

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

der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**Der Einfluss der Footprint-Präparation auf die knöchernen Sehnen-
einheilung der Supraspinatussehne nach Rotatorenmanschettenre-
konstruktion im Tiermodell – eine histologische Analyse**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Michaela Serr

aus München

2017

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Ekkehard Euler
PD Dr. med. Hermann Anetzberger
PD Dr. med. Christian P. Schneider

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Andreas Ficklscherer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Rotatorenmanschette	1
1.2	Die Supraspinatussehne	2
1.2.1	Sehnenaufbau und Mechanik.....	2
1.2.2	Sehnenheilung	4
1.2.3	Insertion am Footprint	5
1.3	Rotatorenmanschettenrupturen.....	6
1.3.1	Epidemiologie	6
1.3.2	Pathogenese.....	7
1.3.3	Operationsmethoden.....	8
1.3.4	Aktuelle Forschung	9
	Stammzellen	10
	Wachstumsfaktoren	11
	Gentherapie	11
	PRP	12
	EZM Scaffolds	12
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Tiermodell.....	15
2.2	Versuchsaufbau	15
2.3	Operationsverfahren	17
2.3.1	Narkose und Operationsvorbereitung	17
2.3.2	Chirurgische Präparation und Nachversorgung	17
2.3.3	Euthanasie und Probenentnahme	19
2.4	Histologie und Immunhistochemie.....	19
2.4.1	Anfertigung der mikroskopischen Schnittpräparate	20

2.4.2	Histologische Übersichtsfärbungen	21
	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	21
	Safranin-O/Fast Green-Färbung	22
	Picrosirius-Red-Färbung	22
2.4.3	Immunhistochemische Färbungen.....	22
	Kollagen II Färbung.....	22
	Kollagen I und III Färbungen.....	23
2.5	Auswertungsmethoden und Datenerhebung	24
2.5.1	Auswertung der Histologie	24
	Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	24
	Auswertung der Safranin-O/Fast Green-Färbung.....	25
	Auswertung der Picrosirius-Red-Färbung	25
2.5.2	Auswertung der Immunhistochemie	26
	Kollagen II Auswertung	26
	Kollagen I und III Auswertung	26
2.5.3	Statistik	29
2.6	Material	29
	2.6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
	2.6.2 Chemikalien und Reagenzien.....	30
	2.6.3 Software.....	31
3	Ergebnisse.....	32
	3.1 Histologische Ergebnisse	32
	3.2 Immunhistochemische Ergebnisse.....	37
	3.3 Statistische Ergebnisse.....	40
4	Diskussion	43
	4.1 Allgemeines	43
	4.2 Tiermodell und Heilungszeitraum.....	43

4.3 Evaluation der Methoden	44
4.3.1 Operatives Procedere und Defektmodell	44
4.3.2 Histologische Aufarbeitung	46
4.3.3 Auswertungsmethoden	46
4.4 Bewertung der Ergebnisse	48
4.5 Korrelation mit anderen Studien	52
4.6 Ausblick	54
5 Zusammenfassung	55
Literaturverzeichnis	57
Abkürzungsverzeichnis	68
Abbildungsverzeichnis	70
Publikationen	72
Arbeitsprotokolle	73
Danksagung	79
Eidesstattliche Versicherung	80

1 Einleitung

1.1 Die Rotatorenmanschette

Die Schulter stellt das Gelenk mit dem größtem Bewegungsumfang im Körper dar. An den Bewegungen sind nicht nur das eigentliche Schultergelenk *Articulatio glenohumeralis* beteiligt, sondern auch die Schulternebgelenke *Articulatio sternoclavicularis*, *Articulatio acromioclavicularis* und das Scapula-Thorax-Gelenk. Das Schultergelenk ist ein typisches Kugelgelenk mit folgenden drei Freiheitsgraden: Flexion/Extension, Abduktion/Adduktion, Innenrotation/Außenrotation. Die Gelenkpfanne wird durch die *Cavitas glenoidalis* der Scapula gebildet und der Gelenkkopf durch das *Caput humeri* des Oberarmknochens. Da die Gelenkfläche der Pfanne nur ein Drittel bis ein Viertel der Gelenkfläche des Kopfes entspricht, ermöglicht dies auf der einen Seite ein enormes Bewegungsausmaß, auf der anderen Seite führt es auch zu Instabilität. Daher wird das Schultergelenk zusätzlich durch einen Kapsel-Band-Apparat sowie muskulär stabilisiert. Der Hauptanteil fällt dabei auf die Rotatorenmanschette (RM), welche aus vier Muskeln mit unterschiedlichen Funktionen besteht:

- *Musculus supraspinatus* (SSP) → Abduktion
- *Musculus infraspinatus* (ISP) → Außenrotation (Adduktion)
- *Musculus subscapularis* (SSC) → Innenrotation (Abduktion, Adduktion)
- *Musculus teres minor* (TM) → Außenrotation (Adduktion)

Der *M. supraspinatus* entspringt aus der *Fossa supraspinata* der Scapula und zieht unterhalb der *Fornix humeri* (bestehend aus *Acromion*, *Ligamentum coracoacromiale*, *Processus coracoideus*) zum *Tuberculum majus* des Humerus, wo die Sehne an der oberen und mittleren Facette inseriert. Der *M. infraspinatus* entspringt weiter unterhalb an der *Fossa infraspinata* und zieht ebenfalls zum *Tuberculum majus*, inseriert allerdings an dessen mittleren und unteren Facette. Der *M. teres minor* hat seinen Ursprung in der *Fossa infraspinata* an der *Margo lateralis* und zieht zusammen mit dem *M. infraspinatus* zum *Tuberculum majus*. Der *M. subscapularis* als vierter Muskel entspringt der *Facies costalis scapulae* und inseriert mit seiner Sehne am *Tuberculum minus* des Humerus. Die vier Muskeln der Rotatorenmanschette sind in ihrer Gesamtheit an allen Bewegungen des Schultergelenks beteiligt [1, 2]. Die Sehnenansätze bilden von ventral, dorsal und kranial eine Sehnenhaube um das Gelenk und zentrieren den Humeruskopf in der Pfanne. An ihrer Unterfläche wird die Rotatorenmanschette vom Gelenkraum durch die Gelenkkapsel getrennt. An ihrer Oberfläche ist sie mit dem tiefen Blatt der *Bursa subacromialis* verbunden [3].

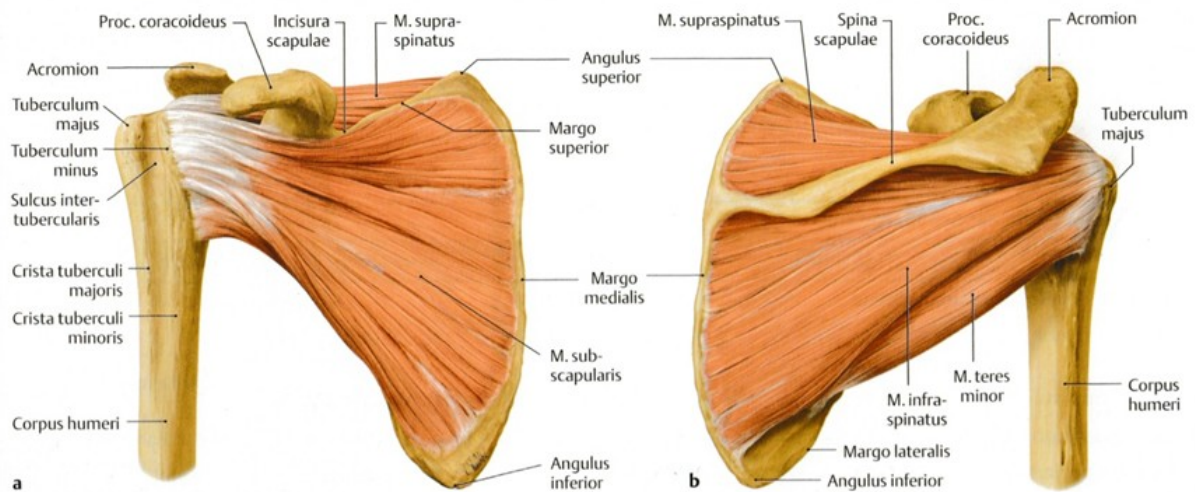


Abbildung 1: Anatomie der Rotatorenmanschette von ventral (a) und von dorsal (b). Abb. aus [2]

1.2 Die Supraspinatussehne

Die Supraspinatussehne ist die am häufigsten betroffene Sehne bei Rotatorenmanschettenrupturen (RMR) [4-6]. Durch ihre exponierte Lage unter dem Schulterdach ist sie besonders anfällig gegenüber Verletzungen und Überbelastung. Zudem können wiederholende Einklemmungen schneller zu degenerativen Veränderungen führen [7, 8]. Entscheidend für die häufige Beteiligung an den Rupturen scheint jedoch unter anderem auch die vaskuläre Versorgung zu sein. In der Literatur wird die so genannte „kritische Zone“ beschrieben, ein Bereich am Supraspinatussehnenansatz mit relativer Avaskularität, verminderter Zellzahl und häufigen Mikrorupturen [9]. Laut Moseley und Goldie [10] stellt die „kritische Zone“ den Anastomosenbereich zwischen den Gefäßen des Knochens und denen der Sehne dar. Rothman und Parke [11] wiederum sind der Meinung, dass das Maß an Avaskularität im Verhältnis zum Alter steht. Einheitliche Meinung herrscht in jedem Fall darüber, dass unabhängig der Ursache für die „kritischen Zone“ die bestehende Hypovaskularität der Supraspinatussehne diese anfälliger gegenüber Rupturen macht als die übrigen Sehnen der Rotatorenmanschette [10-16].

1.2.1 Sehnenaufbau und Mechanik

Sehnen bestehen aus straffem Bindegewebe. Sie sind aus parallel angeordneten Kollagenfasern aufgebaut, die durch lockeres Bindegewebe, das Peritendineum, zu Faserbündeln zusammengefasst werden. Die Gesamtheit aller Kollagenfaserbündel ergibt schlussendlich die Sehne als Ganzes, welche wiederum vom Epitendineum umfasst wird. Die Kollagenfasern bestehen aus parallelen Kollagenfibrillen, welche sich aus Tropokollagenmolekülen zu-

sammensetzen. Die versetzte Anordnung der Moleküle führt zur charakteristischen Querstreifung der Kollagenfibrillen. Die Tropokollagenmoleküle bestehen aus drei alpha-Ketten, die sich als Tripelhelix umeinander winden [17-19]. Innerhalb einer Faser sind die Fibrillen nicht nur parallel, sondern auch transversal und horizontal angeordnet. Zusätzlich kreuzen sich teilweise die longitudinal angeordneten Fibrillen und bilden Spiralen und Geflechte. Dieser dreidimensionale Aufbau bildet die Grundlage zum Schutz gegen sowohl longitudinale, transversale und horizontale Bewegungen als auch gegen Rotationsbewegungen [20].

Zwischen den Kollagenfasern liegen die in Reihen angeordneten länglichen Sehnenzellen, die Tenozyten, welche eine Unterform der Fibrozyten darstellen. Sie repräsentieren den zellulären Bestandteil der Sehne. Die Tenozyten entstehen aus ihren unreifen Vorgängerezellen, den Tenoblasten. Zusammen bilden sie 90-95% der zellulären Bestandteile der Sehne [18, 20] und sind verantwortlich für die Produktion von Kollagen und den restlichen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) [18, 21]. Hierfür kommunizieren sie untereinander über *Gap junctions* und bilden ein weitläufiges Netzwerk innerhalb der Sehne. In ihrem Reifungsprozess von Tenoblasten zu Tenozyten sinkt ihre metabolische Aktivität und somit auch die Produktion der EZM-Bestandteile [18]. Ca. 30% der EZM werden durch die Trockenmasse definiert während die restlichen 70% aus Wasser bestehen. Den Hauptbestandteil der Trockenmasse stellt das Kollagen I mit 65-80% dar [20, 22, 23]. Den restlichen Anteil nehmen Elastin, Proteoglykane und Glykoproteine ein.

Die Sehnen dienen der Kraftübertragung vom Muskel auf den Knochen. Um einen stabilen Übergang vom Sehnengewebe in den Knochen zu schaffen strahlen hier spezielle kollagene Fasern, die Sharpey's Fasern, ein. Sie schaffen Verbindungen auf verschiedenen Ebenen. Ein Teil der Fasern strahlt nur bis in den Faserknorpel ein und manche Fasern direkt bis in den Knochen [22, 24]. Die für die Kraftübertragung nötige Stabilität und Flexibilität wird der Sehne vorrangig durch das Kollagen verliehen, aber auch die EZM verleiht der Sehne durch ihre viskoelastische Beschaffenheit zusätzliche Stärke [19]. Je nach mechanischer Beanspruchung zeigen die Zellen hier ein dynamisches Verhalten bezüglich der Produktion ihrer Bestandteile [25, 26]. Der Aufbau der Sehne führt zu den einmaligen Eigenschaften, welche die Sehne gewährleisten muss. Hierzu zählen ein hohes Maß an mechanischer Belastbarkeit und guter Flexibilität bei gleichzeitiger optimaler Elastizität [27]. Die kollagenen Fasern liegen im Ruhezustand leicht wellenförmig vor. Wird die Sehne nun bis zu 2% belastet straffen und glätten sich die Fasern [18]. Bei weiterer Belastung kommt es zum Verschieben der Tripelhelices auf molekularer Ebene und die Fasern bilden eine parallel angeordnete Einheit [28, 29]. Bleibt die Belastung unter 4%, so überwiegen die elastischen Eigenschaften und die Sehne kehrt nach Ende zurück in ihre ursprüngliche Position [18, 20]. Wird die Sehne jedoch einer Zugkraft von über 4% ausgesetzt entstehen bereits mikroskopische Defekte und ab einer

Zugkraft von 8-10% kann die Sehne bereits reißen [20, 29]. Reißen die Fasern, so ziehen sie sich an ihr Ursprungsende zurück und die Sehne verliert an Kraft.

1.2.2 Sehnenheilung

Sehnenverletzungen können akut oder chronisch auftreten und traumatischer oder degenerativer Ursache sein [18, 30]. Bei traumatischen Rupturen dominieren die extrinsische Faktoren als Ursache während die degenerativen Schäden meist durch Überlastung bedingt oder intrinsischer Ursache sind [18, 31].

Kommt es zu einer Ruptur der Sehne so sind sowohl die zellulären Bestandteile der Sehne als auch die EZM am Heilungsprozess beteiligt [18]. Die primäre Reaktion auf einen Defekt ist die Bildung von Narbengewebe. Zusätzlich werden eine Reihe biochemischer Kaskaden in Gang gesetzt. Die Heilung erfolgt dann in drei Phasen:

- Entzündungsreaktion
- Proliferation
- Remodelierung

In der ersten Phase wandern Entzündungszellen aus dem umliegenden Gewebe an den Ort des Defektes ein. Zusätzlich sammeln sich durch chemotaktische Reaktionen Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Monozyten, um die Trümmer des zerstörten Gewebes zu phagozytieren. Anschließend sammeln sich Tenozyten und Fibroblasten und beginnen mit der Produktion von Bestandteilen der EZM. Hier wird vorwiegend Kollagen Typ III synthetisiert, aber auch Proteoglykane und adhäsive Glykoproteine [18, 23, 32-34]. Zusätzlich bildet sich ein ausgeprägtes Netzwerk an neuen Blutgefäßen [35]. Am Ende der Proliferationsphase ist der Defekt bereits mit Reparaturgewebe ausgefüllt und stabilisiert. Vor allem das Kollagen III, welches normalerweise nur in geringem Maß in gesunden Sehnen enthalten ist, nimmt hier die Schlüsselrolle ein, da es durch seine Fähigkeit der schnellen Vernetzung das neu gebildete Gewebe stabilisiert. Nach sechs bis acht Wochen beginnt die Remodelierungsphase. Die Synthese an Zellen, Matrixbestandteilen und Kollagen nimmt ab, wobei die bestehende Produktion von Kollagen III vorwiegend durch Kollagen I ersetzt wird [36-39]. Im weiteren Verlauf führt das Zusammenwirken der einzelnen Kollageneinheiten zu vermehrter Steifigkeit der Sehne und zunehmend verbesserter Zugkraft [23]. Bis die Sehne allerdings ihre ursprüngliche Belastbarkeit wieder voll erreicht hat kann es bis zu einem Jahr oder sogar länger dauern [40].

Unabhängig der drei Heilungsstadien kann die Heilung der Sehne in eine extrinsische und eine intrinsische Heilung unterteilt werden. Bei der extrinsischen Heilung wandern die Fibroblasten und Entzündungszellen aus dem peripher extern gelegenen Gewebe ein und initiali-

sieren am Ort des Defektes den Heilungsprozess. Bei der intrinsischen Heilung hingegen stammen die Zellen aus Epitendineum und Peritendineum. Obwohl beide Mechanismen gemeinsam interagieren, erfüllen unterschiedliche Zellen verschiedene Aufgaben. Der extrinsische Weg ist primär für die schnelle Defektfüllung mit hoher Zellzahl und unorganisierter EZM zuständig, während der intrinsische Weg sich vor allem durch Reorganisation der kollagenen Fasern und Erhalt der fibrillären Stabilität auszeichnet [23, 41-43]. Die Tenoblasten des Epitendineums zeigen die schnellste Reaktion auf einen Defekt mit einem Beginn der Proliferation nach bereits drei Tagen und einer Kollagensynthese innerhalb von sieben Tagen. Die Tenozyten hingegen beginnen verspätet mit ihrer Synthese, produzieren dafür aber deutlich größere Mengen an Kollagen [18, 33, 44].

1.2.3 Insertion am Footprint

Der Footprint bezeichnet die Insertionsstelle der Ansatzsehne eines Muskels in den Knochen. Den größten Footprint der Rotatorenmanschette besitzt der Subscapularis, den zweitgrößten der Infraspinatus, den drittgrößten der Supraspinatus und den kleinsten der Teres minor. Die Insertionsstelle der Supraspinatussehne erstreckt sich vom lateralen Rand der Bizepsrinne bis zur *bare area*, welche sich zwischen der Gelenkfläche und der unteren Insertionsstelle des Infraspinatus befindet [1]. Der Footprint der Supraspinatussehne wird je nach Literatur unterschiedlich groß beschrieben. In der Studie von Ruotolo et al. [45] wurden 17 Kadaverschultern bezüglich der Insertionsstelle auf verschiedenen Höhenabschnitten vermessen. Die durchschnittliche Breite betrug anteroposterior 25mm. Die von superior nach inferior gemessene Dicke der Sehne betrug hingegen je nach Höhe 11,7 mm, 12,1 mm oder 12 mm. Eine andere Studie entdeckte anhand von 26 untersuchten Schultern, dass der Footprint der Supraspinatussehne eine dreieckige Form aufweist. Gemessene Werte waren hier eine Insertionsbreite anteroposterior von 12,6 mm und eine mediolaterale Länge von 6,9 mm [46]. In der Studie von Curtis et al. [47] zeigten sich ähnliche Werte wie bei Ruotolo mit 23 x 16 mm. Hier wurden 20 Kadaverschultern untersucht.

Dem Footprint der Sehne kommt die größte Bedeutung in der Kraftübertragung zu. Da Sehne und Knochen verschiedene Gewebe mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften darstellen zeigt sich hier am Übergang (=Interface) die größte Stressbelastung. Um den Belastungsansprüchen standzuhalten und auch bei Spannungsspitzen die Balance halten zu können ist ein spezieller vierzoniger Aufbau nötig [24, 48, 49]. Dieser gliedert sich von Sehne zum Knochen in: Sehnensubstanz, Faserknorpel, kalzifizierter Faserknorpel und Knochen. Zone 1, die Sehnensubstanz, besteht vor allem aus den Kollagenen II und XII, sowie den Proteoglykanen Decorin und Biglykan. Zudem zeigen die Zellen hier eine spindelförmige Form. In Richtung der Insertionsstelle verändert sich die Zusammensetzung zunehmend in

Richtung Faserknorpel mit den vorrangigen Bestandteilen Kollagen II, IX und X sowie dem Proteoglykan Aggrecan. Die Zellform wird zunehmend runder und die Zellen zunehmend voneinander isolierter. Dies dient als natürliche Barriere, um die direkte Zellkommunikation zwischen Osteozyten und Tenozyten zu unterbinden. Auch die Fasernanordnung verändert sich von Zone 1 mit guter Ausrichtung bis zu Zone 4 mit geringerer Orientierung [1, 18, 24, 49, 50]. Zwischen unkalzifizierten und kalzifizierten Faserknorpel befindet sich die sogenannte Tidemark, eine leicht basophile Linie, die als Grenze zwischen harten und weichen Gewebe zu verstehen ist [24, 48, 49].

1.3 Rotatorenmanschettenrupturen

Eine Ruptur der Rotatorenmanschette beschreibt einen partiellen oder kompletten Riss einer oder mehrerer Sehnen der Rotatorenmanschette. 1983 beschrieb Neer drei Stadien in der Erkrankung der RM. Das erste Stadium findet sich bei Patienten unter 25 Jahren und beinhaltet Blutungen und Ödeme innerhalb der Sehne und der Bursa. Das zweite Stadium tritt bei Patienten im Alter zwischen 25 und 40 Jahren auf und bezeichnet v.a. eine Tendinitis. Stadium III schließlich betrifft Patienten, welche älter als 40 Jahre sind und definiert die Teil- oder Totalruptur der Sehne [8]. Da Rotatorenmanschettenrupturen zu den gängigsten Krankheitsbildern im Alter zählen wurde bereits viel über die Therapiemöglichkeiten geforscht. Sowohl konservative Behandlungsschematas als auch operative Methoden wurden bis zum heutigen Tage bestmöglich optimiert.

1.3.1 Epidemiologie

Bisherige Studien konnten eindeutig zeigen, dass die Prävalenz für eine Rotatorenmanschettenruptur mit dem Alter steigt [5, 51-57]. Laut einer Studie von Sher et al. [54], in welcher die Prävalenz bei 96 Individuen ohne Schmerzen und mit normaler Schulterfunktion anhand von MRT Bildern untersucht wurde, zeigten bereits 28% der über 60-Jährigen eine komplette Rotatorenmanschettenruptur und 26% eine Teilruptur. Bei jüngeren Personen im Alter von 40-60 Jahren zeigten insgesamt 28% eine Ruptur. Auch in anderen Studien werden ähnliche Ergebnisse gezeigt. Bei Milgrom et al. [55] wurden 90 asymptomatische Patienten beidseits im Alter zwischen 30 und 99 Jahren mittels Ultraschall untersucht. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Anzahl der Teil- oder Totalrupturen ab einem Alter von 50 Jahren. Genau genommen zeigten bei den über 70-Jährigen mehr als 50% in ihrer dominanten Seite eine Ruptur und bei den über 80-Jährigen über 80%. Die Studie von Yamaguchi et al. [52] fand zusätzlich heraus, dass das Durchschnittsalter für eine einseitige Ruptur bei 58,7 Jahren und das für eine zweiseitige Ruptur bei 67,8 Jahren liegt. Tempelhof et al. [57] beschrieben, dass asymptomatische Patienten im Alter von 50-59 Jahren bereits zu 13% eine Ruptur

aufweisen, im Alter von 60-69 Jahren 20%, im Alter von 70-79 31% und in der Gruppe der über 80 Jährigen sogar 51%.

1.3.2 Pathogenese

Klassisch können die Ursachen für eine RMR in extrinsische und intrinsische Faktoren unterteilt werden. Zudem kann zwischen einem chronisch-degenerativem und einem akut-traumatischen Ereignis unterschieden werden.

Der bekannteste extrinsische Faktor ist das von Neer 1972 [7] beschriebene Impingement Syndrom. Hier kommt es durch einen Engpass unterhalb des Acromions zur Einklemmung der Rotatorenmanschette. Ursächlich ist hierfür das vordere Drittel des Acromions, welches morphologisch nach Bigliani in drei verschiedene Typen eingeteilt werden kann [58-60]:

- Typ I: flach
- Typ II: gebogen
- Typ III: hakenförmig

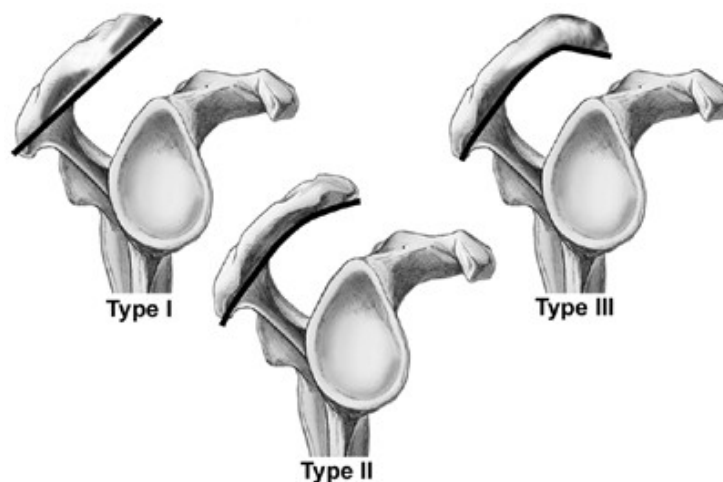


Abbildung 2: Acromiontypen nach Bigliani. Typ I: flach, Typ II: gebogen, Typ III: hakenförmig. Abb. aus [61]

Je nach vorhandener Acromionform steigt das Risiko für eine Ruptur [58, 62, 63], so findet sich beispielsweise ein hakenförmiges Acromion in 70% aller RMR [48]. Zudem scheint laut der Studie von Wang und Shapiro [64] eine Korrelation zwischen den drei Typen und dem Alter zu bestehen. Hier wurden 272 Patienten hinsichtlich der acromialen Morphologie, dem Alter und einer bestehenden Impingementsymptomatik untersucht mit dem Ergebnis eines deutlichen Anstiegs vom Typ III in Patienten älter als 50 Jahre und/oder mit symptomatischen Beschwerden. Andere wichtige extrinsische Faktoren sind außerdem: Os acromiale,

Acromionsporn, mechanische Überbelastung, anteriore Schulterluxationen sowie Rauchen und Diabetes mellitus [48, 59, 65]. Allgemein kann eine RMR jedoch nicht auf einen einzigen Faktor zurückgeführt werden, denn die Ätiologie bleibt immer noch multifaktoriell [48, 66].

Intrinsische Faktoren bezeichnen primäre Veränderungen der Sehne selbst [59, 65, 66]. Hier führen repetitive Mikrotraumata sowie altersbedingte degenerative Veränderungen zu kleinen Teilrupturen, welche sich zu Totalrupturen weiterentwickeln können. Als weitere Ursachen werden oxidativer Stress sowie Veränderungen in Zellzahl und Hypovaskularität diskutiert [48, 65, 67].

