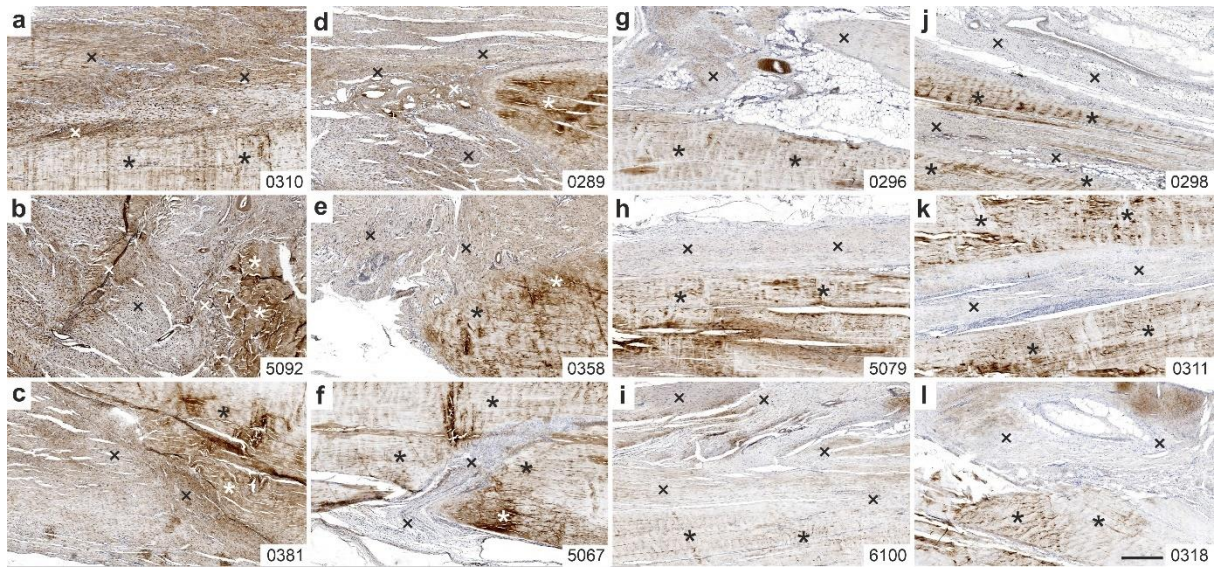
### 3.2.6 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Abbildungen 3.25 bis 3.27 zeigen repräsentative Mikrofotografien des immunhistochemischen Nachweises von Prokollagen I (Abbildung 3.25), Kollagen Typ III (Abbildung 3.26) und CD 163 (Abbildung 3.27) in Schnitten der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 bis 4.

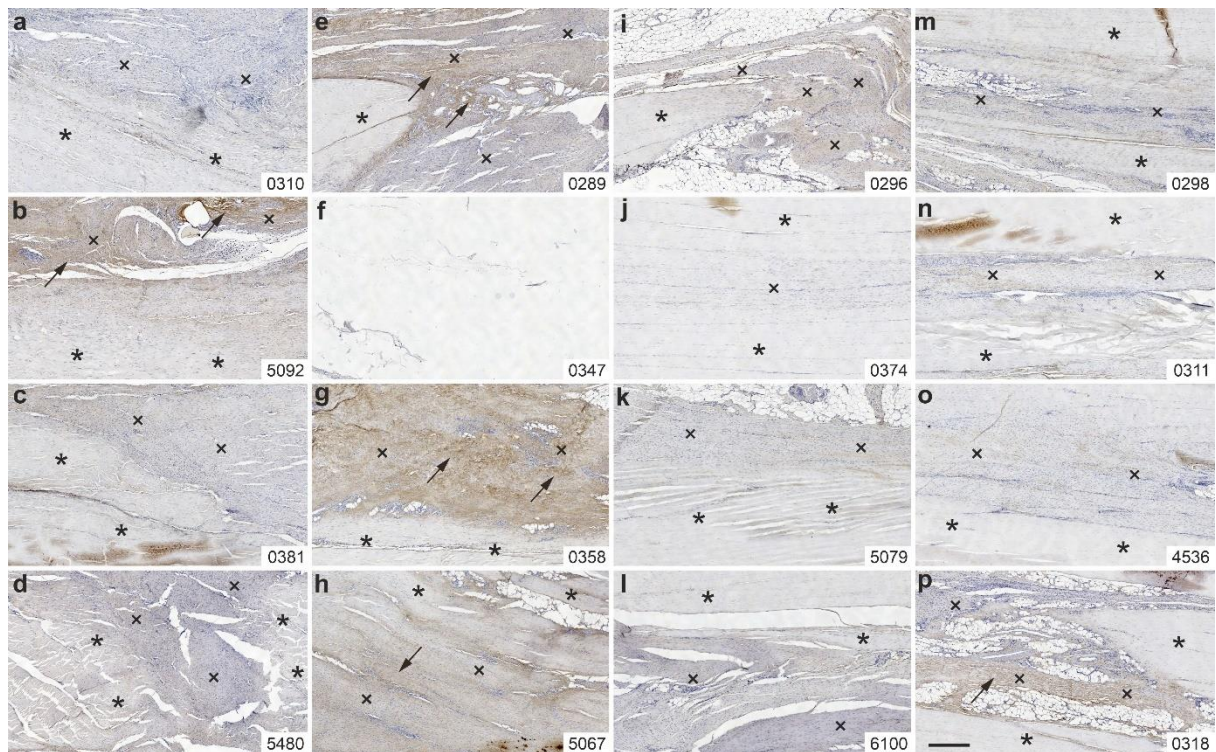
Alle untersuchten Kaninchen der Gruppe 1 (W4/STD/B) zeigten eine starke, extrazelluläre Immunmarkierung für Prokollagen Typ I im neu gebildeten Bindegewebe (Abbildung 3.25a-c). Zwei der drei untersuchten Kaninchen in Gruppe 3 (W4/STD/SB) zeigten ebenfalls eine extrazelluläre Immunmarkierung für Prokollagen I im neu gebildetem Bindegewebe, jedoch deutlich diskreter als die Kaninchen in Gruppe 1 (Abbildung 3.25d,e); ein Kaninchen in Gruppe 3 zeigte nahezu keine Immunmarkierung für Prokollagen I im neu gebildeten Bindegewebe (Abbildung 3.25f). Darüber hinaus zeigten alle untersuchten Kaninchen der Gruppe 2 (W12/STD/B) eine extrazelluläre Immunmarkierung für Prokollagen I im neu gebildeten Bindegewebe (Abbildung 3.25g-i), wenn auch weniger ausgeprägt als die Kaninchen der Gruppe 1. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Kaninchen der Gruppe 4 (W12/STD/SB) nahezu keine Immunmarkierung für Prokollagen I im neu gebildeten Bindegewebe (Abbildung 3.25j-l).

Ein Kaninchen in Gruppe 1 (Abbildung 3.26b) und drei Kaninchen in Gruppe 3 (Abbildung 3.26e,g,h) zeigten eine Immunmarkierung für Kollagen Typ III in neu gebildetem Bindegewebe (der Schnitt von Kaninchen 0347, der für den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ III verwendet wurde, zeigte kein ursprüngliches Sehngewebe und kein neu gebildetes Bindegewebe und konnte daher nicht beurteilt werden). Darüber hinaus zeigte ein Kaninchen in Gruppe 4 eine diskrete Immunmarkierung für Typ-III-Kollagen im neu gebildetem Bindegewebe (Abbildung 3.26p); die anderen Kaninchen in Gruppe 4 sowie alle Tiere in Gruppe 2 zeigten keine Immunmarkierung für Typ-III-Kollagen (Abbildung 3.26i-o).

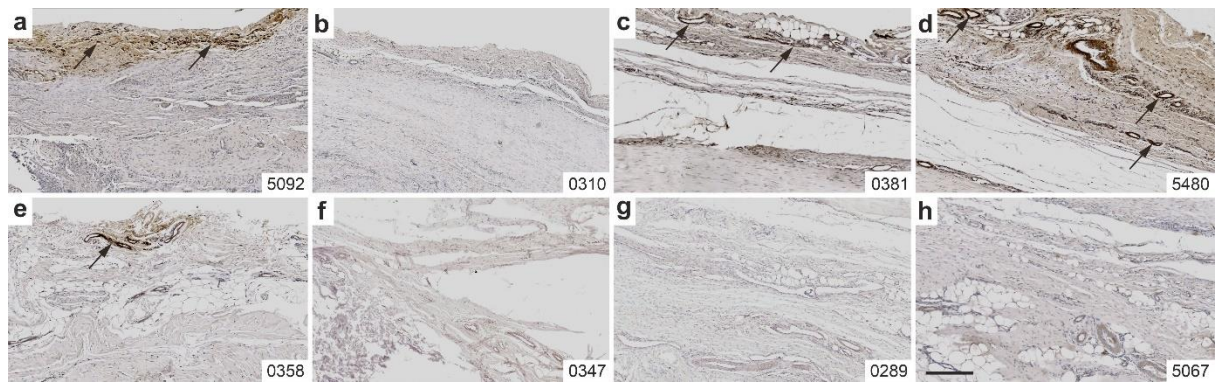
Eine Immunmarkierung für CD 163 wurde im Paratenon der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe von drei Kaninchen in Gruppe 1 (Abbildung 3.27a,c,d) und in geringerem Ausmaß bei einem Kaninchen in Gruppe 3 (Abbildung 3.27e) gefunden. Die Immunmarkierung für CD 163 war eng mit Blutgefäßen assoziiert. Die Kaninchen in den Gruppen 2 und 4 zeigten keine Immunmarkierung für CD 163 im Paratenon der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe (in Abbildung 3.27 nicht gezeigt).



**Abbildung 3.25:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (mit immunhistochemischem Nachweis von Prokollagen I und Gegenfärbung mit Hämatoxylin) der gemeinsamen Calcaneusesehne der rechten Hinterläufe von Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a-c), 3 (W4/STD/SB) (d-f), 2 (W12/STD/B) (g-i) und 4 (W12/STD/SB) (j-l). Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe und die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 500 µm in a-l.



**Abbildung 3.26:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (mit immunhistochemischem Nachweis von Kollagen Typ III und Gegenfärbung mit Hämatoxylin) der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe von Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a-d), 3 (W4/STD/SB) (e-h), 2 (W12/STD/B) (i-l) und 4 (W12/STD/SB) (m-p). Die Sternchen kennzeichnen ursprüngliches Sehngewebe, die Kreuze neu gebildetes Bindegewebe, und die Pfeile den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ III in neu gebildetem Bindegewebe. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (l) entspricht 500 µm in a-l.



**Abbildung 3.27:** Repräsentative Mikrofotografien von sagittalen, 5 µm dicken Sagittalschnitten (mit immunhistochemischem Nachweis von CD 163 und Gegenfärbung mit Hämatoxylin) der gemeinsamen Calcaneusehne der rechten Hinterläufe von Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 1 (W4/STD/B) (a-d) und 3 (W4/STD/SB) (e-h). Die Pfeile kennzeichnen den immunhistochemischen Nachweis von CD 163 im Paratenon in unmittelbarer Nachbarschaft zu Gefäßen. Die Nummern der Kaninchen sind jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Der Maßstabsbalken in (h) entspricht 300 µm in a-h.

