

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

**Untersuchung der Sehnenregeneration mithilfe von zwei verschiedenen  
bioresorbierbaren Scaffolds (PGA und Kollagen I)  
unter Einfluss autologer Tenozyten  
nach künstlichem Totaldefekt an der Achillessehne von Ratten**

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

vorgelegt von  
Pierre Schmitz  
aus  
Luxemburg  
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Ficklscherer

PD Dr. Carl Neuerburg

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Matthias Pietschmann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2018

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Aufbau und Struktur von Sehnen.....	1
1.1.1. Extrazelluläre Matrix (EZM) .....	3
1.1.2. Morphologie und Metabolismus von Tenozyten .....	8
1.1.3. Funktion von Sehnen.....	10
1.2. Pathophysiologie klinisch relevanter Sehnenrupturen.....	14
1.3. Physiologische Sehnenheilung .....	15
1.4. Therapie der Sehnenruptur.....	18
1.4.1. Achillessehnenruptur (ASR) .....	19
1.4.2. Rotatorenmanschettenruptur (RMR).....	21
1.4.3. Vordere Kreuzbandruptur (VKBR).....	22
1.5. „Tissue Engineering“ (TE) .....	23
1.5.1. Tiermodell im TE von Sehnen .....	25
1.5.2. Scaffoldmaterialien im TE .....	26
1.5.3. Zellen für das TE.....	29
1.5.3.1. Differenzierte Zellen .....	29
1.5.3.2. Progenitorzellen.....	30
1.5.3.3. Stammzellen .....	30
1.5.4. Das Defektmodell im TE von Sehnen.....	31
1.6. Ziel der Studie.....	32
1.7. Hypothesen .....	34
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.1. Übersicht und allgemeiner Studienaufbau .....	35
2.2. Verwendete Tiere.....	38
2.3. Zellgewinnung und Scaffoldbesiedelung.....	39
2.3.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur.....	39
2.3.1.1. Kultivierung der Tenozyten.....	40
2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl .....	41
2.3.1.3. Einfrierung und Auftauung der Tenozyten .....	42
2.3.2. Präparation von Sehngewebe und Zellisolation .....	43
2.3.3. Besiedelung der Scaffolds.....	44
2.3.3.1. Einleitung .....	44

2.3.3.2. Aufbau der Brücken-Matrix-Konstruktion.....	45
2.3.3.3. Polyglykolsäure-Scaffold (PGA) .....	46
2.3.3.4. Kollagen-Scaffold .....	47
2.3.3.5. Aufbereitung der Tenozyten und Scaffoldbesiedelung .....	47
2.4. Hauptversuche .....	48
2.4.1. Operative Durchführung .....	49
2.4.2. Anästhesie und perioperative Behandlung.....	50
2.4.3. Explantation der Sehnen .....	51
2.5. Biomechanik .....	51
2.6. Molekularbiologie.....	53
2.6.1. Isolation und Messung der genomischen DNA .....	53
2.6.2. Nachweis des SRY-Gens .....	54
2.6.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	55
2.7. Histologie und Immunhistochemie.....	56
2.7.1. Anfertigung der Kryoschnitte .....	56
2.7.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E).....	57
2.7.3. Immunhistochemie.....	57
2.7.4. Digitale Aufnahme und qualitative Beurteilung der Kryoschnitte .....	60
2.8. Transmissionselektronenmikroskopie .....	60
2.9. Quantifizierung der Verknöcherungsfläche .....	62
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.1. Zellkultur der isolierten Tenozyten.....	63
3.2. Postoperatives Laufverhalten der Ratten .....	64
3.1. Makroskopische Beurteilung und Vermessung der explantierten Sehnen .....	64
3.2. Biomechanik .....	67
3.3. Molekularbiologie – PCR-basierter Nachweis des SRY-Gens.....	68
3.4. Histologie und Immunhistochemie.....	69
3.4.1. Beurteilung der H/E-gefärbten Kryoschnitte .....	69
3.4.2. Vergleich der H/E- und Osteopontin-gefärbten Kryoschnitte .....	71
3.5. Quantifizierung des Knochenflächenanteils .....	75
3.6. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	77
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>84</b>
4.1. Diskussion der Methoden .....	84



---

4.1.1. Isolation der Tenozyten.....	84
4.1.2. Scaffoldauswahl .....	84
4.1.2.1. Angewandte Zellzahl zur adäquaten Besiedelung der Scaffolds .....	85
4.1.3. Angewandtes Versuchs- und Tiermodell .....	85
4.1.4. Auswertung mittels Histologie, Immunhistochemie und TEM .....	87
4.2. Diskussion der Ergebnisse .....	88
4.2.1. Isolierung unterschiedlicher Zellen.....	88
4.2.2. Ektope Verknöcherungen.....	89
4.2.3. Einfluss der unterschiedlichen Scaffolds auf die Sehnenheilung .....	95
4.2.4. Einfluss der Tenozyten auf die Sehnenregeneration.....	97
4.3. Limitierungen.....	99
4.4. Ausblick .....	100
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
Literaturverzeichnis.....	104
Anhang .....	118
Abkürzungsverzeichnis .....	124
Abbildungsverzeichnis .....	127
Tabellenverzeichnis.....	128
Danksagung .....	129
Publikationen.....	130
Eidesstattliche Versicherung .....	131

## **1. Einleitung**

Sehnenverletzungen sind von hoher klinischer Bedeutung in der Orthopädie. Allein in den USA werden ca. 200.000 Patienten jährlich einer Sehnen- oder Bänderoperation unterzogen<sup>2</sup>. Häufig sind Verletzungen von Achillessehnen und Sehnen der Rotatorenmanschette<sup>3</sup>.

Eine spontane Heilung bzw. operative Therapie von Sehnen ist oftmals nur unbefriedigend. Die Entstehung von Narbengewebe unterscheidet sich von nativem gesundem Sehnengewebe deutlich in dessen Funktionalität, Bewegungsfähigkeit und Belastbarkeit<sup>4</sup>. Gesunde Sehnen haben somit einen hohen Stellenwert in der Lebensqualität von sportlich aktiven Menschen. Da aktuelle Behandlungsmöglichkeiten (konservativ oder operativ) teilweise nur eine limitierte Erfolgsrate haben, wird die wachsende Notwendigkeit von „Tissue Engineering“ von Sehnen zunehmend wichtiger. Das „Tissue Engineering“ konnte in den letzten Jahren durch die Anwendung von unterschiedlichen Zellen und Matrizen zur Unterstützung der Sehnenheilung vielversprechende Fortschritte verbuchen<sup>1 5-10</sup>. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen verletzte Sehnen so zu regenerieren, dass sie in Hinsicht auf histologische, biomechanische und biochemische Eigenschaften einer gesunden Sehne gleichzusetzen sind<sup>11</sup>. Erst seit einigen Jahren ist es möglich sehnen-spezifische Zellen (Tenozyten) bei der unterstützenden Sehnenheilung anzuwenden<sup>8 9 12-14</sup>. Erste Forschungsergebnisse lassen hoffen, dass dieser Weg ein weiterer Schritt zur Optimierung der Sehnenheilung ist<sup>9</sup>. Im Folgenden widmen wir uns im Detail dem Aufbau und der Struktur der Sehne sowie den vielfältigen Möglichkeiten der Sehnenheilung nach Verletzungen. Im Verlauf konzentrieren wir uns dann auf das „Tissue Engineering“ und die Verwendung von differenzierten Sehnenzellen (Tenozyten) zur Regeneration von verletzten Sehnen.