1.3.3 Operationsmethoden

In der operativen Versorgung von RMR kommen prinzipiell drei verschiedene Techniken zum Einsatz:

- Offene Rekonstruktion
- Mini-open Technik
- Arthroskopische Rekonstruktion

Durch den heutigen hohen Funktionsanspruch auch im fortgeschrittenen Alter kommt der operativen Versorgung einer RMR eine große Bedeutung zu. Um das passende Behandlungsverfahren zu wählen müssen sowohl die Pathogenese als auch der Aktivitätsgrad des Patienten berücksichtigt werden [68]. Ziel einer operativen Versorgung ist die Eliminierung der Schmerzen und die Verbesserung von Kraft und Bewegung im Schultergelenk [69, 70]. Wichtige Einflussfaktoren auf das postoperative Ergebnis sind hier zum einen die Rupturgröße und zum anderen der Zeitpunkt der Operation, wobei v.a. die Rupturgröße maßgeblich für das Outcome ist [68, 71]. Bei traumatischen Rupturen erfolgt die Versorgung optimalerweise innerhalb der ersten sechs Wochen [72], sobald die freie passive Beweglichkeit wieder erreicht ist. Während der anfänglichen akuten Schmerzphase sollte eine Operation aufgrund des Risikos der Entwicklung einer adhäsiven Kapsulitis vermieden werden [68]. Wird der Operationszeitpunkt erst zu einem späteren Zeitpunkt gewählt, so steigt das Risiko für zunehmende Vergrößerung der Ruptur, Muskelatrophie und fettige Infiltration [73-78]. Früher stellte die klassische offene Rekonstruktion den Goldstandard dar. Durch die Bedürfnisse der Patienten möglichst schnell nach der Operation zurück in den Alltag und in die sportlichen Aktivitäten zurückzukehren, wurden jedoch in den letzten Jahren die arthroskopische und die Mini-open Technik immer populärer [79-81]. Dennoch kommt die offene Rekonstruktion bei großen Rupturen oder stark retrahierten Sehnenstümpfen weiterhin erfolgreich zur Anwendung [69]. Viele Studien zeigen hier gute bis exzellente Ergebnisse mit hoher Patientenzufriedenheit [40, 71, 76, 82]. Nachteil dieses Verfahrens ist die postoperativ auf passive Bewegungen eingeschränkte Beweglichkeit für sechs Wochen [40], verursacht durch die in-

traoperative Spaltung und anteriore Lösung des Deltamuskels. Auch das Ausmaß an postoperativen Schmerzen ist deutlich ausgeprägter als bei arthroskopisch assistierten Techniken [83-85]. Bei der Mini-open Technik wird die subacromiale Dekompression zunächst arthroskopisch durchgeführt. Die Rekonstruktion der Sehne erfolgt anschließend über eine kleine Inzision analog zur offenen Rekonstruktion. Vorteile bei diesem Vorgehen sind, dass der Deltamuskel nicht vom Acromion gelöst werden muss und somit postoperativ eine frühe aktive Beweglichkeit möglich ist [68]. Zusätzlich kann zu Beginn mittels Arthroskop eine glenohumeralen Evaluation durchgeführt werden, was eine bessere Diagnostik intraartikulärer Läsionen bietet [59, 83]. Auch der Wechsel zur klassisch offenen Rekonstruktion ist jederzeit möglich [79]. Die Überlegenheit der Mini-open Technik gegenüber der rein offenen Rekonstruktion konnte vor allem bei Rupturen kleiner als 3 cm gezeigt werden [86, 87], aber auch größere Rupturen zeigen gute Ergebnisse [79]. Die dritte mögliche Operationsmethode ist die arthroskopische Rekonstruktion. Auch hier wird zuerst eine diagnostische Arthroskopie und eine subacromiale Dekompression durchgeführt. Die Mobilisation und Refixierung der Sehne werden anschließend, ebenfalls arthroskopisch, in Single-row oder Double-row Technik durchgeführt [68]. Wenn nötig kann jederzeit auf eine Mini-open Technik gewechselt werden [59]. Vorteile dieser Methode bestehen im unmittelbar postoperativen Verlauf [68]. Durch den geringen Weichteilschaden und den Verzicht auf die Spaltung und partielle Ablösung des Deltoideus sind die Patienten kürzer hospitalisiert und können schneller in den Alltag zurückkehren. Allerdings ist bei dieser Methode der Anspruch an den Operateur höher, die Dauer der Operation ist länger und die Kosten sind höher [74, 80, 88]. Grundlegend zu beachten ist bei allen Methoden, dass die Naht spannungsfrei angelegt wird. Ein wasserdichter Verschluss ist dabei zu vernachlässigen. Zur Fixierung der Sehne am Knochen kommen verschiedene Nahttechniken in Betracht:

- Einfache Naht
- U-Naht nach Walch
- Mason-Allen-Naht [68]

Zusätzlich können Nahtankersysteme verwendet werden, die in Hinsicht auf die Belastung stabiler sind und spannungsärmer angebracht werden können. Hier sind die Materialkosten allerdings höher [9, 70, 89, 90].

1.3.4 Aktuelle Forschung

Trotz der inzwischen vielseitigen Möglichkeiten der operativen Therapie einer RMR zeigt die Literatur dennoch beachtliche Zahlen an Rerupturen [91-93]. Das Risiko schwankt abhängig vom Alter des Patienten und der Rupturgröße bzw. der Anzahl der gerissenen Sehnen zwischen 10% und 50% [6, 92-95]. Cho et al. [94] zeigte beispielsweise eine Defektheilung bei

22,2% in der Gruppe der unter 50-Jährigen, 26% in der Gruppe im Alter zwischen 51 und 60 Jahren und 34,6% in der Gruppe der über 61-Jährigen. Außerdem 3,3% bei kleinen Rupturen, 12,7% bei mittelgroßen Rupturen und 41,2% bei großen Rupturen oder Rupturen mehrerer Sehnen. Harryman et al. [6] zeigten in ihrer Studie eine Fehlerrate von 20% bei alleiniger SSP-Sehnenruptur und über 50% bei Rupturen mehrerer Sehnen. Auch hier korrelierte die Defektrate mit dem Alter des Patienten und der Größe der Ruptur. Bezüglich des Zeitpunkts zeigt die Studie von Iannotti et al. [96], dass das Risiko für eine Reruptur nach arthroskopischer Versorgung innerhalb der ersten 26 Wochen zunehmend ansteigt, wobei sich die Hauptanzahl der Rerupturen innerhalb der 12ten und der 26sten Woche ereignen. Aufgrund der noch nicht zufrieden stellenden Ergebnisse in der Heilung der Sehne hat sich das Augenmerk nun mehr auf die biologischen Aspekte in der Heilungsphase gelegt. Denn trotz optimaler chirurgischer Rekonstruktion entspricht das nachgebildete Gewebe nicht der Qualität des Ursprungsgewebes. Vielmehr findet sich oftmals eine fibrovaskuläre Narbe, welche der mechanischen Belastung nicht standhalten kann und zu unerwünschten Rerupturen führt [97]. Biologische Augmentationsstrategien haben daher das Ziel besseres Reparaturgewebe am Ort des Defektes zu erzeugen und somit die Heilungsrate zu verbessern. Die verschiedenen Ansatzpunkte beziehen sich auf am Heilungsprozess beteiligte Faktoren. Schwerpunkte biologischer Augmentation sind:

- Stammzellen
- Wachstumsfaktoren
- Gentherapie
- Thrombozytenreiches Plasma (PRP)
- EZM Scaffolds

Stammzellen

Grundlegend gibt es zwei Arten von Stammzellen, die embryonalen und die adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und können sich in jegliche Zellen des Ektoderms, Mesoderms und Endoderms weiterdifferenzieren. Im Gegensatz dazu sind die adulten Stammzellen auf die Weiterentwicklung in Zellen eines Keimblattes beschränkt. Aufgrund ethischer Gründe konzentriert sich die Forschung hauptsächlich auf adulte Stammzellen [98]. Hiervon spielen v.a. die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) eine Rolle, die sich in Knochen-, Sehnen-, Muskel-, Knorpel- und Fettgewebe differenzieren können [99-101]. Durch entsprechende Stimulation kann die Entwicklung der Stammzelle in das gewünschte Gewebe gesteuert werden [98, 102, 103]. MSCs können autolog aus dem Knochenmark (Beckenkamm oder proximaler Humerus) oder dem Fettgewebe gewonnen werden [98, 104-106]. Als mögliche Quellen werden inzwischen auch Muskeln und Sehnen der RM, Synovia und die

subacromiale Bursa untersucht [103, 107-110]. Mit den gewonnenen Stammzellen besteht anschließend die Möglichkeit der direkten Applikation in den Defekt, z.B. durch injizieren der MSCs in die geschädigte Sehne oder das Einfügen einer mit MSCs besäten Trägermatrize (Scaffold) in den Sehnendefekt [100].

Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren beeinflussen als Signalmoleküle das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung [100, 101]. Sie spielen im Heilungsprozess der Sehne eine wichtige Rolle, indem sie die Neovaskularisation, Chemotaxis, Proliferation von Fibroblasten und die Kollagensynthese indizieren [100, 111]. Dies erfolgt durch die primäre Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Leukozyten und Makrophagen bei lokaler Gewebeschädigung und Entzündung [98, 111, 112]. Die freigesetzten Wachstumsfaktoren binden anschließend über Rezeptoren an umliegende Zellen und führen zu intrazellularen Veränderungen wie der DNA-Synthese und der Zellexpression [113, 114]. *Epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) führen beispielsweise zu einer Steigerung der Fibroblastenproliferation und der EZM-Produktion [100, 101, 112, 115]. *Insulin-like growth factor* (IGF) wiederum steigert die Migration und Teilungsrate der Tenozyten sowie deren Expression an EZM Bestandteilen [112, 116, 117]. IGF-1 induziert die Kollagen- und Proteoglykansynthese [114, 116] und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) führt zu Angiogenese und erhöhter Kapillarpermeabilität [118-121]. Auch *bone morphogenic proteins* (BMPs) spielen nach neuerem Wissen nicht nur in der Knochenheilung eine Rolle, sondern durch die Induktion von Chemotaxis, Angiogenese und Kollagenproduktion auch in der Wundheilung [103, 122]. Eine Überaktivität von Wachstumsfaktoren kann allerdings auch negative Auswirkungen auf die Sehnenheilung haben. *Transforming growth factor β* (TGF- β) beispielsweise führt zwar einerseits zu einer Steigerung der Kollagensynthese der Tenozyten kann aber andererseits je nach Dosis auch zu Narbengewebe und Fibrose führen [98, 103, 123]. Viele Wachstumsfaktoren regulieren sich gegenseitig oder wirken in Kombination mit Anderen [113, 117]. Die Wachstumsfaktoren können direkt lokal auf das verletzte Gewebe appliziert werden. Dies kann mittels Injektion, imprägniertem Nahtmaterial oder Scaffolds erfolgen. Der Nachteil ist die deutlich zu kurze Verweil- und Funktionsdauer der applizierten Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Dauer der Sehnenheilung [100].

Gentherapie

Die Gentherapie beschreibt das Einbringen von genetischer Information in eine Zelle, um deren Funktion oder Synthese zu verändern [100]. Hierfür werden bevorzugt virale Vektoren verwendet, aber auch die Verwendung von Liposomen ist möglich [101, 124-128]. Der Gen-

transfer kann *in vivo* oder in *ex vivo* Technik durchgeführt werden. Bei der *in vivo* Methode werden die Gene direkt in das Gewebe appliziert. Der Vorteil darin besteht in der weniger invasiven und einfacheren Technik, sowie der Kompatibilität mit der akuten Verletzungsphase. Der Nachteil ist, dass unspezifisch Zellen injiziert werden und der Gentransfer nicht nachgewiesen werden kann. Bei der *ex vivo* Technik werden die Zielzellen erst aus dem Körper isoliert, im Labor mit dem gewünschten Gen versehen und dann zurück in den Körper gegeben. Vorteil ist der explizite Nachweis über die erfolgreiche Transduktion [100, 103]. Für die Sehnenheilung spielt das Einbringen der genetischen Informationen für Wachstumsfaktoren in Tenoblasten eine Rolle. Die modifizierten Zellen stimulieren durch Synthese der Wachstumsfaktoren die umliegenden Zellen zu vermehrter DNA- und Kollagensynthese und fördern dadurch den Heilungsprozess [129]. Im Gegensatz zur reinen Applikation von Wachstumsfaktoren kann mit Hilfe der Trägerzelle die Wirkung über einen längeren Zeitraum gewährleistet werden, da eine stetige Synthese stattfindet solange die Zelle lebt [100, 103]. Andere Einsatzmöglichkeiten in der Gentherapie ist die kontrollierte Steuerung der Differenzierung von MSCs in das Wunschgewebe, wie Tenozyten für die Sehnenheilung [100].

PRP

Platelet-rich-plasma beinhaltet eine hohe Konzentration an Thrombozyten, die bei Aktivierung Wachstumsfaktoren freisetzen [98]. Dazu gehören unter anderem PDGF, EGF, VEGF und TGF- β . Durch die erhöhte Konzentration an der Defektstelle soll der natürliche Heilungsprozess beschleunigt werden [130, 131]. Die freigesetzten Wachstumsfaktoren führen zu erhöhter Zellproliferation und vermehrter Bildung der EZM [98, 131]. Das PRP wird autolog vom Patienten aus Vollblut gewonnen. In der Herstellung gibt es verschiedene Möglichkeiten. Momentan existieren vier verschiedene PRP Zusammensetzungen: *pure PRP* (P-PRP), *leucocyte-rich PRP* (L-PRP), *pure platelet-rich fibrin* (P-PRF) und *leucocyte-rich platelet-rich fibrin* (L-PRF). Außerdem kann jeweils unterteilt werden ob das PRP mit autologem Thrombin kombiniert ist und somit die Aktivierung bereits *ex vivo* stattfindet oder ohne Kombination und die Aktivierung erst *in vivo* erfolgt [132-134]. Als Injektion oder in Form eines Scaffolds wird das PRP am Ende der Operation zwischen Knochen und der genähten Sehne angebracht [98, 130].

EZM Scaffolds

Scaffolds fallen streng genommen unter die Bezeichnung Tissue Engineering, welches die Anwendung von Scaffolds, Wachstumsfaktoren, die direkte Zellaussaat oder eine Kombination dieser Methoden beschreibt [135]. Der Übergang zur biologischen Augmentation ist jedoch fließend. Das Prinzip der Scaffolds besteht darin mit Hilfe einer Trägermatrize natürli-

ches oder künstliches Gewebe in einen Defekt einzubringen und diesen zu füllen. Es können zwei verschiedene Materialgrundlagen verwendet werden. Zum einen biologisches Gewebe wie menschliche oder tierische Dermis, intestinale Submukosa oder Pericard [136]. Zum anderen synthetisches Gewebe aus Polyester, Polymilchsäure oder Kohlenstoffverbindungen wie Polyethylene [135-137]. Bei biologischen Scaffolds muss das Grundlagengewebe noch über verschiedenen Prozesse gereinigt werden [138]. Hintergrund ist, dass zurückbleibendes Fett, Zellen und DNA-Material zu Immunreaktionen führen würden, weshalb das Endprodukt nur noch aus der EZM bestehen darf, vornehmlich aus Kollagenfasern (Typ I) [136]. Die dreidimensionale Struktur des Scaffolds bietet umliegenden Zellen zahlreiche Anheftungsmöglichkeiten, wodurch eine schnelle mechanische Stabilität gewährleistet wird [100]. Nach dem Einsetzen wird das Material nach und nach abgebaut. Während dieses Prozesses werden Wachstumsfaktoren aus der Scaffold EZM freigesetzt, die die Angiogenese, Zelldifferenzierung und die Remodelierung fördern [139]. Durch ihren positiven Einfluss auf die Remodelierung in der Heilungsphase der Sehne stellen Scaffolds aus EZM die momentan meist verwendeten Scaffolds dar [135, 140]. Für die Augmentation stehen diese als Xenograft, Allograft oder synthetische EZM zur Verfügung [138].

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Obwohl sich die therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung von Rotatorenmanschettenrupturen über viele Jahre entwickelt und optimiert haben erscheint die große Anzahl an Rupturen nicht zufrieden stellend [6, 91, 92, 94, 141]. Daher hat sich das Bewusstsein nun mehr in den Bereich der biologischen Aspekte verschoben, um den Vorgang der eigentlichen Sehnenheilung zu verbessern [101, 138, 142-144].

Ziel der Arbeit ist es herauszufinden, ob eine Präparation am Footprint Auswirkungen auf die Einheilung der Supraspinatussehne in den Knochen hat. Einige Studien zeigten bereits positive Effekte in der Augmentation mit Stammzellen, Wachstumsfaktoren und thrombozytenreichen Plasma [130, 145-150]. Für die Verwendung eines Hochfrequenzablationsgerätes bei der RM-Rekonstruktion finden sich in der Literatur bisher keine einheitlichen Empfehlungen [151-154]. Es sollen daher zwei Methoden zur Präparation getestet werden und mit der reinen Refixierung der Sehne verglichen werden. Die Hypothesen lauten wie folgt:

1. Durch das Aufbrechen der Kortikalis und dem Freilegen der darunter liegenden Spongiosa, im Folgenden nur noch als Spongialisierung bezeichnet, können Wachstumsfaktoren und Stammzellen aus dem Knochenmark zur Stelle des Heilungsprozesses auswandern und folglich den Prozess der Einheilung verbessern. **Die Methode der Spongialisierung zeigt daher ein besseres Outcome als die reine Refixierung der Sehne.**

2. Durch die Verwendung eines Hochfrequenzablationsgerätes werden potenzielle Zellen und körpereigenes Gewebe zerstört, was zu einer Verzögerung des Heilungsprozesses führt. **Diese Methode zeigt daher ein schlechteres Outcome als die alleinige Refixierung der Sehne**, wo auf ein solches Gerät während der Operation verzichtet wird.

2 Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln wird nun genau auf den Aufbau der Arbeit, so wie die Durchführung der verschiedenen Schritte im Versuchsablauf eingegangen.

2.1 Tiermodell

Aufgrund bisheriger Studien wurde für diese Arbeit ein Tiermodell mit Ratten gewählt [155-157]. Die entscheidende Rolle spielte dabei die anatomische Ähnlichkeit der Schulter zum Menschen, so wie die gleichzeitig ausreichende Größe der zu untersuchenden Strukturen.

Als Versuchstiere dienten 24 weibliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley mit einem Durchschnittsgewicht von 250g.

Alle Tiere wurden im Walter-Brendel Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) gemäß den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten.

2.2 Versuchsaufbau

Es wurden drei verschiedene Operationstechniken zur Refixierung der Sehne nach simulierter Rotatorenmanschettenruptur getestet. Hierfür wurden die Tiere randomisiert in drei Hauptgruppen eingeteilt:

- Spongialisierungsgruppe
- Hochfrequenzablations (HF-) Gruppe
- Kontrollgruppe

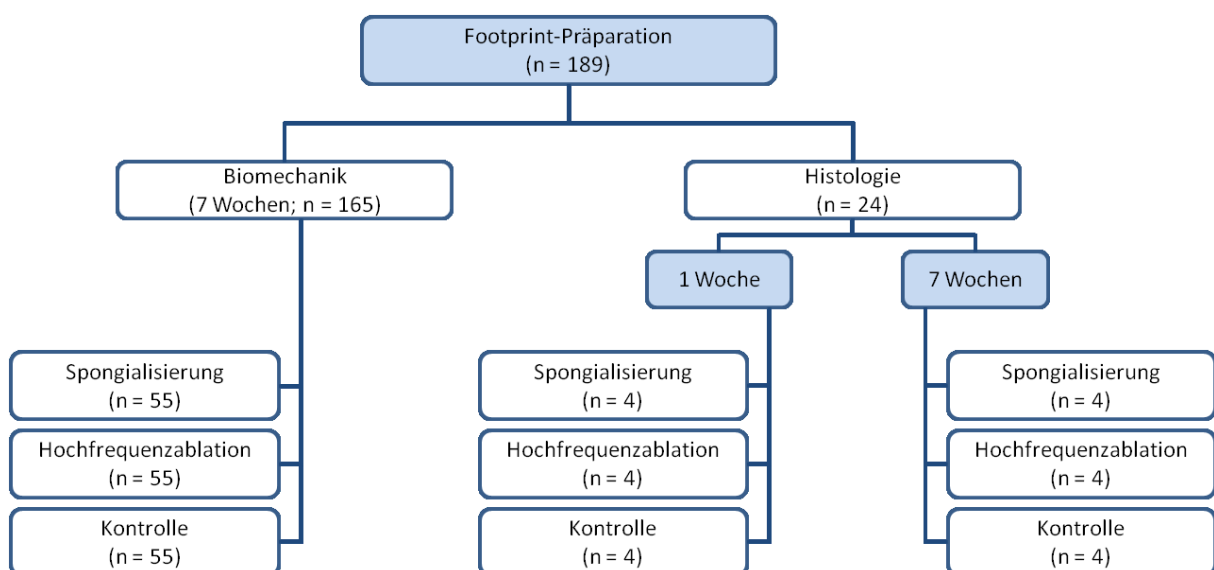


Abbildung 3: Studiendesign mit den unterschiedlichen Aufteilungen in die Gruppen und Untergruppen.

Die Auswertung gliederte sich in einen biomechanischen und einen histologischen Teil. Die biomechanische Testung fand 7 Wochen postoperativ statt und wurde in einer separaten Arbeit von Thomas Loitsch behandelt. Für die histologische Auswertung wurden pro Operationsmethode jeweils vier Tiere nach einer Beobachtungszeit von einer Woche und vier Tiere nach einer Beobachtungszeit von sieben Wochen getötet und das zu untersuchende Material entnommen. Die Proben, bestehend aus Humerus, Supraspinatussehne und M. Supraspinatus, wurden im Anschluss zu histologischen Schnitten aufbereitet. Pro Untergruppe wurden die histologischen Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin (HE), Safranin-O/Fast Green und Picrosirius-Red angefertigt. Hinzu kamen immunhistochemische Färbungen für die Kollagene I, II und III. Im Anschluss wurden die gefärbten Präparate zum einen histologisch am Mikroskop untersucht und zum anderen mithilfe von Computersoftware (s.u.) vermessen. Mit den Messergebnissen der Computersoftware wurde zusätzlich eine Statistik durchgeführt. Entsprechend den Ergebnissen der Auswertung konnten die Operationsmethoden hinsichtlich ihres Heilungspotentials der Sehne am Footprint evaluiert und diskutiert werden.

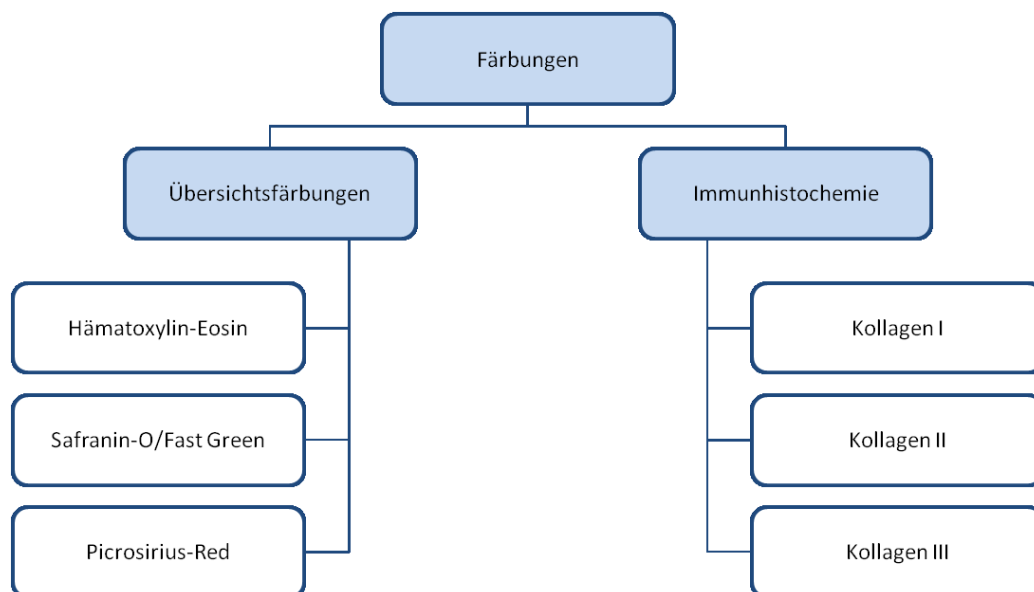


Abbildung 4: Schematische Übersicht über alle durchgeführten Färbungen.

Die operativen Versuche wurden in der Versuchstieranlage des Walter-Brendel Zentrums der LMU durchgeführt. Die weitere Verarbeitung der Proben, sowie die histologische Aufarbeitung und Auswertung fanden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der LMU statt.

2.3 Operationsverfahren

Alle Tiere hatten nach Lieferung eine Akklimatisierungszeit von mindestens einer Woche bevor sie der Operation unterzogen wurden.

2.3.1 Narkose und Operationsvorbereitung

Die Narkoseeinleitung fand in einer für die Ratten angefertigten Plastikbox mittels Isofluran statt. Hierfür wurden die Tiere in die Box gesetzt und anschließend über einen Verbindungsschlauch mittels Verdampfer Isofluran zugeleitet. Dem schlafenden Tier wurde anschließend zur Narkoseunterstützung zusätzlich intramuskulär 50 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid, so wie zur Infektionsprophylaxe subkutan 2,5 mg/kg KG Enrofloxacin gespritzt. Während der Operation wurde die Narkose mittels einer passenden Nasenmaske mit Isofluran und Sauerstoff aufrechterhalten.

Die Schulterpartie wurde auf der zu operierenden rechten Seite großflächig rasiert und anschließend desinfiziert. Das Tier wurde in lateraler Seitenlage mit leicht erhöhtem Oberkörper auf sterilen Tüchern positioniert. Unterhalb der Tücher befand sich eine Wärmedecke, um ein intraoperatives Auskühlen zu vermeiden.

Zum Schutz der Augen vor dem Austrocknen wurde Bepanthen Augensalbe aufgetragen.

2.3.2 Chirurgische Präparation und Nachversorgung

Alle Operationen wurden von derselben Person (PD Dr. med. Andreas Ficklscherer) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach dem Hautschnitt wurde der M. deltoideus in Faserrichtung gespalten, um die Sicht auf die Rotatorenmanschette frei zu legen. Die Klavikula wurde am AC-Gelenk abgetrennt und die Supraspinatussehne vorsichtig freigelegt. Das distale Ende der Sehne wurde mit einer Mason-Allen-Naht versehen und anschließend vom Footprint scharf abgetrennt. Das abgetrennte Sehnenende wurde zur Seite geklappt und der Footprint freigelegt. Abhängig davon welcher Gruppe das Tier zugeordnet war erfolgte die entsprechende Präparation. In der Spongialisierungsgruppe wurde mit Hilfe einer feinen (1,8 mm-) Fräse (s.u.) im gesamten Bereich am Tuberculum majus der Knochen bis auf die Spongiosa aufgebrochen. In der HF-Gruppe erfolgte unter Verwendung eines monopolareren Hochfrequenzablationsgerätes (s.u.) die Verödung von verbliebenem Weichteilgewebe auf dem Footprint. In der Kontrollgruppe erfolgte keine Präparation. Für die Refixierung wurden auf dem Tuberculum majus, jeweils 2 mm von der Gelenkfläche entfernt, zwei schräge 0,5 mm große Löcher gebohrt, um einen Knochentunnel zu erhalten. Die beiden Nahtenden der Supraspinatussehne wurden hindurchgeführt und auf dem Humerus verknotet. Auf diese Weise wurde die abgetrennte

Sehne wieder an ihre ursprüngliche, nun verschieden präparierte, Insertionsstelle platziert. Der M. deltoideus wurde anschließend mit einem 4-0 Ethibond Faden (s.u.) verschlossen und die Haut mit einem resorbierbaren 4-0 Monocryl Faden (s.u.) vernäht. Abschließend wurde ein Sprühpflaster aufgetragen.

Noch in Narkose wurden die Tiere gewogen und am Ohr markiert. Die Narkoseausleitung erfolgte unter Beobachtung in einer geräumigen und gepolsterten Box unter einer Wärmelampe (30°C). Nach ausreichendem Erwachen wurde das Tier zurück in den Käfig gesetzt.

Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) direkt, als auch wiederholt nach 6 und 12 Stunden subkutan gespritzt. Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere zusätzlich zur präoperativen subkutanen Gabe nochmals Enrofloxacin 12,5 mg/kg KG oral im Rahmen des Trinkwassers.