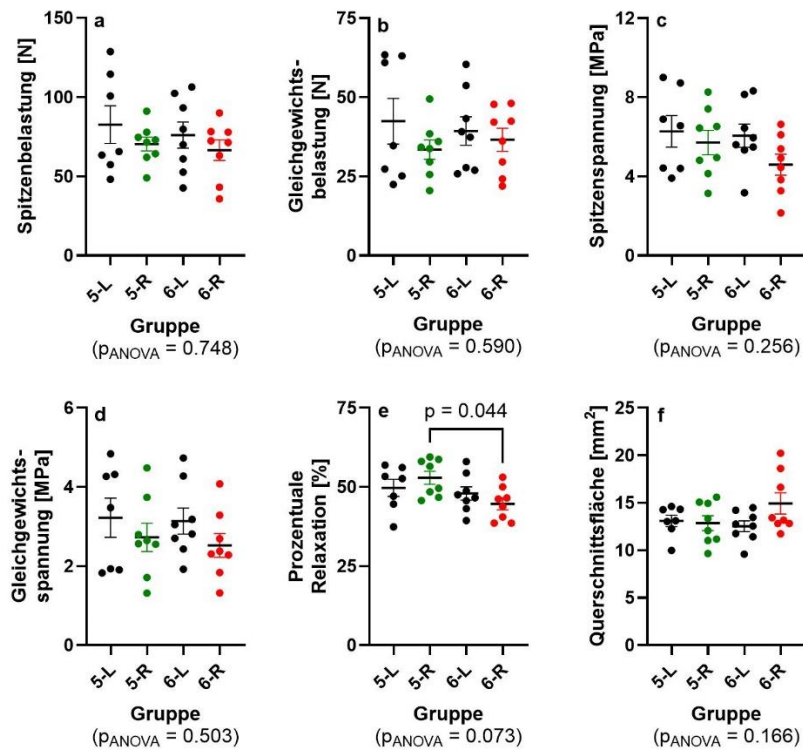


### 3.2.7 Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen

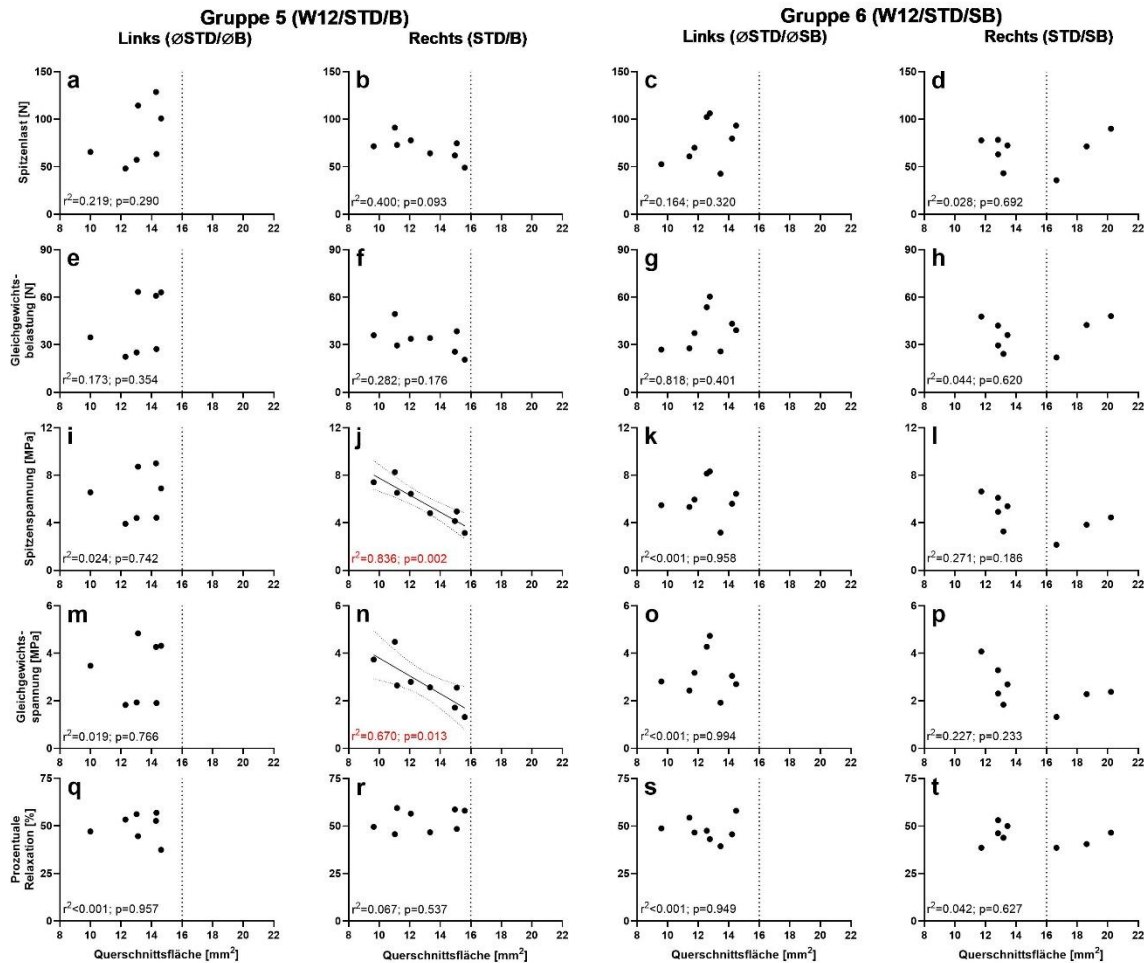
Die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen sind in den Abbildungen 3.28 bis 3.30 zusammengefasst.

Beim Vergleich der rechten Calcaneussehne der Kaninchen in der in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppe 5 (W12/STD/B) mit der rechten Calcaneussehne der Kaninchen in Gruppe 6 (W12/STD/SB) zeigte sich eine statistisch signifikant größere prozentuale Relaxation nach Behandlung mit autologen ADRCs als mit Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung (Abbildung 3.28e). Darüber hinaus zeigte sich nach Behandlung mit autologen ADRCs, nicht aber nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung, eine statistisch signifikant negative Korrelation zwischen der Spitzenspannung sowie der Gleichgewichtsspannung und der Querschnittsfläche der rechten Calcaneussehne (Abbildung 3.29j,n).

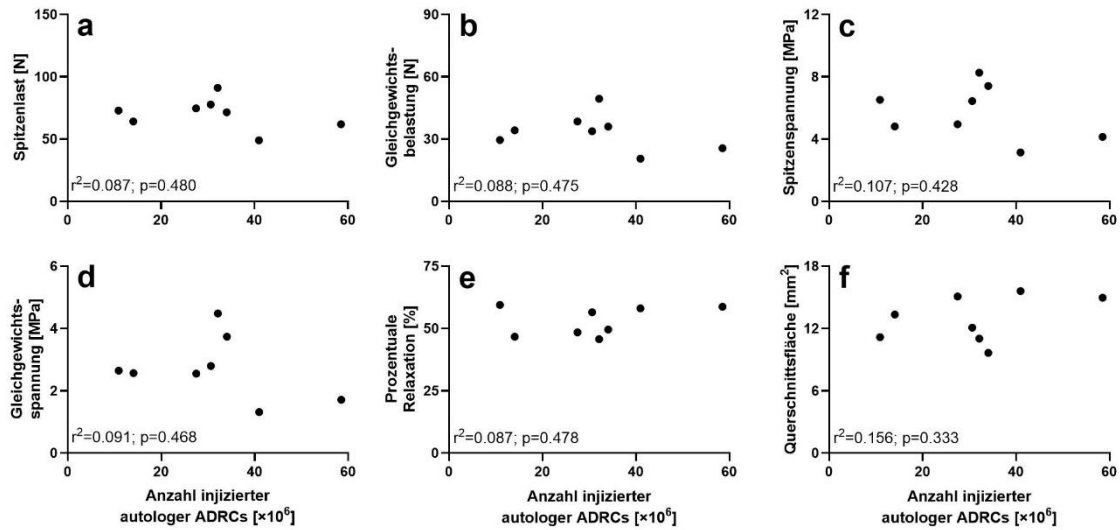
Die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen waren unabhängig von der Anzahl der injizierten autologen ADRCs (Abbildung 3.30a.f).



**Abbildung 3.28:** Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und individuelle Werte von Spitzenbelastung (a), Gleichgewichtsbelastung (b), Spitzenspannung (c), Gleichgewichtsspannung (d) und prozentualer Relaxation (e) bei der biomechanischen Analyse sowie der Querschnittsfläche (f) der gemeinsamen Calcaneussehne der linken Hinterläufe ("L"; ØSTD/ØB bzw. ØSTD/ØSB; schwarze Punkte) und der rechten Hinterläufe ("R"; STD/B (grüne Punkte) bzw. STD/SB" (rote Punkte)) der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 5 (W12/STD/B) und 6 (W12/STD/SB). Die P-Werte der einfaktorier Varianzanalyse sind jeweils unter den Diagrammen angegeben; das Ergebnis eines Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests mit  $p < 0,05$  ist in (e) gezeigt.



**Abbildung 3.29:** Individuelle Werte von Spitzenbelastung (a-d), Gleichgewichtsbelastung (e-h), Spitzenspannung (i-l), Gleichgewichtsspannung (m-p) und prozentualer Relaxation (q-t) bei der biomechanischen Analyse der gemeinsamen Calcaneussehne der linken Hinterläufe ("Links"; ØSTD/ØB bzw. ØSTD/ØSB; a,c,e,g,i,k,m,o,q,s) und der rechten Hinterläufe ("Rechts"; STD/B bzw. STD/SB; b,d,f,h,j,l,n,p,r,t) der Kaninchen in den in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppen 5 (W12/STD/B; a,b,e,f,i,j,m,n,q,r) und 6 (W12/STD/SB; c,d,g,h,k,l,o,p,s,t) als Funktion der Querschnittsfläche der jeweiligen gemeinsamen Calcaneussehne. Die Ergebnisse der Regressionsanalysen ( $r^2$  und P-Wert) sind jeweils in der rechten unteren Ecke der Diagramme angegeben; Regressionsgeraden mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung sind in (j) und (n) jeweils mit dem zugehörigen 95%-Konfidenzintervall gezeigt. Die gepunkteten vertikalen Linien trennen jeweils den Bereich von Querschnittsflächen  $< 16\text{mm}^2$  vom Bereich von Querschnittsflächen  $> 16\text{mm}^2$ .



**Abbildung 3.30:** Individuelle Werte von Spitzenbelastung (a), Gleichgewichtsbelastung (b), Spitzenspannung (c), Gleichgewichtsspannung (d) und prozentualer Relaxation (e) bei der biomechanischen Analyse sowie der Querschnittsfläche (f) der gemeinsamen Calcaneussehne der rechten Hinterläufe der Kaninchen in der in Abbildung 2.9 erläuterten Gruppe 5 (W12/STD/B) als Funktion der Anzahl injizierter autologer ADRCs.

### 3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch 2

In der gemeinsamen Beurteilung aller erhobenen Befunde von Versuch 2 unterschied sich das neu gebildete Bindegewebe im Defektbereich nach operativer Erzeugung eines Sehnenteildefekts der gemeinsamen Calcaneusehne durch Ausstanzen eines Lochs mit 3 Millimeter Durchmesser in der Mittelsubstanz der Gastrocnemiussehne der rechten Hinterläufe der untersuchten Kaninchen nach Behandlung mit autologen ADRCs qualitativ und quantitativ deutlich gegenüber der Situation nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung. Insgesamt zeigten sich nach Behandlung mit autologen ADRCs deutliche Anzeichen für die Bildung von funktionell hochwertigem neuen Sehngewebe, und nach Scheinbehandlung mit Ringer-Laktat-Lösung deutliche Anzeichen für die Bildung von funktionell minderwertigerem Narbengewebe.

Somit musste die Hypothese für Versuch 2 (autologe, lokal an den Sehnendefekt applizierte ADRCs verbessern die Regeneration des partiellen Sehnendefekts) nicht verworfen werden.

## Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche geben umfassenden Einblick in die Regeneration von Sehnenpartialdefekten jeweils mittels allogener und autologer Regenerativzellsuspensionen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen nun verschiedene Schlussfolgerungen zu.

### 4.1 Fehlende Regeneration von Sehnenteildefekten nach Injektion von allogenen ADRCs

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von Versuch I, der Behandlung eines experimentell induzierten Sehnenteildefekts mittels allogener ADRCs, fielen keine wesentlichen Unterschiede in den nicht-histologischen Untersuchungen zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe auf. Weder in den makroskopischen Parametern noch bei der Analyse der MRT-Befunde fanden sich statistisch signifikante Unterschiede. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich in der stereologischen Analyse hinsichtlich der relativen Zellzahl und des relativen Anteils von Extrazellulärmatrix im neu gebildeten Gewebe. In der Darstellung der histologischen Schnitte fiel auf, dass das neu gebildete Bindegewebe in den Schnitten der mittels Ringer-Laktat-Lösung behandelten Kaninchen fester und organisierter erschien als das neu gebildete Gewebe der mit allogenen ADRCs behandelten Kaninchen. Dies lässt darauf schließen, dass die Intervention mit allogenen ADRCs einen auf die Geweberegeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe kontraproduktiven Einfluss hatte.

Bislang wurden nach dem Kenntnisstand unserer Forschungsgruppe lediglich drei grundlagenwissenschaftliche Studien publiziert, welche die Wirkung von allogenen ADRCs auf die Sehnenheilung untersuchten. Zwei Studien von Befahr (112, 113) untersuchten die Wirkung allogener ADRCs bei der Augmentation einer Sehnennaht nach experimenteller Erzeugung einer vollständigen Sehnenruptur in Kaninchen und konnten teilweise signifikant verbesserte biomechanische Eigenschaften im Vergleich zu Kontrollgruppen nachweisen. In (113) wurde zudem die allogene-ADRC-Gruppe mit einer Gruppe von Kaninchen verglichen, welche allogene, aus Knochenmark gewonnene, kultivierte, mesenchymalen Stammzellen (BM-MSCs) an die Sehnennaht injiziert bekamen. Im direkten Vergleich mit den Kaninchen in der allogene-BM-MSC-Gruppe in (113) zeigte die allogene-ADRC-Gruppe in (113) teilweise ebenfalls signifikante Vorteile. In beiden Studien (112, 113) wurden jedoch lediglich biomechanische Untersuchungen durchgeführt; histologische oder immunhistochemische Methoden wurden nicht angewandt. In (114) wurde ebenfalls in einem Kaninchenmodell die Augmentation der Einheilung einer Vorderen Kreuzband (VKB)-Plastik mittels Semitendinosus-Sehnen-Graft am Knochen-Sehnen-Übergang durch allogene ADRCs untersucht. Im längerfristigen Zeitverlauf (> zwei Wochen) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der allogene-ADRC-Gruppe und der Kontrollgruppe gefunden; die in (114) publizierten Bilder der histologischen Schnitte sind jedoch nicht zur ausreichenden Evaluation des Regenerationsvorgangs geeignet.