### **1.1. Aufbau und Struktur von Sehnen**

Sehnen sind anatomische Strukturen die, im Gegensatz zu Bändern (Knochen-Knochen Verbindungen), Knochen mit Muskeln verbinden<sup>15</sup>. Dabei können Muskeln über ein oder zwei Sehnen am Knochen befestigt sein. Außerhalb des Muskels treten die Sehnen als weißliche Platten oder strangförmige bzw. runde Strukturen auf und spalten sich im Muskelgewebe in flächenhafte Zipfel auf, die in Perimysiumblättern verlaufen und den Kontakt zu den Muskelfasern herstellen<sup>15</sup>. Gesunde Sehnen haben eine glänzende, weiße

Farbe und eine elastische Konsistenz; sie zeichnen sich durch hohe Widerstandsfähigkeit aus<sup>16</sup>.

Abgeflachte Sehnen werden Aponeurosen genannt, die als separate Strukturen aus den Muskelbäuchen hervorgehen (z.B. M. latissimus). Andere Sehnenarten bilden eine Faserschicht im Muskel oder auf dessen Oberfläche, damit ein Gleiten zwischen zwei Muskeln möglich ist (z.B. M. gastrocnemius über M. soleus)<sup>17</sup>.

Man unterscheidet einen Muskel-Sehnen-Übergang (myotendinöse Verbindung) und einen Knochen-Sehnen-Übergang (osteotendinöse Verbindung). Letzterer wird als proximale Verbindung zwischen Sehne und Knochen Ursprung bezeichnet, die distale Verbindung wird Ansatz genannt<sup>16</sup>.

Histologisch besteht Sehnengewebe überwiegend aus Sehnenzellen (Tenozyten) und einer extrazellulären Matrix (EZM) vorwiegend bestehend aus straffem, parallelfaserigem Bindegewebe (größtenteils Kollagen Typ I und Elastin). Im Bindegewebe sind die Kollagenfasern in Bündeln parallel angeordnet und der Zugrichtung entsprechend ausgerichtet. Die Tenozyten liegen in lakunenartigen Räumen, in denen die rundlichen Kollagenfasern und -faserbündel zusammenkommen. Ausgehend von diesen Lakunen bilden die Tenozyten mit ihren abgeplatteten Fortsätzen untereinander Zellverbindungen aus<sup>15</sup>.

Im Knochen-Sehnen-Übergang erfolgt eine Transition von Sehnengewebe über Faserknorpel zu Knochen (Sharpeyische Fasern). Ein Periost fehlt an dieser Stelle. Dieser Übergang von weichem zu hartem Gewebe ist maximal 1 mm lang und komplex gegliedert. Man unterscheidet hier 4 verschiedene Zonen: reines faseriges Gewebe, nichtmineralisiertes und mineralisiertes Gewebe, sowie Knochen<sup>18</sup>. Viele Sehnen zeigen hier eine Konvergenz einzelner Kollagenfibrillen die es ermöglicht, die Wirkung vieler Muskelfasern auf eine schmale Insertionstelle am Knochen zu konzentrieren<sup>19</sup>.

Im Muskel-Sehnen-Übergang bilden die Sehnen strangähnliche Ausläufer des bindegewebigen Hüllsystems des Muskels über das äußerste Ende der Muskelfasern hinaus<sup>20</sup>. Sehnen sind somit der zentrale Abschnitt eines Kollagenfasersystems, das von den bindegewebigen Muskelhüllen bis zum Periost und zu den Kollagenfasern der Knochenhartsubstanz reicht<sup>20</sup>. Die Muskelzellen bilden in diesem Bereich lange, dünne Fortsätze aus, die die Kontaktfläche um das 10-20 fache vergrößern und zu einer effektiveren Übertragung führen<sup>15 20 21</sup>.

Faserknorpel ist physiologisch bei Knochen-Sehnen-Übergängen von Röhrenknochen und charakteristisch an Übergängen, deren Ansatzwinkel sich bei Gelenkbewegung stark

verändert. Bei Druckausübung auf Sehnen kommt es zu einer Zunahme der Faserknorpelbildung z.B. an einer Insertion oder wenn Sehnen sich um einen Knochen/Hypomochlion winden. An diesen Stellen sind die Sehnenfaszikel miteinander verflochten um ein Auspreizen der Sehne zu verhindern. Faserknorpel kommt ebenfalls in Sehnenfaszikeln und im Epi- oder Endotenon vor, in denen er Blutgefäße vor Druck schützt und ein Gleiten der Faszikel ermöglicht. Andernfalls ist Faserknorpel als pathologisch anzusehen<sup>22</sup>.

Die weiß glänzende Farbe der Sehne deutet auf eine geringe Blutversorgung hin. Dennoch ist eine ausreichende und gut organisierte Blutversorgung vorhanden, die die Ernährung der Zellen sicherstellt und für die Sehnenheilung wichtig ist. Die Gefäße verlaufen oberflächlich im Endotenon, im Inneren der Sehne verlaufen sie parallel zu den Kollagenfibrillen in schmalen Bindegewebespalten. Es sind zumeist Arteriolen, die sich durch dünne Gefäßwände auszeichnen. Der Muskel-Sehnen-Übergang weist eine gute Durchblutung auf und versorgt das proximale Drittel der Sehne. Im Bereich eines Hypomochlions ist die Blutversorgung häufig reduziert, da die Sehne (z.B. beim M. fibularis longus) hier an den Knochen gepresst wird; die extrazelluläre Matrix (EZM) wie auch die Tenozyten sind hier verändert. Die faserknorpeligen Zellen sezernieren inhibitorische Faktoren wie Endostatin, die die Angiogenese hemmen. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Sekretion von angiogenesestimulierenden Faktoren (VEGF). Es können avaskuläre Zonen entstehen, die eine Degeneration und eine Ruptur der Sehne begünstigen<sup>19</sup>. Bei starker Beanspruchung kann die Sehngewebedurchblutung kurzfristig um das 7-fache gesteigert werden<sup>21</sup>.

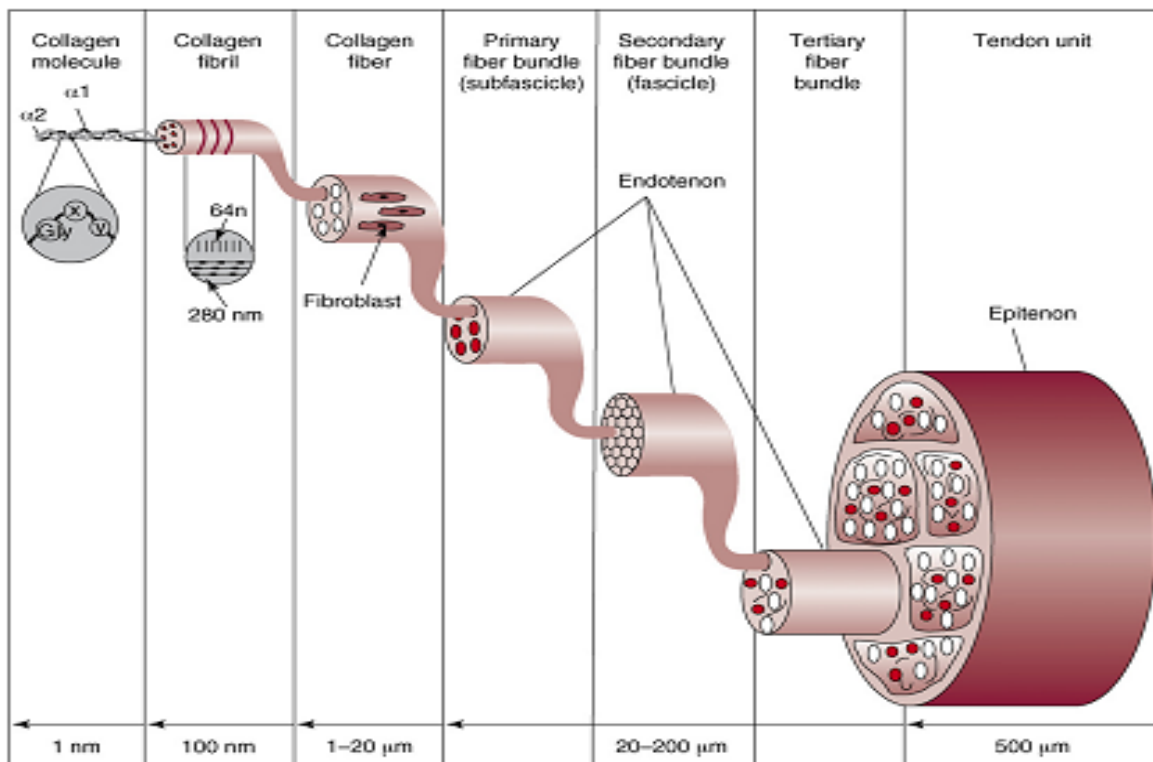
### **1.1.1. Extrazelluläre Matrix (EZM)**