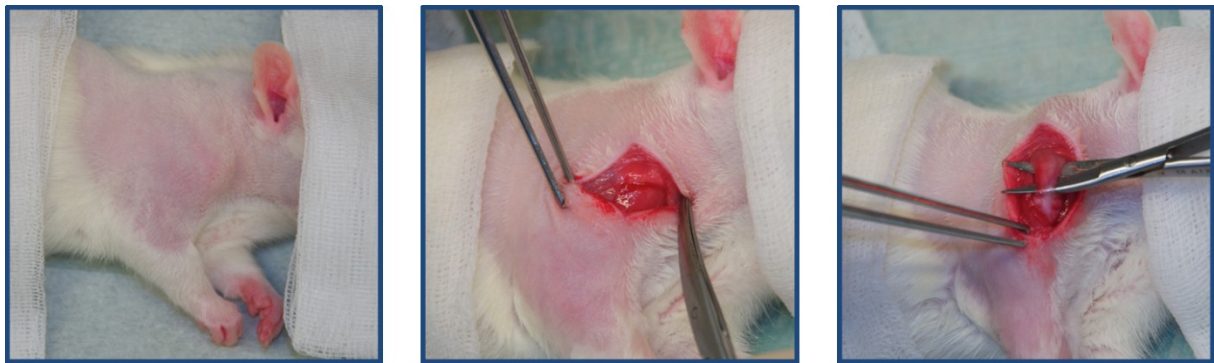


Abbildung 5: Im linken Bild sieht man das narkotisierte Tier. Der OP-Bereich ist rasiert und desinfiziert. Das mittlere Bild zeigt den Blick auf die eröffnete RM. Im rechten Bild ist der M. supraspinatus dargestellt.

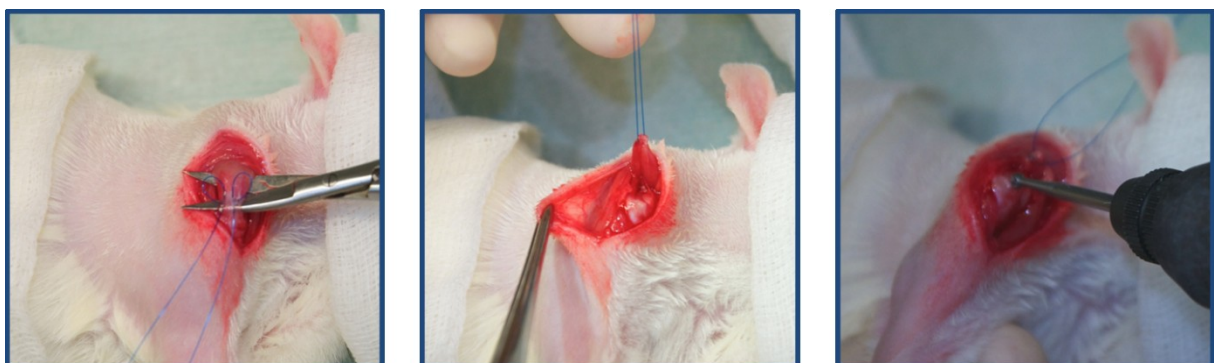


Abbildung 6: Das linke Bild zeigt die Mason-Allen-Naht am M. supraspinatus bevor er wie im mittleren Bild dargestellt abgetrennt wird. Im rechten Bild wird der Footprint spongialisiert (nur in der Spongialisierungsgruppe).

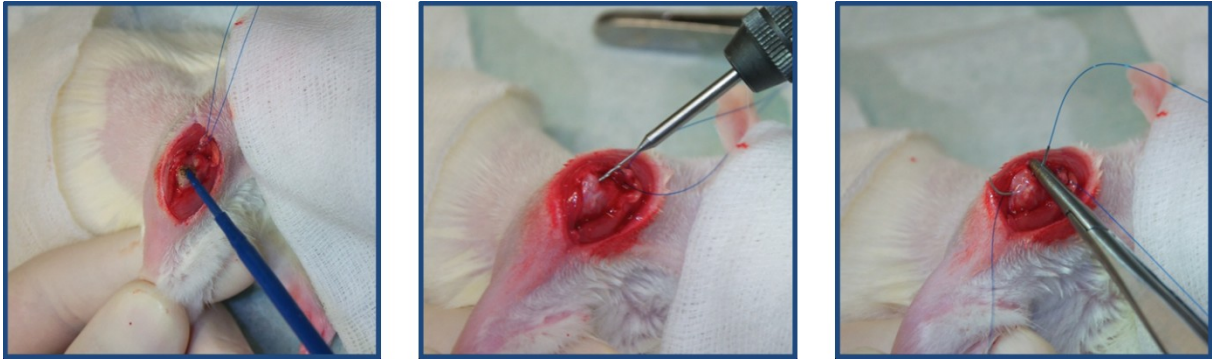


Abbildung 7: Im linken Bild wird der Footprint mit dem HF-Gerät bearbeitet (nur in der HF-Gruppe). Im mittleren Bild werden die Löcher für die transossäre Naht zur Sehnenrefixierung gebohrt. Das rechte Bild zeigt das Durchfädeln der Nahtenden durch die gebohrten Löcher.

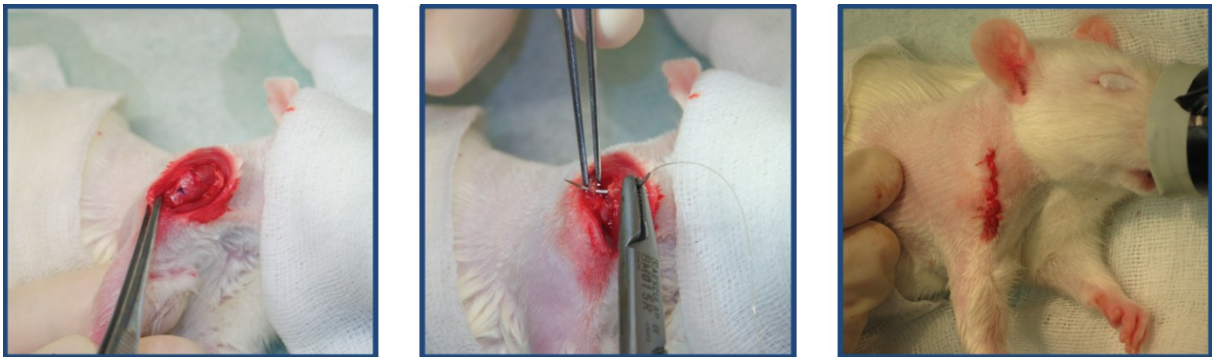


Abbildung 8: Im linken Bild sieht man die refixierte Sehne. Das mittlere Bild zeigt den Verschluss des gespaltenen M. deltoideus. Im rechten Bild sieht man das noch narkotisierte Tier nach der Hautnaht.

2.3.3 Euthanasie und Probenentnahme

Sowohl nach einer Woche als auch nach sieben Wochen postoperativ erfolgte die Euthanasie und die Probenentnahme. Die Tiere wurden mittels Isofluran leicht narkotisiert und anschließend mit einer Überdosis an Pentobarbital getötet. Jedes Tier wurde erneut gewogen und anschließend die operierte Schulter entnommen. Sorgfältig wurden hierbei der Humerus mit Supraspinatussehne und dazugehörigem Muskel vom restlichen Gewebe getrennt. Die Proben wurden zur Fixierung in gepuffertes Formalin 4% eingelegt und für 1-3 Tage im Kühlschrank gelagert.

2.4 Histologie und Immunhistochemie

Für die histologischen Färbungen wurden jeweils so viele Schnitte angefertigt und gefärbt, dass am Ende für jede Probe pro Färbung mindestens zehn auswertbare, gefärbte Schnitte vorhanden waren. Alle Arbeits- und Färbeprotokolle können im Anhang im Detail nachgelesen werden.

2.4.1 Anfertigung der mikroskopischen Schnittpräparate

Nach der Probenentnahme und Fixierung des Materials in gepuffertem Formalin 4% wurden die Rattenoberarme zur Entkalkung in EDTA/Zitronensäure eingelegt und für weitere drei Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Einmal pro Woche wurde die Lösung gewechselt, um ein erfolgreiches entkalken zu fördern. Nach Ablauf der drei Wochen wurde der Status mithilfe einer dünnen Nadel am Knochen getestet. Nicht genügend entkalkte Proben wurden für eine weitere Woche zurück in die Lösung gelegt.

Die entkalkten Proben wurden nach Zurechtschneiden des Humerusschafts auf eine kürzere Länge in beschriftete Makroeinbettkästen umgelagert und unter fließendem Wasser für zwei Stunden gewässert. Anschließend wurden sie in 70% Alkohol gelegt und im Kühlschrank bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Mithilfe eines Vollautomaten (s.u.) wurden die Proben anschließend entwässert und mit Paraffin getränkt. Automatisch durchliefen die Proben die am Automaten eingestellten Schritte über mehrere Stunden. Begonnen wurde mit zweimal 70% Alkohol für jeweils zwei und eine Stunde, gefolgt von 96% Alkohol für dreimal jeweils eine Stunde. Anschließend folgte 100% Alkohol, ebenfalls dreimal für eine Stunde. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe folgten zweimal für jeweils 1,5 Stunden das Einlegen in Rotihistol und abschließend zweimal für erneute 1,5 Stunden das Tränken in flüssigem Paraffin. Der gesamte Durchlauf wurde über Nacht durchgeführt, so dass die frisch in Paraffin getränkten und warmen Proben am nächsten Morgen zügig weiterverarbeitet werden konnten.

Hierbei wurden die Proben in erwärmten Metallkassetten positioniert und mit flüssigem Paraffin übergossen, wenn nötig nachpositioniert, die Kassette zum späteren Einspannen in das Schneidemikrotom (s.u.) angedrückt und dann auf einer gekühlten Arbeitsfläche für ca. drei Stunden zum Abkühlen gelagert. Anschließend wurden die Paraffinblöcke aus den Metallkassetten gelöst und bis zum Schneiden an einem kühlen Ort gelagert.

Im nicht gekühlten Zustand wurden die Blöckchen bis zur gewollten Stelle mittels eines Rotationsmikrotoms angeschnitten und dann für ca. eine halbe Stunde bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden am gefrorenen Paraffinblock Serienschritte in einer Dicke von 5 µm angefertigt. In einem mit Aqua Dest. gefülltem und auf 45°C erhitzten Wasserbad wurden die Schnitte zum Strecken eingelegt bevor sie anschließend auf Objektträger aufgezogen und zum Trocknen auf eine Wärmeplatte, ebenfalls auf 45°C erwärmt, gelegt wurden.

Getrocknete Schnitte wurden in Glasküvetten einsortiert und weiter über Nacht im Trockenschrank bei 50°C gelagert.

Schwierigkeiten lieferten zum Teil trotz Entkalkung und der Verwendung von Mikrotommes- ser für extra hartes Gewebe der Knochen im Präparat. Um das Herausbrechen der Proben aus dem Paraffinblock zu vermeiden und gute Schnitte zu ermöglichen wurden die entspre- chenden Blöcke erneut über Nacht im Wärmeschränk bei 37°C in die entkalkende Lösung eingelegt. Am nächsten Tag wurden die Blöcke anschließend sofort eingefroren und dann geschnitten.

Beim Wasserbad musste sehr darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen im Wasser vorhanden sind, da sich diese in den Schnitten ablagern und der Schnitt dadurch nicht durchgehend am Objektträger haftet. In diesem Fall würde sich der Schnitt bei den Färbun- gen vom Objektträger lösen und der Schnitt wäre zerstört.

Ein anderes Problem zeigte sich beim Einfrieren der Blöckchen. Da sich an den Blöckchen glatte und gute Schnitte nur am stark gekühlten Block herstellen ließen musste der Block in gekühltem Zustand geschnitten werden. Sobald der Block sich erwärmte kräuselte sich der Schnitt zu stark, um sich wieder faltenfrei im Wasserbecken zu entrecken. Gleichzeitig ver- änderte sich die Schnittdicke durch Ausdehnung und eine Dicke von 5 µm war nicht mehr gewährt. Daher musste der Block zwischenzeitlich immer wieder eingefroren werden bevor weitergeschnitten werden konnte. Hieraus entwickelte sich das Problem, dass sich der ge- samte Block irgendwann von seiner Halterung, welche zum Einspannen in das Mikrotom nötig ist, löste. Sobald daher der Eindruck entstand, dass der Block nicht mehr fest an seiner Halterung klebte wurde er manuell herausgebrochen und anschließend mit Acrylkleber wie- der angeklebt. Hierdurch konnte ein versehentliches Ablösen während dem Schneiden und somit ein unkontrolliertes Schneiden in den Block mit dem Messer vermieden werden.

2.4.2 Histologische Übersichtsfärbungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wurde mithilfe eines Färbeautomaten (s.u.) durchgeführt. Die Tauchzeit pro Lösung betrug drei Minuten und die Abtropfzeit 12 Sekunden. Insgesamt dauerte ein Färbe- durchgang ca. eine Stunde. Begonnen wurde zunächst mit der Entparaffinierung. Hierzu durchliefen die Schnitte folgende Lösungen in der beschriebenen Reihenfolge: Rotihistol, Rotihistol, 100% Alkohol, 100% Alkohol, 96% Alkohol, 70% Alkohol. Anschließend folgte der eigentliche Färbevorgang mit drei Küvetten an Hämalaun Farblösung (vorher filtriert), gefolgt von zwei Küvetten, die mit Leitungswasser gespült wurden und abschließend einer Küvette Eosin Farblösung. Der letzte Teil diente dem Entwässern mit dreimal 100% Alkohol und zweimal Rotihistol. Anschließend wurden die Schnitte mit DPX eingedeckt und 48 Stunden zum Trocknen gelegt.

Safranin-O/Fast Green-Färbung

Für die Safranin-O/Fast Green-Färbung erfolgte die Entparaffinierung manuell nach folgendem Schema: 2 x 10 Minuten Rotihistol, 2 x 5 Minuten 100% Alkohol, 5 Minuten 96% Alkohol, 5 Minuten 70% Alkohol. Anschließend kamen die Schnitte für ein bis fünf Minuten in Aqua Dest. Danach erfolgte die Safranin-O-Färbung mit 10 Minuten 1,5% Safranin-O Farblösung (filtriert) gefolgt von drei Küvetten Aqua Dest. mit jeweils 8 x dippen zum Auswaschen der überschüssigen Farbe. Die Fast Green-Färbung folgte sofort im Anschluss mit 10 Sekunden verbleiben der Schnitten in 0,02% Fast Green Farblösung (filtriert) und anschließend 8 x dippen in 1% Essigsäure. Es folgte erneutes Auswaschen in Aqua dest. mit 6 x dippen und die aufsteigende Alkoholreihe mit 96%, 100%, 100% mit jeweils 8 x dippen. Abschließend verblieben die Schnitte ein bis fünf Minuten in Rotihistol, wurden mit DPX eingedeckt und anschließend 48 Stunden getrocknet.

Picrosirius-Red-Färbung

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte nach dem üblichem manuellen Schema (siehe Safranin-O/Fast Green-Färbung). Im Anschluss erfolgte die eigentliche Färbung, wofür die Schnitte 15 Minuten in Weigert's Hämatoxylin verblieben und anschließend unter fließendem Leitungswasser für weitere 15 Minuten gewässert wurden. Daraufhin folgten 40 Minuten in der Picrosirius-Red Farblösung. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in 0,5% Essigsäure gedippt, kurz über mehrmaliges dippen in Aqua Dest. gespült und durchliefen dann eine aufsteigende Alkoholreihe mit 5 Minuten 96%, 5 Minuten 100% und zweimal 10 Minuten Rotihistol. Es folgte das Eindecken mit DPX und das Trocknen der Schnitte.

2.4.3 Immunhistochemische Färbungen

Kollagen II Färbung

Für die Kollagen II Färbung wurden zu Beginn verschiedene Kombinationen an Enzymen getestet bis das eigentliche Protokoll festgelegt wurde. Es wurden die Kombinationen aus jeweils Hyaluronidase und Proteinase mit Chondroitinase AC und Chondroitinase ABC getestet. Beste Ergebnisse wurden mit der Kombination aus Proteinase und Chondroitinase AC erzielt. Zu Beginn wurden die Schnitte wie üblich zuerst in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Der Vorgang verlief wie folgt: 2 x 10 Minuten Rotihistol, 2 x 5 Minuten 100% Alkohol, 5 Minuten 96% Alkohol, 5 Minuten 70% Alkohol. Im Anschluss begann die eigentliche Immunhistologie.

Die Schnitte wurden 10 Minuten in Waschpuffer gelegt. Anschließend wurde auf die Schnitte als erstes Enzym Proteinase XXIV pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach

wurden die Schnitte wieder für 2 x 5 Minuten in Waschpuffer getaucht bevor sie für 30 Minuten in ein Gemisch aus Methanol und H₂O₂ bei Raumtemperatur gelegt wurden. Nach 2 x 5 Minuten Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Enzym Chondroitinase AC für erneute 30 Minuten bei 37°C. Nach dem üblichen tauchen in Waschpuffer wurde nun ein Gemisch aus Pferde- und Ziegenserum auf die Präparate pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ohne zwischenzeitliches Waschen wurde im Anschluss der primäre Antikörper, Kollagen II, aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Kontrolle, welche bei jedem Vorgang mitlief wurde nur mit Ak-Verdünnerlösung versehen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder für 2 x 5 Minuten gewaschen und im Anschluss biotinylierter horse-anti-mouse-Antikörper als sekundärer Antikörper aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wieder gewaschen und die Schnitte für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur mit ABC-Komplex versehen. Es folgte der entscheidende Schritt des Sichtbarwerdens der Färbung mit Impact DAB, welches für 5 Minuten im Dunkeln aufgetragen wurde. Die Präparate wurden anschließend sofort in Aqua Dest getaucht, um die Farbreaktion zu stoppen und eine Überfärbung zu vermeiden. Dann wurde für 30 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und danach für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser die überschüssige Farbe entfernt.

Abschließend folgte das übliche Durchwandern der aufsteigenden Alkoholreihe mit: 5 Minuten 70% Alkohol, 5 Minuten 80% Alkohol, 5 Minuten 96% Alkohol, 2 x 5 Minuten 100% Alkohol und 2 x 10 Minuten Rotihistol. Schließlich wurden die Präparate mit DPX und Deckgläschen versehen.

Kollagen I und III Färbungen

Für die Kollagen I und Kollagen III Färbung wurden ebenfalls verschiedenen Kombinationen an Enzymen mit und ohne zusätzlicher Hitze getestet. Die alleinige Kombination aus Hitze mit einem weiteren Enzym erbrachte keine zufriedenstellende Färbeergebnisse, ebenso wenig wie die Kombination aus nur zwei Enzymen ohne zusätzliche Hitze. Daher wurde schließlich ein Protokoll mit der Kombination aus Hitze und zwei weiteren Enzymen gewählt. Beste Ergebnisse erzielte hier die Kombination mit Proteinase XXIV und Hyaluronidase.

Bevor die Schnitte den Färbedurchgang durchliefen wurden sie in den Tagen davor mehrmals bei 50°C im Trockenschrank gelagert und wieder herausgenommen und abgekühlt, um das Haften des Gewebes am Objektträger zu verbessern.

Der Entparaffinierungsvorgang wurde entsprechend dem Protokoll für Kollagen II durchgeführt.

Nach 10 Minuten Waschpuffer wurden die Präparate für 20 Minuten im Dampfgarer, eingelegt in EDTA Puffer (PH 8), gekocht und anschließend im Puffer verbleibend für weitere 20 Minuten abgekühlt. Danach wurden die Schnitte für 2 x 5 Minuten im Waschpuffer neutralisiert und anschließend das Enzym Proteinase XXIV aufgetragen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang verblieben die Präparate für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Methanol-H₂O₂-Gemisch, gefolgt von 2 x 5 Minuten Waschpuffer. Anschließend wurde das zweite Enzym Hyaluronidase auf die Schnitte pipetiert und erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 2 x 5 Minuten Eintauchen in die Waschpufferlösung wurden Pferde- und Ziegenserum aufgetragen und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gewartet. Abschließend für Tag eins wurden die primären Antikörper für Kollagen I oder III aufgetragen und die Kontrolle mit Antikörperverdünnerlösung versehen. Tag zwei im Färbeprozess gleich dem Protokoll der Kollagen II Färbung. Die einzige Abweichung findet sich hier in der Inkubationszeit für Impact DAB, welches bei Kollagen I 4 Minuten betrug und bei Kollagen III nur 3 Minuten.

Das Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken der Präparate erfolgten ebenfalls in der gleichen Vorgehensweise wie bei Kollagen II.

2.5 Auswertungsmethoden und Datenerhebung

2.5.1 Auswertung der Histologie

Die Auswertung der histologischen Übersichtsfärbungen wurden sowohl am Lichtmikroskop (s.u.) als auch an mit einer Kamera (s.u.) aufgenommenen Bildern durchgeführt. Zuvor wurden für die jeweiligen Färbungen Kriterien festgelegt nach welchen die Schnitte beurteilt werden sollten. Alle Präparate wurden mehrmals und ohne Wissen der Gruppenzugehörigkeit unter denselben Bedingungen bewertet. Für jede Untergruppe wurden mindestens 20 Schnitte in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Safranin-O/Fast Green-Färbung ausgewertet so wie 10 Schnitte in der Picrosirius-Red-Färbung.

Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In Anlehnung an die von einigen anderen Studien verwendete semiquantitative Beurteilungsskala [158-163], sowie unter Berücksichtigung der operativen Vorgehensweisen wurden die Schnitte in der HE-Färbung auf folgende Kriterien untersucht:

- Intaktheit der Epiphysenfuge
- Vorhandensein von Zysten
- Vaskularisation
- Zellhäufung und Entzündungsreaktion

- Organisation der Sehnenfasern
- Erfolgreiches Anwachsen der Sehne
- Auftreten von Bindegewebe um die Insertionsstelle
- Gesamteindruck des Schnittes

Auswertung der Safranin-O/Fast Green-Färbung

In der Safranin-O/Fast Green Färbung wurde zum einen die Knorpelstruktur nach folgenden Kriterien untersucht:

- Vorhandensein von Clustern/Gruppen
- (Un-)Regelmäßigkeit in der Anordnung der Chondrone
- Hyper-/ Hypozellularität der Knorpelzellen

Da sich außerdem die Anfärbbarkeit proportional zur Menge an Proteoglykanen verhält, wurden zum anderen folgende Färbemöglichkeiten unterschieden:

- Rot = normaler Proteoglykangehalt
- Hellorange = leicht reduzierter Proteoglykangehalt
- Weiß = stark reduzierter Proteoglykangehalt
- Blau/blaugrün = kein Proteoglykangehalt

Zusätzlich wurde die Mineralisierungsschicht beurteilt.

Die Auswahl der Auswertungskriterien erfolgte sowohl mit Hilfe verschiedener Scores zur Beurteilung der Knorpelstruktur (ICRS II, MODS) [164-166], als auch orientiert an den Merkmalen der histologischen Schnitte. Kriterien der Scores, welche nicht beobachtet werden konnten wurden nicht weiter berücksichtigt.

Auswertung der Picrosirius-Red-Färbung

In der Picrosirius-Red-Färbung wurden zusätzlich und detaillierter zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Ordnungsgrad der Sehnenfasern am Ansatz bestimmt. Hierfür wurde die normale Färbung sowie zusätzlich das Präparat unter polarisiertem Licht beurteilt. Bestimmt wurde der Ordnungsgrad anhand der Gleichheit der Ausrichtung der Sehnenfasern. An den aufgenommenen Bildern konnte hierfür mit der Software Image J (s.u.) eine Linie entlang einer Sehnenfaser erstellt werden und dann mit dem Curser über die gesamte Insertionsfläche verschoben werden, um die Ausrichtung mit anderen Fasern abzugleichen. Der Vorgang wurde mehrmals mit verschiedenen Fasern als Basis wiederholt und damit der Ordnungsgrad bestimmt. Auf die Differenzierung zwischen Kollagen I und III Fasern unter polarisiertem

Licht wurde verzichtet, da hierfür die entsprechenden immunhistochemischen Färbungen spezifisch ausgewertet wurden.

2.5.2 Auswertung der Immunhistochemie

Für die Auswertung der Immunhistochemie wurden am Mikroskop mit einer verbundenen Kamera und dem dazugehörigem Programm Axiovision Rel. 4.8 Bilder der gefärbten Schnitte in 25facher und 100facher Vergrößerung angefertigt. Für alle Bilder wurden die gleichen Einstellungen verwendet, um Varietäten zu vermeiden und die folgenden Messanalysen nicht zu beeinflussen. Mit Hilfe des Programmes Image J wurden die Präparate anschließend ausgewertet.

Kollagen II Auswertung

Die Kollagen II Färbung diente der Quantifizierung von Kollagen II an der Insertionsstelle der Sehne. Da Kollagen II den Hauptbestandteil der EZM des Faserknorpels darstellt, kann der Knorpel am Sehnen-Knochen-Übergang ergänzend zur Safranin-O/Fast Green-Färbung beurteilt werden [167, 168]. Für die Auswertung der Färbung wurden Bilder mit 25facher Vergrößerung verwendet. Pro Untergruppe wurden durchschnittlich elf Schnitte ausgewertet, wobei jedes Versuchstier auch mit mindestens zwei Schnitten repräsentiert wurde. Die Einstellungen in Image J wurden so kalibriert, dass aus einer vermessenen Anzahl an Pixeln die entsprechende Fläche in mm^2 berechnet wurde. Hierfür wurde das Image J Plugin „*Microscope Scale*“ verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden nacheinander mit dem Programm geöffnet und die Kollagen II positive Insertionsfläche der Supraspinatussehne in den Knochen manuell vermessen. Alle Messungen wurden mehrmals und ohne Wissen der Gruppenzugehörigkeit des Präparates durchgeführt und dann gemittelt. Auf diese Weise konnten objektive und repräsentative Ergebnisse erzielt werden. Anschließend wurden die Messwerte verglichen und ein Mittelwert pro Untergruppe gebildet. Zusätzlich wurden die Werte statistisch ausgewertet.

Kollagen I und III Auswertung

Für die Auswertung der Kollagen I und III Färbungen wurde die Menge an Kollagen I im Verhältnis zu Kollagen III an der Insertionsstelle der Sehne vermessen. Gesundes Sehnen-gewebe besteht vorrangig aus Kollagen I während Kollagen III vermehrt in verletztem Gewebe, degenerativem Gewebe oder Narbengewebe vorkommt [39, 169-178]. Mit Hilfe der Mengenbestimmung können somit Rückschlüsse auf die Qualität der eingehielten Sehne am Knochen geschlossen werden. Grundlage der hier entwickelten Auswertungsmethode bildet die Farbtonanalyse [50, 179-181], welche es ermöglicht ausschließlich die spezifisch angefärb-

ten Areale bzw. Pixel zu vermessen. Hierfür wurden Paare an Schnitten, bestehend aus jeweils einem Schnitt pro Färbungen, herausgesucht, die die gleiche Ebene und somit bis auf wenige Mikrometer denselben Schnitt zeigten. Auf diese Weise konnten zwei Bilder der gleichen Schnittebene, also zwei hintereinander erstellte Schnitte aus dem Paraffinblock eines Versuchstieres, aber einmal in der Kollagen I und einmal in der Kollagen III Färbung, miteinander verglichen werden. Pro Untergruppe wurden mindestens elf Paare ausgewertet. Um repräsentativ einen Vergleich ziehen zu können wurde von jedem Bild jeweils nur ein Ausschnitt von 500 x 500 Pixel verwendet, welcher ausschließlich die Insertionsstelle der Suprapinatussehne zeigte. Der Ausschnitt wurde aus den Bildern der 100fachen Vergrößerung gewählt und mit Hilfe des Programmes paint.net erstellt. Diese Ausschnitte durchliefen schließlich die eigentliche Messung. Mit dem Programm Image J und dem Plugin „*Threshold colour*“ konnte über das Einsetzen von Filtern für Farbe, Intensität und Kontrast die Mengen an Kollagen I bzw. III vermessen werden. Es wurden drei verschiedene Einstellung festgelegt, jeweils mit unterschiedlich starken Filtereigenschaften von schwach, mittel und stark. Nachdem ein Bild die entsprechenden Farbeinstellungen durchlaufen hatte blieben nur die dem Filter entsprechenden angefärbten Pixel für das jeweilige Kollagen im Bild übrig. Anschließend wurde es in ein schwarz-weiß Bild umgewandelt und die Anzahl an schwarzen Pixeln konnten vermessen werden und wurden vom Programm als *Area* wiedergegeben.