Auch in klinischen Studien, welche den Einfluss von allogenen, aus Fettgewebe gewonnenen, kultivierten Stammzellen (allogene ADSCs) auf die Sehnenheilung untersuchen, wurden bislang keine überzeugenden Ergebnisse publiziert. In (115) wurde zwar ein positiver langfristiger Effekt

von allogenen ADSCs ohne schwerwiegende Nebenwirkungen beschrieben, jedoch kann ein therapeutischer Nutzen bei fehlender Kontrollgruppe in (115) nicht beurteilt werden. Eine weitere klinische Studie beschrieb nach Injektion von allogenen ADSCs mit Fibrinkleber als „scaffold“ bei Partialrupturen der Rotatorenmanschette unter sonografischer Kontrolle keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Schmerzsituation im Vergleich zur Kontrolle mittels Kochsalz-Injektion (116). Im Gegensatz dazu lieferte eine vergleichbare Studie mit Injektion autologer ADRCs ohne Fibrinkleber bei gleicher Indikation einen signifikanten Vorteil, sogar im Vergleich mit der bisherigen Standard-Therapie (Injektion von Kortikosteroid) (61,62) und nicht lediglich mit einer Placebo-Intervention wie Kochsalz-Injektion (wie in (116)).

Der Misserfolg von allogenen Stammzellprodukten lässt sich eigentlich recht einfach erklären. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, exprimieren undifferenzierte Stammzellen MHC-I-Oberflächenproteine, die auf den sogenannten HLA (human leucocyte antigen)-Genen kodiert sind und mit Hilfe deren das Immunsystem Organismus-eigene und Organismus-fremde Zellen erkennen kann (für weitergehende Informationen vgl. z.B. (117)). Im Verlauf der Differenzierung von Stammzellen werden zudem MHC-II-Proteine exprimiert, welche eine ähnliche Funktion wie die MHC-I-Proteine besitzen und die Immunogenität zusätzlich erhöhen (12). Aus der langjährigen Erfahrung mit allogenen Stammzelltransplantationen bei Leukämie-PatientInnen und mit Transplantationen von soliden Organen sind die Probleme bei Transplantation HLA-Inkompatibilität schon lange bekannt. Das körpereigene Immunsystem des Transplantatempfängers („Host“) induziert eine Immun- und somit Abstoßungsreaktion gegen das körperfremde Transplantat („Graft“); die genauen Mechanismen sind in (13) beschrieben. Einige WissenschaftlerInnen waren der Hoffnung, dass dieser Mechanismus bei allogenen transplantierten Stammzellen nur gering ausgeprägt sei. Zudem wurde argumentiert, dass Stammzellen gewisse trophische Faktoren produzieren, welche dann gewebständige Stammzellen im Empfängergewebe stimulieren (50). Dieser Wirkmechanismus der allogenen Stammzellen könnte auch die einzelnen positiven Ergebnisse der oben genannten Studien erklären. Die Motivation hinter der Transplantation allogener Stammzellprodukte steckte bisher in der vergleichsweise einfachen Gewinnung von Stammzellen von wenigen Spendern, welche zentral in großem Stil aufbereitet werden und anschließend in vielfachem Umfang transplantiert werden können. Mittlerweile wurde jedoch auch bei wiederholt allogenen transplantierten, mesenchymalen Stammzellen eine Abstoßungsreaktion nachgewiesen (118). Dies und die (in Kenntnis der immunologischen Physiologie von Stammzellen wohl logischerweise) erfolglosen grundlagenwissenschaftlichen und klinischen Studien mit allogenen Stammzellen ließen mittlerweile jedoch Projekte dieser Art scheitern.

In der Zusammenschau mit der in der Literatur vorliegenden Evidenz lassen sich die Ergebnisse von Versuch 1 der vorliegenden Arbeit nach Injektion von allogenen ADRCs am ehesten als immunologische Abstoßungsreaktion werten, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem schlechteren histologischem Gewebebild führte. Somit lässt sich schließen, dass allogene ADRC-Präparate der Gewebeheilung nicht förderlich sind.

### 4.2 Regeneration von Sehnengewebe mit autologen ADRCs

In Versuch II wurden autologe ADRCs an den Ort der Läsion eines experimentell erzeugten Sehnenteildefekts injiziert und anschließend die Regenerationsvorgänge mittels verschiedener

Methoden beurteilt. Während in den makroskopischen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit autologen ADRCs behandelten Kaninchen und den mit RLL behandelten Kaninchen gefunden wurden, traten bei den weiteren Untersuchungen entscheidende Differenzen zwischen den beiden Gruppen auf. Die Ergebnisse legen nahe, dass nach Behandlung mit autologen ADRCs eine Gewebeheilung des Sehnenteildefekts ohne wesentliche Bildung von Narbengewebe stattfand, während nach Scheinbehandlung mit RLL narbentypisches Gewebe gefunden wurde. Dies verdeutlichte insbesondere der immunhistochemische Nachweis von verstärkter Expression von Prokollagen I vier und zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL, sowie die verringerte Expression von Kollagen Typ III vier Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL. Zudem zeigte sich das für das Sehngewebe charakteristische „crimp pattern“ in der Polarisationsmikroskopie bereits nach vier Wochen bei allen Kaninchen nach Behandlung mit autologen ADRCs, aber lediglich bei der Hälfte der Kaninchen auch nach 12 Wochen nach Scheinbehandlung mit RLL.

#### Die Bedeutung von Kollagen im Sehngewebe

Im physiologischen Zustand beträgt der Anteil von Kollagen Typ I ca. 95 % am gesamten Kollagen-Gehalt des Sehngewebes. Nur zu vernachlässigenden Anteilen enthält die Extrazellulärmatrix von Sehnen physiologisch auch andere Formen von Kollagen, insbesondere Kollagen Typ III (119). Prokollagen Typ I wird nach ribosomaler Expression außerhalb der Zelle enzymatisch in seine reguläre molekulare Struktur dreisträngig und seilartig verarbeitet. Diese dreisträngigen Kollagenmoleküle ordnen und bilden sich im Anschluss selbst zu länglichen, dünneren Kollagenfibrillen aus, welche sich untereinander in der Extrazellulärmatrix des Sehngewebes quervernetzen. Die Quervernetzung der Kollagenfibrillen ist essenziell für die biomechanischen Eigenschaften und die Kraftübertragung im Sehngewebe (120-122). Für Kollagen Typ III hingegen ist eine höhere Härte und eine geringere Festigkeit charakteristisch, wodurch diese Art von Kollagen durch geringere Flexibilität in nur geringem Maße für die biomechanische Kraftübertragung geeignet ist (123, 124). Während der physiologischen Regeneration von Sehngewebe wird anfangs Kollagen Typ III exprimiert und nach und nach durch stabileres Kollagen Typ I ersetzt. Im Vergleich zu unversehrtem Sehngewebe führt jedoch der höhere Gehalt von Kollagen Typ III zu einer geringeren Quervernetzung der Kollagen Typ I Fasern, die für die biomechanischen Eigenschaften der Sehne relevant ist (125). Am Ende können bis zu 30 % des Gesamtkollagens in narbig verändertem Sehngewebe aus Kollagen Typ III bestehen (126). In den Ergebnissen der Immunhistochemie in Versuch II fiel insbesondere vier Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL eine Erhöhung der Expression von Prokollagen Typ I und eine Verringerung der Expression von Kollagen Typ III in den untersuchten Sehnen auf. Dies lässt darauf schließen, dass der in (125) beschriebene Mechanismus durch die autologen ADRCs verändert wurde: es wurde folglich zu Beginn in mit autologen ADRCs behandeltem Sehngewebe nicht vermehrt Kollagen Typ III exprimiert, sondern bereits zu Beginn Kollagen Typ I. Dadurch fand aller Wahrscheinlichkeit nach auch eine verbesserte Quervernetzung statt, was sich in dem bereits nach vier Wochen erkennbaren „crimp pattern“ in der Polarisationsmikroskopie nach Behandlung mit autologen ADRCs zeigte. Obwohl der genaue Wirkmechanismus hierfür nicht geklärt ist, gibt es Hinweise, dass dafür der direkte zelluläre Kontakt zwischen Stammzellen und gewebständigen Zellen verantwortlich ist (127). Die



Anregung der Stammzellen durch axiale Zugbelastungen würde wohl diesen Effekt nicht erklären, da durch diese mechanische Stimulation die Expression sowohl von Prokollagen I als auch Kollagen Typ III angeregt wird (128). Beide Mechanismen werden genauer im Abschnitt zu den biomolekularen Wirkmechanismen der ADRCs beleuchtet.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Immunhistochemie fiel zudem die starke Expression von CD 163 nach Behandlung mit autologen ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL auf. CD 163 ist ein Zellmarker für M2-Makrophagen (129). Dieser Befund deutete auf einen höheren Gehalt von M2-Makrophagen im Paratenon des neu gebildeten Sehngewebes nach Behandlung mit autologen ADRCs hin. Die biomolekularen Hintergründe zu diesem Befund werden im Abschnitt „Die Rolle der ‚Begleitzellen‘ in autologen ADRCs“ diskutiert.

Ein wichtiger Aspekt in der Betrachtung der histologischen Schnitte von Versuch II war die Ausbildung eines nahtlosen Übergangs zwischen dem neu gebildeten Bindegewebe und dem altem Sehngewebe nach Behandlung mit autologen ADRCs. Dies impliziert eine direkte Interaktion zwischen den Stammzellen und den gewebeständigen Zellen, welche zu einem homogenen Zustand des Sehngewebes nach der Schädigung führte und möglicherweise zur vollen biomechanischen Funktionsfähigkeit beitrug. Nach Scheinbehandlung mit RLL wurde stattdessen eine Grenzschicht aus Blutgefäßen und Fettgewebe gefunden, welche einen Bruch zwischen dem altem Sehngewebe und dem neu gebildeten Bindegewebe darstellte und somit das Gewebe deutlich inhomogener erscheinen ließ. Es ist nicht auszuschließen, dass durch diese zelluläre Barriere die mechanische Belastbarkeit der Sehne beeinträchtigt wurde.

Die Ergebnisse der stereologischen Analyse unterstützen die Hypothese einer narbenarmen, den physiologischen Sehnenzustand annähernden Sehnenregeneration nach Behandlung von Sehnteildefekten mit autologen ADRCs. Besonders auffällig war der signifikant verringerte mittlere relative Anteil von Zellen im neu gebildeten Bindegewebe zwölf Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL, sowie der starke Abfall der mittleren Zellzahl in dem neu gebildeten Bindegewebe zwischen Woche 4 und Woche 12 (-73%) nach Behandlung mit autologen ADRCs, der nach Scheinbehandlung mit RLL in nur geringem Umfang (-20 %) gefunden wurde. Diesbezüglich sind zwei Punkte von Relevanz: Einerseits zeichnet sich normalerweise das narbig veränderte Sehngewebe nach Sehnen Schaden durch eine höhere Zellularität (128) sowie einen Anstieg der Gewebezellularität im Regenerationsverlauf (104) aus. Andererseits zeigte sich in einer kürzlich veröffentlichten Studie zur postnatalen Sehnenentstehung von Mäusen ein Höhepunkt der Genexpression von Skleraxis, Mohawk, Kollagen Typ IA1 und Tenomodulin am vierten postnatalen Tag, gefolgt von einem erheblichen Rückgang der mittleren relativen Anzahl an Zellen im Sehngewebe zwischen dem 14. und 28. Tag der postnatalen Sehnenentwicklung (130). Es scheint also so zu sein, dass in Versuch II der vorliegenden Arbeit durch die autologen ADRCs ein Regenerationsvorgang gestartet wurde, der bezogen auf die Zellzahl den Charakter der frühen postnatalen Sehnenentstehung aufwies. Die Tatsache, dass dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit erst verzögert (zwischen Woche 4 und Woche 12) und nicht wie postnatal zwischen Woche 2 und Woche 4 stattfand, könnte sich durch die nicht vergleichbaren Bedingungen in der Gewebeumgebung erklären (Gewebeschaden vs. natives Gewebe, ggf. inflammatorische Prozesse, etc.).