Sehnen sind eingebettet in eine Proteoglykan-Wasser-Matrix. Die Trockenmasse der Sehne besteht zu 65 - 80 % aus Kollagen und zu 1 - 2 % aus Elastin und wird von Tenozyten und Tenoblasten gebildet<sup>16</sup>. Die Kollagentypen III, V, VI, IX, XI sind nur in geringen Mengen vorhanden<sup>19</sup>. Im Vergleich zu Sehnen ist der Anteil von Kollagen Typ III in Bändern deutlich erhöht<sup>21</sup>. Kollagen Typ II ist bei stark überlasteten Sehnen vermehrt vorhanden<sup>22</sup>.

Es wurden zudem elastische Fasern in Sehnen von Ratten gefunden sowie im Faserknorpel humaner Sehnen-Knochen-Übergänge. Sie tragen zur Wiedererlangung des wellenförmigen Musters der Kollagenfasern nach einer Dehnung bei. Die elastische Faser setzt sich aus einem dichten, amorphen Kern und dünnen Mikrofilamenten zusammen. Der Durchmesser liegt bei ca. 0,3-2  $\mu\text{m}$ <sup>16</sup>.

## Aufbau und Funktion von Kollagenfasern

Im Zellkern von Tenozyten werden über einen Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) 3 Aminosäuren (Glycin, Prolin und Hydroxyprolin) gebildet, die im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) zu einzelnen  $\alpha$ -Polypeptidketten (Präprokollagen) zusammengefügt werden. Nach Abtrennung des Signalpeptids und Weitertransports zum Golgi Apparat wird Präprokollagen über weitere Modifikationen zu Prokollagen umgewandelt<sup>16</sup>. Die Prokollagenmoleküle verlassen den Golgi Apparat in sekretorischen Vesikeln, die mit der Plasmamembran fusionieren und die Kollagenmoleküle über Einstülpungen nach extrazellulär sezernieren<sup>23 24</sup>. Durch die Nukleation von drei terminalen C-Propeptid-Domänen entsteht durch Faltung eines Prokollagenmoleküls ein spiralförmig angeordnetes Tropokollagenmolekül<sup>23</sup>.



**Abb. 1** Schematischer Aufbau einer Sehne mit Größenangaben. Schema übernommen von Liu et al. 2008<sup>25</sup>.

Fünf Tropokollagenmoleküle bilden eine Mikrofibrille<sup>19</sup>; sie sind untereinander durch kovalente Querverbindungen verbunden und jeweils um ein Viertel ihrer Länge versetzt, das zu den charakteristischen D-Muster-Perioden der Kollagenfibrillen führt. Mehrere Mikrofibrillen sind umgeben von Proteo- und Glykosaminoglykanen (GAG) und bilden eine

seilähnliche Kollagenfibrille, die über laterale Fusion in der Länge und der Dicke wachsen<sup>16</sup>  
26-28.

Ein Kollagenfibrillenbündel bildet eine Kollagenfaser. Es ist die kleinste Einheit der Sehne, die noch lichtmikroskopisch erkennbar ist und die Sehne von Anfang bis Ende durchzieht. Ein Bündel von Kollagenfasern wiederum ergibt einen Subfaszikel (primäres Faserbündel), ein Bündel von Subfaszikeln (3-12) bildet einen Faszikel (sekundäres Faserbündel). Die größte Einheit der Sehne setzt sich aus Tertiärbündeln zusammen, die wiederum aus mehreren Faszikeln bestehen<sup>16</sup> (Abb. 1).

Je nach Spezies unterscheidet sich der Durchmesser in den einzelnen Organisationsebenen der Kollagenbündel. Tabelle 1 zeigt eine ungefähre Durchmesservertelung von humanen Sehnen. Zum Vergleich liegt der Durchmesser von Kollagenfasern, gemessen in der Schwanzsehne von Ratten, bei ca. 5-30 µm.

<b>Organisationsebene</b>	<b>Durchmesser in µm</b>
Kollagenfibrille	20 - 150
Kollagenfaser	< 300
Subfaszikel	< 400
Faszikel	< 1000
Tertiäre Faserbündel	1000 - 3000

**Tab. 1** Durchschnittlicher Durchmesser der Kollagenorganisationsebenen von humanen Sehnen nach Kannus et al. 2000<sup>16</sup>.

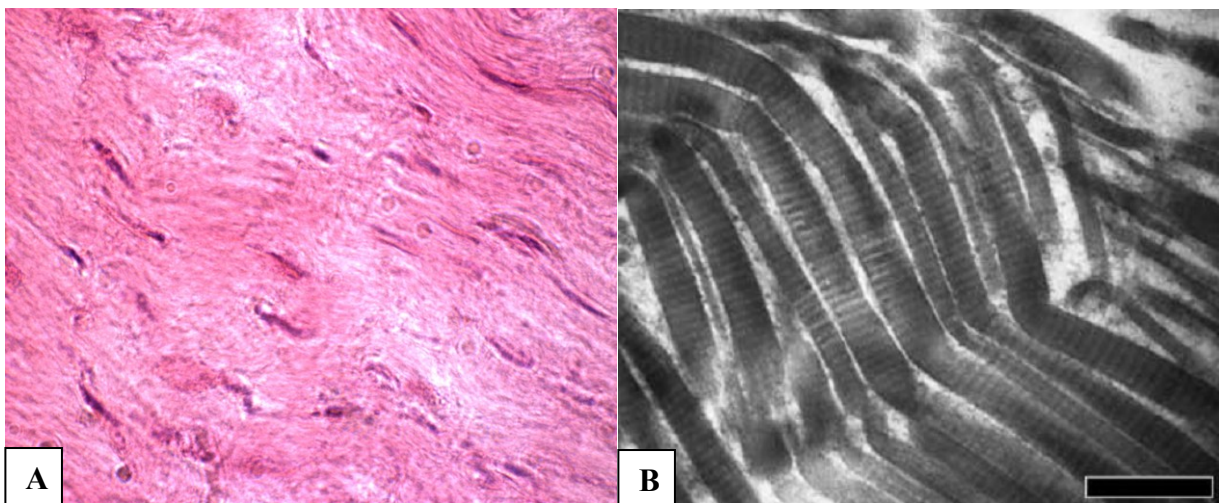
Der Durchmesser von humanen Kollagenfasern verändert sich je nach Entwicklungsstand und Alter. Mit fortschreitender Entwicklung und bei Adoleszenz der Sehne nehmen Durchmessergröße und -variabilität innerhalb einer Sehne zu<sup>16</sup>.