Es wurden jeweils fünf Paare pro Präparat (also pro Versuchstier) vermessen, um eine repräsentative Anzahl an Werten pro Untergruppe zu erhalten. Dies ergab 20 Schnitte pro Untergruppe pro Färbung, also 240 Schnitte. Da die Ausschnitte aller dieser Schnitte jeweils die drei Farbeinstellungen durchlaufen mussten wurden für den Messvorgang Macros erstellt. Für jede der drei Filtereinstellungen wurde ein Macro programmiert. Hierdurch wurden alle Schritte von Öffnen des Bildes bis inklusive Umwandlung in ein schwarz-weiß Bild automatisch für alle Ausschnitte durchgeführt. Nachdem alle Ausschnitte von jeweils Kollagen I und III die drei Macros durchlaufen hatten wurde ein weiteres Macro angewendet, welches automatisch die Vermessung der schwarzen Pixel durchführte.

Die berechneten Werte wurden zwischen den Paaren in Relation zueinander gesetzt und das Verhältnis, also der Quotient zwischen Kollagen I und III in den einzelnen Paaren und den verschiedenen Gruppen konnte beurteilt werden. Mit Hilfe einer Excel-Tabelle wurden die Quotienten berechnet und anschließend der Mittelwert pro Untergruppe und Gruppe bestimmt. Zusätzlich wurden die direkten Quotientenwerte der Schnittpaare statistisch ausgewertet.

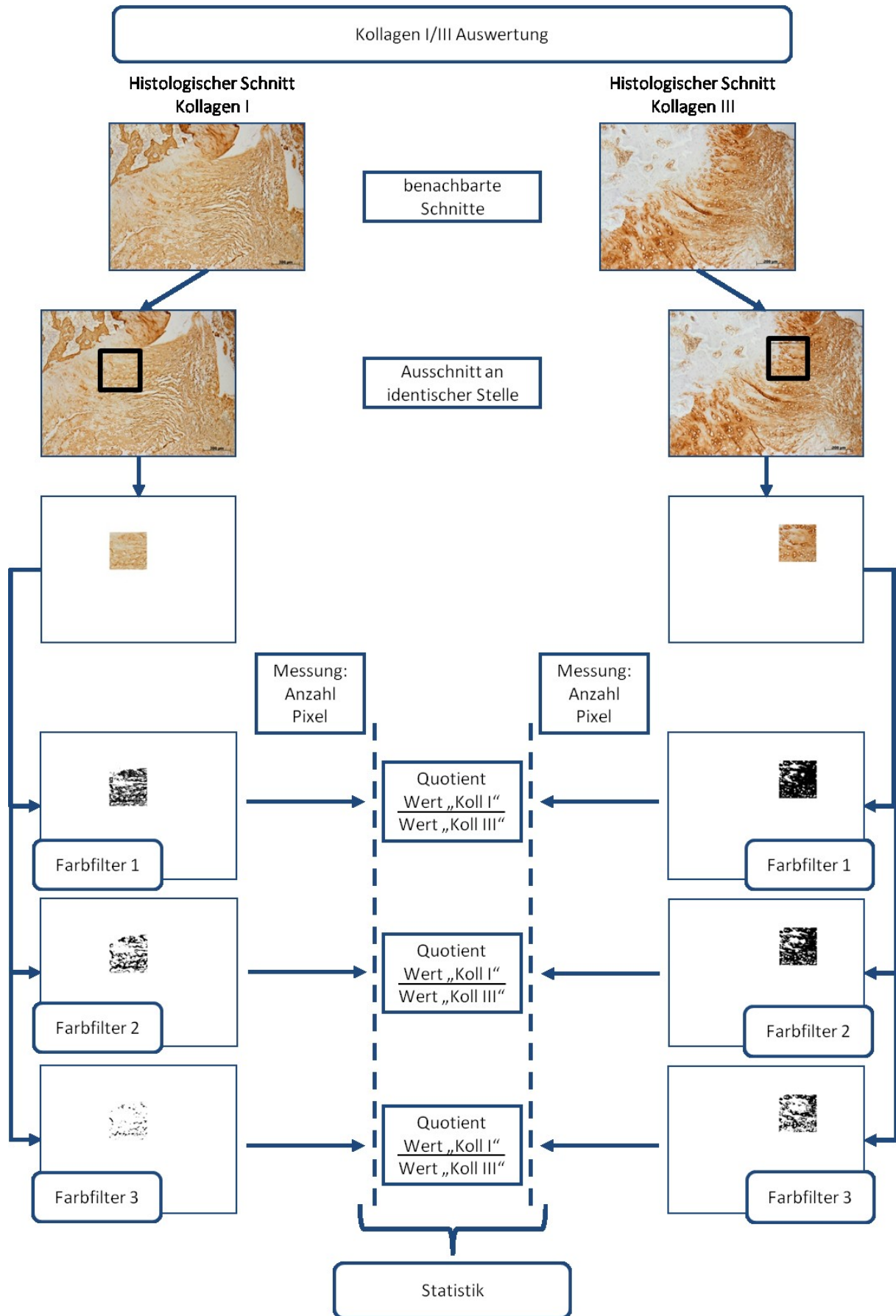


Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Auswertung der Kollagen I und III Färbung.

2.5.3 Statistik

Sowohl für Kollagen II als auch für Kollagen I und III wurden zusätzlich statistische Auswertungen vorgenommen. Hierfür wurde das Statistikprogramm Prism (s.u.) verwendet. Die Tests erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test. Für die Kollagen II Auswertung wurden die vermessenen Kollagen II positiv gefärbten Flächen miteinander verglichen und die Untergruppen gegeneinander auf signifikante Unterschiede getestet. Für die Auswertung von Kollagen I und III wurden die Quotienten von Kollagen I/Kollagen III aus den Messergebnissen verwendet. Auch hier wurden die Werte innerhalb der Untergruppen auf Signifikanz geprüft.

2.6 Material

2.6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

10 ml Spritze	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
20 ml Spritze	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Abdecktücher	Segewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf-Thansau
Alufolie, Typ Universal 30	VWR International GmbH, Darmstadt
Anatomische Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Abzug: Lamin Air® HB 2448	Heraeus Holding GmbH, München
Abzug: Köttermann Typ:2-453	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Analysenwaage, Typ Kern 770-12	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Autoklav, Typ Varioklav 300	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Bohr- und Fräsgerät: MICROMOT 50/E	PROXXON GmbH, Föhren
Brutschrank IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Cellulose Acetat Filter	Sartorius AG, Göttingen
Chirurgische Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Combitec Slide Stainer 4009	Histolab Products, Göteborg, Schweden
CoolCut 45	Arthrex GmbH, München
Deckgläser 24x32 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser 24x50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Desinfektionsmittel Cutasept F	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Duran®-Glasware (Flaschen, Bechergläser)	Schott AG, Mainz
Ecomed Heating Pad	Medisana AG, Neuss
Einmal-Pinzetten	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Erlenmeyerkolben, verschiedene Größen	Schott AG, Mainz
Ethibond Faden 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Fadenschere	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Falcon® 15 ml	Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Falcon® 50 ml	Falcon®, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Faltenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbekammer Stain Tray™	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbekasten- und Gestell	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Feinanalysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Glasobjektträger, Typ Superfrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Handschuhe, Typ sempercure edition	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien (Österreich)
Hypercenter XP	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig
Infrarotlampe	Beurer GmbH, Ulm
Kamerasystem Axio Cam MRC5	Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Jena
Küchenpapier Flori Professional	Flory Cart, Tassignano (Italien)
Küchenwaage	Beurer GmbH, Ulm

Kühl-Gefrier-Kombination, Typ 561284

Lichtmikroskop Axioskop 40
Magnetrührer ARE Axon
Micromot 50/E
Microtome Blade R35
Monocryl Faden 4-0
Multi Gourmet Kocher
Nadelhalter
Objekträgerkasten

OP Handschuhe steril
OP Haube

OP Kittel

OP Mundschutz
Opsite Spray Sprühverband
Paraffinausgiesstation Leica EG 1160
Petrischalen
Pipetten 5 ml, 10ml, 25ml
Pipettenspitzen, verschiedene Größen
Pipette, Typ Pipetman, verschiedene Größen
Pipettierhilfe, Typ Pipettus akku

Präparierschere
Prolene Faden 5-0
Rotilabo®-embedding cassettes, macro
Schere
Schermaschine Favorita II
Skalpelle 15, 20
Spritzen, verschiedene Größen
Sterican Kanülen 20G gelb, 26G braun
Sterile Kompressen
Tiefkühlschrank (-80°C), Typ 6485
Ultracut ultramicrotome
Vapor®
Vortex-Genie
Wärmeplatte
Wärmeschrank (37°C)
Wasserbad, Typ 1012
Zellsiebe BD Falcon

Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen GmbH,
Ochsenhausen
Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Jena
VELP Scientifica srl, Usmate (Italien)
Proxxon GmbH, Föhren
Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Ethicon GmbH, Norderstedt
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Hei-
delberg
Mai Med GmbH, Neukirchen
Mölnlycke Health Care AB, Göteborg (Schwe-
den)
Segewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf-
Thansau
Medeco B.v. Quel-Beijerland (Niederlande)
Smith & Nephew GmbH, Hamburg
Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Corning Incorporated, New York (USA)
Eppendorf AG, Hamburg
Gilson Inc., Middleton (USA)
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eber-
stadt
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ethicon GmbH, Norderstedt
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan)
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
GFL GmbH, Burgwedel
Reichert-Jung, C. Reichert AG, Wien (Österreich)
Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck
Scientific Industries Inc., Bohemia N.Y. (USA)
Medax GmbH & Co., Rendsburg
Jouan GmbH, Unterhaching
GFL GmbH, Burgwedel
BD, Franklin Lakes, NJ (USA)

2.6.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrifix® Kleber
Alkohol 70%
Alkohol 96%
Alkohol 100%
Antikörperverdünner
Baytril® (Enrofloxacin)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe
Brij
Buprenovet® (Buprenorphin)
Chondroitinase AC
Citronensäure20%/EDTA

Collagen I Anti-Human, Ratte, Kaninchen (IgG 1)
aus Maus
Collagen C II C2 Antikörper

Evonik Industries AG, Essen
CLN GmbH, Niederhummel
CLN GmbH, Niederhummel
CLN GmbH, Niederhummel
DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Apotheke Innenstadt Universität München, Mün-
chen
Novus Biologicals, Ltd. Cambridge (UK)

Develop. Stud. Hybr. Bank, Iowa (USA)

Collagen III Anti-Human, Ratte, Maus (IgG 1) aus Maus	Novus Biologicals, Ltd. Cambridge (UK)
DAB ImmPact Peroxidase Substrate	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Direct Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DPX Mountant for histology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA Puffer PH 8	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Fast Green 0,02%	Waldeck GmbH & Co., Münster
Forene® (Isofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Formalin 4% PBS, gepuffert	Apotheke Innenstadt Universität München, München
Hämalaun (nach Mayer)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylin A und B (nach Weigert)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Narcoren® (Pentobarbital)	Merial GmbH, Halbergmoos
Paraplast® (Paraffin)	Leica Biosystem, Richmond, IL (USA)
PBS	Apotheke Innenstadt Universität München, München
Pferdeserum	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Proteinase XXIV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rotihistol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Safranin O 1,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sauerstoff	Linde AG, Pullach
Sekundärer AK, Pferd-anti-Maus (IgG)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame (USA)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt
Ziegen Serum	Dako Deutschland GmbH

2.6.3 Software

AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA (USA)
Image J	U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA)

3 Ergebnisse

Zur Wiederholung werden hier nochmals kurz die Gruppen erklärt. In der Kontrollgruppe fand keine Präparation am Footprint statt, in der Spongialisierungsgruppe wurde der Footprint spongialisiert und in der HF-Gruppe wurde der Footprint mit einem HF-Gerät behandelt. Jede Gruppe wird in zwei Untergruppen geteilt abhängig von der Beobachtungszeit von einer Woche und sieben Wochen. Somit ergeben sich insgesamt sechs Untergruppen.

3.1 Histologische Ergebnisse

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte eine intakte Epiphysenfuge in beinahe allen Präparaten und nur eine Verletzung durch die Bohrung bei insgesamt zwei der 24 Tiere. Deutliche Unterschiede fanden sich im Auftreten von Entzündungszellen und Fibroblasten. Grundsätzlich konnte hier eine höhere Anzahl an Zellen jeweils innerhalb einer Gruppe nach einer Woche im Vergleich zu sieben Wochen festgestellt werden. Im Vergleich zwischen den Gruppen zeigte die Kontrollgruppe nach einer Woche ein sehr gemischtes Ergebnis von teilweise deutlicher Entzündungsreaktion bis nur leichte Inflammation mit insgesamt mittelmäßiger Fibroblastenproliferation. Nach sieben Wochen konnte schließlich kaum noch Entzündung gefunden werden und die Menge an Fibroblasten war deutlich reduziert. In der Spongialisierungsgruppe zeigten die Schnitte nach einer Woche deutlich Entzündung und viele Fibroblasten. Nach sieben Wochen wiederum wiesen die Präparate kaum noch Inflammation auf, aber immer noch deutliche Zellvermehrung im Bindegewebe. Schnitte der HF-Gruppe zeigten sowohl nach einer Woche als auch nach sieben Wochen sehr viele Entzündungs- und Gewebezellen. Hier konnte über die Zeit keine Verbesserung der Zellsituation beobachtet werden. Unterschiede in der Vaskularisation im Bereich der Insertionsstelle zeigten ein ähnliches Muster. Nach einer Woche fanden sich weniger Gefäße in der Kontrollgruppe als in der Spongialisierungsgruppe und am meisten Neubildungen in der HF-Gruppe. Dasselbe konnte nach sieben Wochen festgestellt werden. Die Organisation des Gewebes und der Fasern waren in der Kontrollgruppe etwas besser als in der Spongialisierungsgruppe und diese wiederum deutlich besser als in der HF-Gruppe. Insgesamt zeigten alle Gruppen nach sieben Wochen eine bessere Organisation als nach einer Woche. In der Spongialisierungsgruppe fanden sich nach einer Woche deutliche Mengen an neu gebildetem Bindegewebe im Bereich um die Sehne, was sich bis zu Woche sieben wieder zurückbildete.

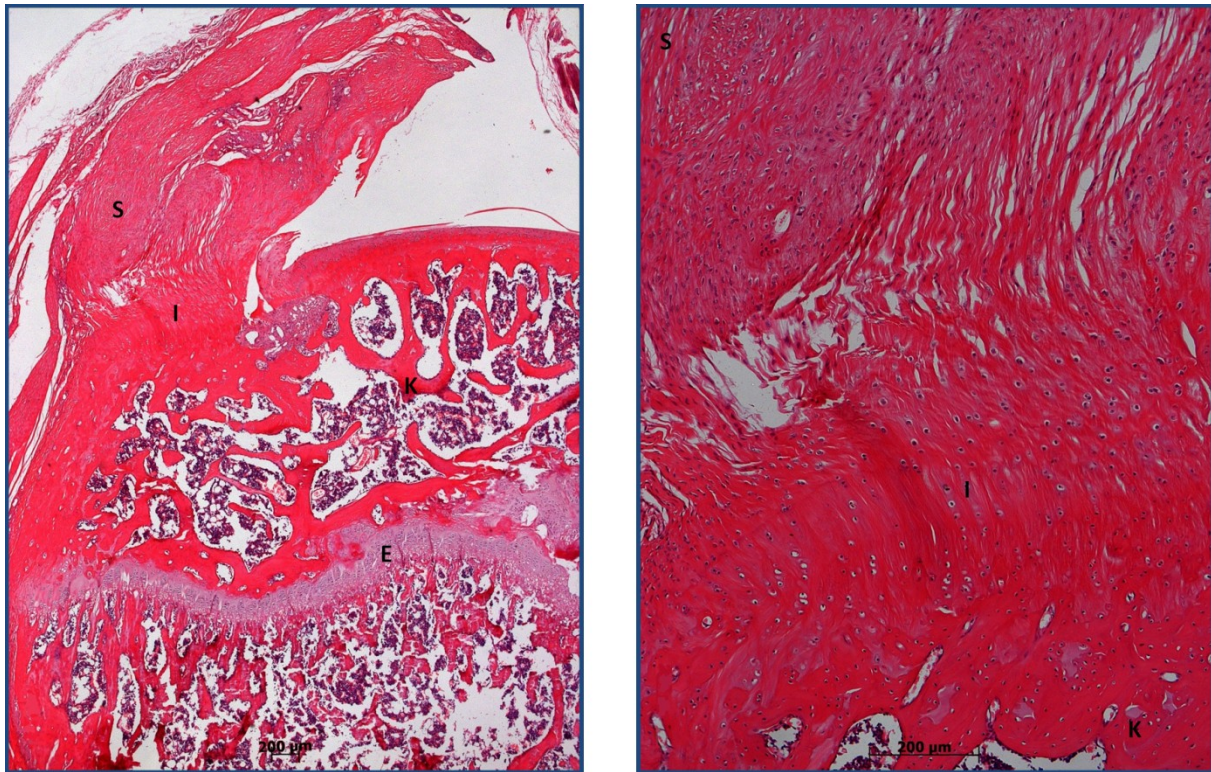


Abbildung 10: Exemplarischer histologischer Schnitt aus der Kontrollgruppe nach sieben Wochen in der HE-Färbung, links in der Übersicht, rechts als vergrößerte Aufnahme die Insertionsstelle der Sehne. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge

Die Analyse der Knorpelstruktur in der Safranin-O/Fast Green-Färbung zeigte innerhalb der Gruppen leichte Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Chondrone. Nach einer Woche verstärkt im Vergleich zur siebten Woche. Starke Unregelmäßigkeiten konnten nur in der HF-Gruppe festgestellt werden, was sich bis zu Woche sieben hin sogar verschlechterte. Chondrozytencluster konnten ebenfalls nur in der HF-Gruppe gefunden werden, hier vermehrt nach einer Woche. Eine normale Knorpelstruktur mit regelmäßig in Säulen angeordneten Chondronen fand sich in keinem Schnitt der HF-Gruppe wieder. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigten hier ähnliche Ergebnisse, beide besser nach sieben Wochen. Wenig Veränderung in der Anzahl der Chondrone, mit entweder Hypo- oder Hyperzellularität, zeigte die Kontrollgruppe sowohl nach einer als auch nach sieben Wochen. In der Spongialisierungsgruppe zeigte sich nach einer Woche eine Hyperzellularität, welche sich bis Woche sieben wieder stark reduzierte. In der HF-Gruppe hingegen konnte nach einer Woche bei fast 90% aller Schnitte eine Veränderung festgestellt werden, sowohl entweder mit einem Überschuss an Chondronen, als auch mit einem Defizit. In der Anfärbbarkeit und somit der Menge an Proteoglykanen zeigte sich die Spongialisierungsgruppe nach sieben Wochen am besten, gefolgt von der Kontrollgruppe. Leicht und stark reduzierte Anfärbbarkeit zeigten die meisten Schnitte aus der HF-Gruppe mit der insgesamt schlechtesten Anfärbbarkeit nach

sieben Wochen. Eine normale Mineralisierungsschicht zeigten Spongialisierungs- und Kontrollgruppe nach sieben Wochen mit 95%, im Gegensatz zur HF-Gruppe, wo sich nur 30% im Normalbereich befanden. Das Auftreten einer vermehrten Mineralisierung wurde zusätzlich ausschließlich in der HF-Gruppe gefunden.

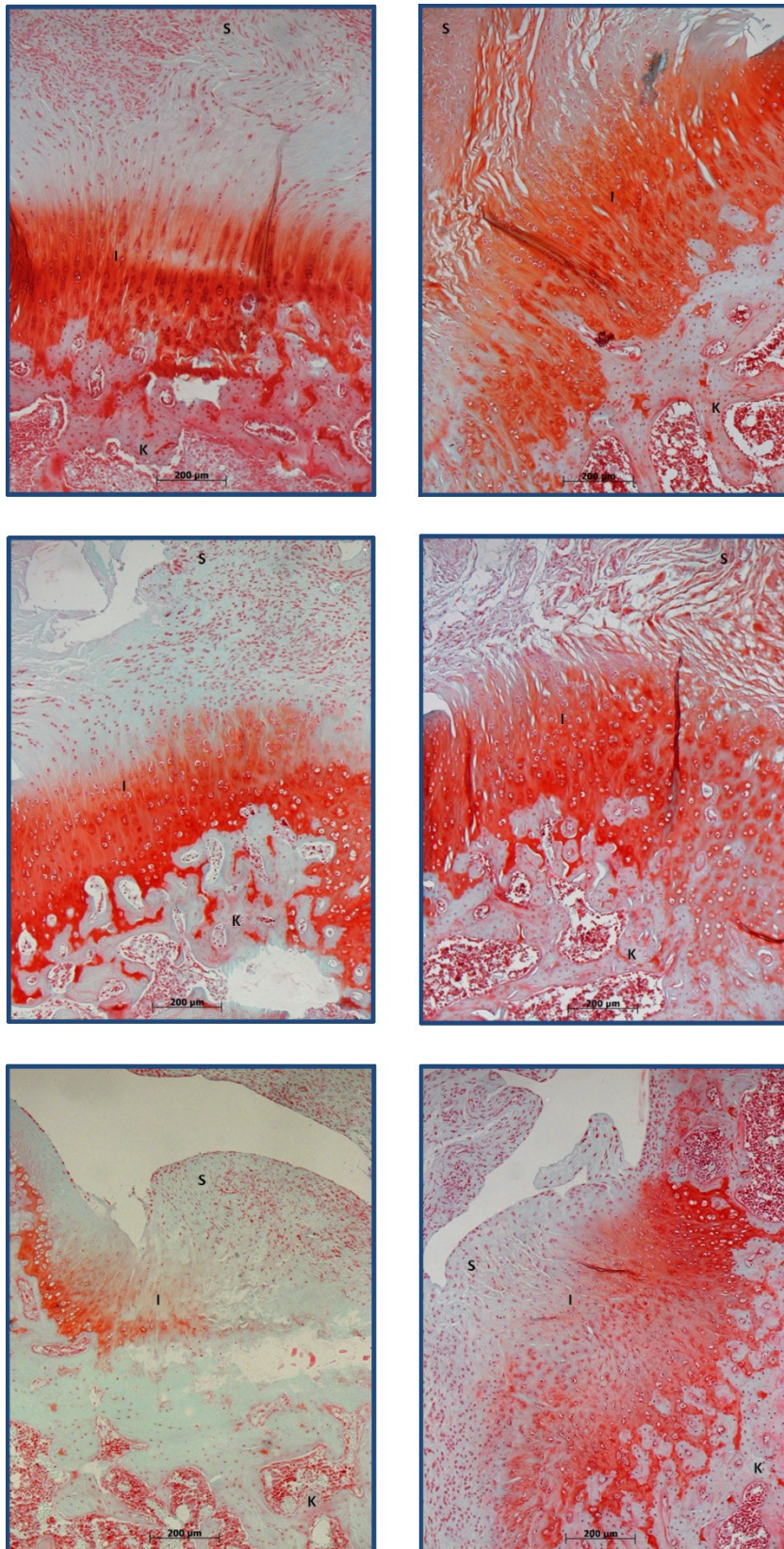


Abbildung 11: Histologische Schnitte in der Safranin-O Färbung. In der linken Spalte jeweils nach einer Woche, in der rechten Spalte jeweils nach sieben Wochen. Oberste Reihe zeigt Bilder der Kontrollgruppe, mittlere Reihe der Spongialisierungsgruppe und untere Reihe zeigt Bilder der HF-Gruppe. Kontroll- und Spongialisierungsgruppe zeigen deutlich bessere Organisation der Knorpelstruktur als die HF-Gruppe und eine allgemein sehr gute Knorpelstruktur nach sieben Wochen. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge

In der Picosirius-Red-Färbung zeigten alle Gruppen eine bessere Faserstruktur nach sieben Wochen als nach einer Woche. Die Kontrollgruppe zeigte eine minimal bessere Organisation als die Spongialisierungsgruppe nach einer Woche und beide deutlich bessere Ergebnisse als die HF-Gruppe. Nach sieben Wochen war kaum noch ein Unterschied zwischen Kontroll- und Spongialisierungsgruppe festzustellen, aber immer noch eine deutlich schlechte Organisation in der HF-Gruppe vorhanden.

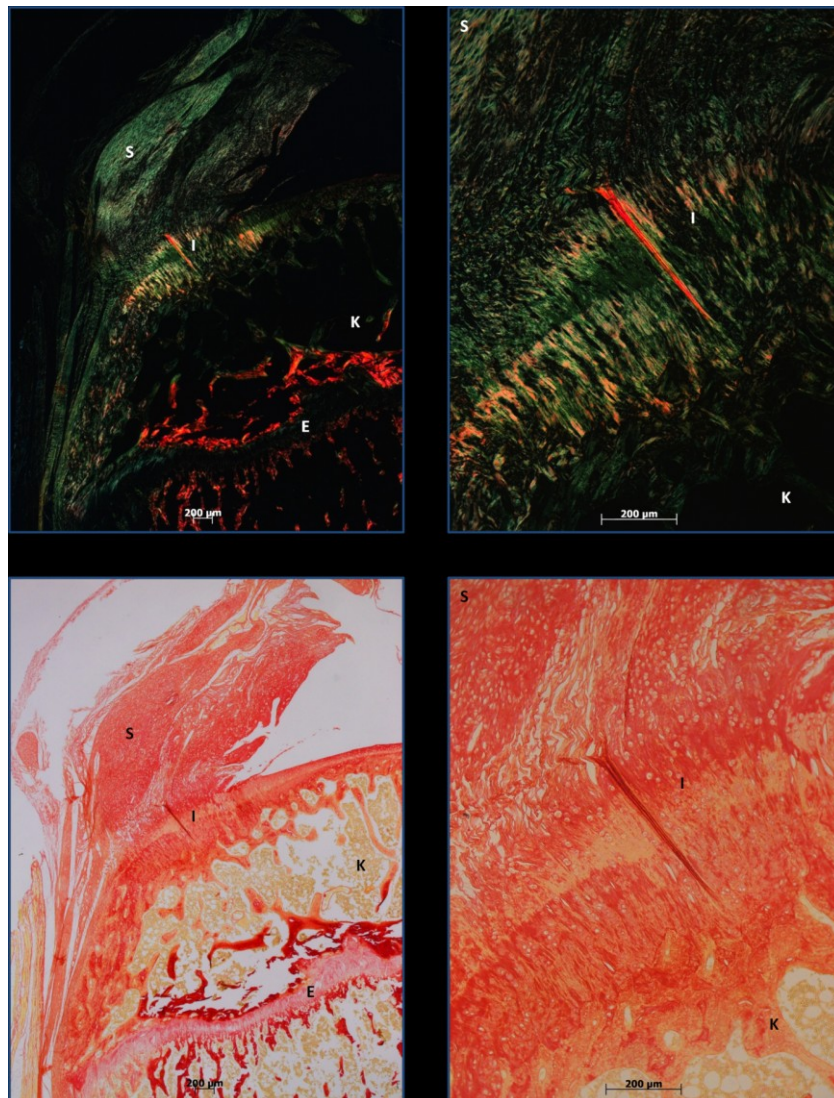


Abbildung 12: Darstellung eines histologischen Schnittes in der Picosirius-Red-Färbung aus der Kontrollgruppe nach sieben Wochen in nativer Aufnahme (untere Reihe) und unter polarisiertem Licht (obere Reihe). Die linke Spalte zeigt den Schnitt in 25facher Vergrößerung, die rechte Spalte zeigt in 100facher Vergrößerung die Insertionsstelle der Sehne. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge

3.2 Immunhistochemische Ergebnisse

In der Kollagen II Färbung zeigten die Messwerte der Kontrollgruppe und der Spongialisierungsgruppe sowohl nach einer als auch nach sieben Wochen deutlich mehr Mengen an Kollagen II als die HF-Gruppe. Am stärksten waren die Unterschiede nach einer Woche mit den Mittelwerten von $0,545 \pm 0,139 \text{ mm}^2$ in der Kontrollgruppe, $0,481 \pm 0,114 \text{ mm}^2$ in der Spongialisierungsgruppe und nur $0,115 \pm 0,084 \text{ mm}^2$ in der HF-Gruppe. Aber auch nach sieben Wochen zeigten die Werte die gleichen Tendenzen mit den Mittelwerten von $0,550 \pm 0,162 \text{ mm}^2$ in der Kontrollgruppe, $0,513 \pm 0,139 \text{ mm}^2$ in der Spongialisierungsgruppe und $0,370 \pm 0,101 \text{ mm}^2$ in der HF-Gruppe. In allen Gruppen fand zwischen Woche eins und Woche sieben eine Zunahme der Kollagen II Menge statt. Am wenigsten in den Untergruppen der Kontrollgruppe und am meisten in den Untergruppen der HF-Gruppe.