In der stereologischen Analyse fiel zudem ein signifikant erhöhter mittlerer Anteil von Gefäßen 12 Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL auf. Normalerweise treten in physiologischem, nicht geschädigtem Sehngewebe kaum Gefäße bzw. Kapillaren auf; in geschädigtem, narbig verändertem Sehngewebe ist der Gefäß- bzw. Kapillaranteil jedoch erhöht (104). Dies könnte sich durch einen erhöhten Stoffwechselbedarf des neu entstehenden Gewebes erklären, wobei in Versuch II der vorliegenden Arbeit nach Behandlung mit autologen ADRCs die Gewebeheilung auch zu dem späteren Zeitpunkt (12 Wochen nach Behandlung) noch nicht vollständig abschlossen war und die Kapillargefäße nur unvollständig zurückgebildet waren. Nicht gänzlich auszuschließen ist auch die Möglichkeit, dass bei der Regeneration von Sehngewebe nach Behandlung mit ADRCs eine Art hybrides Gewebe mit histologischen Eigenschaften von sowohl gesundem als auch narbig verändertem Sehngewebe entsteht. Für die genauere Untersuchung dieser Frage sind in Zukunft Studien notwendig, welche die Sehnenregeneration histologisch und stereologisch über einen längeren Zeitraum als zwölf Wochen untersuchen.

Die ermittelten mittleren Bonar Score-Grade zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlung mit autologen ADRCs und der Scheinbehandlung mit RLL. Dies ist mutmaßlich in einer geringen möglichen Spannweite der Ergebnisse (Bonar Score-Grade 0-3) begründet. Dennoch waren in dieser Analyse gewisse Tendenzen erkennbar. So zeigte sich 12 Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs für die Kategorie *Zellmorphologie* durchgehend ein Bonar Score-Grad 0, was der Zellmorphologie von Tenozyten im gesunden Sehngewebe entspricht, während nach Scheinbehandlung mit RLL höhere Bonar Score-Grade erreicht wurden. Auch in der Kategorie *Kollagenanordnung* fanden sich 4 und 12 Wochen nach Behandlung mit ADRCs jeweils geringere mittlere Bonar Score-Grade im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL, was darauf hindeutet, dass durch die autologen ADRCs eher eine physiologische Anordnung der Kollagenfasern im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL erreicht wurde. Dies unterstützt wiederum die im Abschnitt „Die Bedeutung von Kollagen im Sehngewebe“ beschriebene Wirkung der autologen ADRCs auf die Kollagenexpression bei der Sehnenregeneration. In der Bonar Score Kategorie *Zellularität* wurden 12 Wochen nach Behandlung mit autologen ADRCs Werte von maximal 1 und insgesamt geringere Werte im Vergleich zur Scheinbehandlung mit RLL erzielt, was in Einklang mit den Ergebnissen der Stereologie steht. Die Bonar Score Kategorien *Vaskularität* und *Grundsubstanz* zeigten keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Behandlung mit autologen ADRCs und der Scheinbehandlung mit RLL.

In der biomechanischen Analyse fand sich eine bemerkenswerte, statistisch signifikante, negative Korrelation jeweils zwischen der Spitzenspannung und der Gleichgewichtsspannung der gemeinsamen Gastrocnemiussehne nach Behandlung mit autologen ADRCs. Aus den Messungen der prozentualen Relaxation ging hervor, dass die mit autologen ADRCs behandelten Sehnen eine signifikant erhöhte mittlere Elastizität im Vergleich zu den mit RLL scheinbehandelten Sehnen besaßen. Dies deutet auf eine homogene Zusammensetzung des Gewebes mit Eigenschaften von neu gebildetem Sehngewebe hin und stützt die Hypothese, dass durch die autologen ADRCs eine der postnatalen Sehnenentwicklung ähnliche Regeneration der Sehne induziert wurde.

### 4.3 Biomolekulare Wirkmechanismen von autologen ADRCs bei der Sehnenregeneration

Bei der erfolgreichen Regeneration von Sehnenteildéfekten mit autologen ADRCs scheinen verschiedene biomolekulare Mechanismen zusammenspielen. In der Literatur wurden bislang einige Mechanismen beschrieben, welche mutmaßlich zu dem Heilungserfolg beitragen. Zentraler Bestandteil dabei ist, dass die regenerativen Zellen ausschließlich durch Interaktion mit den Umgebungsfaktoren ihre Wirkung entfalten. Im Folgenden werden die bisher publizierten Interaktionsmechanismen genauer beschrieben.

#### Intuitive Differenzierungsmuster der Stammzellen im Sehnengewebe

Ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der Interaktion zwischen lokalem Sehnengewebe und Stammzellen ist die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Durch diese Kommunikation werden wechselseitige Effekte erzielt, die die Sehnenregeneration unterstützen. In (131) konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen durch intensive Zell-Zell-Kontakte und Austausch von Vesikeln mit Tenozyten *in vitro* tenogene Proteinexpressionsmuster entwickeln. Diese Zell-Zell-Kontakte und der vesikuläre Austausch wurden ebenfalls zwischen menschlichen ADSCs und MDA-MB-231-Zellen (einer kommerziell erhältlichen menschlichen Brustkrebszelllinie) *in vitro* nachgewiesen (45). Zudem gibt es Evidenz dafür, dass nicht nur die ADSCs an sich, sondern auch andere Zellen in unvollständig differenzierten Stadien mit den ortsständigen Zellen kommunizieren. So wurde in (132) gezeigt, dass Zell-Zell-Verbindungen zwischen endothelialen Vorläuferzellen und Herzmuskelzellen durch sogenannte „Nanoröhren“ zur Kommunikation existieren. Eine weitere Studie untersuchte die synergistische Proliferation und Kollagen-Expression von humanen Tenozyten und humanen ADSCs *in vitro* (133). In dieser Studie traten bei direkter Co-Kultur synergistische Effekte mit verstärkter Expression und Proliferation beider Zelltypen auf, während sich bei indirekter Co-Kultur keine Synergismen fanden (133). Ähnliche Ergebnisse wurden in (127) präsentiert: durch direkte Co-Kultur zwischen menschlichen ADSCs und menschlichen Tenozyten wurde eine verstärkte mRNA-Expression sowie folgende Protein-Expression von Kollagen Typ I und verminderte mRNA- und Proteinexpression von Kollagen Typ III induziert; bei separater Kultur konnten die Effekte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der genannten Studien unterstreichen die Bedeutung des direkten zellulären Kontaktes zwischen den Stammzellen und den Tenozyten zur Anregung der Tenogenese. Dieser synergistische Effekt von gegenseitiger Anregung zwischen Stammzellen und differenzierten Zellen stellt aller Wahrscheinlichkeit nach einen Schlüsselmechanismus für die Wirksamkeit der stammzellbasierten Therapien dar. Allerdings es gibt Hinweise darauf, dass nicht nur die zelluläre Kommunikation die Sehnenregeneration mittels Stammzellen beeinflusst. Die biomechanischen Kräfte, welche für Sehnengewebe typisch sind, stellen ebenfalls einen Stimulus für die Stammzellen dar. Dies wurde in einer anderen Studie gezeigt, bei der menschliche ADSCs auf 3D-Kollagen-Scaffolds verkapselt und anschließend verschiedenen axialen Zugbelastungen ausgesetzt wurden (128). Dabei wurde im Anschluss eine erhöhte Genexpression von Tenascin, Skleraxis, Tenomodulin, runX2, Decorin, Aggrecan, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III festgestellt (128). Wiederum in einer anderen Studie wurden menschliche ADSCs mit mechanischer Zugstimulation unter Verwendung eines pneumatischen Mikrokammergeräts exponiert; *in vitro* zeigten die ADSCs eine erhöhte

Proliferation sowie eine veränderte Genexpression (134). In (135) wurde gezeigt, dass nach der Aussaat menschlicher ADSCs auf ein 3D-Kollagen-Scaffold, das mit einer aus der extrazellulären Matrix von Sehnen extrahierten Fraktion angereichert war, axiale Zugkräfte eine verstärkte Proliferation und Differenzierung in die tenozytäre Linie auslösten.

Die Stimulation von Stammzellen durch mechanische Zugkräfte läuft offenbar sehr zielgenau ab, da keine Differenzierung in Zelltypen stattfindet, die physiologischerweise nicht im behandelten Gewebe vorkommen. In (135) wurde eine Verhinderung der osteogenen Differenzierung festgestellt, und in (128) wurde keine erhöhte Expression von Genen, die mit der osteogenen, chondrogenen und myogenen Differenzierung zusammenhängen, nachgewiesen. Dass nach Injektion von autologen ADRCs zur Behandlung von Sehnenlängendefekten weder in der vorliegenden Arbeit noch in dem bereits zitierten Fallbeispiel (93) und in klinischen Studien (61, 62) eine Formation von ektoem Knorpel- oder Knochengewebe auftrat, kann auch durch die in (136) präsentierten Ergebnisse erklärt werden. In dieser Studie wurden aus einer kultivierten Mauslinie gewonnene ADSCs mit Tenomodulin konditional überexprimiert, wodurch eine erhöhte Genexpression in Richtung tenogener Differenzierung (Tenomodulin, Skleraxis, Tenascin-C, Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Kollagen Typ IV) sowie eine verringerte Genexpression in Richtung osteogener und chondrogener Differenzierung (alkalischer Phosphatase, Runx2, Osteocalcin, Sox9, Typ-II-Kollagen und Aggrecan) resultierten (136). Dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass sich die aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen ausschließlich in Zellen der tenogenen Zelllinie differenzieren, da die ADSCs auch über die Fähigkeit verfügen, sich in andere Zelltypen zu differenzieren, die für die Sehnenregeneration notwendig sind. In diesem Zusammenhang untersuchte eine Studie (137) das in-vitro-Verhalten von ADSCs nach Aufbringen auf ein spezielles, sehnenähnliches Scaffold (Hyalonect-Mesh) und der anschließenden Exposition mit mechanischen Zugbelastungen. Dabei bildeten die ADSCs ein Kapillarnetz innerhalb des Scaffold aus (137).

Einen weiteren bedeutenden Aspekt für die Wirkung von ADRCs stellt die Fähigkeit von Stammzellen dar, sich fortzubewegen und zum Ort des größten Bedarfs zu migrieren. In diesem Zusammenhang entscheidend wurde in einer Studie gezeigt, dass bei der Positionierung einer dezellularisierten menschlichen Sehne, die mit menschlichen, kultivierten, aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen besiedelt war, neben einer dezellularisierten menschlichen Sehne, die nicht mit ADSCs besiedelt war, die ADSCs in vitro von der mit ADSCs besiedelten Sehne in die dezellularisierte Sehne migrierten (138). In der weiter oben erwähnten Studie (133) wurde ebenfalls die Migrationsfähigkeit von ADSCs demonstriert; außerdem wurde gezeigt, dass die verwendeten Stammzellen die Tenozyten zur Migration anregten. Die hier aufgeführten Wirkungsmechanismen, die in in-vitro-Studien erforscht wurden, werden in zwei weiteren Studien in vivo bestätigt: sowohl in (139) als auch in (140) wurde jeweils in einem Sehnenlängendefektmodell im Tierversuch die Differenzierung und Integration kultivierter ADSCs nach Injektion an den Gewebeschaden nachgewiesen.

### Die Rolle der „Begleitzellen“ in autologen ADRCs

Im unmittelbaren Umfeld von Sehnenrissen der Rotatorenmanschette beim Menschen wurde ein entzündliches biochemisches Gewebeumfeld mit assoziiert verstärkter Proteinexpression von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gefunden (141, 142). Möchte man Sehnenrisse mit autologen Stammzellen behandeln, so trifft man auf das folgende Problem: Die Exposition von ADSCs mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führt zu einer verminderten Expression des tenogenen Transkriptionsfaktors Scleraxis (143). Skleraxis spielt eine entscheidende Rolle bei der tenozytären Proliferation, Ausbreitung neu gebildeter Tenozyten sowie der Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix (144). Folglich würden ADSCs in einem entzündlichen Umfeld einen geringeren Heilungserfolg erzielen. Dies unterstreicht eine Studie, bei der durch Exposition von postnatalen Sehnenzellen mit IL-1 $\beta$  eine verminderte anabole Aktivität, die zu abnormaler Organisation und Ablagerungen der Extrazellulärmatrix führte, und eine erhöhte katabole Aktivität, die durch proinflammatorische Signale unter anderem den Abbau der Extrazellulärmatrix vermittelte, festgestellt wurde (145). Die ADSCs können zwar nicht die IL-1 $\beta$ -induzierte Hochregulierung von pro-inflammatorischen Faktoren und Matrixabbauaktoren in kultivierten Sehnenfibroblasten direkt verhindern, sie verfügen jedoch über die Fähigkeit, M1-Makrophagen in M2-Makrophagen zu transformieren (146). Grundsätzlich wirken M1-Makrophagen eher proinflammatorisch, während M2-Makrophagen die Immunantwort tendenziell herunterregulieren und somit antiinflammatorisch und heilungsfördernd wirken; zudem interagieren sie miteinander (147).