Die Art der Ausrichtung der Kollagenfibrillen variiert stark zwischen den verschiedenen Sehnen und deren Lage im Körper. Achillessehnen besitzen einheitlich eine parallele, der Zugrichtung entsprechende Ausrichtung der Kollagenfasern. Eine Undulation der Kollagenfasern (wellenförmiges Muster), weitläufig auch „crimp“<sup>19</sup> genannt, stellt in einem histologischen Schnittbild ein charakteristisches Phänomen dar und weist auf eine entspannte Sehne hin (Abb. 2. A).

In einem unregelmäßigen Abstand kommen im Verlauf einzelner Kollagenfibrillen Knickbildungen vor, auch „fibrillar crimp“<sup>29</sup> genannt, die wahrscheinlich hervorgerufen sind

durch unterschiedlich starke Proteoglykan-Querverbindungen zwischen den einzelnen Fibrillen (Abb. 2. B)<sup>16</sup>. Auf Höhe jedes Knickes wechselt die Kollagenfibrille spontan die Richtung, indem sie sich in einem bestimmten Winkel von 0 – 60° biegt.

Beim einer Dehnung flacht das wellenförmige Muster („crimp“) ab, indem es zur Abflachung des Knickwinkels einzelner Kollagenfibrillen in Richtung der Beanspruchung kommt. In gedehnten Sehnen nimmt der Winkelhöchstwert der Knicke von 148 Grad auf bis zu 165 Grad zu und es kann zu einer merkliche Abnahme der „fibrillar crimps“ um bis zu 46,7 % kommen<sup>27 29</sup>.



**Abb. 2** A. Longitudinalschnitt durch eine Sehne (Bild aus eigener Testreihe). Sehr gut erkennbar ist die wellenförmige Anordnung der Kollagenfasern („crimp“). B. Elektronenmikroskopische Aufnahme von sogenannten „fibrillar crimps“ einer gedehnten Achillessehne<sup>29</sup>. Maßstab = 1 µm

Die schraubenförmige und seilähnliche Architektur der Fasern ist ein universelles Bauprinzip, das sich durch alle Organisationsebenen von der Sehne über Faszikel bis hin zur einzelnen Fibrille erkennen lässt<sup>19</sup>. Diese Ausrichtung der Kollagenfibrillen- und Kollagenfaserbündel ermöglicht der Sehne eine nahezu perfekte Anpassung an Druck- und Ziehkräfte sowie an Rotationsbewegungen und fördert somit die optimale Kraftübertragung.

Bei der Ausrichtung der Kollagenfibrillen spielen zusätzlich Zellkontakte über „gap junctions“ vom Connexin Typ 32 und 43 eine wichtige Rolle. Sie koordinieren über Stimulation bzw. Inhibition der Kollagensynthese die einheitliche Ausrichtung der Kollagenfibrillen<sup>30</sup>. Weiterhin haben auch die SLRP (small leucine rich proteins) und im Besonderen Dekorin einen Einfluss auf die korrekte Ausrichtung von Fibrillen bei der Kollagenbildung.

## **Zusammensetzung und Funktion der Grundsubstanz**

Die Grundsubstanz der Sehne wird von Tenozyten gebildet und setzt sich zusammen aus Proteoglykanen, Glycosaminoglycanen (GAG), strukturellen Glykoproteinen und einer Vielzahl an kleineren Molekülen. Sie hat die Konsistenz eines hydrophilen Gels und variiert je nach Verhältnis zwischen Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat. Die beachtliche Wasserbindungsfähigkeit der Proteoglykane und GAG verbessert die Elastizität der Sehne gegenüber Druck- und Scherkräften<sup>16</sup>. Eine Abnahme des Wassergehalts ist durch die vermehrte Abwesenheit von Proteoglykanen und deren degenerativen Veränderungen zu erklären<sup>21</sup>.

Proteoglykane (PG) bestehen aus einem Proteinkern, an den eine oder mehrere GAG kovalent gebunden sind. Es gibt 2 unterschiedliche Gruppen von PG: die „modular“ PG<sup>31</sup> und die SLRP.

Zu den „modular“ PG (auch „lecticans“ genannt) gehören z.B. Aggrekan und Versikan. Sie sind negativ geladene, hydrophile Moleküle, die das Fünffache ihres Gewichts an Wasser binden können und reich an Keratinsulfat- und Chondroitinsulfat-Ketten sind<sup>31</sup>. Die hohe Bindungskapazität der Proteoglykane ist verantwortlich für den hohen Wassergehalt (60-70 %) der EZM<sup>21</sup>. Aufgrund der hohen Ladungsdichte und durch die gegenseitige Abstoßung sind die Proteoglykane erheblich für die viskoelastischen Eigenschaften der Sehnen und die interfibrilläre Stabilität in der EZM verantwortlich. Zudem fördern sie eine schnelle Diffusion von Wassermolekülen und die Zellmigration<sup>16</sup>. Im interfibrillären Raum interagieren PG mit dem Kollagenfibrillennetzwerk und regulieren die Fibrillogenese durch Anordnung bzw. Ausrichtung von Kollagenfibrillen.

SLRP sind Proteine reich an LRR („leucine rich repeats“), die 20-30 Aminosäuren lang sind und Leuzin an fixen Stellen gebunden haben. Als funktionelle Einheit und Teil der EZM bilden die SLRP Quervernetzungen zwischen den Kollagenfibrillen aus und tragen somit zur Stabilität der Sehnen bei.

In der Entwicklungsphase spielen sie eine wichtige Rolle in der Fibrillogenese und beeinflussen die Bildung, Ausrichtung und Reifung der Kollagenfibrillen entscheidend mit<sup>32-38</sup>. Wichtige Vertreter der SLRP sind Biglykan und Dekorin. Dekorin besitzt die höchste Affinität zu Kollagen und ist während der Entwicklungsphase wichtig für die Regulation der Kollagenfibrillenstruktur (Form, Ausrichtung und Durchmesser), die Regulation der Zellproliferation und die Stimulation der Immunantwort<sup>31</sup>.



Dekorin und Biglykan sind bei Entzündungen vermehrt exprimiert und spielen besonders bei krankhaften Zuständen eine wichtige Rolle<sup>39</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei Mäusen mit Dekorindefizienz und Biglykandefizienz zu einer Störung der Fibrillogenese und somit zu einer Schwächung der Fibrillenstruktur kommt<sup>34 40 41</sup>.

### **Para-, Epi- und Endotenon**

Faserarmes, blutgefäß- und nervenführendes Bindegewebe umschließen die Sehne und die verschiedenen Kompartimente. Die Bindegewebe spielen eine wichtige Rolle als Verschiebeschicht zwischen den organisierten Faserbündeln.

Das Paratenon besteht aus lockerem, fibrillärem und gut vaskularisiertem Gewebe und hüllt die komplette Sehne ein. Die Hauptkomponenten sind Kollagenfibrillen vom Typ I und III, sowie elastische Fibrillen. Das Paratenon der Achillessehne wird von flüssigkeitsgefüllten Gleitschichten umgeben<sup>16</sup>.

Das Epitenon (Abb. 1) liegt dem Paratenon wie eine feine Bindegewebshülle innen an und umhüllt ebenfalls die komplette Sehne. Das Epitenon ist ein dichtes Netzwerk von 8-10 µm dicken Kollagenfibrillen, die quer, längs und diagonal ausgerichtet sind und zeitweise mit den oberflächlich gelegenen Kollagenfibrillen verschmelzen.