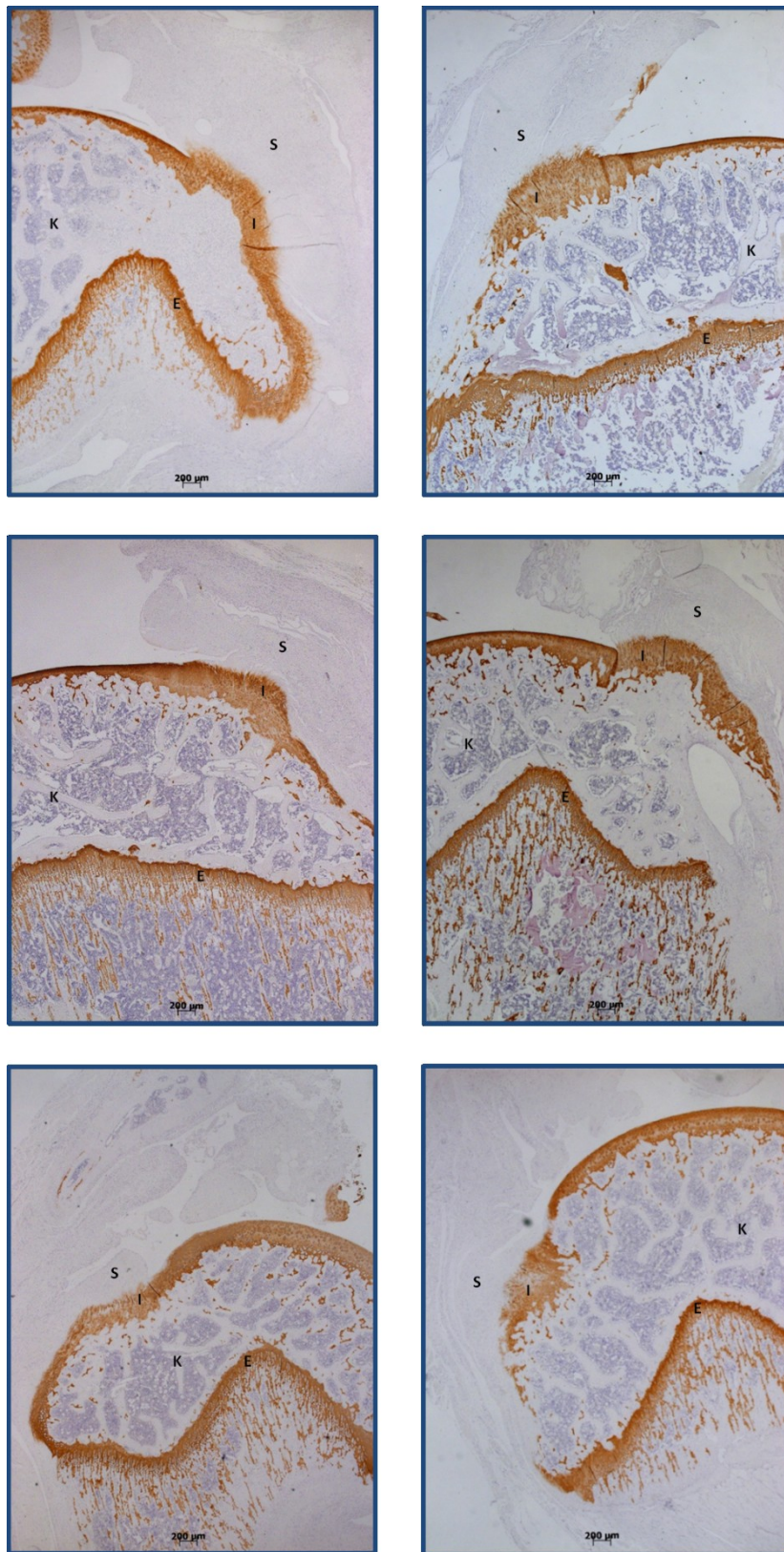


Abbildung 13: Histologische Schnitte in der Kollagen II Färbung. In der linken Spalte jeweils nach einer Woche, in der rechten Spalte jeweils nach sieben Wochen. Oberste Reihe zeigt Bilder der Kontrollgruppe, mittlere Reihe der Spongialisierungsgruppe und untere Reihe zeigt Bilder der HF-Gruppe. Kontroll- und Spongialisierungsgruppe zeigen deutlich größere Mengen an Kollagen II im Bereich der Sehneninsertion. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge

Die Vergleiche der Messwerte in den Kollagen I und III Färbungen zeigten prinzipiell über alle drei Farbfilter gleiche Ergebnisse. Kontrollgruppe und Spongialisierungsgruppe zeigten beide deutlich höhere Quotientenwerte, also einen insgesamt höheren Kollagengehalt (mehr Kollagen I im Verhältnis zu Kollagen III), als die HF-Gruppe. Die Mittelwerte der Quotienten bezogen auf alle Farbfilter zeigten nach einer Woche folgende Werte: Kontrollgruppe $1,514 \pm 1,658$, Spongialisierungsgruppe $1,378 \pm 1,054$ und HF-Gruppe $0,492 \pm 0,270$. Nach sieben Wochen waren die Werte wie folgt: Kontrollgruppe $1,429 \pm 1,408$, Spongialisierungsgruppe $1,182 \pm 0,556$ und HF-Gruppe $0,656 \pm 0,448$. Die Kontroll- und Spongialisierungsgruppe zeigten somit ein leichtes Absinken der Quotientenwerte über die Zeit, während die HF-Gruppe als einzige höhere Werte nach sieben Wochen aufwies. Auch im Vergleich der gesamten Gruppen, unabhängig von einer oder sieben Wochen, führten Kontroll- und Spongialisierungsgruppe mit deutlich höheren Quotientenwerten im Gegensatz zur HF-Gruppe.

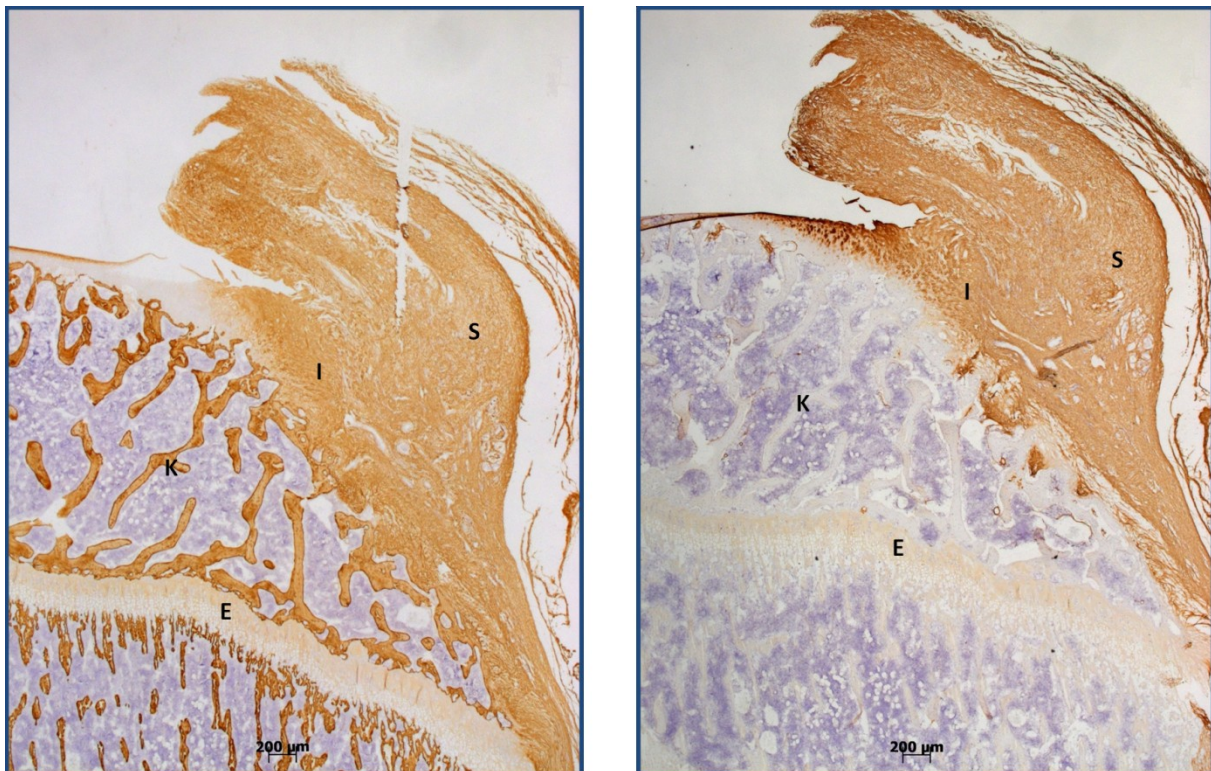


Abbildung 14: Histologisches Schnittpaar aus der Spongialisierungsgruppe nach einer Woche. Links in der Kollagen I Färbung, rechts in der Kollagen III Färbung. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge

3.3 Statistische Ergebnisse

Um die Kollagen II Färbung zusätzlich statistisch auszuwerten wurden hierfür die Werte der vermessenen Kollagen II positiven Flächen verwendet. Die Untergruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test miteinander auf signifikante Unterschiede getestet. Nach einer Woche zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe (0,545 mm²) und HF-Gruppe (0,115 mm²) mit $p < 0.01$ und zwischen Spongialisierungsgruppe (0,481 mm²) und HF-Gruppe (0,115 mm²), ebenfalls mit $p < 0.01$. Zwischen Spongialisierungs- und Kontrollgruppe wurde keine Signifikanz festgestellt.

Nach sieben Wochen zeigte die Kontrollgruppe (0,550 mm²) im Vergleich zur HF-Gruppe (0,370 mm²) weiterhin signifikant höhere Werte mit $p < 0.01$. Auch die Werte der Spongialisierungsgruppe (0,513 mm²) blieben signifikant unterschiedlich zur HF-Gruppe (0,370 mm²) mit $p < 0.05$. Zwischen Spongialisierungs- und Kontrollgruppe blieben die Werte weiterhin zu ähnlich, um einen signifikanten Unterschied festzustellen.

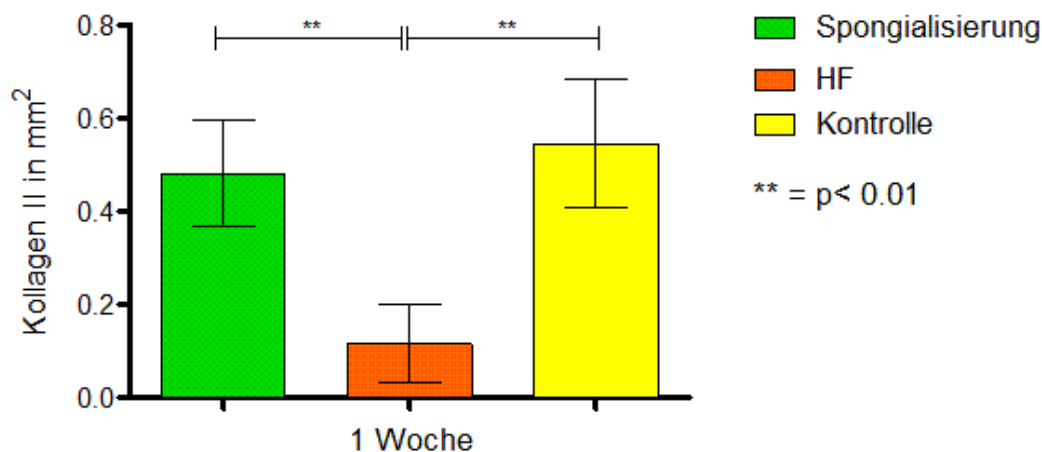


Abbildung 15: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen II Flächen in den Untergruppen nach einer Woche. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen signifikant höhere Werte an Kollagen II als die HF-Gruppe.

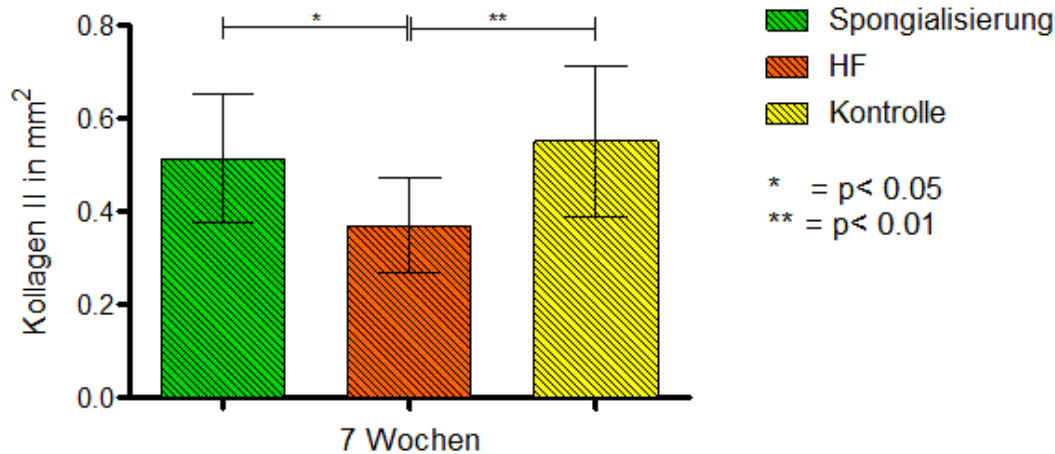


Abbildung 16: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen II Flächen in den Untergruppen nach sieben Wochen. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen weiterhin signifikant höhere Werte an Kollagen II als die HF-Gruppe.

Für die statistische Auswertung der Kollagen I und III Färbung wurden die Quotientenwerte aus Kollagen I/Kollagen III aus allen drei Farbfiltern verwendet und die Untergruppen mittels Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. Nach einer Woche zeigten sowohl Kontrollgruppe (1,514) als auch Spongialisierungsgruppe (1,378) signifikante höhere Werte ($p < 0.01$) im Vergleich zur HF-Gruppe (0,492). Zwischen Spongialisierungsgruppe und Kontrollgruppe konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Nach sieben Wochen waren die Werte weiterhin signifikant unterschiedlich sowohl zwischen Kontrollgruppe (1,492) und HF-Gruppe (0,656) mit $p < 0.01$ als auch zwischen Spongialisierungsgruppe (1,182) und HF-Gruppe (0,656) mit $p < 0.01$. Die Werte der Spongialisierungsgruppe waren auch nach sieben Wochen nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe.

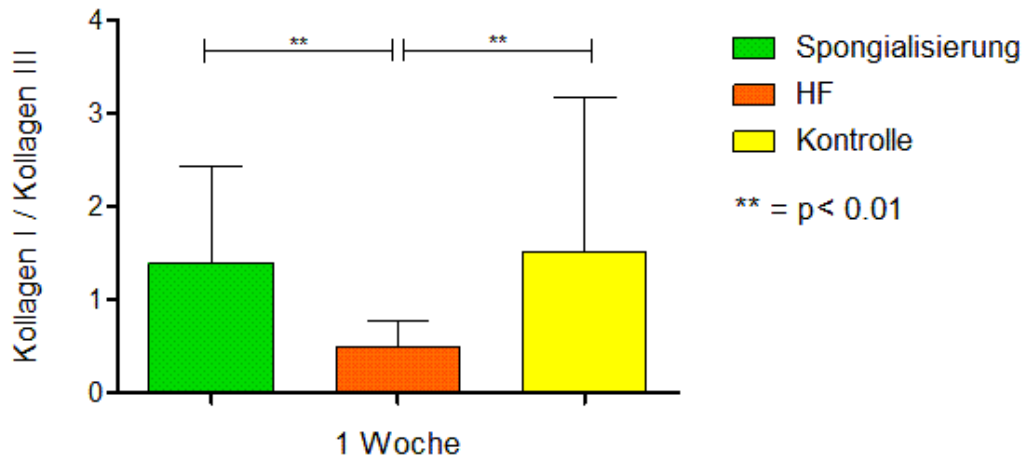


Abbildung 17: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen I/Kollagen III Quotientenwerte nach einer Woche. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen signifikant höhere Quotientenwerte als die HF-Gruppe.

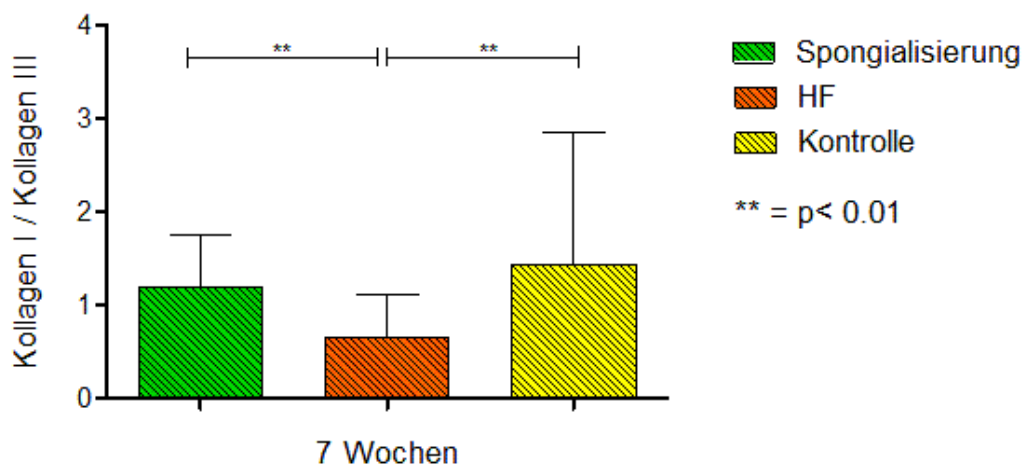


Abbildung 18: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen I/Kollagen III Quotientenwerte nach sieben Wochen. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen weiterhin signifikant höhere Quotientenwerte als die HF-Gruppe.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Ziel dieser Studie war es das Outcome verschiedener Footprint-Präparationen zu untersuchen. Mit Hilfe eines Tiermodells wurde daher der Footprint der Supraspinatussehne entweder spongialisiert oder mit einem HF-Gerät behandelt, bevor die Sehne readaptiert wurde. Zum Vergleich diente eine Kontrollgruppe, wo keine zusätzliche Behandlung des Footprints erfolgte. Grundlage dieser Forschungsarbeit ist das Fehlen von Empfehlungen in der Literatur bezüglich dieses Schrittes in einer Operation [74, 182, 183] und das Verlangen nach einer besseren Sehneneinheilung.

4.2 Tiermodell und Heilungszeitraum

Die Wahl des Kleintiermodells der Ratte wurde in Anlehnung an die Empfehlungen in der Literatur gewählt. Bereits 1996 untersuchten Soslowsky et al. verschiedene Tiere nach ausgewählten Kriterien auf die bestmögliche Kompatibilität zum Menschen. Um Erkrankungen der RM zu erforschen zeigte die Ratte deutliche Vorteile gegenüber anderen Tieren. Vor allem die anatomische Ähnlichkeit zur menschlichen Schulter spielt hier die entscheidende Rolle. Ebenso wie beim Menschen wird die SSP bei der Ratte von knöchernen und ligamentären Strukturen überdeckt. Das Acromion zieht über den Humeruskopf nach vorne und bildet zusammen mit der Clavicula ein Dach unter welchem die SSP bei der normalen Vorwärtsbewegung entlang gleitet [156]. Daher ist das Kleintiermodell Ratte bereits in vielen Studien verwendet worden, um extrinsische Ursachen der Sehnendegeneration bzw. das Impingementsyndrom zu untersuchen [66, 184, 185]. Weitere Vorteile dieses Modells sind niedrige Kosten, die Möglichkeit der großen Versuchstieranzahl und einfache Tierhaltung. Zu beachten sind aber auch, dass die Sehnen der RM nicht wie beim Menschen in einer Sehnenplatte ineinander übergreifen, sondern getrennt verlaufen und nur im Bereich der Insertionsstelle mit der Gelenkkapsel verschmelzen [155]. Zudem lastet durch den Vierfüßlerstand eine andere Gewichtsverteilung auf den Vorderbeinen, was in einem gewissen Maß die Biomechanik des Schultergelenkes beeinflusst. Das Auftreten von Rerupturen nach refixierter RMR ist außerdem so gut wie nicht vorhanden, ebenso wie muskuläre Veränderungen, beispielsweise fettige Infiltration oder Atrophie [155]. Da in dieser Arbeit das Augenmerk weder auf die Sehnenreruptur noch auf muskuläre Veränderungen gelegt wurde, stellen diese Eigenschaften jedoch keine limitierenden Faktoren für die Verwendung dieses Modells dar.

In der Wahl des Heilungszeitraums muss berücksichtigt werden, dass Ratten ein besonderes Selbstheilungspotential besitzen. Erfolgt beispielsweise nach einer RMR keine Behandlung

so heilt der Defekt dennoch durch die Bildung von robusten Narbengewebe [155, 186, 187]. Zeitliche Eingrenzungen sind hier schwer zu bestimmen, aber es scheint, dass bereits nach sechs Wochen auch bei ausbleibender Behandlung eine Defektdeckung erfolgt [187]. Um aber dennoch die Entwicklung im Heilungsprozess in Bezug auf die verschiedenen Behandlungsverfahren verfolgen zu können und unter Berücksichtigung des Sehnenheilungsmechanismus wurden die Beobachtungszeiträume von einer Woche und sieben Wochen gewählt. Im regulären Sehnenheilungsverlauf befindet sich das Gewebe nach einer Woche in der Proliferativen Phase mit Bildung von EZM Bestandteilen und maximaler Kollagen III Synthese. Ab der sechsten Woche tritt die Remodelierungsphase ein mit langsam rückgängiger Zellzahl und Umbau des Kollagens in das stabilere Kollagen I [38]. Hinsichtlich unseres Interesses an eben genannten Zell- und Gewebeveränderungen erscheint die Wahl der vorgenommenen Heilungszeiträume sinnvoll.

4.3 Evaluation der Methoden

4.3.1 Operatives Procedere und Defektmodell

Zur Bewertung der durchgeführten Operationen ist zu erwähnen, dass keines der Tiere während oder nach der Operation verstorben ist. Es traten keine Komplikationen hinsichtlich der Anästhesie peri- und postoperativ oder bezüglich der Wundheilung auf. Nahrungsaufnahme und Verhalten der Tiere veränderten sich nicht im postoperativen Verlauf. Keines der Tiere zeigte signifikante Unterschiede im Körpergewicht vor und nach der Operation oder zwischen den verschiedenen Gruppen. Alle Tiere erholten sich schnell und zeigten ein normales Aktivitätslevel.

Bezüglich der Wahl eines monopolen HF-Gerätes sollen hier kurz die Gründe erläutert werden. Das Ziel war eine exakte und lokale Verödung der verbliebenen Weichteile unter Schonung des umliegenden Gewebes. Hierfür bieten sich monopolare Gerätemodelle für Eingriffe an kleinen Gelenken mit filigranen Ablationsaufsätzen an. Mit einem klassischen bipolaren Gerät wäre ein feines Arbeiten auf der sehr kleinen Fläche vergleichsweise schlechter umsetzbar gewesen. Weitere Gründe sind die unterschiedliche Temperaturentwicklung und die Größe des Koagulationsdefektes, welche die Geräte im Umgebungsgewebe hervorrufen. Ein zu hoher Temperaturanstieg kann hier zu irreversiblen Schäden durch Zelltod führen. Monopolare Geräte zeigen diesbezüglich geringere Schäden in der Tiefe [152, 188, 189]. Bei kontrollierter Anwendung zeigen sie zudem einen vergleichsweise kleineren Umgebungsdefekt [190]. Um eine exakte, lokale Anwendung möglichst ohne Umgebungsschäden zu gewährleisten wurde daher ein monopolares Gerät mit feinem Ablationsaufsatz gewählt.

Unmittelbar postoperativ wurden die Tiere nach vollständigem Erwachen aus der Narkose unter Beobachtung zurück in die Käfige gesetzt. In Bezug auf die bisherigen Aussagen in der Literatur ist es schwierig sich für ein optimales Belastungsschema zu entscheiden. Einerseits scheinen Studien darauf hinzuweisen, dass durch primäre Immobilisation nach einer Reflexierung der SSP bei Ratten im frühen Heilungsverlauf bessere biomechanische Testergebnisse und Kollagenanordnung erreicht werden können [191, 192]. Andererseits beschreiben mehrere Studien, dass fehlende Belastung zu unorganisiertem Narbengewebe führt während hingegen durch zyklische Bewegungen die Kollagenfasern sich entsprechend den mechanischen Ansprüchen entlang ausrichten. Zeitnahe Rehabilitation zeigte sich auch in klinischen Studien mit positiven Effekten auf Funktionalität und Bewegungsausmaß. Zu hohe Belastung zeigt allerdings wiederum schädliche Auswirkung [43, 100, 193-195].

Bezüglich der Übertragbarkeit dieser Studie auf den Menschen müssen unter anderem drei wichtige Punkte beachtet werden. Die Hypothesen entstanden auf der Tatsache degenerativer RMR beim Menschen im höheren Alter. Aufgrund der mangelnden Umsetzbarkeit eines guten degenerativen Modells und um eine strukturierte und vergleichbare histologische Auswertung vornehmen zu können wurde auf ein akutes, künstlich erzeugtes Verletzungsmodell ausgewichen. Der Defekt an der RM wurde somit vorsätzlich an einer zuvor gesunden Schulter gesetzt und war nicht die Folge langjähriger degenerativer Einflüsse. Zudem wurde die SSP gleichmäßig scharf und vollständig durchtrennt, was sich vom Reißen der Sehne unterscheidet. Ein weiterer Punkt besteht in den unterschiedlichen Heilungsfähigkeiten von Mensch und Ratte. Wie bereits in Kapitel 4.2 erwähnt besitzen Ratten ein äußerst ausgeprägtes und schnelles Heilungspotenzial. Die zeitliche Abfolge der Heilungsschritte ist somit nur bedingt übertragbar. Da hier aber vorwiegend das grundlegende Verständnis im Erfolg der Heilung mit den entsprechenden Zell- und Gewebeveränderungen von Interesse ist und nicht die zeitlichen Abfolge der Heilungsphasen im Menschen, soll dies nur der Gesamtheit halber erwähnt werden. Wesentlich relevanter erscheint jedoch der dritte Punkt, welcher sich auf die Größe der Bohrlöcher für die transossäre Naht der SSP bei der Operation bezieht. Die hier verwendete Größe von 0,5 mm ist im Verhältnis zur Größe des Humerus der Ratte sehr groß. Würde man diese Größenkonstellation auf den Menschen übertragen, ergäbe sich eine nicht vertretbare Bohrlochgröße. Aufgrund der im Verhältnis überdimensionalen Bohrkanäle lässt sich nicht ausschließen, dass mesenchymale Stammzellen durch die Tunnel an die Sehnenansatzstelle wandern konnten, welches den gleichen Effekt hervorrufen würde wie die Spongialisierung. Daher empfiehlt es sich das Studiendesign diesbezüglich auf ein größeres Tiermodell zu erweitern, um die Größenverhältnisse besser anpassen zu können.

4.3.2 Histologische Aufarbeitung

Gründe für die gewählten histologischen und immunhistochemischen Färbungen waren die Möglichkeit der ausreichenden Evaluation des Gewebes bezüglich der zu untersuchenden Kriterien sowie die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit und mit anderen Studien.