Neben mesenchymalen Stammzellen sind auch Tenozyten in der Lage, M1-Makrophagen in M2-Makrophagen zu transformieren (148). In einem in-vivo-Sehnendefektmodell führte die Applikation von ADSCs zu einer erhöhten Expression von M2-Makrophagen-assoziierten Genen und einer verringerten Expression von M1-Makrophagen-assoziierten Genen (149). Dieser Effekt scheint allerdings für die optimale stammzellvermittelte Sehnenheilung nicht ausreichend zu sein. In zwei verschiedenen Studien, die die Sehnenheilung in vivo mit kultivierten, autologen ADSCs ohne weitere Zellarten untersuchten, konnte kein verbesserter Heilungseffekt festgestellt werden (150, 151).

Im Gegensatz zu kultivierten Stammzellprodukten enthalten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, nicht kultivierten, aus Fettgewebe gewonnenen autologen ADRCs auch M2-Makrophagen (152), welche durch einen Kultivierungsprozess verloren gehen würden. Dies lässt darauf schließen, dass in Versuch II der vorliegenden Arbeit die in den autologen ADRCs enthaltenen M2-Makrophagen maßgeblich zum Erfolg der Therapie beigetragen haben. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von (153); in dieser Studie wurde eine Sehnenheilung mit verbesserten mechanischen Eigenschaften, reduzierter Entzündung und früherer Angiogenese bei der Kombinationstherapie von mesenchymalen Stammzellen zusammen mit M2-Makrophagen im Vergleich zur Sehnenregeneration mit den mesenchymalen Stammzellen alleine nachgewiesen. Auch in zwei Studien von Lu et al. (154, 155) führte die Applikation von autologen ADRCs in einem Kaninchen-Sehnendefekt-Modell zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften und erhöhter Expression von Kollagen 1, BMP 2 und einem erhöhten Verhältnis zwischen Kollagen Typ I und Kollagen Typ III.

Neben den eigentlichen Stammzellen und M2-Makrophagen sind in ADRCs noch weitere Arten von Zellen vorhanden. Dazu gehören unter anderem Endothelzellen, endotheliale

Vorläuferzellen, Perizyten, Leukozyten und Lymphozyten (152). Zwar gibt es Hinweise, dass auch andere Vorläuferzellen mit dem umliegenden, differenzierten Gewebe kommunizieren können (132), jedoch ist leider für diese Zelltypen zum aktuellen Zeitpunkt keine ausreichende Evidenz für etwaige Einflüsse auf Regenerationsprozesse bei Sehnen vorhanden. Aufgrund der Überlegenheit von ADRCs im Vergleich zu kultivierten Stammzellen (150, 151) scheinen die weiteren Zellarten jedoch der Heilung nicht hinderlich zu sein.

#### 4.4 Vorteile von nicht-kultivierten ADRCs im Vergleich zu kultivierten Stammzellen

Die Wirkmechanismen bei der Sehnenregeneration mittels autologer ADRCs beruhen einerseits auf der Wirkung der Stammzellen an sich, andererseits auf den zusätzlichen Zelltypen, welche nicht durch den Aufbereitungsprozess verloren gehen. Durch diese Begleitzellen werden mutmaßlich mehr für die Sehnenregeneration förderliche trophische Faktoren, wie IGF-1, SDF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 sowie TGF- $\beta$ 3 als bei kultivierten Stammzellen im geschädigten Gewebe bereitgestellt (52). Wie bereits in der Einleitung skizziert und in (50) beschrieben, scheint darin der große Vorteil der ADRCs gegenüber kultivierten Stammzellprodukten zu liegen. Die Separation und Kultivierung der Stammzellen benötigt mit Wochen bis Monaten deutlich mehr Zeit als die Aufbereitung mittels des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Point-of-Care-Systems, die etwa nur zwei bis drei Stunden dauert und im klinischen Einsatz direkt nach der Liposuktion stattfindet (49). Dadurch besteht das Problem, dass bei der Anwendung autologer, kultivierter Stammzellen der ideale Therapiezeitpunkt verpasst werden könnte. Mit der Kultivierung von Stammzellen geht außerdem selbst unter idealen Laborbedingungen immer zellulärer Stress einher, etwa mechanischem oder oxidativem Stress, der für die volle Funktionsfähigkeit der Stammzellen hinderlich sein kann und gegebenenfalls zu zusätzlichen Risiken führt (55). Ein weiteres Hindernis stellt die absolute Bedingung für die Kultivierung von Stammzellen dar, keinerlei xenogene Materialien zu verwenden. Andernfalls besteht die Gefahr, dass xenogene Krankheiten übertragen werden oder eine spätere Immunreaktion nach Transplantation im Empfänger ausgelöst wird (28). Die Kontamination von Zellkulturen durch unter Umständen pathogene Mikroorganismen oder Viren stellt bei jeglichen in-vitro-Kulturen ein Problem dar. Nicht zu vernachlässigen sollte auch die Anforderung sein, dass die Selektion und Vervielfältigung von Stammzellen in einer Zellkultur so zielgenau sein muss, dass dort keine weiteren Zellen co-kultiviert werden. Tatsächlich besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich auch andere begleitende Zellen in der Kultur vermehren (z.B. Fibroblasten bei der Kultur von mesenchymalen Stammzellen; vgl. (48)), was sich dann negativ auf die Anzahl an Stammzellen in der Kultur auswirkt. Auch wenn aktuelle, neu entwickelte Kultivierungstechniken sehr sicher und effizient scheinen (156), ist es nach aktuellem Kenntnisstand nicht notwendig, die aus dem Fettgewebe gewonnenen Stammzellen zu separieren und zu kultivieren. Weder wurden in Tierversuchen signifikante Vorteile der Applikation kultivierter ADSCs beim Heilungsprozess von Sehnenschäden gefunden (150, 151), noch waren kultivierte ADSCs in klinischen Studien unkultivierten ADRCs überlegen (vgl. (157, 158) mit (61, 62)).

### 4.5 Limitierungen

Mögliche Limitierungen der vorliegenden Arbeit sind durch den Aufbau der Versuche nicht zu umgehen. Dazu gehört die Tatsache, dass Ergebnisse aus einem Tierversuch nicht direkt auf Vorgänge im menschlichen Körper zu übertragen sind. Für die untersuchte Fragestellung war es jedoch – wie in der Einleitung ausführlich beschrieben – aus ethischen Gründen unumgänglich, ein Tiermodell zu etablieren und zu untersuchen. Es ist in diesem Zusammenhang davon auszugehen, dass sich die zellulären und molekularen Mechanismen der Sehnenregeneration bei Säugetieren prinzipiell stark ähneln. Etwas problematisch im Hinblick auf Sehneteildefekte beim Menschen ist die experimentelle Generierung von Sehneteildefekten in Versuch II der vorliegenden Arbeit, bei der Löcher in die Mittelsubstanz einer Sehne von gesunden, nativen Kaninchen ohne wesentliche Belastungs- und Degenerationserscheinungen gestanzt wurden. Ein solcher experimentell induzierter Defekt weicht von den tatsächlich bei menschlichen Sehnen vorkommenden Läsionen ab. Die humanen Sehnenläsionen gehen in aller Regel mit degenerativen Erscheinungen und länger andauernder mechanischer Fehlbelastung einher und stellen sich kaum lochförmig dar (81). Ein entzündliches Umfeld an menschlichem Sehnenngewebe könnte bei der Anwendung von autologen ADRCs das aus diesen Versuchen ermittelte histologische, immunhistochemische und mechanische Ergebnis durchaus beeinflussen. Da ADRCs allerdings wohl vor allem über die M2-Makrophagen einen entzündungsmodulierenden Effekt besitzen und sich die Therapie in klinischen Studien bereits als erfolgreich erwiesen hat (61, 62, 93), scheint ein inflammatorisches Umfeld der Sehnenläsion nicht wesentlich hinderlich zu sein.

Bei der Analyse der in Versuch II erzielten Ergebnisse könnte die Verwendung des Bonar Scores eine Limitation darstellen. Eigentlich ist der Bonar Score nur zur Erfassung degenerativer Veränderungen menschlicher Sehnen entwickelt worden (108, 109). Inzwischen wird der Bonar Score allerdings auch zur histologischen Einschätzung des Zustandes von Sehnenngewebe bei Regenerationsvorgängen eingesetzt. Dies hat den Hintergrund, dass der Bonar Score aufgrund seiner verschiedenen Kategorien sehr gut dazu geeignet scheint, eine Abweichung von physiologischem, gesunden Sehnenngewebe hinsichtlich histologischer Parameter zu erfassen. Ob allerdings die einzelnen Stadien bzw. Grade der Degeneration in ähnlichem Umfang mit einem Grad der Regeneration zu vergleichen sind, ist ungeklärt geblieben. Mutmaßlich stellen sich regenerative Prozesse im Sehnenngewebe im Vergleich zu degenerativen Vorgängen histologisch anders dar, insbesondere wenn die Gewebeheilung durch verschiedene Therapieformen beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit ist dieser Aspekt allerdings zu vernachlässigen, da die Kernaussagen der Versuche nicht auf den Ergebnissen der Auswertung des Bonar Scores beruhen. Insgesamt erscheinen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten stereologischen Analysen dem Bonar Score klar überlegen, wie weiter oben ausführlich diskutiert.

Eine generelle Limitierung für die klinische Anwendung autologer ADRCs würden schwerwiegende Nebenwirkungen darstellen. Allerdings scheint der klinische Einsatz von autologen ADRCs, die mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Technologie isoliert wurden, nach aktueller Evidenz sicher zu sein (61, 62, 93, 159, 160), und das Sicherheitsprofil erscheint insgesamt sogar tendenziell besser als bei Injektionen von Kortikosteroid. Es ist allerdings zu betonen, dass bei Behandlungen mit Stammzellen die Sicherheit der Therapie für

jede Indikation separat in klinischen Studien zu überprüfen ist. Als Nebenwirkung einer intravitrealen Injektion von autologen ADRCs zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration wurde beispielsweise die Erblindung einer Patientin beschrieben (161). Ein weiterer Fall gravierender Nebenwirkungen wurde nach intrathekaler Injektion von mutmaßlich mesenchymalen, embryonalen und / oder fetalen Stammzellen zur Therapie bestehender Restdefizite nach ischämischem Schlaganfall beschrieben, bei dem der Patient eine glioproliferative Läsion mit progredienten Schmerzen und Querschnittssymptomatik entwickelte (162). In diesem Fall entsprachen jedoch einerseits die applizierten Stammzellprodukte mutmaßlich nicht den Standards der Medizin in den hoch entwickelten Industrieländern, wie z. B. eine kontrollierte Zulassung nach randomisiert-kontrollierten Studien für die jeweilige Indikation durch Gesundheitsbehörden; andererseits wurden verschiedene Stammzellprodukte, darunter nicht mit den aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen vergleichbare embryonale oder fetale Stammzellen appliziert. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind für embryonale Stammzellen und induziert pluripotente Stammzellen die Entstehung von Malignomen und Teratomen sowie die Fehldifferenzierung in Zellen weiterer, nicht physiologischer Zelllinien als schwerwiegende Nebenwirkungen beschrieben. Diese Arten von Stammzellen spielen zudem aktuell keine Rolle bei der Behandlung von Tendinopathien oder Sehnenverletzungen. Als generelles Problem bei der Erfassung von Nebenwirkungen von Stammzelltherapien ist die Tatsache anzusehen, dass keine Meldepflicht für das Auftreten (schwerwiegender) Nebenwirkungen nach Stammzellenbehandlung außerhalb klinischer Studien besteht. Dies könnte dazu führen, dass die Rate von Nebenwirkungen durch Stammzell-haltige Therapien als tendenziell zu niedrig angenommen wird (163).

Die Limitationen bezüglich des aktuellen klinischen Einsatzes von autologen ADRCs wurden ausführlich in (50) beschrieben.

#### 4.6 Schlussfolgerungen

Die Verwendung allogener Stammzellpräparate und allogener ADRCs scheint keinen Nutzen für die Geweberegeneration bei Sehnen(teil-)defekten zu besitzen. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Applikation autologer ADRCs die Regeneration von partiellen Sehnendefekten so beeinflusst wird, dass ein der frühen postnatalen Sehnenentstehung ähnlicher Prozess zur homogenen Gewebeheilung ohne wesentliche Narbenbildung induziert wird. Verschiedene molekulare und zelluläre Mechanismen, welche auf den in autologen ADRCs enthaltenen Stammzellen sowie begleitenden Zellen beruhen, führten zu verbesserter biomechanischer, histologischer und immunhistochemischer Regeneration nach Injektion von autologen ADRCs nach experimenteller Erzeugung eines Sehnenpartidefekts ohne wesentliche Bildung von Narbengewebe. Nach aktuellem Erkenntnisstand ist es nicht notwendig, die Stammzellen aus autologen ADRCs zu separieren und zu kultivieren; die in autologen ADRCs enthaltenen Stammzellen erscheinen für den Therapieerfolg vollkommen ausreichend. Zwar sind für verschiedene Arten von Stammzelltherapien schwerwiegende Komplikationen durchaus möglich; beim klinischen Einsatz von autologen ADRCs ist dies nach dem bisherigen Erkenntnisstand jedoch nicht der Fall.