Das Endotenon (Abb. 1) umhüllt jede Kollagenfibrille bis hin zu jedem Kollagenfaserbündel. Es zeichnet sich durch ein dünnes retikuläres Bindegewebsnetzwerk innerhalb der Sehne aus und befördert Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße ins Innere<sup>16</sup>. Das Endotenon erlaubt die unabhängige Verschieblichkeit einzelner Faszikel (Relativbewegungen) und kann Längenveränderungen und –differenzen kompensieren<sup>17</sup>. Außerdem sezerniert es Lubricin, ein Molekül das die Reibungsreduktion zwischen den Faszikeln erhöht<sup>16</sup>.

Die Zellen vom Epitenon und Endotenon (Abkömmlinge vom Mesotenon) spielen eine Rolle in der Regeneration von verletzten Sehnen. Die Tenozyten-ähnlichen Zellen wandern bis zum verletzten Bereich und tragen zur Bildung neuer Kollagenfibrillen bei<sup>15</sup>.

### **1.1.2. Morphologie und Metabolismus von Tenozyten**

Tenozyten sind die charakteristischen Zellen des Sehnengewebes. Sie sind eine spezialisierte Form von Fibroblasten, produzieren die EZM und sind in longitudinalen Reihen zwischen den Kollagenfaserbündeln angeordnet<sup>19</sup>.

90-95 % der Zellen im Sehngewebe sind Tenozyten und Tenoblasten (Vorstufe der Tenozyten). Die verbleibenden 5-10 % bilden Chondrozyten, vorhanden in den Druck- und Ansatzstellen, Synovialzellen und vaskuläre Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen)<sup>19</sup>.

In der jungen unreifen Sehne existiert ein hohes Zell-Matrix-Verhältnis. Hier sind vorwiegend Tenoblasten anwesend, die in langen parallelen Linien angeordnet sind. Sie können unterschiedliche Formen (rund, polygonal, spindelförmig) und Größen (Länge: 20-70 µm; Breite: 8-20 µm) annehmen.

Mit zunehmendem Entwicklungsalter nimmt das Zell-Matrix-Verhältnis ab und die Tenoblasten werden länglicher und spindelförmiger. Ebenso kann die Form des Zellkerns zwischen oval und spindelförmig variieren. Im Zytoplasma sind, neben einem gut ausgebildeten rER und Golgi-Apparat, auch Mitochondrien und vereinzelt Lysosome sowie pinozytische Vesikel erkennbar<sup>19</sup>.

Bei abgeschlossener Entwicklung sinkt das Zell-Matrix-Verhältnis des Sehngewebes weiter ab und die Tenoblasten wandeln sich zu Tenozyten. Die Zellen werden länger (Durchmesser 80-300 µm) und bilden vermehrt lange, teils flache und tubuläre Zellfortsätze (Durchmesser 2-10 µm) aus, die nötig sind um über desmosomale Verbindungen, „tight- und gap junctions“, Zellkontakte herzustellen. Der Zellkern der Tenozyten ist gestreckt und füllt nahezu den ganzen Zytoplasmaraum aus. Das nukleäre Chromatin ist kondensiert und die metabolische Aktivität nimmt ab<sup>16</sup>.

Tenozyten sind von einem Fasersystem aus Aktin- und Myosinfasern (Stressfasern) durchzogen, das sich über die Zellfortsätze in benachbarte Zellen fortsetzt. Dieses Fasersystem dient der Wiederherstellung der wellenförmigen Sehnenstruktur nach mechanischer Beanspruchung<sup>21</sup>. Die in der Zellwand verankerten Integrine verbinden das extrazelluläre Fasersystem mit dem intrazellulären Zytoskelett (Aktin- und Myosinfilamente). Durch Sehnzug kann das Kerngerüst mechanisch deformiert und die Genexpression sowie der Stoffwechsel der Tenozyten über unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Es kommt zur Aktivierung von Enzymkomplexen und Öffnung spezifischer Membranporen, das die Freisetzung von „second messenger“ beeinflusst (Mechanotransduktion)<sup>21</sup>.

Tenozyten beziehen die benötigte Energie zur Produktion der EZM aus dem Krebszyklus, der anaeroben Glykolyse und dem Pentosephosphatweg. Je älter und reifer das Sehngewebe ist, desto geringer ist die metabolische Aktivität. Dies ist ein deutlicher Nachteil bei Heilungsprozessen von Sehnen und erklärt die relativ geringe Regenerationskapazität einer Sehne. Der anaerobe Syntheseweg ist wichtig bei langer Beanspruchung und Dehnung und bewahrt die Sehne vor Ischämie und Nekrose.

Über den Ort und die Mechanismen des Abbaus von Matrixkomponenten ist wenig bekannt. Es gibt 2 mögliche Wege: (1) Die Tenozyten produzieren lysosomale oder zytoplasmaabbauende Enzyme und sezernieren diese in die EZM ab, in der der Abbau der Matrixkomponenten stattfindet, oder (2) der EZM-Abbau findet über zelluläre Phagozytose und Pinozytose statt<sup>16</sup>.

### **Zellspezifische Genexpression von Tenozyten**

Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert kein spezifischer Tenozytenmarker, der ausschließlich in Sehngewebe vorhanden ist, jedoch wurden bereits eine Reihe von molekularen Markern erforscht, die eine wichtige Rolle in der Differenzierung und in bestimmten Entwicklungsphasen spielen<sup>42</sup>.

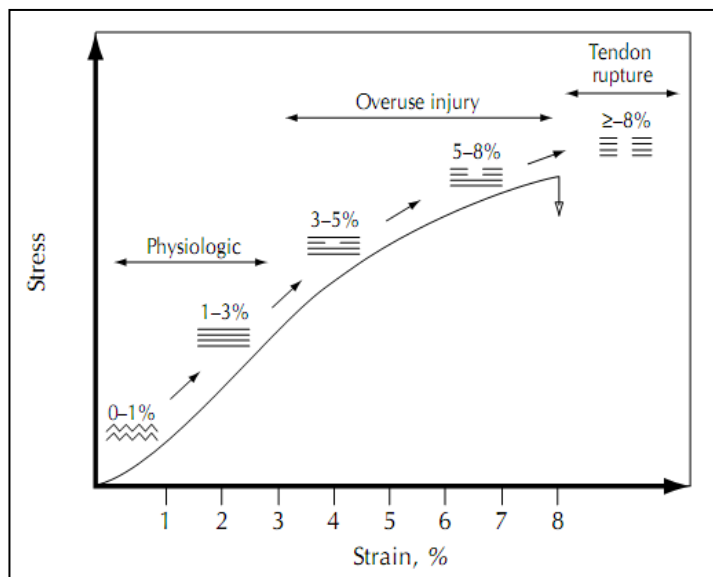
Der Transkriptionsfaktor Scleraxis wird bevorzugt in Sehnen- und Bändergeweben in unterschiedlich frühen Entwicklungsstadien exprimiert. Dessen Aktivierung erfolgt in der frühen Sehnenentwicklung über TGF- $\beta$ , wird aber auch von anderen mesodermalen Geweben exprimiert<sup>19 43</sup>. Er reguliert die Expression eines weiteren Tenozytenmarkers positiv, Tenomodulin, ein Transmembranprotein vom Typ II. Er reguliert die Proliferation der Tenozyten und spielt eine Rolle bei der Anordnung und Ausrichtung der Kollagenfibrillen<sup>44</sup>. Tenascin-C, ein Protein der EZM, wird besonders als Reaktion auf eine mechanische Reizung im Sehngewebe gebildet und ist auch im Knorpel- und Nervengewebe vorhanden<sup>19</sup>.