Als primäre Übersichtsfärbungen wurde daher die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt, welche eine weit verbreitete und standardisierte Färbung in der Histologie darstellt [50, 156, 178, 196]. Allgemeine Gewebeverhältnisse, Sehnenansatz sowie Zellzahl lassen sich hiermit unter anderem sehr gut beurteilen. Des Weiteren wurde zur genaueren Beurteilung des Knorpels die Safranin-O/Fast Green-Färbung gewählt. Diese ermöglicht als weitere Standardfärbung in der Histologie die quantitative Abschätzung der Glykosaminoglykane im Knorpelgewebe sowie die Beurteilung der Knorpelregeneration [164-166, 197-200]. Als dritte Übersichtsfärbung wurde die Picrosirius-Red-Färbung gewählt. Als typische Standardfärbung zur Beurteilung von Sehnen- und Sehneninsertionsstellen [196, 201-204] diente sie der Evaluation des Faserverlaufes und zur Beurteilung der Sehneninsertionsstelle. Durch die Kombination der verwendeten drei Übersichtsfärbungen konnte somit eine umfassende und detaillierte Untersuchung des Gewebes garantiert werden.

In Ergänzung zu den Übersichtsfärbungen wurden zusätzlich die anspruchsvolleren immunhistochemischen Färbungen für verschiedene Kollagene durchgeführt. Durch die Verwendung von Antikörpern können die verschiedenen Kollagentypen spezifisch nachgewiesen und angefärbt werden. Um eine unspezifische Überfärbung zu vermeiden wurde stets eine Negativkontrolle pro Färbegang mitbestimmt. Kollagen II als Bestandteil des Faserknorpels [167, 168] wurde zusätzlich zur Safranin-O/Fast Green-Färbung nachgewiesen, um den Sehnen-Knochen-Übergang ergänzend beurteilen zu können. Kollagen I und III hingegen weisen ein charakteristisches Verteilungsmuster im Sehnen- und Sehneninsertionsgewebe auf und ermöglichen den Rückschluss auf den Zustand der Sehne in den verschiedenen Heilungsstadien sowie auf die Qualität des Sehnen- und Sehneninsertionsgewebes [169, 171, 174, 175]. In Bezug auf die zu untersuchenden Kriterien konnte mit diesen zusätzlichen Färbungen eine tiefgründige Untersuchung des Footprints erzielt werden.

4.3.3 Auswertungsmethoden

Für die Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin und Safranin-O/Fast Green wurden jeweils mit Hilfe bereits etablierter Scores die Kriterien zur Gewebeevaluation entwickelt. Hierfür wurden die Scores leicht umgewandelt, ergänzt und angepasst.

Für die HE-Auswertung wurde die semiquantitative Beurteilungsskala [158-160, 163] wie folgt umgewandelt und ins Deutsche übersetzt: Die Kriterien *fiber structure* und *fiber arrangement* wurden zu einem Punkt als „Organisation der Sehnenfasern“ zusammengefasst. *Regional variations of cellularity* spiegelt sich wieder im Kriterium „Zellhäufung und Entzündungsreaktion“. *Increased vascularity* wurde mit „Vaskularisation“ übernommen. Auf die Kriterien *rounding of the nuclei*, *hyalinization* und *decreased collagen stainability* wurde verzichtet, da sich diese Kriterien in anderen Färbungen besser beurteilen ließen. Unter Berücksichtigung der operativen Vorgehensweise und der Relevanz des Footprints wurden folgende Punkte zusätzlich hinzugefügt: „Intaktheit der Epiphysenfuge“, „Vorhandensein von Zysten“, „Erfolgreiches Anwachsen der Sehne“, „Auftreten von Bindegewebe um die Insertionsstelle“ und „Gesamteindruck des Schnittes“. Mit Hilfe des abgewandelten Scores konnte eine umfassende und vielschichtige Untersuchung der HE-Schnitte garantiert werden.

Für die Safranin-O/Fast Green-Färbung wurden zwei zuverlässige Scores für die Beurteilung von Knorpelgewebe herangezogen. Zum einen der MODS (*Modified O'Driscoll Scale*) und zum anderen die ICRS II Parameter (*International Cartilage Repair Society*) [164-166, 205, 206]. Beide Scores vereinen zusammen so gut wie alle Kriterien der bekanntesten Scores für die Knorpelregeneration. Alle Punkte waren jedoch nicht sinnvoll anwendbar bzw. in den Schnitten vorhanden oder wurden bereits in einer anderen Färbeauswertung evaluiert. Daher wurden die Auswertungskriterien auch hier sinnvoll an die Studie angepasst.

Für die Auswertung der Picosirius-Red-Färbung wurde mit Hilfe der Software Image J der Ordnungsgrad der Sehnenfasern am Ansatz beurteilt. Die qualitative Untersuchung des Faserverlaufs ist relativ verbreitet und kann in verschiedenen Färbungen durchgeführt werden [179, 207-209]. Innerhalb dieser Studie erschien es sinnvoll die Picosirius-Red-Färbung zu wählen, um die Organisation der Sehnenfasern ergänzend zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung zu bestimmen. Im Gegensatz zur HE-Färbung kann in der Picosirius-Red-Färbung der Faserverlauf bei Betrachtung unter polarisiertem Licht genau nachverfolgt werden und die Ausrichtung der Fasern ist somit besser vergleichbar. Auf die Bestimmung der Kollagen I und Kollagen III Mengen wurde jedoch hier verzichtet, da dies in den immunhistochemischen Färbungen spezifisch ausgewertet wurde.

Die Auswertungsmethode für die Kollagen II Färbung beruht auf der Tatsache, dass eine Mengenbestimmung erforderlich war. Um die Kollagen II Menge und somit den Faserknorpel quantitativ beurteilen zu können wurde die angefärbte Fläche am Sehnenansatz mittels Computersoftware vermessen. Alle Präparate wurden ohne Wissen der Gruppenzugehörigkeit von derselben Person (Michaela Serr) und unter gleichen Bedingungen vermessen. Somit konnten objektive und repräsentative Ergebnisse erzielt werden.

Für die Kollagen I und III Auswertung war ebenfalls die Mengenbestimmung relevant. Da spezifisch nur die entsprechenden Kollagenfasern angefärbt wurden, konnte keine Fläche vermessen werden. Die Messmethode musste daher eine Unterscheidung zum übrigen Gewebe ermöglichen. Aus diesem Grund wurden Farbfilter kalibriert, um nur die spezifisch angefärbten Areale vermessen zu können. Da im Heilungsverlauf der Sehnen die verschiedenen Kollagentypen unterschiedlich vertreten sind und bezüglich der Mengenverhältnisse auf die Qualität der Sehne geschlossen werden kann [169-172, 175] wurden die Messwerte ins Verhältnis Kollagen I/Kollagen III gesetzt.

Die Statistische Auswertung erfolgte testgerecht mittels standardisierten Mann-Whitney-U-Test [210] und diente der Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.4 Bewertung der Ergebnisse

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse nochmals betrachtet und deren Bedeutung diskutiert und hinterfragt werden.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben verläuft der Heilungsverlauf der Sehne in drei Phasen. Zu Beginn steht die Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sowie Zellen der Blutlaufbahn. Durch Chemotaxis mobilisiert der Körper schnellstmöglich seine Abwehrzellen, um den Gewebeschaden zu limitieren. Die Trümmer des zerstörten Gewebes werden beseitigt und stimulierende Faktoren für Proliferation und Wachstum freigesetzt. Zügig schließt sich die Proliferationsphase mit Vermehrung der Blutgefäße an, um den anschließenden Gewebeumbau zu unterstützen. Fibroblasten und Tenozyten sammeln und vermehren sich und beginnen mit der Produktion von vorrangig Kollagen III. Ziel der zweiten Phase ist es eine primäre Defektdeckung zu erzeugen und das geschädigte Areal zu stabilisieren. Der Übergang zwischen den Phasen ist fließend und überschneidend [38]. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung weisen darauf hin, dass sich das Gewebe nach einer Woche im Bereich zwischen den beiden ersten Phasen des Heilungsverlaufes befindet. Alle Gruppen zeigen hier eine Entzündungsreaktion mit Zellvermehrung, Vaskularisation und Kollagensynthese. Nach sechs bis acht Wochen schließt sich im Heilungsverlauf die Remodelierungsphase an. Hier reduziert sich die Zellzahl und die Synthese von Matrixbestandteilen sinkt. Die Produktion von Kollagen nimmt ab und wird zunehmend durch das stabilere Kollagen I ersetzt [36-38]. In den Präparaten nach sieben Wochen kann die dritte Phase des Heilungsverlaufes gut erkannt werden. Entzündungsreaktion und Zellzahl sind im Vergleich zur ersten Woche verringert und die Kollagenproduktion verändert. Auch zeigt sich das Gewebe hier besser organisiert und der Faserverlauf geordneter. Die zeitliche Abfolge der Phasen im Heilungsverlauf korrelieren mit den Daten in der Literatur und den Ergebnissen anderer Studien [18, 34, 37, 38, 50, 178]. In einer dieser Studien wur-

de beispielsweise die Sehnen-Knochen Heilung nach akuter SSP Verletzung am Rattenmodell untersucht. Hier zeigte die histologische Auswertung ebenfalls einen Peak an Entzündungszellen um die erste Woche, ebenso bei der Neubildung der Gefäße und der Fibroblastenproliferation. Nach 28 Tagen wurden keine Entzündungszeichen mehr gefunden, ähnlich wie in der hier vorliegenden Studie in der Kontroll- und Spongialisierungsgruppe nach sieben Wochen [50]. Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen demnach in Bezug auf die Heilung repräsentativ und mit anderen Studien vergleichbar zu sein.

Vergleicht man nun die Gruppen in den Übersichtsfärbungen untereinander und im zeitlichen Verlauf so zeigt sich, dass alle Gruppen nach einer Woche Entzündungszellen aufweisen, dies aber in unterschiedlicher Ausprägung. In der Kontrollgruppe waren die Ergebnisse sehr gemischt. Hier fand sich teilweise eine deutliche Entzündungsreaktion bis teilweise nur eher wenig Inflammation und eine mittelgradige Fibroblastenproliferation. Nach sieben Wochen waren kaum noch Entzündungszellen und nur wenige Fibroblasten zu finden. Die Gefäßneubildung im Bereich des Sehnenansatzes nach einer Woche war eher gering und änderte sich nicht mehr bis zur siebten Woche. In der Spongialisierungsgruppe war das Zellaufkommen hingegen nach einer Woche deutlicher vertreten als in der Kontrollgruppe. Nach sieben Wochen waren allerdings ebenfalls kaum noch Entzündungszellen vorhanden, aber immer noch viele Fibroblasten im Bindegewebe zu finden. Die primäre Entzündungsreaktion war folglich in der Spongialisierungsgruppe erst mal stärker als in der Kontrollgruppe, glich sich aber im zeitlichen Verlauf dem normalen Heilungsprozess an, so dass nach sieben Wochen keine relevanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen feststellbar waren. Die persistierende Fibroblastenzahl in der Spongialisierungsgruppe weist auf die erhöhte Produktion von Ersatzgewebe hin, was durch den verstärkten strukturellen Schaden durch die Spongialisierung zu erklären ist und auch in anderen Studien beobachtet wurde [192]. Bezüglich der Vaskularisation zeigte sich in der Spongialisierungsgruppe eine höhere Neubildung als in der Kontrollgruppe. Hierauf wird später nochmals genauer eingegangen. Betrachtet man nun die Ergebnisse der HF-Gruppe muss man feststellen, dass hier sowohl Zellzahl als auch Gefäßneubildung die höchste Anzahl aufweisen. Dem ist aber gegenüber zu stellen, dass zwar ein massiver Gewebeschaden vorlag, welcher diese Reaktion erklärt, die Rückläufigkeit der Zellzahl bis zur siebten Woche allerdings nicht bestand und somit eine Stagnation oder Verzögerung im Heilungsprozess erfolgte. Der Schaden war demzufolge zu groß um ausgeglichen und behoben zu werden. Diese Vermutung wird durch mehrere Studien unterstützt [34, 211]. Eine verstärkte Inflammation kann bis zu einem gewissen Maß die Wundheilung fördern, massive und vor allem persistierende Entzündung hingegen sind schädlich und führen zu schlechteren klinischen Ergebnissen [34, 211]. Auch wenn die Studie von Tibor et al. [151] zeigt, dass die Anwendung eines bipolaren HF-Gerätes nach Teildurchtrennung der

Achillessehne mit anschließender Sehnennaht am Kaninchen zu verbesserten biomechanischen Ergebnissen führt, berichten andere Studien hierbei über Komplikationen [152-154, 212, 213]. Edwards et al. [152] verglichen die thermische Wirkung von monopolaren HF-Geräten mit denen von bipolaren Geräten auf den Knorpel mit und ohne Flüssigkeitszugabe (wie bei der Arthroskopie). Durch beide Geräte wurden hierbei Temperaturen erreicht, welche zum Zelltod führen. Das bipolare Gerät zeigte im Vergleich zum monopolaren Gerät sogar eine höhere Temperaturentwicklung mit bis zu 100°C. Diese Studie unterstützt das schlechte Outcome der HF-Gruppe in dieser Arbeit. Die stagnierte Heilung spiegelt sich auch in der teils fraglich angewachsenen Sehne in den Präparaten und den restlichen Ergebnissen der Auswertung wieder. In der Safranin-O/Fast Green-Färbung zeigte die HF-Gruppe als einzige Gruppe starke Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Chondrone sowie Chondrozytencluster und eine reduzierte Anfärbbarkeit. Kontroll- und Spongialisierungsgruppe zeigten hingegen nach sieben Wochen eine geordnete Knorpelstruktur und wenig Zellveränderungen. Die beste Anfärbbarkeit und somit die meiste Menge an Proteoglykanen bzw. Regeneration des Faserknorpels fand sich nach einer Woche leicht führend vor der Spongialisierungsgruppe in der Kontrollgruppe und nach sieben Wochen anders herum leicht führend vor der Kontrollgruppe in der Spongialisierungsgruppe. Hier scheint bei der Spongialisierungsgruppe zu Beginn eine dezente Verzögerung vorhanden zu sein, aber im Verlauf eine umso bessere Regeneration. In der Kollagen II Färbung zeigten sich in der Kontrollgruppe nach einer Woche minimal höhere Mengen des Kollagens als in der Spongialisierungsgruppe und nach sieben Wochen wiederum angeglichenen Werte. Beide Gruppen zeigten aber sowohl nach einer als auch nach sieben Wochen signifikante Unterschiede zur HF-Gruppe. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen also eine vergleichbare positive Entwicklung, wohingegen die HF-Gruppe sich negativ abgrenzt. Abschließend gilt es nun noch die Ergebnisse der Kollagen I und III Auswertung zu beurteilen. Es ist wichtig zu verstehen, dass die Quotientenwerte aus Kollagen I/Kollagen III nicht die absoluten Mengen der gebildeten Kollagene zeigen sondern deren Verhältnis zueinander. Ein hoher Wert spricht daher für eine gute Sehnenqualität mit hohem Kollagen I Gehalt. Je größer der Wert >1 ist desto mehr Kollagen I ist in der Sehne enthalten im Verhältnis zu Kollagen III. Ist der Wert <1 bedeutet dies einen höheren Anteil des schwächeren Kollagens III. Hier zeigt sich das bisherige Verteilungsmuster innerhalb der Gruppen. Kontroll- und Spongialisierungsgruppe weisen deutlich höhere Werte auf als die HF-Gruppe. Der Unterschied ist sowohl nach einer als auch nach sieben Wochen statistisch signifikant. Auch diese Färbung bestätigt daher wieder den ähnlichen Heilungsablauf zwischen Kontroll- und Spongialisierungsgruppe sowie das verringerte Heilungspotential in der HF-Gruppe. Die vergleichsweise niedrigen Werte dieser Gruppe weisen auf einen höheren Kollagen III Gehalt sowohl nach einer als auch nach sieben Wochen hin. Dies wiederum nicht im absoluten Sinne, sondern im Verhältnis zu Kollagen I.

Auch wenn der Wert hier von der ersten Woche bis zur siebten Woche ansteigt, so ist der bessere Wert nach sieben Wochen immer noch statistisch signifikant schlechter als die Werte der anderen beiden Gruppen. Das Verhältnis mag sich somit vielleicht leicht verbessert haben, dennoch ist das Gesamtergebnis nicht positiv zu werten (<1) und im zeitlichen Verlauf verzögert. Der über die Zeit leicht absinkende Wert in den beiden anderen Gruppen darf wiederum nicht falsch negativ gewertet werden. Zwar scheint sich durch die Verkleinerung der Quotientenwerte das Verhältnis der Kollagene zugunsten von Kollagen III zu verschieben, als wahrscheinlicher ist aber in Anlehnung an die Literatur anzunehmen, dass die Produktion beider Kollagene bis zur siebten Woche insgesamt wieder sinkt und Kollagen III im zeitlichen Verlauf weniger schnell gesunken ist [50, 171, 214]. Zudem blieb der Quotientenwert trotz des leichten Absinkens >1 , was bei der Rechnung von Kollagen I \div Kollagen III weiterhin auf einen höheren Kollagen I Gehalt schließen lässt. Die Qualität der Sehne ist folglich sowohl in der Kontroll- als auch in der Spongialisierungsgruppe positiv zu bewerten. Ein unterstützendes Beispiel bezüglich der Vermutung, dass die Kollagen III Produktion langsamer als die von Kollagen I sinkt ist die Studie von Galatz et al. [50]. Hier wurde ebenfalls die Heilung der SSP im akuten Verletzungsmodell an Ratten untersucht. Schwerpunkt bildete die Evaluation der Kollagen I und III Produktion im zeitlichen Verlauf. Kollagen I zeigte seinen Peak nach ca. 10 Tagen und sank anschließend relativ schnell bis zum 28.ten Tag bis beinahe auf den Ausgangswert zurück und stieg dann langsam im Verlauf wieder an. Kollagen III erreichte seinen Peak ebenfalls um den 10.ten Tag, sank aber hingegen nach einer Plateauphase bis zum 28.ten Tag eher langsam bis zum Tiefpunkt am 59.ten Tag ab.

Durch alle Färbungen zieht sich nun prinzipiell ein ähnliches Verhältnis der Gruppen zueinander. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind meist führend und dicht gefolgt von denen der Spongialisierungsgruppe, während die HF-Gruppe grundsätzlich deutlich schlechtere Ergebnisse aufweist. Berücksichtigt man nun die Tatsache, dass bei der Spongialisierung ein deutlich größerer Defekt gesetzt wurde, kann daraus die Erkenntnis folgen, dass die Heilung hier verbessert abgelaufen ist. Nur so konnten die ähnlichen Ergebnisse erzielt werden. Diese Annahme bestätigt sich bei näherer Betrachtung der einzelnen Untersuchungskriterien. Beispielsweise zeigen die Präparate nach einer Woche in der Spongialisierungsgruppe zwar zum einen ein stärkeres Auftreten von Entzündungszellen, aber zum anderen auch eine höhere Anzahl an Fibroblasten. Durch das vermehrte Zellaufkommen und der damit verbesserten Gewebeproduktion wurde der größere Schaden somit potentiell kompensiert. Passend zu dieser Theorie zeigt sich in der Spongialisierungsgruppe zusätzlich, wie oben bereits erwähnt, eine stärkere Vaskularisation als in der Kontrollgruppe und somit eine bessere Versorgung des umliegenden Gewebes und der Zellen. In der Safranin-O/Fast Green-Färbung zeigt sich wie vorher beschrieben in der ersten Woche eine leichte Verzögerung in der

Spongialisierungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe bezüglich des Proteoglykangehaltes. Das Ergebnis nach sieben Wochen ist dann aber besser als das in der Kontrollgruppe. Der größere Heilungsaufwand ist somit auch hier primär bemerkbar, führt aber letztendlich wieder zu ähnlichen Ergebnissen.

Zusammenfassend können durch die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse nun folgende Aussagen getroffen werden:

1. Durch die Verwendung der Spongialisierungsmethode können keine besseren Ergebnisse in der Heilung der Sehne im Vergleich zur reinen Refixation erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen im zeitlichen Verlauf ähnliche Werte, dennoch bleibt die Kontrollgruppe leicht führend. Unter Beachtung des deutlich größeren strukturellen Schadens in der Spongialisierungsgruppe kann dennoch vermutet werden, dass das Heilungspotenzial durch die Spongialisierung angeregt wird. Die in Kapitel 1.4 aufgestellte erste Hypothese, dass

durch die Methode der Spongialisierung ein besseres Outcome als bei der reinen Refixierung der Sehne erreicht wird,

kann somit nicht angenommen werden.

2. Durch die Verwendung eines HF-Gerätes während der Operation wird der Heilungsprozess gestört. Die Ergebnisse mit dieser Methode sind deutlich schlechter. Die definitive Einheilung der Sehne ist hier oftmals nicht sicher zu bestätigen. Die zweite Hypothese, dass

durch die Verwendung eines HF-Gerätes ein schlechteres Outcome erzielt wird als durch die Methode der reinen Sehnenrefixierung ohne ein HF-Gerät,

kann somit angenommen werden.

4.5 Korrelation mit anderen Studien

Nachdem die Ergebnisse dieser Studie ausführlich diskutiert und auf die Hypothesen übertragen wurden sollen diese nun im folgenden Kapitel mit anderen Forschungsarbeiten verglichen werden. Es existieren bereits einige Studien, welche sich auf die Wirkung von Wachstumsfaktoren oder Stammzellen auf die Sehneneinheilung konzentriert haben. Der positive Effekt beim Einsatz von PRP oder einzelnen Wachstumsfaktoren [130, 148, 149, 215-218] ist ebenso vielversprechend wie die Ergebnisse der Versuche mit der Applikation von Stammzellen [145, 146, 219-225]. Nur wenige Studien lassen sich hingegen finden, welche die Möglichkeit zur Anreicherung körpereigener Stammzellen und Wachstumsfaktoren ohne separate Applikation untersuchen und ein vergleichbares Versuchsmodell zeigen wie es in dieser Arbeit hier vorliegt.

St. Pierre et al. [226] untersuchten bereits vor mehreren Jahren die Auswirkung der Sehnenrefixierung am spongiösen Knochen. Anhand eines Ziegenmodells wurde die Einheilung der Infraspinatussehne im spongiösen Knochen mit der Einheilung in die Kortikalis verglichen. Hierfür wurde an 20 Untersuchungstieren eine bilaterale Tenotomie durchgeführt und die Sehne anschließend entweder direkt am Knochen refixiert oder in einer zuvor mit Hilfe eines kleinen Bohrers präparierten Mulde am spongiösen Knochen befestigt. Nach 6 und 12 Wochen erfolgte jeweils die histologische (n=2) und biomechanische (n=8) Evaluation, welche keine signifikanten Unterschiede aufwies. Eine weitere Studie erschien 2013 von Levy et al.[227]. Hier wurde an 28 Ratten eine RMR (SSP) mit anschließender Sehnennaht simuliert. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde entweder ein hohles oder ein solides Tunnelimplantat in den Humerus eingebracht mit der Hypothese, dass lokale Knochenmarkzellen durch den Tunnel an den Ort der Sehneneinheilung wandern können und diese dadurch verbessern. Die Auswertung erfolgte nach 4 und 8 Wochen mit jeweils 4 Tieren für die histologische und 10 Tieren für die biomechanische Analyse. Auch hier konnte keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden. Limitierende Ursache könnten die sehr kleinen Implantate gewesen sein und bezogen auf beide eben genannten Studien die zu geringe Gruppengröße. In anderen Studien finden sich durchaus auch positive Ergebnisse. Randelli et al. [228] beispielweise konnte nachweisen, dass sich unmittelbar nach Durchführung einer Acromioplastik ein deutlich erhöhter Anteil an Wachstumsfaktoren im Subacromialraum befindet. Das Aufbrechen der Kortikalis, also die Spongialisierung, führte somit nachweislich zu einer Freisetzung an Wachstumsfaktoren. Eine relativ aktuelle Studie von Kida et al. [147] konnte das Wandern von Knochenmarkzellen an den Ort der Sehnenheilung durch Anbohren des Knochens nachweisen. An insgesamt 27 Ratten wurde die SSP-Sehne bilateral abgetrennt und vor Readaption auf einer Seite mit einem 0,5 mm Bohrer sechs Löcher am Tuberkulum majus in das Knochenmark gebohrt. Nach 2, 4 und 8 Wochen wurden jeweils 9 Tiere histologisch und biomechanisch evaluiert. Die Untersuchung der Knochenmarkszellen erfolgte spezifisch durch den Nachweis eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Sowohl in der Kontroll- als auch in Bohrgruppe waren mesenchymale Zellen ab der zweiten Woche nachweisbar, aber zu allen drei Evaluationszeitpunkten zeigten sich mehr Zellen in der Bohrgruppe. Auch die Ergebnisse der biomechanischen Auswertung waren in der Bohrgruppe überlegen. *Force-to-failure* war hier in Woche 4 und 8 signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Diese Studie belegt folglich die Hypothese, dass bei ermöglichtem Weg Zellen aus dem Knochenmark zum Sehnenansatz wandern können und dort die Einheilung am Footprint positiv beeinflussen. Die Ergebnisse in der Literatur sind somit noch sehr spärlich, zeigen aber eine Tendenz in die gleiche Richtung. Die Aussagen in dieser Arbeit finden aber durchaus Unterstützung und können durch anderen Studien bestätigt werden.

4.6 Ausblick

Für die Zukunft und weitere Forschungsarbeiten wäre es empfehlenswert den Versuchsaufbau auf ein größeres Tiermodell zu übertragen. Hierdurch würde sich die Diskrepanz zwischen der Bohrlochgröße für die transossäre Naht und der Humerusgröße ausgleichen und könnte als potenzielle Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Neben der Ratte stellen das Kaninchen, die Ziege und das Schaf ebenfalls etablierte Tiermodelle für die Sehnenforschung dar [34]. Auch hier wurden bereits viele Studien über die Sehneneinheilung durchgeführt [145, 149, 215, 226, 229-233]. Da sich die Heilungsprozesse bei den größeren Tieren langsamer abspielen, können die Ergebnisse aufgrund des ähnlicheren Heilungspotenzials besser auf den Menschen übertragen werden. Die Beobachtungszeiträume müssten dementsprechend angepasst werden.

Für noch aussagekräftigere Ergebnisse sollte die Auswertung um spezifische Nachweise für Stammzellen und/ oder Wachstumsfaktoren am Footprint ergänzt werden. Auf diese Weise könnte im Vergleich zu einer Kontrolle das vermehrte Vorhandensein und somit der Effekt der Methode der Spongialisierung bewiesen werden. Eine Möglichkeit wäre auch der Einsatz chimärer Tiere, welche über Genmanipulation die gesuchten Zellen unter fluoreszierendem Licht zeigen, wie es in der Studie von Kida et al. [147] angewendet wurde.

Der Beobachtungszeitraum könnte zudem verlängert werden, um den weiteren Verlauf bis zur komplett abgeschlossenen Heilung auszuwerten. Auch wenn Ratten ein sehr gutes Heilungspotenzial besitzen, so ist nach sieben Wochen die Heilung noch nicht abgeschlossen. In dieser Arbeit wäre es interessant gewesen wie sich die Verhältnisse der Kollagene weiter entwickelt hätten. Eine zusätzliche detailliertere zeitliche Aufschlüsselung der Kollagene zu mehreren Zeitpunkten wie es bei Galatz et al. [50] durchgeführt wurde würde sich ebenfalls anbieten, um ein besseres Verständnis über diesen Teil der Sehnenheilung zu erlangen.