Es sei an dieser Stelle abschließend ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit weder auf andere Formen von Stammzelltherapien zur Sehnenregeneration übertragbar sind, noch auf autologe ADRCs, die mit anderen Technologien als in der vorliegenden Arbeit verwendet aus Fettgewebe isoliert wurden. Wie in (49) und (152) gezeigt, unterscheiden sich die verschiedenen Aufbereitungstechnologien insbesondere sowohl hinsichtlich der Anzahl lebender Zellen als auch der relativen Anzahlen der verschiedenen Zelltypen. Dabei kommt insbesondere der Anzahl lebender Zellen besondere Bedeutung zu, da die Injektion von toten Zellen mit einem erhöhten Risiko lokaler Entzündungsreaktionen einhergeht (164). Die International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) hat in diesem Zusammenhang eine Untergrenze von mindestens 70% lebender Zellen bei der Verwendung von ADRCs festgelegt (165). Diese Untergrenze wird von der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Technologie erfüllt; insbesondere nicht-enzymatische Verfahren zur Isolierung von Zellen aus Fettgewebe erfüllen diese Forderung jedoch nicht (49, 166).

## Literaturverzeichnis

1. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp Hematol** 1974;2(2):83-92.
2. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in pluripotent stem cells: History, mechanisms, technologies, and applications. **Stem Cell Rev Rep** 2020;16(1):3-32.
3. Golchin A, Chatziparasidou A, Ranjbarvan P, Niknam Z, Ardeshiryajimi A. Embryonic stem cells in clinical trials: current overview of developments and challenges. **Adv Exp Med Biol** 2021;1312:19-37.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science** 1998;282(5391):1145-7.
5. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. **Endocr Rev** 2009;30(3):204-13.
6. Ilic D, Ogilvie C. Concise review: human embryonic stem cells-What have we done? What are we doing? Where are we going? **Stem Cells** 2017;35(1):17-25.
7. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. **Cell Stem Cell** 2008;2(2):113-7.
8. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. **Nat Protoc** 2007;2(8):1963-72.
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell** 2007;131(5):861-72.
10. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science** 2007;318(5858):1917-20.
11. Ilic D, Devito L, Miere C, Codognotto S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. **Br Med Bull** 2015;116:19-27.
12. Bradley JA, Bolton EM, Pedersen RA. Stem cell medicine encounters the immune system. **Nat Rev Immunol** 2002;2(11):859-71.
13. Halloran PF, Broski AP, Batiuk TD, Madrenas J. The molecular immunology of acute rejection: an overview. **Transpl Immunol** 1993;1(1):3-27.
14. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. **Nat Med** 2006;12(11):1259-68.
15. Gepstein L, Ding C, Rahmutula D, Wilson EE, Yankelson L, Caspi O, Gepstein A, Huber I, Olgin JE. In vivo assessment of the electrophysiological integration and arrhythmogenic risk of myocardial cell transplantation strategies. **Stem Cells** 2010;28(12):2151-61.
16. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. **Cell** 2010;142(3):375-86.
17. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. **Nature** 2011;475(7356):390-3.

18. Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2015;370(1680):20140367.
19. Waddington CH. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. **London, UK: George Allen & Unwin; 1957.**
20. Young MA, Larson DE, Sun CW, George DR, Ding L, Miller CA, Lin L, Pawlik KM, Chen K, Fan X, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Cook LL, Swift GW, Demeter RT, Wendl MC, Sands MS, Mardis ER, Wilson RK, Townes TM, Ley TJ. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell** 2012;10(5):570-82.
21. Rouhani F, Kumasaka N, de Brito MC, Bradley A, Vallier L, Gaffney D. Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. **PLoS Genet** 2014;10(6):e1004432.
22. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature** 2010;467(7313):285-90.
23. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Sasaki A, Yamamoto M, Nakamura M, Sutou K, Osafune K, Yamanaka S. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. **Nat Commun** 2014;5:3678.
24. Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. **Nat Cell Biol** 2011;13(5):541-9.
25. Yamanaka S. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. **Cell Stem Cell** 2010;7(1):1-2.
26. Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. **Nature** 2014;513(7519):507-11.
27. Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. **Nat Med** 2013;19(8):998-1004.
28. Jung Y, Bauer G, Nolte JA. Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. **Stem Cells** 2012;30(1):42-7.
29. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature** 1996;380(6569):64-6.
30. Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. **Cell** 2018;172(4):881-7 e7.
31. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)-SSEA-1(+)-Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. **Leukemia** 2006 May;20(5):857-69.
32. Miyaniishi M, Mori Y, Seita J, Chen JY, Karten S, Chan CK, Nakauchi H, Weissman IL. Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? **Stem Cell Reports** 2013;1(2):198-208.

33. Danova-Alt R, Heider A, Egger D, Cross M, Alt R. Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. **PLoS One**. **2012;7(4):e34899**.
34. Suszynska M, Mierzejewska K, Liu R, Ratajczak J, Shin DM, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. **Leukemia** **2014;28(3):473-84**.
35. Bhartiya D, Shaikh A, Anand S, Patel H, Kapoor S, Sriraman K, Parte S, Unni S. Endogenous, very small embryonic-like stem cells: critical review, therapeutic potential and a look ahead. **Hum Reprod Update** **2016;23(1):41-76**.
36. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Suszynska M, Miller DM, Kucia M, Shin DM. A novel view of the adult stem cell compartment from the perspective of a quiescent population of very small embryonic-like stem cells. **Circ Res** **2017;120(1):166-78**.
37. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Kucia M. Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs). *Circ Res*. 2019;124(2):208-10.
38. Bhartiya D. Adult tissue-resident stem cells-fact or fiction? **Stem Cell Res Ther** **2021;12(1):73**.
39. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Jozkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. **Acta Biochim Pol** **2015;62(3):329-37**.
40. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. **Cytometry A** **2018;93(1):19-31**.
41. Simpson E, Dazzi F. Bone Marrow Transplantation 1957-2019. **Front Immunol** **2019;10:1246**.
42. Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, Pfeiffer N, Gericke A. Corneal epithelial stem cells-physiology, pathophysiology and therapeutic options. **Cells** **2021;10(9)**.
43. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Cells** **2019;8(8)**.
44. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **PLoS One** **2012;7(10):e47559**.
45. Alt EU, Schmitz C, Bai X. Perspective: Why and how ubiquitously distributed, vascular-associated, pluripotent stem cells in the adult body (vaPS Cells) are the next generation of medicine. **Cells** **2021;10(9)**.
46. Davidoff MS. The pluripotent microvascular pericytes are the adult stem cells even in the testis. **Adv Exp Med Biol** **2019;1122:235-67**.
47. Gehmert S, Gehmert S, Prantl L, Vykoukal J, Alt E, Song YH. Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR-beta signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun** **2010;398(3):601-5**.
48. Alt EU, Winnier G, Haenel A, Rothoerl R, Solakoglu O, Alt C, et al. Towards a comprehensive understanding of UA-ADRCs (uncultured, autologous, fresh, unmodified, adipose derived regenerative cells, isolated at point of care) in regenerative medicine. **Cells** **2020;9(5)**.
49. Winnier GE, Valenzuela N, Peters-Hall J, Kellner J, Alt C, Alt EU. Isolation of adipose tissue derived regenerative cells from human subcutaneous tissue with or without the use of an enzymatic reagent. **PLoS One** **2019;14(9):e0221457**.

50. Schmitz C, Würfel T, Alt C, Alt EU. Behandlung von Sehnenrupturen mit Stammzellen: eine aktuelle Übersicht. **Obere Extremität** 2022;**17(3):141-53**.
51. Cicione C, Vadalà G, Di Giacomo G, Tilotta V, Ambrosio L, Russo F, Zampogna B, Cannata F, Papalia R, Denaro V. Micro-fragmented and nanofat adipose tissue derivatives: In vitro qualitative and quantitative analysis. **Front Bioeng Biotechnol** 2023;**11:911600**.
52. Sheu JJ, Lee MS, Wallace CG, Chen KH, Sung PH, Chua S, Lee FY, Chung SY, Chen YL, Li YC, Yip HK. Therapeutic effects of adipose derived fresh stromal vascular fraction-containing stem cells versus cultured adipose derived mesenchymal stem cells on rescuing heart function in rat after acute myocardial infarction. **Am J Transl Res** 2019;**11(1):67-86**.
53. Nyberg E, Farris A, O'Sullivan A, Rodriguez R, Grayson W. Comparison of stromal vascular fraction and passaged adipose-derived stromal/stem cells as point-of-care agents for bone regeneration. **Tissue Eng Part A** 2019;**25(21-22):1459-69**.
54. Polly SS, Nichols AEC, Donnini E, Inman DJ, Scott TJ, Apple SM, Werre SR, Dahlgren LA. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction and Cultured Stromal Cells as Trophic Mediators for Tendon Healing. **J Orthop Res** 2019;**37(6):1429-1439**.
55. Cossu G, Birchall M, Brown T, De Coppi P, Culme-Seymour E, Gibbon S, Hitchcock J, Mason C, Montgomery J, Morris S, Muntoni F, Napier D, Owji N, Prasad A, Round J, Sapraï P, Stilgoe J, Thrasher A, Wilson J. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. **Lancet** 2018;**391(10123):883-910**.
56. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. **Stem Cell Res Ther** 2018;**9(1):168**.
57. Mavrogenis AF, Karampikas V, Zikopoulos A, Sioutis S, Mastrokalos D, Koulalis D, Scarlat MM, Hernigou P. Orthobiologics: a review. **Int Orthop** 2023;**47(7):1645-1662**.
58. Tomasian A, Jennings JW. Bone marrow aspiration and biopsy: techniques and practice implications. *Skeletal Radiol.* 2022 Jan;**51(1):81-88**.
59. Beane OS, Darling EM. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. **Ann Biomed Eng** 2012;**40(10):2079-97**.
60. Lamplot JD, Rodeo SA, Brophy RH. A Practical Guide for the Current Use of Biologic Therapies in Sports Medicine. **Am J Sports Med** 2020;**48(2):488-503**.
61. Hurd JL, Facile TR, Weiss J, Hayes M, Hayes M, Furia JP, Maffulli N, Winnier GE, Alt C, Schmitz C, Alt EU, Lundeen M. Safety and efficacy of treating symptomatic, partial-thickness rotator cuff tears with fresh, uncultured, unmodified, autologous adipose-derived regenerative cells (UA-ADRCs) isolated at the point of care: a prospective, randomized, controlled first-in-human pilot study. **J Orthop Surg Res** 2020;**15(1):122**.
62. Lundeen M, Hurd JL, Hayes M, Hayes M, Facile TR, Furia JP, Maffulli N, Alt C, Alt EU, Schmitz C, Pearce DA. Management of partial-thickness rotator cuff tears with autologous adipose-derived regenerative cells is safe and more effective than injection of corticosteroid. **Sci Rep** 2023;**13(1):19348**.
63. Scott A, Squier K, Alfredson H, Bahr R, Cook JL, Coombes B, de Vos RJ, Fu SN, Grimaldi A, Lewis JS, Maffulli N, Magnusson SP, Malliaras P, Mc Auliffe S, Oei EHG, Purdam CR, Rees JD, Rio EK, Gravare Silbernagel K, Speed C, Weir A, Wolf JM, Akker-Scheek IVD,