### **1.1.3. Funktion von Sehnen**

Sehnen widerstehen großen Kräften und dienen der Kraftübertragung ohne erhebliche Verluste. Sie machen Gelenkbewegungen überhaupt erst möglich und erlauben den flüssigen Ablauf der Lokomotion. Sie besitzen eine hohe Belastungsfähigkeit und tragen zur Gelenkstabilität bei. Dank des komplexen histologischen Aufbaus, dämpfen sie die Wirkung abrupter Muskelkontraktionen ab und verhindern somit gravierende Verletzungen des Gelenkapparates<sup>21</sup>.

Die direkte Kraftübertragung passiert über lang gespannte Kollagenfibrillen, die sich durch die komplette Sehne ziehen und sich verflechten, kreuzen und fusionieren können<sup>45</sup>. Es gilt, je größer die generierte Muskelkraft, desto größer ist auch die Belastung für die Sehne<sup>27</sup>. Die Kraftübertragung auf die Kollagenfibrillen beginnt bereits am Muskel-Sehnen-Übergang<sup>15</sup>. Während der Muskelkontraktion verkürzt sich der kontraktile Teil des Muskels und dehnt die Sehne, um die Kraft auf den Knochen zu übertragen<sup>29</sup>.

Das wellenförmige Muster von Sehngewebe („crimp“) und besonders die Knickbildungen einzelner Kollagenfibrillen („fibrillar crimp“) agieren als so genannte „shock absorber“<sup>16 46-48</sup>. Diese Strukturen schützen die Sehne bei der akuten Muskelkontraktion und dienen als mechanischer Puffer. Es wird geschätzt, dass eine Längenzunahme der Sehne von 1 - 3 % physiologisch und allein durch das Glätten der Knickbildungen möglich ist<sup>16 46-49</sup> (Abb. 3).



**Abb. 3** Eine schematische Darstellung der Dehnungskapazität von Sehnen und den daraus resultierenden Folgen. Graphik übernommen von Järvinen et al. 2001<sup>56</sup>.

Der Knickwinkel von Sehnen scheint mit der Belastungsfähigkeit zu korrelieren; je mehr eine Sehne belastet wird, desto größer ist der Knickwinkel der Kollagenfasern<sup>50-55</sup>.

Nach der elastischen Dehnung von 1 - 3 % nimmt die Sehne wieder ihren ursprünglichen wellenförmigen Verlauf an. Ab einer Elongation von mehr als 4 % der Ausgangslänge, kann jedoch der Ausgangszustand nicht mehr erreicht werden.

Bei unzureichender Readaptionszeit und repetitiven Wiederholungen

kommt es dann zu Mikrorupturen, die zu degenerativen Veränderungen des Sehngewebes führen können. Eine Dehnung von 8 % der Ausgangslänge führt zu irreparablen Schäden, wie z.B. der Sehnenruptur<sup>16</sup> (Abb. 3).

Die Kraft-Verlängerungskurve steigt linear an, d.h. die Spannung fällt ab wenn die Sehnenlänge über einen längeren Zeitraum konstant gehalten wird, bzw. die Sehne verlängert sich wenn die Spannung konstant bleibt (Kriechphänomen)<sup>21</sup>.

Durch Ermüdungsvorgänge, wie z.B. repetitive Wiederholungen einer Bewegung, werden die elastischen Fähigkeiten der Sehne verändert, d.h. unter gleicher Kraftanwendung dehnt sich eine vorher beanspruchte Sehne mehr als eine ausgeruhte<sup>19</sup>. Extremes repetitives Dehnen von Sehnen führt zu einer zunehmenden Expression von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukine) und Mediatoren wie z.B. Cox-2, PGE2, MMP-1. Leichte Dehnwiederholungen können wiederum einen günstigen Effekt haben und antiinflammatorisch wirken<sup>17 19</sup>. Ein andauerndes Schonen bzw. Immobilisieren von Sehnen führt zu einer Abnahme des Kollagenfibrillendurchmessers und der Sehnenfestigkeit<sup>57</sup>.

Das komplexe 3D Netzwerk aus Zellfortsätzen erlaubt es auf mechanische Beanspruchungen wie Dehnung, zu reagieren. Bei druckbeanspruchten Sehnenarealen zum Beispiel, kommt es zu Verformung von Tenozyten und es werden vermehrt knorpelähnliche Moleküle exprimiert, um Faserknorpel zu bilden<sup>30</sup>.

Dank der elastischen Dehnung ist die EZM der Sehne in der Lage, für kurze Zeit bei hoher Beanspruchung (Laufen) Energie zu speichern und erlaubt dem Muskel kürzere Muskelfaszikel zu entwickeln, die insgesamt eine ökonomischere Kraft generieren.

Besonders die Achillessehne kann eine hohe Menge an kinetischer Energie speichern. Die spezifische Speicherkapazität liegt dabei um den Faktor 400-1800 höher als im Muskelgewebe. Sehnen der oberen Extremität sind aufgrund eines etwas anderen histologischen Aufbaus dazu nicht in der Lage<sup>21</sup>.

### **Die Anpassung der Sehnenstruktur an Belastung**

Bereits im 19. Jahrhundert vermutete Julius Wolff, dass die mechanische Belastung die Knochenstruktur definiert, d.h. der Knochen sich in seiner Form an die Funktion anpasst<sup>58</sup>. Wilhelm Roux verfeinerte diese Theorie und postulierte, dass jedes einzelne Stützgewebe einer spezifischen physikalischen Größe unterliegt<sup>59</sup>. Dementsprechend sollte Druck die Bildung von Knochengewebe, Schub die Bildung von Knorpelgewebe und Zug die Bildung von Bindegewebe fördern. In den 1960er Jahren widerlegte Pauwels Theorie der „Kausalen Histiogenese“ dies aufgrund eigener Untersuchungen. Er kam zu der Ansicht, dass „Dehnung“ zur Bildung von Bindegewebe und Kollagen (hierzu gehört auch das Sehngewebe) führt und „hydrostatischer Druck“ für die Knorpelbildung verantwortlich ist. Knochengewebe unterliege seiner Meinung nach keinem spezifischen Reiz und solle sich in einem weiteren Schritt aus dem bestehenden Bindegewebe (Kollagen) und Knorpelgewebe über desmale bzw. chondrale Ossifikation erst bilden<sup>60</sup>. Pauwels Theorie besteht bis heute.

Beim Sehngewebe geht man heutzutage deshalb davon aus, dass die Einwirkung mechanischer Kräfte im Sinne einer spezifischen Zugspannung einen tensilen Stimulus auf die mesenchymalen Stammzellen darstellt und die tenogene Differenzierung anregt, sowie zur Bildung von Sehngewebe führt<sup>27 51 61-67</sup>.

Zur Aufrechterhaltung des differenzierten Gewebes benötigt die Sehne ebenfalls einen adäquaten mechanischen, tensilen Stimulus. Ähnlich der embryologischen Frühentwicklung, entstehen Sehnen autonom aus mesodermalem Gewebe, jedoch ist die Weiterentwicklung entscheidend abhängig vom mechanischen Einfluss des Muskels<sup>68 69</sup>.

Sehnen sind *in vivo* aufgrund der alltäglichen körperlichen Bewegungen vielen verschiedenen dynamischen Belastungsarten ausgesetzt (Zug, Druck und Dehnung) und unterstehen, je nach Lage im Körper, unterschiedlich großen Kräften. Es gilt, je größer der Muskeldurchmesser ist, desto größer sind die Kräfte die auf die Sehnen einwirken<sup>70</sup>. Dies äußert sich in einem veränderten Aufbau der EZM bedeutet, dass die Sehne auf Belastungen reagiert.