5 Zusammenfassung

Rotatorenmanschettenrupturen stellen eine der häufigsten degenerativen Erkrankungen der oberen Extremität dar. Daher wurden operative Methoden und Behandlungsschematas in den letzten Jahren intensiv in der Literatur thematisiert. Für eine verbesserte Einheilung der rupturierten Sehne an ihrem Ansatz rückte die Anwendung von Wachstumsfaktoren und Stammzellen immer mehr in den Mittelpunkt. Bisherige Studien weisen hierfür vielversprechende Ergebnisse vor. Für die eigentliche Präparation des Footprints vor der Refixierung der Sehne gibt es aber bisher keine einheitliche Empfehlung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Footprint Präparationen auf die knöcherne Sehneneinheilung der Supraspinatussehne nach Rotatorenmanschettennaht an der Ratte untersucht. Hierfür wurden 24 weibliche Sprague-Dawley Ratten in drei Hauptgruppen aufgeteilt. In allen Gruppen erfolgte die scharfe Durchtrennung der SSP-Sehne am Ansatz mit sofortiger Refixierung nach gruppenspezifischer Präparation am Footprint. Diese unterschied sich wie folgt:

1. Gruppe → Durch Aufbrechen der Kortikalis und Freilegen der darunterliegenden Spongiosa sollen Wachstumsfaktoren und Stammzellen zum Sehnenansatz wandern und die Einheilung nach Readaption verbessern → Spongialisierungsgruppe
2. Gruppe → Durch Anwendung eines Hochfrequenzablationsgerätes zur Entfernung lokal verbliebener Weichteile werden potenzielle Zellen abgetötet und der Heilungsprozess verzögert → HF-Gruppe
3. Gruppe → Keine spezifische Präparation → Kontrollgruppe

Nach einer Regenerationsphase von 1 und 7 Wochen erfolgte die Euthanasie der Tiere für die histologische Auswertung. Hierfür wurden die Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin, Safranin O/Fast-Green und Picrosirius-Red durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate mikroskopisch nach etablierten Scores ausgewertet. Zur weiteren Untersuchung wurden spezifische immunhistochemische Färbungen für Kollagen I, II und III durchgeführt. Diese wurden anhand einer eigenen Testmethode quantitativ evaluiert und anschließend statistisch ausgewertet.

Durch den größeren strukturellen Schaden durch die Spongialisierung am Footprint zeigten sich in dieser Gruppe zunächst stärkere Entzündungszeichen, vermehrtes Zellaufkommen und erhöhte Vaskularisation als in der Kontrollgruppe. Die Organisation der Sehnenfasern, Proteoglykangehalt und Knorpelstruktur wiesen keine relevanten Unterschiede nach sieben Wochen auf. In der HF-Gruppe zeigten sich hingegen durchwegs schlechtere Ergebnisse mit

massiver und persistierender Entzündungsreaktion sowie einer Stagnation im Heilungsverlauf. Bis zur siebten Woche blieben die Fasern ungeordnet und das Anwachsen der Sehne konnte nicht immer sicher bestätigt werden. In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich die Kontrollgruppe stets leicht führend vor der Spongialisierungsgruppe. Im Kollagen II Gehalt erreichten beide Gruppen gute Werte. Im Vergleich zur HF-Gruppe waren diese sowohl nach einer als auch nach sieben Wochen statistisch signifikant höher. Die Auswertung der Kollagen I /Kollagen III Quotienten zeigte eine gute Qualität der Sehne in Spongialisierungs- und Kontrollgruppe. In der HF-Gruppe blieb die Bildung von Kollagen I deutlich reduziert und verzögert. Im Verhältnis zeigte die Sehne hier einen vorrangigen Kollagen III Gehalt. Die Quotientenwerte waren zu beiden Evaluationszeitpunkten signifikant besser in der Spongialisierungs- und Kontrollgruppe.

Die Spongialisierung des Footprints führt möglicherweise zu einem insgesamt verbesserten Heilungsprozess. Trotz des größeren Schadens durch die Präparation werden nach sieben Wochen nur leicht schlechtere oder sogar ähnliche Ergebnisse erreicht wie in der Kontrollgruppe. Die Anwendung eines HF-Gerätes kann nicht empfohlen werden, da die Heilung hier deutlich verschlechtert ist. Eine Übertragung auf ein Großtiermodell sowie ein zusätzlicher Nachweis von Stammzellen im Heilungsgebiet und eine längere Beobachtungszeit wären die nächsten Schritte, um die Auswirkungen der Spongialisierung noch besser evaluieren zu können.

Literaturverzeichnis

1. Huegel, J., A. Williams, and L. Soslowsky, *Rotator Cuff Biology and Biomechanics: a Review of Normal and Pathological Conditions*. Current Rheumatology Reports, 2014. **17**(1): p. 1-9.
2. Aumüller, G., et al., *Duale reihe anatomie*. 2014: Georg Thieme Verlag.
3. Wiedemann, E., P. Biberthaler, and S. Hinterwimmer, *Anatomie und Einteilung der Rotatorenmanschettendefekte*. Arthroskopie, 2004. **17**(1): p. 17-26.
4. Mochizuki, T., et al., *Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(5): p. 962-9.
5. Jerosch, J., T. Muller, and W.H. Castro, *The incidence of rotator cuff rupture. An anatomic study*. Acta Orthop Belg, 1991. **57**(2): p. 124-9.
6. Harryman, D.T., 2nd, et al., *Repairs of the rotator cuff. Correlation of functional results with integrity of the cuff*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(7): p. 982-9.
7. Neer, C.S., 2nd, *Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder*. 1972. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(6): p. 1399.
8. Neer, C.S., 2nd, *Impingement lesions*. Clin Orthop Relat Res, 1983(173): p. 70-7.
9. Cofield, R.H., *Rotator cuff disease of the shoulder*. J Bone Joint Surg Am, 1985. **67**(6): p. 974-9.
10. Moseley, H.F. and I. Goldie, *THE ARTERIAL PATTERN OF THE ROTATOR CUFF OF THE SHOULDER*. J Bone Joint Surg Br, 1963. **45**(4): p. 780-9.
11. Rothman, R.H. and W.W. Parke, *The vascular anatomy of the rotator cuff*. Clin Orthop Relat Res, 1965. **41**: p. 176-86.
12. Chansky, H. and J. Iannotti, *The vascularity of the rotator cuff*. Clinics in sports medicine, 1991. **10**(4): p. 807-822.
13. Biberthaler, P., et al., *Microcirculation associated with degenerative rotator cuff lesions. In vivo assessment with orthogonal polarization spectral imaging during arthroscopy of the shoulder*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-a**(3): p. 475-80.
14. Ling, S.C., C.F. Chen, and R.X. Wan, *A study on the vascular supply of the supraspinatus tendon*. Surg Radiol Anat, 1990. **12**(3): p. 161-5.
15. Lohr, J.F. and H.K. Uthoff, *The microvascular pattern of the supraspinatus tendon*. Clin Orthop Relat Res, 1990(254): p. 35-8.
16. Rathbun, J.B. and I. Macnab, *The microvascular pattern of the rotator cuff*. J Bone Joint Surg Br, 1970. **52**(3): p. 540-53.
17. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. 2011: Georg Thieme Verlag.
18. Sharma, P. and N. Maffulli, *Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006. **6**(2): p. 181-90.
19. Nordin, M. and V.H. Frankel, *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*. 2001: Lippincott Williams & Wilkins.
20. Kannus, P., *Structure of the tendon connective tissue*. Scandinavian journal of medicine & science in sports, 2000. **10**(6): p. 312-320.
21. Williams, J.G., *Achilles tendon lesions in sport*. Sports Med, 1986. **3**(2): p. 114-35.
22. Kirkendall, D. and W. Garrett, *Function and biomechanics of tendons*. Scandinavian journal of medicine & science in sports, 1997. **7**(2): p. 62-66.
23. James, R., et al., *Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options*. J Hand Surg Am, 2008. **33**(1): p. 102-12.
24. Benjamin, M., et al., *The skeletal attachment of tendons--tendon "entheses"*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002. **133**(4): p. 931-45.
25. Benjamin, M. and J.R. Ralphs, *Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load*. J Anat, 1998. **193 (Pt 4)**: p. 481-94.
26. Benjamin, M. and J.R. Ralphs, *Tendons and ligaments--an overview*. Histol Histopathol, 1997. **12**(4): p. 1135-44.

27. O'Brien, M., *Functional anatomy and physiology of tendons*. Clin Sports Med, 1992. **11**(3): p. 505-20.
28. Mosler, E., et al., *Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen*. J Mol Biol, 1985. **182**(4): p. 589-96.
29. Sasaki, N., et al., *Time-resolved X-ray diffraction from tendon collagen during creep using synchrotron radiation*. J Biomech, 1999. **32**(3): p. 285-92.
30. Rees, J.D., N. Maffulli, and J. Cook, *Management of tendinopathy*. Am J Sports Med, 2009. **37**(9): p. 1855-67.
31. Kannus, P., et al., *[Pathophysiology of overuse tendon injury]*. Radiologe, 2002. **42**(10): p. 766-70.
32. Oakes, B.W., *Tissue healing and repair: tendons and ligaments*. Rehabilitation of sports injuries: scientific basis, 2003: p. 28-98.
33. Garner, W.L., et al., *Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons*. Plast Reconstr Surg, 1989. **83**(5): p. 875-9.
34. Thomopoulos, S., et al., *Mechanisms of tendon injury and repair*. J Orthop Res, 2015.
35. Myers, B. and M. Wolf, *Vascularization of the healing wound*. Am Surg, 1974. **40**(12): p. 716-22.
36. Liu, S.H., et al., *Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review*. Clin Orthop Relat Res, 1995(318): p. 265-78.
37. Abrahamsson, S.O., *Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon*. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg Suppl, 1991. **23**: p. 1-51.
38. Sharma, P. and N. Maffulli, *Tendon injury and tendinopathy: healing and repair*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(1): p. 187-202.
39. Blevins, F.T., et al., *Biology of the rotator cuff tendon*. Orthop Clin North Am, 1997. **28**(1): p. 1-16.
40. Rokito, A.S., et al., *Long-term functional outcome of repair of large and massive chronic tears of the rotator cuff*. J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(7): p. 991-7.
41. Manske, P.R. and P.A. Lesker, *Biochemical evidence of flexor tendon participation in the repair process--an in vitro study*. J Hand Surg Br, 1984. **9**(2): p. 117-20.
42. Potenza, A.D., *Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog*. J Bone Joint Surg Am, 1962. **44-a**: p. 49-64.
43. Hefti, F. and T.M. Stoll, *[Healing of ligaments and tendons]*. Orthopade, 1995. **24**(3): p. 237-45.
44. Fujita, M., S. Hukuda, and Y. Doida, *[Experimental study of intrinsic healing of the flexor tendon: collagen synthesis of the cultured flexor tendon cells of the canine]*. Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1992. **66**(4): p. 326-33.
45. Ruotolo, C., J.E. Fow, and W.M. Nottage, *The supraspinatus footprint: an anatomic study of the supraspinatus insertion*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2004. **20**(3): p. 246-249.
46. Mochizuki, T., et al., *Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff*. JBJS Essential Surgical Techniques, 2009(Supplement 2 Part 1): p. 1-7.
47. Curtis, A.S., et al., *The insertional footprint of the rotator cuff: an anatomic study*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2006. **22**(6): p. 603-609. e1.
48. Giai Via, A., et al., *Clinical and biological aspects of rotator cuff tears*. Muscles, Ligaments and Tendons Journal, 2013. **3**(2): p. 70-79.
49. Benjamin, M., E.J. Evans, and L. Copp, *The histology of tendon attachments to bone in man*. J Anat, 1986. **149**: p. 89-100.
50. Galatz, L.M., et al., *Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury*. J Orthop Res, 2006. **24**(3): p. 541-50.
51. Yamamoto, A., et al., *Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population*. J Shoulder Elbow Surg, 2010. **19**(1): p. 116-20.

52. Yamaguchi, K., et al., *The demographic and morphological features of rotator cuff disease. A comparison of asymptomatic and symptomatic shoulders.* J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(8): p. 1699-704.
53. Mall, N.A., et al., *An evidenced-based examination of the epidemiology and outcomes of traumatic rotator cuff tears.* Arthroscopy, 2013. **29**(2): p. 366-76.
54. Sher, J.S., et al., *Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders.* J Bone Joint Surg Am, 1995. **77**(1): p. 10-5.
55. Milgrom, C., et al., *Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender.* Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 1995. **77**(2): p. 296-298.
56. Reilly, P., et al., *Dead Men and Radiologists Don't Lie: A Review of Cadaveric and Radiological Studies of Rotator Cuff Tear Prevalence.* Annals of The Royal College of Surgeons of England, 2006. **88**(2): p. 116-121.
57. Tempelhof, S., S. Rupp, and R. Seil, *Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders.* J Shoulder Elbow Surg, 1999. **8**(4): p. 296-9.
58. Bigliani, L.U., et al., *[Relationship of acromial architecture and diseases of the rotator cuff].* Orthopade, 1991. **20**(5): p. 302-9.
59. Imhoff, A., R. Linke, and R. Baumgartner, *Checkliste Orthopädie.* 2014: Georg Thieme Verlag.
60. Bigliani, L., *The morphology of the acromion and its relationship to rotator cuff tears.* Orthop. Trans., 1986. **10**: p. 228.
61. Johnson, D.H. and R.A. Pedowitz, *Practical orthopaedic sports medicine and arthroscopy.* 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
62. Bigliani, L.U., et al., *The relationship of acromial architecture to rotator cuff disease.* Clin Sports Med, 1991. **10**(4): p. 823-38.
63. Epstein, R.E., et al., *Hooked acromion: prevalence on MR images of painful shoulders.* Radiology, 1993. **187**(2): p. 479-81.
64. Wang, J.C. and M.S. Shapiro, *Changes in acromial morphology with age.* J Shoulder Elbow Surg, 1997. **6**(1): p. 55-9.
65. Nho, S.J., et al., *Rotator cuff degeneration: etiology and pathogenesis.* Am J Sports Med, 2008. **36**(5): p. 987-93.
66. Carpenter, J.E., et al., *The effects of overuse combined with intrinsic or extrinsic alterations in an animal model of rotator cuff tendinosis.* Am J Sports Med, 1998. **26**(6): p. 801-7.
67. Loew, M., *Zur traumatischen Entstehung der Rotatorenmanschettenläsion.* Der Orthopäde, 2000. **29**(10): p. 881-887.
68. Dietz, S.O., P. Habermeyer, and P. Magosch, *[Current concepts in treatment of rotator cuff tears].* Zentralbl Chir, 2002. **127**(3): p. 194-202.
69. Ghodadra, N.S., et al., *Open, mini-open, and all-arthroscopic rotator cuff repair surgery: indications and implications for rehabilitation.* J Orthop Sports Phys Ther, 2009. **39**(2): p. 81-9.
70. Schofer, M.D., et al., *[Operative and follow-up treatment of rotator cuff tears--the current situation].* Z Orthop Unfall, 2009. **147**(3): p. 321-6.
71. Cofield, R.H., et al., *Surgical repair of chronic rotator cuff tears.* The Journal of Bone & Joint Surgery, 2001. **83**(1): p. 71-71.
72. Bassett, R.W. and R.H. Cofield, *Acute tears of the rotator cuff. The timing of surgical repair.* Clin Orthop Relat Res, 1983. **175**: p. 18-24.
73. Yamaguchi, K., et al., *Natural history of asymptomatic rotator cuff tears: a longitudinal analysis of asymptomatic tears detected sonographically.* J Shoulder Elbow Surg, 2001. **10**(3): p. 199-203.
74. Ozbaydar, M., et al., *[Arthroscopic reconstruction of the rotator cuff. The current gold standard?].* Orthopade, 2007. **36**(9): p. 825-33.
75. Gerber, C., et al., *Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep.* J Bone Joint Surg Am, 2004. **86-a**(9): p. 1973-82.

76. Ellman, H., G. Hunker, and M. Bayer, *Repair of the rotator cuff. End-result study of factors influencing reconstruction.* J Bone Joint Surg Am, 1986. **68**(8): p. 1136-44.
77. Goutallier, D., et al., *Fatty infiltration of disrupted rotator cuff muscles.* Rev Rhum Engl Ed, 1995. **62**(6): p. 415-22.
78. Kuzel, B.R., et al., *Fatty infiltration and rotator cuff atrophy.* J Am Acad Orthop Surg, 2013. **21**(10): p. 613-23.
79. Hata, Y., et al., *A less invasive surgery for rotator cuff tear: mini-open repair.* J Shoulder Elbow Surg, 2001. **10**(1): p. 11-6.
80. Yamaguchi, K., C.M. Ball, and L.M. Galatz, *Arthroscopic rotator cuff repair: transition from mini-open to all-arthroscopic.* Clin Orthop Relat Res, 2001(390): p. 83-94.
81. Chhabra, A., et al., *In vitro analysis of rotator cuff repairs: A comparison of arthroscopically inserted tacks or anchors with open transosseous repairs.* Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2005. **21**(3): p. 323-327.
82. Hawkins, R.J., G.W. Misamore, and P.E. Hobeika, *Surgery for full-thickness rotator-cuff tears.* J Bone Joint Surg Am, 1985. **67**(9): p. 1349-55.
83. Gartsman, G.M., *Arthroscopic management of rotator cuff disease.* J Am Acad Orthop Surg, 1998. **6**(4): p. 259-66.
84. Gartsman, G.M., M.R. Brinker, and M. Khan, *Early effectiveness of arthroscopic repair for full-thickness tears of the rotator cuff: an outcome analysis.* J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(1): p. 33-40.
85. Gartsman, G.M. and S.M. Hammerman, *Full-thickness tears: arthroscopic repair.* Orthop Clin North Am, 1997. **28**(1): p. 83-98.
86. Baker, C.L. and S.H. Liu, *Comparison of open and arthroscopically assisted rotator cuff repairs.* Am J Sports Med, 1995. **23**(1): p. 99-104.
87. Pollock, R.G. and E.L. Flatow, *The rotator cuff. Full-thickness tears. Mini-open repair.* Orthop Clin North Am, 1997. **28**(2): p. 169-77.
88. Gartsman, G.M., M. Khan, and S.M. Hammerman, *Arthroscopic repair of full-thickness tears of the rotator cuff.* J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(6): p. 832-40.
89. Burkhart, S.S., et al., *Cyclic loading of anchor-based rotator cuff repairs: confirmation of the tension overload phenomenon and comparison of suture anchor fixation with transosseous fixation.* Arthroscopy, 1997. **13**(6): p. 720-4.
90. Goradia, V.K., et al., *Cyclic loading of rotator cuff repairs: A comparison of bioabsorbable tacks with metal suture anchors and transosseous sutures.* Arthroscopy, 2001. **17**(4): p. 360-4.
91. Galatz, L.M., et al., *The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears.* J Bone Joint Surg Am, 2004: p. 219-24.
92. Bishop, J., et al., *Cuff integrity after arthroscopic versus open rotator cuff repair: a prospective study.* J Shoulder Elbow Surg, 2006. **15**(3): p. 290-9.
93. Boileau, P., et al., *Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal?* J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(6): p. 1229-40.
94. Cho, N.S. and Y.G. Rhee, *The factors affecting the clinical outcome and integrity of arthroscopically repaired rotator cuff tears of the shoulder.* Clin Orthop Surg, 2009. **1**(2): p. 96-104.
95. Lubiatowski, P., et al., *Clinical and biomechanical performance of patients with failed rotator cuff repair.* Int Orthop, 2013. **37**(12): p. 2395-401.
96. Iannotti, J.P., et al., *Time to failure after rotator cuff repair: a prospective imaging study.* J Bone Joint Surg Am, 2013. **95**(11): p. 965-71.
97. Weeks, K.D., 3rd, et al., *The basic science behind biologic augmentation of tendon-bone healing: a scientific review.* Instr Course Lect, 2014. **63**: p. 443-50.
98. Randelli, P., et al., *Regenerative medicine in rotator cuff injuries.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 129515.
99. Caplan, A.I., *The mesengenic process.* Clin Plast Surg, 1994. **21**(3): p. 429-35.
100. Sharma, P. and N. Maffulli, *Tendinopathy and tendon injury: the future.* Disabil Rehabil, 2008. **30**(20-22): p. 1733-45.

101. Montgomery, S.R., F.A. Petrigliano, and S.C. Gamradt, *Biologic augmentation of rotator cuff repair*. Curr Rev Musculoskelet Med, 2011. **4**(4): p. 221-30.
102. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
103. Isaac, C., et al., *Biologic approaches to enhance rotator cuff healing after injury*. J Shoulder Elbow Surg, 2012. **21**(2): p. 181-90.
104. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.
105. Mazzocca, A.D., et al., *Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery*. Am J Sports Med, 2010. **38**(7): p. 1438-47.
106. Beitzel, K., et al., *Rapid isolation of human stem cells (connective progenitor cells) from the distal femur during arthroscopic knee surgery*. Arthroscopy, 2012. **28**(1): p. 74-84.
107. Tsai, C.C., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells from shoulder rotator cuff: a potential source for muscle and tendon repair*. Cell Transplant, 2013. **22**(3): p. 413-22.
108. Randelli, P., et al., *Isolation and characterization of 2 new human rotator cuff and long head of biceps tendon cells possessing stem cell-like self-renewal and multipotential differentiation capacity*. Am J Sports Med, 2013. **41**(7): p. 1653-64.
109. Utsunomiya, H., et al., *Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from shoulder tissues involved in rotator cuff tears*. Am J Sports Med, 2013. **41**(3): p. 657-68.
110. Song, N., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from human subacromial bursa: potential for cell based tendon tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(1-2): p. 239-49.
111. Marui, T., et al., *Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts*. J Orthop Res, 1997. **15**(1): p. 18-23.
112. Tsuzaki, M., et al., *Insulin-like growth factor-I is expressed by avian flexor tendon cells*. J Orthop Res, 2000. **18**(4): p. 546-56.
113. Sciore, P., R. Boykiw, and D.A. Hart, *Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue*. J Orthop Res, 1998. **16**(4): p. 429-37.
114. Chang, J., et al., *Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression*. J Hand Surg Am, 1998. **23**(6): p. 1052-8.
115. Stein, L.E., *Effects of serum, fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor on explants of rat tail tendon: a morphological study*. Acta Anat (Basel), 1985. **123**(4): p. 247-52.
116. Abrahamsson, S.O. and S. Lohmander, *Differential effects of insulin-like growth factor-I on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons*. J Orthop Res, 1996. **14**(3): p. 370-6.
117. Banes, A.J., et al., *PDGF-BB, IGF-I and mechanical load stimulate DNA synthesis in avian tendon fibroblasts in vitro*. J Biomech, 1995. **28**(12): p. 1505-13.
118. Petersen, W., et al., *The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing*. Arch Orthop Trauma Surg, 2003. **123**(9): p. 475-80.
119. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 789-91.
120. Bidder, M., et al., *Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon*. J Orthop Res, 2000. **18**(2): p. 247-52.
121. Zhang, F., et al., *Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing*. Plast Reconstr Surg, 2003. **112**(6): p. 1613-9.

122. Moura, J., et al., *Molecular and cellular mechanisms of bone morphogenetic proteins and activins in the skin: potential benefits for wound healing*. Arch Dermatol Res, 2013. **305**(7): p. 557-69.
123. Chang, J., et al., *Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair*. Plast Reconstr Surg, 1997. **100**(4): p. 937-44.
124. Nakamura, N., et al., *A comparison of in vivo gene delivery methods for antisense therapy in ligament healing*. Gene Ther, 1998. **5**(11): p. 1455-61.
125. Nakamura, N., et al., *Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament*. Gene Ther, 1998. **5**(9): p. 1165-70.
126. Ozkan, I., et al., *Direct in vivo gene transfer to healing rat patellar ligament by intra-arterial delivery of haemagglutinating virus of Japan liposomes*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(1): p. 63-7.
127. Lou, J., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer into tendon and tendon sheath*. J Orthop Res, 1996. **14**(4): p. 513-7.
128. Goomer, R.S., et al., *Nonviral in vivo gene therapy for tissue engineering of articular cartilage and tendon repair*. Clin Orthop Relat Res, 2000(379 Suppl): p. S189-200.
129. Uggen, J.C., et al., *Tendon gene therapy modulates the local repair environment in the shoulder*. J Am Osteopath Assoc, 2005. **105**(1): p. 20-1.
130. Randelli, P.S., et al., *Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study*. Disabil Rehabil, 2008. **30**(20-22): p. 1584-9.
131. Andia, I. and N. Maffulli, *Muscle and Tendon Injuries: The Role of Biological Interventions to Promote and Assist Healing and Recovery*. Arthroscopy, 2015.
132. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 158-67.
133. Mishra, A., et al., *Platelet-rich plasma and the upper extremity*. Hand Clin, 2012. **28**(4): p. 481-91.
134. Rodeo, S.A., *Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair*. J Shoulder Elbow Surg, 2007. **16**(5 Suppl): p. S191-7.
135. Derwin, K.A., et al., *Extracellular matrix scaffold devices for rotator cuff repair*. J Shoulder Elbow Surg, 2010. **19**(3): p. 467-76.
136. Chen, J., et al., *Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products*. Expert Rev Med Devices, 2009. **6**(1): p. 61-73.
137. Kimura, A., et al., *Reconstruction of a defect of the rotator cuff with polytetrafluoroethylene felt graft RECOVERY OF TENSILE STRENGTH AND HISTOCOMPATIBILITY IN AN ANIMAL MODEL*. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 2003. **85**(2): p. 282-287.
138. Cheung, E.V., L. Silverio, and J.W. Sperling, *Strategies in biologic augmentation of rotator cuff repair: a review*. Clin Orthop Relat Res, 2010. **468**(6): p. 1476-84.
139. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Biomaterials, 2007. **28**(25): p. 3587-93.
140. Zhang, X., et al., *Biomimetic scaffold design for functional and integrative tendon repair*. J Shoulder Elbow Surg, 2012. **21**(2): p. 266-77.
141. Meyer, M., et al., *Does arthroscopic rotator cuff repair actually heal? Anatomic evaluation with magnetic resonance arthrography at minimum 2 years follow-up*. J Shoulder Elbow Surg, 2012. **21**(4): p. 531-6.
142. Nho, S.J., et al., *Biomechanical and biologic augmentation for the treatment of massive rotator cuff tears*. Am J Sports Med, 2010. **38**(3): p. 619-29.
143. Wildemann, B. and F. Klatte, *Biological aspects of rotator cuff healing*. Muscles Ligaments Tendons J, 2011. **1**(4): p. 161-8.
144. Papalia, R., et al., *Augmentation techniques for rotator cuff repair*. Br Med Bull, 2012. **18**: p. 18.