- Vicenzino BT, Zwerver J. ICON 2019: International Scientific Tendinopathy Symposium Consensus: Clinical Terminology. **Br J Sports Med** 2020;54(5):260-262.
64. Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. **Arthroscopy** 1998;14(8):840-3.
65. Mendonca LD, Ocarino JM, Bittencourt NFN, Macedo LG, Fonseca ST. Association of hip and foot factors with patellar tendinopathy (jumper's knee) in athletes. **J Orthop Sports Phys Ther** 2018;48(9):676-84.
66. Dan M, Parr W, Broe D, Cross M, Walsh WR. Biomechanics of the knee extensor mechanism and its relationship to patella tendinopathy: A review. **J Orthop Res** 2018;36(12):3105-12.
67. Magnusson SP, Langberg H, Kjaer M. The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading. **Nat Rev Rheumatol** 2010;6(5):262-8.
68. Herod TW, Veres SP. Development of overuse tendinopathy: A new descriptive model for the initiation of tendon damage during cyclic loading. **J Orthop Res** 2018;36(1):467-76.
69. Longo UG, Fazio V, Poeta ML, Rabitti C, Franceschi F, Maffulli N, Denaro V. Bilateral consecutive rupture of the quadriceps tendon in a man with BstUI polymorphism of the COL5A1 gene. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc** 2010;18(4):514-8.
70. Mikic B, Schalet BJ, Clark RT, Gaschen V, Hunziker EB. GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the Achilles tendon. **J Orthop Res** 2001;19(3):365-71.
71. Mokone GG, Gajjar M, September AV, Schwellnus MP, Greenberg J, Noakes TD, Collins M. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with achilles tendon injuries. **Am J Sports Med** 2005;33(7):1016-21.
72. Jomaa G, Kwan CK, Fu SC, Ling SK, Chan KM, Yung PS, Rolf C. A systematic review of inflammatory cells and markers in human tendinopathy. **BMC Musculoskelet Disord.** 2020;21(1):78.
73. Lui PPY, Yung PSH. Inflammatory mechanisms linking obesity and tendinopathy. **J Orthop Translat** 2021;31:80-90.
74. Hijlkema A, Roozenboom C, Mensink M, Zwerver J. The impact of nutrition on tendon health and tendinopathy: a systematic review. **J Int Soc Sports Nutr** 2022;19(1):474-504.
75. Mueller AL, Brockmueller A, Kunnumakkara AB, Shakibaei M. Modulation of Inflammation by Plant-Derived Nutraceuticals in Tendinitis. **Nutrients** 2022;14(10).
76. Hudek R, von Schacky C, Passow A, Abdelkawi AF, Werner B, Gohlke F. Degenerative rotator cuff tears are associated with a low Omega-3 Index. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 2019;148:35-40.
77. Buhrmann C, Mobasher A, Busch F, Aldinger C, Stahlmann R, Montaseri A, Shakibaei M. Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **J Biol Chem** 2011;286(32):28556-66.
78. Littlewood C, May S, Walters S. Epidemiology of rotator cuff tendinopathy: a systematic review. **Shoulder & Elbow** 2017;5(4):256-65.

79. Florit D, Pedret C, Casals M, Malliaras P, Sugimoto D, Rodas G. Incidence of tendinopathy in team sports in a multidisciplinary sports club over 8 seasons. **J Sports Sci Med** 2019;18(4):780-8.
80. de Jonge S, van den Berg C, de Vos RJ, van der Heide HJ, Weir A, Verhaar JA, et al. Incidence of midportion Achilles tendinopathy in the general population. **Br J Sports Med** 2011;45(13):1026-8.
81. Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Morini S, Maffulli N, Denaro V. Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears. **Am J Sports Med** 2008;36(3):533-8.
82. Schweitzer ME, Karasick D. MR imaging of disorders of the Achilles tendon. **AJR Am J Roentgenol** 2000;175(3):613-25.
83. Abelkis E, Willekens I, Boulet C, Buls N, Provyn S, De Smet A, De Maeseneer M. Pseudo-tear appearance of the Achilles tendon on MR imaging in normal volunteers. **Surg Radiol Anat** 2021;43(1):73-77.
84. Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, Kobayashi T. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. **J Shoulder Elbow Surg.** 2010;19(1):116-20.
85. Splittgerber LE, Ihm JM. Significance of Asymptomatic Tendon Pathology in Athletes. **Curr Sports Med Rep** 2019;18(6):192-200.
86. Figueroa D, Figueroa F, Calvo R. Patellar Tendinopathy. **J Am Ac Orthop Surg** 2016;24(12):e184-e92.
87. Maffulli N, Longo UG, Kadakia A, Spiezia F. Achilles tendinopathy. **Foot Ankle Surg** 2020;26(3):240-9.
88. Chianca V, Albano D, Messina C, Midiri F, Mauri G, Aliprandi A, et al. Rotator cuff calcific tendinopathy: from diagnosis to treatment. **Acta Biomed** 2018;89(1-S):186-96.
89. Schmitz C, Cszasz NB, Milz S, Schieker M, Maffulli N, Rompe JD, et al. Efficacy and safety of extracorporeal shock wave therapy for orthopedic conditions: a systematic review on studies listed in the PEDro database. *Br Med Bull.* 2015;116:115-38.
- 90.. Wuerfel T, Schmitz C, Jokinen LLJ. The effects of the exposure of musculoskeletal tissue to extracorporeal shock waves. *Biomedicines.* 2022;10(5).
91. Mirghaderi SP, Valizadeh Z, Shadman K, Lafosse T, Oryadi-Zanjani L, Yekaninejad MS, Nabian MH. Cell therapy efficacy and safety in treating tendon disorders: a systemic review of clinical studies. **J Exp Orthop** 2022;9(1):85.
92. van den Boom NAC, Winters M, Haisma HJ, Moen MH. Efficacy of stem cell therapy for tendon disorders: a systematic review. **Orthop J Sports Med** 2020;8(4):2325967120915857.
93. Alt E, Rothoerl R, Hoppert M, Frank HG, Wuerfel T, Alt C, et al. First immunohistochemical evidence of human tendon repair following stem cell injection: A case report and review of literature. *World J Stem Cells.* 2021;13(7):944-70.
94. Beredjikian PK, Favata M, Cartmell JS, Flanagan CL, Crombleholme TM, Soslowsky LJ. Regenerative versus reparative healing in tendon: a study of biomechanical and histological properties in fetal sheep. **Ann Biomed Eng** 2003;31(10):1143-52.
95. Pak J, Lee JH, Jeon JH, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Potential benefits of allogeneic haploidentical adipose tissue-derived stromal vascular fraction in a hutchinson-gilford progeria syndrome patient. **Front Bioeng Biotechnol** 2020;8:574010.

96. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. **Int J Mol Sci** **2017**;**18**(9).
97. Schmitz C, Alt C, Wuerfel T, Milz S, Dinzey J, Hill A, et al. New, biomechanically sound tendon tissue after injection of uncultured, autologous, adipose derived regenerative cells in partial Achilles tendon defects in rabbits. **bioRxiv** **2024.02.18.580890**; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.18.580890>.
98. Naff KA, Craig S. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents: Chapter 6 - **The Domestic Rabbit, *Oryctolagus Cuniculus*: Origins and History**: **American College of Laboratory Animal Medicine**; **2012**.
99. Skalec A, Janeczek M, Czerski A. Anatomy and histology of the rabbit common calcanean tendon. **Anat Histol Embryol** **2019**;**48**(5):466–75.
100. Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu C. The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. **Biochem Biophys Res Commun** **2009**;**383**(2):235-9.
101. Ryf C, Weymann A. The neutral zero method — A principle of measuring joint function. **Injury**. **1995**;**26**:1-11.
102. Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: a biomechanical and histologic analysis in an animal model. **J Shoulder Elbow Surg**. **1998**;**7**(6):599-605.
103. Miyashita H, Ochi M, Ikuta Y. Histological and biomechanical observations of the rabbit patellar tendon after removal of its central one-third. **Arch Orthop Trauma Surg** **1997**;**116**(8):454-62.
104. Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR. Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. **The Journal of Hand Surgery** **2003**;**28**(5):814-23.
105. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports** **2000**;**10**(6):312-20.
106. Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience** **2005**;**130**(4):813-31.
107. Sharun K, Pawde AM, Kumar R, Kalaiselvan E, Kinjavdekar P, Dhama K, Pal A. Standardization and characterization of adipose-derived stromal vascular fraction from New Zealand white rabbits for bone tissue engineering. **Vet World** **2021**;**14**(2):508-514.
108. Fearon A, Dahlstrom JE, Twin J, Cook J, Scott A. The Bonar score revisited: region of evaluation significantly influences the standardized assessment of tendon degeneration. **J Sci Med Sport** **2014**;**17**(4):346-50.
109. Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. **J Orthop Res** **2004**;**22**(2):334-8.
110. Gerhardt JJ, Rondinelli RD. Goniometric techniques for range-of-motion assessment. **Phys Med Rehabil Clin N Am** **2001**;**12**(3):507-527.
111. Wörtler K. MRT von Muskelverletzungen. **Radiologie up2date** **2014**;**14**(04):291-304.
112. Behfar M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Hobbenaghi R, Delirez N, Dalir-Naghadeh B. Enhanced mechanical properties of rabbit flexor tendons in response to intratendinous



- injection of adipose derived stromal vascular fraction. **Curr Stem Cell Res Ther** **2012;7(3):173-8.**
113. Behfar M, Javanmardi S, Sarrafzadeh-Rezaei F. Comparative study on functional effects of allotransplantation of bone marrow stromal cells and adipose derived stromal vascular fraction on tendon repair: a biomechanical study in rabbits. **Cell J** **2014;16(3):263-70.**
114. Kosaka M, Nakase J, Hayashi K, Tsuchiya H. Adipose-derived regenerative cells promote tendon-bone healing in a rabbit model. **Arthroscopy** **2016;32(5):851-9.**
115. Lee SY, Kim W, Lim C, Chung SG. Treatment of lateral epicondylitis by using allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a pilot study. **Stem Cells** **2015;33(10):2995-3005.**
116. Chun SW, Kim W, Lee SY, Lim CY, Kim K, Kim JG, et al. A randomized controlled trial of stem cell injection for tendon tear. **Sci Rep** **2022;12(1):818.**
117. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat Rev Immunol** **2011;11(12):823-36.**
118. Joswig AJ, Mitchell A, Cummings KJ, Levine GJ, Gregory CA, Smith R 3rd, Watts AE. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. **Stem Cell Res Ther** **2017;8(1):42.**
119. Screen HR, Berk DE, Kadler KE, Ramirez F, Young MF. Tendon functional extracellular matrix. **J Orthop Res** **2015;33(6):793-9.**
120. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). **N Engl J Med** **1979;301(1):13-23.**
121. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (second of two parts). **N Engl J Med** **1979;301(2):77-85.**
122. Gaut L, Duprez D. Tendon development and diseases. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol** **2016;5(1):5-23.**
123. Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. **Proc Soc Exp Biol Med** **1979;161(3):337-40.**
124. Bhogal RK, Stoica CM, McGaha TL, Bona CA. Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis. **J Clin Immunol** **2005;25(6):592-603.**
125. Muller SA, Todorov A, Heisterbach PE, Martin I, Majewski M. Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc** **2015;23(7):2097-105.**
126. Williams IF, Heaton A, McCullagh KG. Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. **Res Vet Sci** **1980;28(3):302-10.**
127. Costa-Almeida R, Calejo I, Reis RL, Gomes ME. Crosstalk between adipose stem cells and tendon cells reveals a temporal regulation of tenogenesis by matrix deposition and remodeling. **J Cell Physiol** **2018;233(7):5383-95.**
128. Subramanian G, Stasuk A, Elsaadany M, Yildirim-Ayan E. Effect of uniaxial tensile cyclic loading regimes on matrix organization and tenogenic differentiation of adipose-derived stem cells encapsulated within 3d collagen scaffolds. **Stem Cells Int** **2017;2017:6072406.**

129. Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS One** 2013;8(11):e80908.
130. Fan C, Zhao Y, Chen Y, Qin T, Lin J, Han S, et al. A Cd9+Cd271+ stem/progenitor population and the SHP2 pathway contribute to neonatal-to-adult switching that regulates tendon maturation. **Cell Reports** 2022;39(4).
131. Schneider PR, Buhrmann C, Mobasher A, Matis U, Shakibaei M. Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **J Orthop Res** 2011;29(9):1351-60.
132. Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? **Circ Res** 2005;96(10):1039-41.
133. Long C, Wang Z, Legrand A, Chattopadhyay A, Chang J, Fox PM. Tendon tissue engineering: mechanism and effects of human tenocyte coculture with adipose-derived stem cells. **J Hand Surg Am** 2018;43(2):183 e1- e9.
134. Chiu CH, Tong YW, Yeh WL, Lei KF, Chen AC. Self-renewal and differentiation of adipose-derived stem cells (ADSCs) stimulated by multi-axial tensile strain in a pneumatic microdevice. **Micromachines (Basel)** 2018;9(11).
135. Yang G, Rothrauff BB, Lin H, Gottardi R, Alexander PG, Tuan RS. Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. **Biomaterials** 2013;34(37):9295-306.
136. Shi Y, Xiong Y, Jiang Y, Zhang Z, Zhou G, Zhang W, Cao Y, He J, Liu W. Conditional tenomodulin overexpression favors tenogenic lineage differentiation of transgenic mouse derived cells. **Gene** 2017;598:9-19.
137. Vindigni V, Tonello C, Lancerotto L, Abatangelo G, Cortivo R, Zavan B, Bassetto F. Preliminary report of in vitro reconstruction of a vascularized tendon-like structure: a novel application for adipose-derived stem cells. **Ann Plast Surg** 2013;71(6):664-70.
138. Schmitt T, Fox PM, Woon CY, Farnebo SJ, Bronstein JA, Behn A, Pham H, Chang J. Human flexor tendon tissue engineering: in vivo effects of stem cell reseeding. **Plast Reconstr Surg** 2013;132(4):567e-576e.
139. Uysal AC, Mizuno H. Differentiation of adipose-derived stem cells for tendon repair. **Methods Mol Biol** 2011;702:443-51.
140. Geburek F, Mundle K, Conrad S, Hellige M, Walliser U, van Schie HT, van Weeren R, Skutella T, Stadler PM. Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with in vivo magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions--a pilot study. **Stem Cell Res Ther** 2016;7:21.
141. Shindle MK, Chen CC, Robertson C, DiTullio AE, Paulus MC, Clinton CM, Cordasco FA, Rodeo SA, Warren RF. Full-thickness supraspinatus tears are associated with more synovial inflammation and tissue degeneration than partial-thickness tears. **J Shoulder Elbow Surg** 2011;20(6):917-27.
142. Blaine TA, Kim YS, Voloshin I, Chen D, Murakami K, Chang SS, Winchester R, Lee FY, O'keefe RJ, Bigliani LU. The molecular pathophysiology of subacromial bursitis in rotator cuff disease. **J Shoulder Elbow Surg** 2005;14(1 Suppl S):84S-89S.