Tenozyten reagieren auf Belastung mit vermehrter Kollagenbildung und der Umfang der Sehne nimmt bei konstanter und regelmäßiger Beanspruchung der Sehne zu.

Die erhöhte Kollagensynthese ist vermutlich über die „gap junctions“ hergestellte Zellkommunikation zwischen Nachbarzellen gesteuert. Über „gap junctions“ vom Connexin Typ 32 vermittelte Reize stimulieren überwiegend die Kollagensynthese, vermittelte Reize vom Connexin Typ 43 wirken inhibitorisch auf die Kollagensynthese. Diese Einrichtung der Regulation der Kollagensynthese koordiniert und limitiert die Reaktion auf mechanische Reizung und garantiert eine einheitliche und adaptierte Synthese von EZM<sup>27</sup>.

Bei der Mechanotransduktion, der strukturellen Übertragung der Kraft vom Muskel auf die Sehne, konvertieren Zellprozesse einen mechanischen Stimulus in biochemische Signale. Im Prozess der Transduktion sind mehrere Zellkomponente involviert. Die EZM reagiert auf Belastung mit einer Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- $\beta$ 1, bFGF, PDGF)<sup>71</sup>; TGF- $\beta$  vermittelt, z.B. über die Einwirkung von Kräften auf die EZM, eine Steigerung der Kollagenbildung<sup>72</sup>. Die EZM speichert und verteilt mechanische Kräfte oder leitet sie weiter an das Aktin-Myosin-Zytoskelett. Das Zytoskelett steht über Aktinmikrofilamente in dynamischer Verbindung mit beinahe allen intrazellulären Strukturen und kann so die Zellform sowie die Motilität kontrollieren. Durch die Verformung des Zytoskeletts verändert sich die Skelettstruktur und über Signalkaskaden werden Membranproteine (z.B. Integrine, G-Proteine u.a.) aktiviert, die wiederum weitere Zellfunktionen aktivieren wie, z.B. die DNA- und Proteinsynthese<sup>73 74</sup>.

Tenozyten antworten auf mechanische Kräfte durch Anpassung des Metabolismus und der strukturellen und mechanischen Eigenschaften<sup>61</sup>. Die Tenozyten können ihre Genexpression, die Proteinsynthese und den Zellphenotyp verändern. Bei angepasstem Training zum Beispiel vergrößert sich der Sehnenumfang und die Belastbarkeit nimmt zu. Außerdem reagieren die Tenozyten auf Belastung mit einer Steigerung der Kollagen Typ I Produktion<sup>75</sup> um bis zu 46 % nach 8 Wochen Training<sup>76</sup>. Langanhaltende Immobilisation hingegen führt zu Gewichtsverlusten der Sehne und die tenogene Belastbarkeit nimmt deutlich ab; dies kann zu Sehnenüberlastungsschäden und Tendinopathien führen<sup>75</sup>. Zusätzlich kommt es zur Bildung

von unregelmäßig angeordneten Kollagenfasern, dilatierten Venen und Kapillaren<sup>77</sup>. Untersuchungen zeigten in der Vergangenheit, dass nach einwöchigen Laufübungen bei Mäusen die Anzahl und die Durchmessergröße der Kollagenfibrillen im Vergleich zu sitzenden Mäusen zunahm<sup>66</sup>. In *in vitro* Versuchen wurden, nach 8 Wochen Belastungsentzug, signifikante Veränderungen in der Zellform, Zellzahl und der Kollagenfaserausrichtung festgestellt<sup>64</sup>.

## 1.2. Pathophysiologie klinisch relevanter Sehnenrupturen

Sehnenverletzungen können akut oder chronisch sein und sind entweder durch intrinsische Faktoren wie z.B. Durchblutung, Konstitution, Gelenkfehlstellung begründet oder durch extrinsische Faktoren wie z.B. Überlastung, Schnittverletzungen, Medikamente, Umwelt verursacht<sup>78</sup>.

Exzessive und repetitive Überlastung der Sehne ist, neben Alter, Trauma und verminderter Durchblutung, der häufigste pathologische Stimulus für eine Sehnedegeneration und daraus resultierender Abnahme der absoluten Resistenzfähigkeit. Die am häufigsten verletzten Sehnen sind Achilles- und Patellarsehnen sowie die Sehnen der Rotatorenmanschette mit unterschiedlichen Erkrankungen wie z.B. kalzifizierenden Tendinopathien, partiellen und kompletten Sehnenrupturen<sup>3</sup>.

Laut Kannus et al. machen Überlastungsschäden von Sehnen 30-50 % aller Sportverletzungen aus<sup>79</sup>. Durch wiederholte, exzessive Dehnung kommt es zu manifesten Gewebsschäden. Die homogene Struktur ist gestört, d.h. die kollagenen „crosslinks“, die intrazelluläre Matrix und vaskulären Bestandteile der Sehne werden beschädigt<sup>79</sup>. Es kann zu akuten entzündlichen Mikrotraumen mit Schmerz und Ödem (Tendinitis) kommen. Im Rahmen der Entzündung bilden sich vermehrt Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).

Die grundsätzliche Möglichkeit der Selbstheilung ist durch meist intensive wiederholende Belastung und daraus resultierenden kumulativen Mikrotraumen limitiert und kann auf diesem Weg in einer chronisch pathologischen Veränderung der Sehnenstruktur enden<sup>78</sup>. Aufgrund eines Ungleichgewichtes zwischen Matrixdegeneration und –synthese kann sich Sehnenewebe nicht an hohe Belastungskräfte anpassen. Veränderungen können in einer Tendinose resultieren, die laut Kannus et al. als fokales Areal einer intratendinösen Degeneration definiert ist<sup>79</sup>. Histologisch finden sich hypoxische Veränderungen, mukoide

Degenerationen, Tendolipomatosen und kalzifizierende Veränderungen<sup>80</sup>. Die Ausrichtung der Kollagenfasern ist gestört und es zeigt sich ein insgesamt dünnerer Faserdurchmesser, der wahrscheinlich durch eine gestörte Expression der SLRP zustande kommt. Die Produktion von biomechanisch minderwertigen Kollagenfasern des Typ III erhöht sich, während die Durchblutung verringert ist<sup>78</sup>. Dies führt zu einer Störung der metabolischen Aktivität mit Beeinträchtigung des Sauerstofftransportes<sup>79</sup>. Makroskopisch verliert die Sehne ihr weißliches Aussehen und nimmt eine graubraune wie amorphe Farbe an. Die Sehne wird hypertroph und kann sich diffus-knotige umformieren.

Durch Überlastung vorgeschädigte Sehnen sind anfällig für Verletzungen am Muskel-Sehnen-Übergang (z.B. Faserrisse, Rupturen) sowie für Verletzungen am Knochen-Sehnen-Übergang wie z.B. Knochenabrisse<sup>81</sup>.