145. Chong, A.K., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(1): p. 74-81.
146. Nourissat, G., et al., *Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12248.
147. Kida, Y., et al., *Bone marrow-derived cells from the footprint infiltrate into the repaired rotator cuff*. J Shoulder Elbow Surg, 2013. **22**(2): p. 197-205.
148. Hapa, O., et al., *Effect of platelet-rich plasma on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in rats: an in vivo experimental study*. Acta Orthop Traumatol Turc, 2012. **46**(4): p. 301-7.
149. Rodeo, S.A., et al., *Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(11): p. 2485-97.
150. Barber, F.A., et al., *Rotator cuff repair healing influenced by platelet-rich plasma construct augmentation*. Arthroscopy, 2011. **27**(8): p. 1029-35.
151. Tibor, L.M., et al., *A biomechanical assessment of tendon repair after radiofrequency treatment*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2012. **41**(9): p. E115-21.
152. Edwards, R.B., 3rd, et al., *Thermometric determination of cartilage matrix temperatures during thermal chondroplasty: comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices*. Arthroscopy, 2002. **18**(4): p. 339-46.
153. Kouk, S.N., B. Zoric, and W.B. Stetson, *Complication of the use of a radiofrequency device in arthroscopic shoulder surgery: second-degree burn of the shoulder girdle*. Arthroscopy, 2011. **27**(1): p. 136-41.
154. Lu, Y., et al., *Effect of bipolar radiofrequency energy on human articular cartilage. Comparison of confocal laser microscopy and light microscopy*. Arthroscopy, 2001. **17**(2): p. 117-23.
155. Derwin, K.A., et al., *Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(1): p. 21-30.
156. Soslowky, L.J., et al., *Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease*. J Shoulder Elbow Surg, 1996. **5**(5): p. 383-92.
157. Ficklscherer, A., et al., *Effects of selective paralysis of the supraspinatus muscle using botulinum neurotoxin a in rotator cuff healing in rats*. J Orthop Res, 2012. **13**(10): p. 22260.
158. Longo, U.G., et al., *Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears*. Am J Sports Med, 2008. **36**(3): p. 533-8.
159. Astrom, M. and A. Rausing, *Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings*. Clin Orthop Relat Res, 1995(316): p. 151-64.
160. Maffulli, N., et al., *Similar histopathological picture in males with Achilles and patellar tendinopathy*. Med Sci Sports Exerc, 2004. **36**(9): p. 1470-5.
161. Movin, T., et al., *Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients*. Acta Orthop Scand, 1997. **68**(2): p. 170-5.
162. Tallon, C., N. Maffulli, and S.W. Ewen, *Ruptured Achilles tendons are significantly more degenerated than tendinopathic tendons*. Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(12): p. 1983-90.
163. Maffulli, N., V. Barrass, and S.W. Ewen, *Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons*. Am J Sports Med, 2000. **28**(6): p. 857-63.
164. Mainil-Varlet, P., et al., *A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II*. Am J Sports Med, 2010. **38**(5): p. 880-90.
165. Rutgers, M., et al., *Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis and Cartilage, 2010. **18**(1): p. 12-23.
166. O'Driscoll, S.W., F.W. Keeley, and R.B. Salter, *The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects*

- in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit.* J Bone Joint Surg Am, 1986. **68**(7): p. 1017-35.
167. Kumagai, J., et al., *Immunohistochemical distribution of type I, II and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion.* J Anat, 1994. **185 (Pt 2)**: p. 279-84.
168. Kumagai, J., K. Sarkar, and H.K. Uthoff, *The collagen types in the attachment zone of rotator cuff tendons in the elderly: an immunohistochemical study.* J Rheumatol, 1994. **21**(11): p. 2096-100.
169. Maffulli, N., et al., *Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing.* Am J Sports Med, 2000. **28**(4): p. 499-505.
170. Ippolito, E., et al., *Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages.* J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(4): p. 583-98.
171. Williams, I.F., K.G. McCullagh, and I.A. Silver, *The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon.* Connect Tissue Res, 1984. **12**(3-4): p. 211-27.
172. Jozsa, L., A. Reffy, and J.B. Balint, *Polarization and electron microscopic studies on the collagen of intact and ruptured human tendons.* Acta Histochem, 1984. **74**(2): p. 209-15.
173. Holz, U., [*Achilles tendon rupture and achillodynia. The importance of tissue regeneration*]. Fortschr Med, 1980. **98**(39): p. 1517-20.
174. Williams, I.F., A. Heaton, and K.G. McCullagh, *Cell morphology and collagen types in equine tendon scar.* Res Vet Sci, 1980. **28**(3): p. 302-10.
175. Kumagai, J., et al., *Collagen type III in rotator cuff tears: An immunohistochemical study.* J Shoulder Elbow Surg, 1992. **1**(4): p. 187-92.
176. Riley, G.P., et al., *Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis.* Ann Rheum Dis, 1994. **53**(6): p. 359-66.
177. Liu, S.H., et al., *Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing.* Clin Orthop Relat Res, 1997(339): p. 253-60.
178. Boyer, M.I., et al., *Two-portal repair of canine flexor tendon insertion site injuries: histologic and immunohistochemical characterization of healing during the early postoperative period.* J Hand Surg Am, 2003. **28**(3): p. 469-74.
179. Martins, C.A., et al., *Dextrose prolotherapy and corticosteroid injection into rat Achilles tendon.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(10): p. 1895-900.
180. Rich, L. and P. Whittaker, *Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution.* Braz J Morphol Sci, 2005. **22**(2): p. 97-104.
181. Gulotta, L.V., et al., *Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model.* Am J Sports Med, 2009. **37**(11): p. 2126-33.
182. Burkhart, S.S. and I.K. Lo, *Arthroscopic rotator cuff repair.* J Am Acad Orthop Surg, 2006. **14**(6): p. 333-46.
183. Duquin, T.R., C. Buyea, and L.J. Bisson, *Which method of rotator cuff repair leads to the highest rate of structural healing? A systematic review.* Am J Sports Med, 2010. **38**(4): p. 835-41.
184. Soslowky, L.J., et al., *Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study.* J Shoulder Elbow Surg, 2000. **9**(2): p. 79-84.
185. Soslowky, L.J., et al., *Rotator cuff tendinosis in an animal model: role of extrinsic and overuse factors.* Ann Biomed Eng, 2002. **30**(8): p. 1057-63.
186. Ide, J., et al., *Reconstruction of large rotator-cuff tears with acellular dermal matrix grafts in rats.* J Shoulder Elbow Surg, 2009. **18**(2): p. 288-95.
187. Zalavras, C.G., et al., *Reconstruction of large rotator cuff tendon defects with porcine small intestinal submucosa in an animal model.* J Shoulder Elbow Surg, 2006. **15**(2): p. 224-31.

188. Lu, Y., et al., *Thermal chondroplasty with bipolar and monopolar radiofrequency energy: effect of treatment time on chondrocyte death and surface contouring*. Arthroscopy, 2002. **18**(7): p. 779-88.
189. Lu, Y., et al., *Thermal chondroplasty with radiofrequency energy. An in vitro comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices*. Am J Sports Med, 2001. **29**(1): p. 42-9.
190. Yoon, J.H., et al., *Switching bipolar hepatic radiofrequency ablation using internally cooled wet electrodes: comparison with consecutive monopolar and switching monopolar modes*. Br J Radiol, 2015. **88**(1050): p. 20140468.
191. Gimbel, J.A., et al., *Long durations of immobilization in the rat result in enhanced mechanical properties of the healing supraspinatus tendon insertion site*. J Biomech Eng, 2007. **129**(3): p. 400-4.
192. Thomopoulos, S., G.R. Williams, and L.J. Soslowsky, *Tendon to bone healing: differences in biomechanical, structural, and compositional properties due to a range of activity levels*. J Biomech Eng, 2003. **125**(1): p. 106-13.
193. Buckwalter, J.A., *Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries*. Iowa Orthop J, 1995. **15**: p. 29-42.
194. Buckwalter, J.A., *Effects of early motion on healing of musculoskeletal tissues*. Hand Clin, 1996. **12**(1): p. 13-24.
195. Gallagher, B.P., et al., *Early versus delayed rehabilitation following arthroscopic rotator cuff repair: A systematic review*. Phys Sportsmed, 2015. **43**(2): p. 178-87.
196. Plate, J.F., et al., *Advanced age diminishes tendon-to-bone healing in a rat model of rotator cuff repair*. Am J Sports Med, 2014. **42**(4): p. 859-68.
197. Jubb, R.W. and F.M. Eggert, *Staining of demineralized cartilage. II. Quantitation of articular cartilage proteoglycan after fixation and rapid demineralization*. Histochemistry, 1981. **73**(3): p. 391-6.
198. Camplejohn, K.L. and S.A. Allard, *Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies*. Histochemistry, 1988. **89**(2): p. 185-8.
199. Troyer, H., *Spectral characteristics of metachromatically stained cartilage: effects of enzymatic degradation and dehydration*. Acta Histochem, 1977. **58**(2): p. 263-8.
200. Shepard, N. and N. Mitchell, *The localization of articular cartilage proteoglycan by electron microscopy*. Anat Rec, 1977. **187**(4): p. 463-76.
201. Arruda, E.M., et al., *Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(2): p. R983-7.
202. Bi, X., et al., *A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS)*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(12): p. 1050-8.
203. Li, X.J., T. Lei, and J.H. Gao, *Detection of collagens in hypertrophic scars by picrosirius polarization method*. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002. **22**(3): p. 217-9.
204. Junqueira, L.C.U., G. Bignolas, and R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. The Histochemical journal, 1979. **11**(4): p. 447-455.
205. Bonasia, D.E., et al., *Intra- and inter-observer reliability of ten major histological scoring systems used for the evaluation of in vivo cartilage repair*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015. **23**(9): p. 2484-93.
206. Orth, P., et al., *Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model*. Tissue Eng Part C Methods, 2012. **18**(5): p. 329-39.
207. Killian, M.L., et al., *Chronic Degeneration Leads to Poor Healing of Repaired Massive Rotator Cuff Tears in Rats*. Am J Sports Med, 2015. **43**(10): p. 2401-10.
208. Jan, N.J., et al., *Polarization microscopy for characterizing fiber orientation of ocular tissues*. Biomed Opt Express, 2015. **6**(12): p. 4705-18.

209. Chung, S.W., et al., *Effect of platelet-rich plasma and porcine dermal collagen graft augmentation for rotator cuff healing in a rabbit model*. Am J Sports Med, 2013. **41**(12): p. 2909-18.
210. Winters, R., A. Winters, and R.G. Amedee, *Statistics: a brief overview*. Ochsner J, 2010. **10**(3): p. 213-6.
211. Mann, C.J., et al., *Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle*. Skelet Muscle, 2011. **1**(1): p. 21.
212. Oron, A., et al., *The influence of radiofrequency ablation patterns on length, histological and mechanical properties of tendons*. Muscles Ligaments Tendons J, 2012. **2**(2): p. 85-90.
213. Edwards, R.B., 3rd, et al., *Thermal chondroplasty of chondromalacic human cartilage. An ex vivo comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices*. Am J Sports Med, 2002. **30**(1): p. 90-7.
214. Sakai, H., et al., *Type I and type III procollagen gene expressions in the early phase of ligament healing in rabbits: an in situ hybridization study*. J Orthop Res, 2001. **19**(1): p. 132-5.
215. Wu, Y., et al., *Effect of platelet-rich plasma and bioactive glass powder for the improvement of rotator cuff tendon-to-bone healing in a rabbit model*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(12): p. 21980-91.
216. Dolkart, O., et al., *A single dose of platelet-rich plasma improves the organization and strength of a surgically repaired rotator cuff tendon in rats*. Arch Orthop Trauma Surg, 2014. **134**(9): p. 1271-7.
217. Tokunaga, T., et al., *Local Application of Gelatin Hydrogel Sheets Impregnated With Platelet-Derived Growth Factor BB Promotes Tendon-to-Bone Healing After Rotator Cuff Repair in Rats*. Arthroscopy, 2015. **31**(8): p. 1482-91.
218. Milano, G., et al., *The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(7): p. 971-80.
219. Ellera Gomes, J.L., et al., *Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(2): p. 373-7.
220. Chen, H.S., et al., *Human adipose-derived stem cells accelerate the restoration of tensile strength of tendon and alleviate the progression of rotator cuff injury in a rat model*. Cell Transplant, 2015. **24**(3): p. 509-20.
221. Gulotta, L.V., et al., *Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site*. Am J Sports Med, 2010. **38**(7): p. 1429-37.
222. Hernigou, P., et al., *Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: a case-controlled study*. Int Orthop, 2014. **38**(9): p. 1811-8.
223. Omi, R., et al., *Rotator cuff repair augmentation in a rat model that combines a multilayer xenograft tendon scaffold with bone marrow stromal cells*. J Shoulder Elbow Surg, 2015.
224. Gulotta, L.V., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model*. Am J Sports Med, 2011. **39**(6): p. 1282-9.
225. Dashtdar, H., et al., *A preliminary study comparing the use of allogenic chondrogenic pre-differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells for the repair of full thickness articular cartilage defects in rabbits*. J Orthop Res, 2011. **29**(9): p. 1336-42.
226. St Pierre, P., et al., *Tendon-healing to cortical bone compared with healing to a cancellous trough. A biomechanical and histological evaluation in goats*. J Bone Joint Surg Am, 1995. **77**(12): p. 1858-66.
227. Levy, D.M., et al., *Rotator cuff repair augmentation with local autogenous bone marrow via humeral cannulation in a rat model*. J Shoulder Elbow Surg, 2013. **31**(12): p. 014.

228. Randelli, P., et al., *Release of growth factors after arthroscopic acromioplasty*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009. **17**(1): p. 98-101.
229. Soda, Y., et al., *Attachment of autogenous tendon graft to cortical bone is better than to cancellous bone: a mechanical and histological study of MCL reconstruction in rabbits*. Acta Orthop Scand, 2003. **74**(3): p. 322-6.
230. Chen, C.H., et al., *Enveloping the tendon graft with periosteum to enhance tendon-bone healing in a bone tunnel: A biomechanical and histologic study in rabbits*. Arthroscopy, 2003. **19**(3): p. 290-6.
231. Kobayashi, M., et al., *Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits*. J Shoulder Elbow Surg, 2006. **15**(3): p. 371-7.
232. Lacitignola, L., et al., *Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis*. Vet Comp Orthop Traumatol, 2014. **27**(3): p. 204-9.
233. Seeherman, H.J., et al., *rhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(10): p. 2206-19.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb.	Abbildung
AC	acromioclavicular
AK	Antikörper
BMP	bone morphogenic protein
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dest.	Destilliert
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DPX	Distrene, Plasticiser, Xylene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (engl.)
engl.	englisch
et al.	und Andere (lat.)
etc.	und so weiter (lat.)
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF	fibroblast growth factor (engl.)
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein (engl.)
ggf.	Gegebenenfalls
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Hochfrequenz
ICRS	International Cartilage Repair Society (engl.)
i.m.	intramuskulär
ISP	M. infraspinatus
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
lat.	lateinisch
lig.	ligamentum (lat.)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
L-PRF	leucocyte-rich platelet rich fibrin (engl.)
L-PRP	leucocyte-rich platelet rich plasma (engl.)
m	Meter
M.	musculus (lat.)
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
µm	Mikrometer
MODS	Modified O'Driscoll Scale (engl.)
MSC	mesenchymale Stammzelle
n	Fallzahl
Nr.	Nummer

OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Salzsäure
PDGF	platelet derived growth factor (engl.)
P-PRF	pure platelet rich fibrin (engl.)
P-PRP	pure platelet rich plasma (engl.)
proc.	processus (lat.)
PRP	platelet rich plasma (engl.)
RM	Rotatorenmanschette
RMR	Rotatorenmanschettenruptur
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
Sek.	Sekunden
SSC	M. subscapularis
SSP	M. supraspinatus
TGF- β	transforming growth factor β (engl.)
TM	M. teres minor
TVA-Nr.	Tierversuchsantragsnummer
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor (engl.)
x	mal

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Rotatorenmanschette von ventral (a) und von dorsal (b). Abb. aus [2]	2
Abbildung 2: Acromiontypen nach Bigliani. Typ I: flach, Typ II: gebogen, Typ III: hakenförmig. Abb. aus [61].....	7
Abbildung 3: Studiendesign mit den unterschiedlichen Aufteilungen in die Gruppen und Untergruppen.....	15
Abbildung 4: Schematische Übersicht über alle durchgeführten Färbungen.	16
Abbildung 5: Im linken Bild sieht man das narkotisierte Tier. Der OP-Bereich ist rasiert und desinfiziert. Das mittlere Bild zeigt den Blick auf die eröffnete RM. Im rechten Bild ist der M. supraspinatus dargestellt.....	18
Abbildung 6: Das linke Bild zeigt die Mason-Allen-Naht am M. supraspinatus bevor er wie im mittleren Bild dargestellt abgetrennt wird. Im rechten Bild wird der Footprint spongialisiert (nur in der Spongialisierungsgruppe).....	18
Abbildung 7: Im linken Bild wird der Footprint mit dem HF-Gerät bearbeitet (nur in der HF-Gruppe). Im mittleren Bild werden die Löcher für die transossäre Naht zur Sehnenrefixierung gebohrt. Das rechte Bild zeigt das Durchfädeln der Nahtenden durch die gebohrten Löcher.	19
Abbildung 8: Im linken Bild sieht man die refixierte Sehne. Das mittlere Bild zeigt den Verschluss des gespaltenen M. deltoideus. Im rechten Bild sieht man das noch narkotisierte Tier nach der Hautnaht.	19
Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Auswertung der Kollagen I und III Färbung. 28	
Abbildung 10: Exemplarischer histologischer Schnitt aus der Kontrollgruppe nach sieben Wochen in der HE-Färbung, links in der Übersicht, rechts als vergrößerte Aufnahme die Insertionsstelle der Sehne. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge.....	33
Abbildung 11: Histologische Schnitte in der Safranin-O Färbung. In der linken Spalte jeweils nach einer Woche, in der rechten Spalte jeweils nach sieben Wochen. Oberste Reihe zeigt Bilder der Kontrollgruppe, mittlere Reihe der Spongialisierungsgruppe und untere Reihe zeigt Bilder der HF-Gruppe. Kontroll- und Spongialisierungsgruppe zeigen deutlich bessere Organisation der Knorpelstruktur	

als die HF-Gruppe und eine allgemein sehr gute Knorpelstruktur nach sieben Wochen. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge	35
Abbildung 12: Darstellung eines histologischen Schnittes in der Picrosirius-Red-Färbung aus der Kontrollgruppe nach sieben Wochen in nativer Aufnahme (untere Reihe) und unter polarisiertem Licht (obere Reihe). Die linke Spalte zeigt den Schnitt in 25facher Vergrößerung, die rechte Spalte zeigt in 100facher Vergrößerung die Insertionsstelle der Sehne. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge.....	36
Abbildung 13: Histologische Schnitte in der Kollagen II Färbung. In der linken Spalte jeweils nach einer Woche, in der rechten Spalte jeweils nach sieben Wochen. Oberste Reihe zeigt Bilder der Kontrollgruppe, mittlere Reihe der Spongialisierungsgruppe und untere Reihe zeigt Bilder der HF-Gruppe. Kontroll- und Spongialisierungsgruppe zeigen deutlich größere Mengen an Kollagen II im Bereich der Sehneninsertion. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge.....	38
Abbildung 14: Histologisches Schnittpaar aus der Spongialisierungsgruppe nach einer Woche. Links in der Kollagen I Färbung, rechts in der Kollagen III Färbung. S=Sehne, I=Insertionsstelle, K=Knochen, E=Epiphysenfuge	39
Abbildung 15: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen II Flächen in den Untergruppen nach einer Woche. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen signifikant höhere Werte an Kollagen II als die HF-Gruppe.....	40
Abbildung 16: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen II Flächen in den Untergruppen nach sieben Wochen. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen weiterhin signifikant höhere Werte an Kollagen II als die HF-Gruppe.....	41
Abbildung 17: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen I/Kollagen III Quotientenwerte nach einer Woche. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen signifikant höhere Quotientenwerte als die HF-Gruppe.	42
Abbildung 18: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kollagen I/Kollagen III Quotientenwerte nach sieben Wochen. Spongialisierungs- und Kontrollgruppe zeigen weiterhin signifikant höhere Quotientenwerte als die HF-Gruppe.....	42

Publikationen

- 06/2013 Vortrag, 20. DVSE - Kongress, 19. - 22. Juni 2013, Würzburg
- 09/2013 Vortrag, 30. AGA - Kongress, 19. - 21. September 2013, Wiesbaden
- 10/2013 Vortrag, DKOU - Kongress, 22. - 25. Oktober 2013, Berlin
- 02/2014 Vortrag, IV. Münchener Symposium für experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskelettale Forschung, 13. - 14. Februar 2014, München
- 02/2014 Ficklscherer A., Loitsch T., Serr M., Gülecyüz MF., Niethammer TR., Müller HH., Milz S., Pietschmann MF., Müller PE.
Does footprint preparation influence tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in an animal model?
Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2014 Feb. 30(2): p. 188-94.
- 10/2014 Vortrag, 22nd Annual Meeting of the Iranian Orthopaedic Association, 13. - 14. Oktober 2014, Teheran
- 03/2017 Ficklscherer A., Serr M., Loitsch T., Niethammer TR., Lahner M., Pietschmann MF., Müller PE.
The influence of different footprint preparation techniques on tissue regeneration in rotator cuff repair in an animal model.
Archives of Medical Science: AMS, 2017 Mar 1; 13(2): 481-488.

Arbeitsprotokolle

Protokoll 1: Knochen entkalken

- Präparat aus gepufferten Formalin 4% nehmen und in 20% Zitronensäure/EDTA geben
- Lagerung für ca. drei Wochen im Kühlschrank (Lösung einmal pro Woche wechseln)

Protokoll 2: Einbetten in Paraffin

- Präparate aus 20% Zitronensäure/EDTA nehmen und in Einbettkästen legen
- 2 h mit fließendem Leitungswasser wässern
- In 70% Alkohol lagern
- Einbetten über Paraffinierungsreihe am Automaten:

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

- Präparate aus Einbettkästen entnehmen und in Gussform legen
- Mit Paraffin übergießen und Präparat in gewünschter Position halten
- Deckel andrücken und nochmal mit Paraffin aufgießen
- Auf Eisfläche ca. 1-3 h auskühlen lassen
- Aus Gussformen herauslösen und trocknen lagern

Protokoll 3: Herstellung von Paraffinschnitten

- Paraffinblock bei -20°C einfrieren
- Wenn Knochen noch zu hart Paraffinblock über Nacht nochmal in 20% Zitronensäure/EDTA bei 37°C und am nächsten Tag dann wieder bei -20°C einfrieren
- Wasserbad mit Aqua dest. füllen und auf 45°C aufheizen
- Wärmeplatte auf 45°C einstellen
- Gefrorener Paraffinblock ins Rotationsmikrotom einspannen (Messerwinkel 2,5°), Schnittdicke einstellen (5µm), gebrochene Blöcke mit Acrykleber wieder ankleben
- Schnitte vorsichtig ins Wasserbad überführen
- Mit Objektträger geglättete Schnitte aus dem Wasserbad aufziehen und auf Wärmeplatte trocknen lassen
- Schnitte in Küvetten einsortieren und über Nacht im Trockenschrank bei 50°C lagern

Protokoll 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung am Automaten

Tauchzeit jeweils 3 Min., Abtropfzeit 12 Sek.

1. Entparaffinieren

- Rotihistol
- Rotihistol
- 100% Alkohol
- 100% Alkohol
- 96% Alkohol
- 70% Alkohol

2. Färben

- Hämaun Farblösung (vorher filtriert)
- Hämaun Farblösung (vorher filtriert)
- Hämaun Farblösung (vorher filtriert)
- Fließendes Leitungswasser
- Fließendes Leitungswasser
- Eosin Farblösung (vorher filtriert)
- Aqua dest.

3. Entwässern

- 100% Alkohol
- 100% Alkohol
- 100% Alkohol
- Rotihistol

- Rotihistol

4. Eindecken mit DPX

Protokoll 5: Safranin-O/Fast Green-Färbung

1. Entparaffinieren

- 10 Min. Rotihistol
- 10 Min. Rotihistol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 5 Min. 96% Alkohol
- 5 Min. 70% Alkohol
- 5 Min. Aqua dest.

2. Färben

- 10 Min. 1,5% Safranin O (vorher filtriert)
- Aqua dest. 8xdippen
- Aqua dest. 8xdippen
- Aqua dest. 8xdippen
- 10 Sek. 0,02% Fast Green (vorher filtriert)
- 1% Essigsäure 8xdippen
- Aqua dest. 6xdippen

3. Aufsteigende Alkoholreihe

- 96% Alkohol 8xdippen
- 100% Alkohol 8xdippen
- 100% Alkohol 8xdippen
- 5 Min. Rotihistol

4. Eindecken mit DPX

Protokoll 6: Picrosirius-Red-Färbung

1. Entparaffinieren (siehe Safranin-O/Fast Green-Färbung)

2. Färben

- 15 Min. Weigert's Hämatoxylin (200ml Lösung A + 200ml Lösung B, jeweils filtriert)
- 15 Min. fließendes Leitungswasser

- 40 Min. Picrosirius Red (400ml Pikrinsäure + 4g Direct Red, 1h mit Magnetrührer mischen)
- 0,5% Essigsäure 2xdippen
- Aqua dest. mehrmals dippen

3. Aufsteigende Alkoholreihe

- 5 Min. 96% Alkohol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 10 Min. Rotihistol
- 10 Min. Rotihistol

4. Eindecken mit DPX

Protokoll 7: Kollagen I und III Färbung

Schnitte vor der Färbung ca. 5x über Nacht in Trockenschrank bei 50°C und jeweils zwischendurch abkühlen lassen

1. Entparaffinierung

- 10 Min. Rotihistol
- 10 Min. Rotihistol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 5 Min. 96% Alkohol
- 5 Min. 70% Alkohol

2. Immunhistologie

- 10 Min. Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 20 Min. Dampfgerar in EDTA Puffer PH 8 (360ml Aqua dest. + 40ml EDTA Puffer PH 8/ Schale, danach 20 Min. im Puffer abkühlen lassen)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. 37°C Proteinase XXIV (0,2mg/ 1ml)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. RT Methanol (100%) + H₂O₂ (30%) (198ml + 2ml/Küvette)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. 37°C Hyaluronidase
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 1h RT Pferdeserum + Ziegenserum (je 1:20 in PBS)

- üN 4°C Kollagen I/III (primärer AK)(1:800 in AK-Verdünner), Kontrolle nur AK-Verdünner
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. RT biotinylierter horse-anti-mouse (sekundärer AK) (1:200 in AK-Verdünner)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. RT ABC-Komplex (Komplex vorher 30 Min. im Kühlschrank inkubieren, 1Tropfen A + 1Tropfen B in 1ml PBS)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- Kollagen I 4 Min., Kollagen III 3 Min. Impact DAB im Dunkeln (1ml DAB Detergenz + 1 Tropfen DAB im Dunkeln)
- Stoppen in Aqua dest.
- 30 Sek. Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 10 Min. mit Leitungswasser wässern

3. Aufsteigende Alkoholreihe

- 5 Min. 70% Alkohol
- 5 Min. 80% Alkohol
- 5 Min. 96% Alkohol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 5 Min. 100% Alkohol
- 10 Min. Rotihistol
- 10 Min. Rotihistol

4. Eindecken mit DPX

Protokoll 8: Kollagen II Färbung

1. Entparaffinierung (siehe Kollagen I und III Färbung)

2. Immunhistologie

- 10 Min. Waschpuffer (2 Liter PBS + 2 ml Brij)
- 30 Min. 37°C Proteinase XXIV (0,2mg/ 1ml)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. RT Methanol (100%) + H₂O₂ (30%) (198ml + 2ml/Küvette)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. 37°C Chondroitinase AC (0,25U/ 1ml)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 1h RT Pferdeserum + Ziegenserum (je 1:20 in PBS)

- üN 4°C Kollagen II (primärer AK) (1:6 in AK-Verdünner), Kontrolle nur AK-Verdünner
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. RT biotinylierter horse-anti-mouse (sekundärer AK) (1:200 in AK-Verdünner)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- 30 Min. RT ABC-Komplex (Komplex vorher 30 Min. im Kühlschrank inkubieren, 1Tropfen A + 1Tropfen B in 1ml PBS)
- 2x5 Min. Waschpuffer
- Ca. 5 Min. Impact DAB im Dunkeln (1ml DAB Detergenz + 1 Tropfen DAB, im Dunkeln)
- Stoppen in Aqua dest.
- 30 Sek. Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 10 Min. mit Leitungswasser wässern

3. Aufsteigende Alkoholreihe (siehe Kollagen I und III Färbung)

4. Eindecken mit DPX

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die zur erfolgreichen Durchführung und zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller für die Überlassung des Themas und der Unterstützung während des Arbeitsprozesses.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Andreas Ficklscherer für die hervorragende Planung und Organisation des Projektes, für seine fachliche Kompetenz, seine Anregungen und Motivation und für die umfassende Betreuung und stetige Hilfsbereitschaft während der gesamten Arbeit.

Auch danke ich dem Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie des Klinikums Großhadern für die Bereitstellung der Geräte und der Materialien sowie der angenehmen Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt Bärbel Schmidt für die gute Einarbeitung und Ihre stetige Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei Konstanze Eichmüller und Lena Kempfert für ihre Ratschläge, Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Abschließend geht mein persönlicher Dank an Max Stanglmeier für die grenzenlose Unterstützung, die aufbauenden Worte, die Geduld, sein unermüdliches Verständnis und den privaten Rückhalt.

Eidesstattliche Versicherung

Serr, Michaela

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

Der Einfluss der Footprint-Präparation auf die knöcherne Sehneneinheilung der Supraspinatussehne nach Rotatorenmanschettenrekonstruktion im Tiermodell – eine histologische Analyse

selbstständig 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, 07.12.2017

Unterschrift Doktorandin