143. Brandt L, Schubert S, Scheibe P, Brehm W, Franzen J, Gross C, Burk J. Tenogenic Properties of Mesenchymal Progenitor Cells Are Compromised in an Inflammatory Environment. **Int J Mol Sci** 2018;**19(9):2549**.
144. Gumucio JP, Schonk MM, Kharaz YA, Comerford E, Mendias CL. Scleraxis is required for the growth of adult tendons in response to mechanical loading. **JCI Insight** 2020;**5(13): e138295**.
145. Li J, Stoppato M, Schiele NR, Graybeal KL, Nguyen PK, Kuo CK. Embryonic and postnatal tendon cells respond differently to interleukin-1beta. **Ann N Y Acad Sci** 2019;**1442(1):118-27**.
146. Manning CN, Martel C, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Shah S, Gelberman RH, Thomopoulos S. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast responses to macrophage-induced inflammation in vitro. **Stem Cell Res Ther** 2015;**6(1):74**.
147. Chisari E, Rehak L, Khan WS, Maffulli N. The role of the immune system in tendon healing: a systematic review. **Br Med Bull** 2020;**133(1):49-64**.
148. Stolk M, Klatte-Schulz F, Schmock A, Minkwitz S, Wildemann B, Seifert M. New insights into tenocyte-immune cell interplay in an in vitro model of inflammation. **Sci Rep** 2017;**7(1):9801**.
149. Shen H, Korpakakis I, Havlioglu N, Linderman SW, Sakiyama-Elbert SE, Erickson IE, Zarebinski T, Silva MJ, Gelberman RH, Thomopoulos S. The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing. **Stem Cell Res Ther** 2016;**7(1):144**.
150. Gelberman RH, Shen H, Korpakakis I, Rothrauff B, Yang G, Tuan RS, Xia Y, Sakiyama-Elbert S, Silva MJ, Thomopoulos S. Effect of adipose-derived stromal cells and BMP12 on intrasynovial tendon repair: A biomechanical, biochemical, and proteomics study. **J Orthop Res** 2016;**34(4):630-40**.
151. Geburek F, Roggel F, van Schie HTM, Beineke A, Estrada R, Weber K, Hellige M, Rohn K, Jagodzinski M, Welke B, Hurschler C, Conrad S, Skutella T, van de Lest C, van Weeren R, Stadler PM. Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells: a controlled experimental trial. **Stem Cell Res Ther** 2017;**8(1):129**.
152. Schmitz C, Alt C, Azares AR, Pearce DA, Facile TR, Furia JP, Maffulli N, Huang C, Alt EU. The Composition of Adipose-Derived Regenerative Cells Isolated from Lipoaspirate Using a Point of Care System Does Not Depend on the Subject's Individual Age, Sex, Body Mass Index and Ethnicity. **Cells** 2022;**12(1):30**.
153. Chamberlain CS, Clements AEB, Kink JA, Choi U, Baer GS, Halanski MA, Hematti P, Vanderby R. Extracellular Vesicle-Educated Macrophages Promote Early Achilles Tendon Healing. **Stem Cells** 2019;**37(5):652-662**.
154. Lu LY, Kuang CY, Yin F. Magnetic resonance imaging and biomechanical analysis of adipose-derived stromal vascular fraction applied on rotator cuff repair in rabbits. **Chin Med J (Engl)** 2018;**131(1):69-74**.
155. Lu LY, Ma M, Cai JF, Yuan F, Zhou W, Luo SL, Pan ZY, Zeng W, Zhong N, Yin F. Effects of local application of adipose-derived stromal vascular fraction on tendon-bone healing after rotator cuff tear in rabbits. **Chin Med J (Engl)** 2018;**131(21):2620-2622**.

156. Guiotto M, Palombella S, Brambilla S, Applegate LA, Riehle M, Hart A, Raffoul W, di Summa PG. Isolation and Culture of Human Adipose-Derived Stem Cells With an Innovative Xenogeneic-Free Method for Human Therapy. **J Vis Exp 2023;(192)**.
157. Jo CH, Chai JW, Jeong EC, Oh S, Yoon KS. Intratendinous injection of mesenchymal stem cells for the treatment of rotator cuff disease: a 2-year follow-up study. **Arthroscopy 2020;36(4):971-80**.
158. Jo CH, Chai JW, Jeong EC, Oh S, Kim PS, Yoon JY, Yoon KS. Intratendinous Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Rotator Cuff Disease: A First-In-Human Trial. **Stem Cells 2018;36(9):1441-1450**.
159. Rothoerl R, Tomelden J, Alt EU. Safety and efficacy of autologous stem cell treatment for facetogenic chronic back pain. **J Pers Med 2023;13(3)**.
160. Mautner K, Gottschalk M, Boden SD, Akard A, Bae WC, Black L, Boggess B, Chatterjee P, Chung CB, Easley KA, Gibson G, Hackel J, Jensen K, Kippner L, Kurtenbach C, Kurtzberg J, Mason RA, Noonan B, Roy K, Valentine V, Yeago C, Drissi H. Cell-based versus corticosteroid injections for knee pain in osteoarthritis: a randomized phase 3 trial. **Nat Med 2023;29(12):3120-3126**.
161. Kuriyan AE, Albini TA, Townsend JH, Rodriguez M, Pandya HK, Leonard RE 2nd, Parrott MB, Rosenfeld PJ, Flynn HW Jr, Goldberg JL. Vision Loss after Intravitreal Injection of Autologous "Stem Cells" for AMD. **N Engl J Med 2017;376(11):1047-1053**.
162. Berkowitz AL, Miller MB, Mir SA, Cagney D, Chavakula V, Guleria I, Aizer A, Ligon KL, Chi JH. Glioproliferative lesion of the spinal cord as a complication of "Stem-Cell Tourism". **N Engl J Med 2016;375(2):196-8**.
163. Marks PW, Witten CM, Califf RM. Clarifying stem-cell therapy's benefits and risks. **N Engl J Med 2017;376(11):1007-9**.
164. Snyder AG, Hubbard NW, Messmer MN, Kofman SB, Hagan CE, Orozco SL, Chiang K, Daniels BP, Baker D, Oberst A. Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. **Sci Immunol 2019;4(36):eaaw2004**.
165. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy 2013;15(6):641-8**.
166. Labarre KW, Zimmermann G. Infiltration of the Hoffa's fat pad with stromal vascular fraction in patients with osteoarthritis of the knee -Results after one year of follow-up. **Bone Rep 2022;16:101168**.

### Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung durch die MitarbeiterInnen des Lehrstuhls Anatomie II der Ludwig-Maximilians-Universität München, insbesondere den Lehrstuhlinhaber Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Schmitz für seinen geduligen und motivierenden Umgang und die Betreuung dieser Dissertation sowie sein Mentoring für weitere Forschungsprojekte. Ohne diese wertschätzende Förderung wäre meine bisherige Forschungstätigkeit kaum möglich gewesen. Weiterer Dank geht an unsere Forschungsgruppe der *adipose-derived regenerative cells* rund um Prof. Dr. med. Eckhard U. Alt (Houston, TX, USA), die mir die Beteiligung an der Stamm- bzw. Regenerativzell-forschung ermöglichten.

Für die nötige Inspiration und das Erkennen der Bedeutung der eigenen Forschung möchte ich mich von Herzen bei Peter Stiller bedanken, durch den ich innovative Therapiemethoden in der klinischen Anwendung kennenlernen durfte. Zudem bedanke ich mich besonders bei Robert Erbedinger, der meine Forschungsbemühungen der Fachöffentlichkeit sichtbar macht. An dieser Stelle sind zudem Dr. Robert Percy Marshall, der mich jederzeit im Hinblick auf meine Karriereaspirationen im sportorthopädischen Bereich unterstützt, Samuel Bonorden, bei dem ich viele therapeutische Erfahrungen sammeln durfte, und Dr. Christian Rülke zu erwähnen, durch welchen ich bei meinen ersten medizinischen Erfahrungen für meinen beruflichen Weg in der Medizin geprägt wurde.

Der Hanns-Seidel-Stiftung, allen voran Frau Isabel Küfer, möchte ich für die ideale sowie materielle Förderung für die Zeit meines Studiums danken, durch die ich einerseits wertvolle Erfahrungen zum einen für meine fachliche, zum anderen für meine persönliche Entwicklung sammeln durfte. Durch die finanzielle Unterstützung wurde mir der volle Fokus auf Forschungstätigkeiten bereits während des medizinischen Curriculums ermöglicht.

Ich bedanke mich zudem bei meinen Freunden, durch deren Umgang ich charakterlich geprägt wurde und bei diversen Diskussionen, allen voran mit Johannes Klinkert, Klaus Burtscher und Kevin Scharl, meine argumentativen und rhetorischen Fähigkeiten trainiert wurden.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, meiner Mutter, Stiefvater und Großeltern, die mich jederzeit uneingeschränkt unterstützen und ohne die mein bisheriger Weg in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Mein inniger Dank gilt meiner Partnerin Dr. Aurélie Gaasch, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite steht und auf die ich mich einhundertprozentig in jeder Lebenslage verlassen kann.

## Affidavit



## Eidesstattliche Versicherung

Würfel, Tobias

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

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

**Regeneration tendinöser Partiailläsionen mittels aus Fettgewebe gewonnener, regenerativer Zellen im Tierversuch**

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

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

München, 29.06.2024

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Tobias Würfel

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

### Publikationsliste

Alt EU, Rothoerl R, Hoppert M, Frank HG, **Wuerfel T**, Alt C, Schmitz C.

First Immunohistochemical Evidence of Human Tendon Repair Following Stem Cell Injection: A case report and review of literature.

*World J Stem Cells.* 2021 Jul;13(7):944-970.

Schmitz C, **Würfel T**, Alt C, Alt EU.

Behandlung von Sehnenrupturen mit Stammzellen: eine aktuelle Übersicht.

*Obere Extremität.* 2022;17:141–153.

**Wuerfel T**, Schmitz C, Jokinen LLJ.

The Effects of the Exposure of Musculoskeletal Tissue to Extracorporeal Shock Waves.

*Biomedicines.* 2022;10(5):1084.

Jokinen LLJ, **Wuerfel T**, Schmitz C.

Opinion: Application of extracorporeal shock wave therapy in nervous system diseases.

*Front Neurol.* 2023;14:1281684.

Schmitz C, Alt C, **Würfel T**, Milz S, Dinzey J, Hill A, Sikes KJ, Burton L, Easley J, Stewart HL, Puttlitz CM, Gadomski BC, Labus K, Pearce DA, Maffulli N, Alt EU.

New, biomechanically sound tendon tissue after injection of uncultured, autologous, adipose derived regenerative cells in partial Achilles tendon defects in rabbits.

*bioRxiv.* 2024 Feb 18:580890. doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.18.580890>.

### Kongressbeiträge

Kongress der Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA) 2022, Wien, AT

**Vortrag:** Regeneration of partial-thickness tendon tears with uncultured, unmodified, autologous, adipose-derived regenerative cells (UA-ADRCs), 16.09.2022

ISOKINETIC Conference 2023, London, UK

**Vortrag:** Mechanisms of Action of Extracorporeal Shockwave Therapy – A systematic review, 29.05.2023, einsehbar unter: <https://www.youtube.com/watch?v=ucx-J2UOaA0>

Kongress der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin (GOTS) 2023, Luxemburg, LU

**Poster:** Mechanisms of Action of Extracorporeal Shockwave Therapy – A systematic review, 16.06.2023