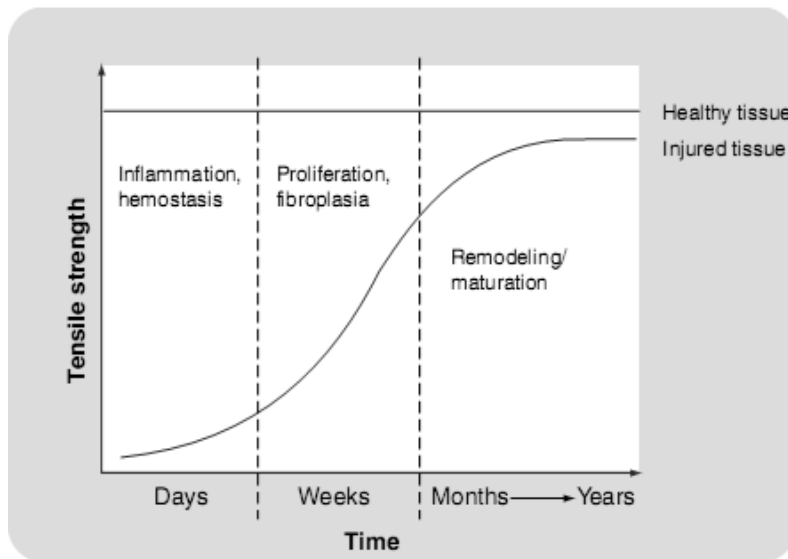
Spontane Sehnenrupturen sind akute Verletzungen, denen meist degenerative histopathologische Veränderungen vorausgehen. Kannus et al. konnte bei 97 % der untersuchten Patienten mit Achillessehnenrupturen degenerative Veränderungen nachweisen<sup>82</sup>. Eine Präsenz von Kollagenfibrillen mit dünnem Durchmesser konnte im Vergleich zu gesunden Sehnen vermehrt in spontan rupturierten Achillessehnen<sup>83 84</sup>, in degenerierten Sehnen der Rotatorenmanschette<sup>85</sup>, in einer alternden Patellarsehne<sup>86</sup> und in der Narbe von heilenden Bändern<sup>35</sup> gezeigt werden. Es konnten in rupturierten Sehnen ebenfalls Veränderungen in der Durchblutung des Sehngewebes und des Paratenon nachgewiesen werden<sup>82</sup>.

Eine Sehnendegeneration führt zu reduzierter Belastbarkeit und Rupturprädisposition. 2/3 der Patienten mit spontanen Sehnenschäden wiesen im Vorfeld keine klinischen Symptome wie Schmerz, Druckempfindlichkeit oder Bewegungseinschränkung auf<sup>79</sup>.

### **1.3. Physiologische Sehnenheilung**

Der autogene Heilungsprozess der oben beschriebenen Sehnenverletzungen ist typischerweise geprägt durch die Bildung von Narbengewebe, das weniger organisiert ist als normales Sehngewebe und selbst lange nach Auftreten der Verletzung minderwertige morphologische, biomechanische und biochemische Eigenschaften aufweist. Beste Voraussetzungen für einen idealen Heilungsprozess ist an erster Stelle eine adäquate Adaption der beiden Sehnenenden. Dies soll verhindern, dass die Stümpfe bei einer zu großen Lücke





**Abb. 4** Zeitliche Übersicht der Wundheilung von Sehnen. Schema übernommen von Hoffmann et al. 2006<sup>67</sup>.

überlappen können (siehe Abb. 4). Obwohl die Sehne wieder schnell an Widerstandsfähigkeit gewinnt, erreicht sie im Gegensatz zum Knochen nicht mehr die physiologische Funktionalität einer normalen gesunden Sehne.

In der Inflammations- bzw. Hämostasisphase, kurzfristig nach Verletzung in den ersten 3 – 5 Tagen<sup>89</sup>, kommt es aufgrund der zerstörten umliegenden Blutgefäße zur Ödembildung. Das neugebildete Koagulat mit eingeschlossenen Plättchen, aktiviert eine Kaskade an Vasodilatoren. Erythrozyten, Lymphozyten und entzündliche Zellen wie z.B. Makrophagen und Granulozyten wandern aus peritendinösem Gewebe sowie Epitenon und Endotenon zur Verletzungstelle<sup>89</sup> und, zusammen mit immigrierenden Tenoblasten phagozytieren sie nekrotisches Gewebe. Mastzellen setzen proinflammatorische Zytokine frei und Makrophagen locken neue Tenoblasten an, die überwiegend Kollagen Typ III bilden. Zudem produzieren Makrophagen einerseits angiogene Faktoren, die das Wachstum von Blutgefäßen fördern. Andererseits bilden sie chemotaktische Faktoren, die zur Tenozytenproliferation führen und weitere inflammatorische Zellen anlocken. In dieser Phase kommt es, durch einen Anstieg von DNA, Fibronectin, GAG, Wasser und Kollagen Typ III, zu einer zügigen Stabilisation der neugeformten EZM<sup>81</sup>.

Die zweite Phase, auch Proliferationsphase genannt, dauert mehrere Wochen an. Es findet sich zu diesem Zeitpunkt ein unorganisiertes Granulationsgewebe in der Verletzungsstelle. Proliferierende Tenoblasten mit vielen rER bilden nun vermehrt EZM (besonders Kollagen Typ III) wobei sich die Anzahl an Makrophagen und Mastzellen kontinuierlich verringert. Die

mit dem umliegenden Bindegewebe vernarben und somit zu einem minderwertigen Regenerat und folglich zu einer erhöhten Re-Ruptur führt<sup>87 88</sup>.

Heilungsprozesse starten bekanntermaßen unmittelbar nach der Verletzung und werden weitläufig in 3 unterschiedliche Phasen unterteilt, die je nach Verletzungslage und – art zeitlich variieren und sich

Konzentration von Kollagen Typ III und DNA nimmt zu, zudem wird Kollagen Typ III nun schrittweise in den optimalen Typ I umgewandelt. Die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern ist anfänglich noch desorientiert, trägt aber dennoch zur biomechanischen Stabilität bei<sup>67</sup>. Tenoblasten sind gegen Ende der ca. 2 Monate andauernden Phase die vorherrschenden Zellen und resorbieren und synthetisieren zu dieser Zeit aktiv Kollagen<sup>89</sup>.

In der dritten Phase, die über ein Jahr in Anspruch nehmen kann, kommt es zur Geweberestrukturierung und Maturation. Es kommt zur weiteren Gewebereifung, wobei sich die Kollagenfasern allmählich wieder entlang der longitudinalen Achse der Sehne, parallel zur Zugbeanspruchung ordnen. Die „crosslinks“ zwischen den Kollagenfasern werden verstärkt und es kommt zu einer Verschiebung des gebildeten Kollagen Typ III zu dem widerstandsfähigeren Kollagen Typ I. Die Tenoblasten verlieren langsam an Größe und verringern die EZM-Synthese<sup>67 81 89</sup>.

Obwohl die ursprüngliche Struktur wieder annähernd hergestellt ist, sind die funktionellen Eigenschaften der heilenden Sehne im Vergleich zur gesunden Sehne stark verringert. Das Regenerat ist vergleichsweise hyperzellulär und es herrscht ein hoher Anteil an Kollagenfibrillen dünneren Durchmessers vor. Ebenfalls ist die Konzentration an Kollagen Typ III im Regenerat immer noch erhöht. Das Kollagen Typ III steht wegen seiner geringen interfibrillären Quervernetzungen in umgekehrter Korrelation zur mechanischen Belastbarkeit der verheilten Sehne<sup>90</sup>. Die Ursache kann einerseits im sehr komplexen Vorgang der akuten und chronischen Entzündung liegen: eine akute Entzündung kann zum Abbau von intakten Kollagenfasern und zum Zelltod führen, was zur weiteren Verschlechterung der funktionellen Einschränkungen und Regenerationszeit beiträgt<sup>67</sup>. Andererseits kommt es zur Freilassung einer großen Menge an Wachstumsfaktoren (wie z.B. FGF, PDGF-BB, EGF, IGF-1, TGF- $\beta$ 1, GDF5-7, BMP12-14)<sup>91-98</sup> von denen bekannt ist, dass sie Zellproliferation und Chemotaxis fördern, die Angiogenese initiieren und auf die Zelldifferenzierung Einfluss nehmen<sup>99</sup>. Durch die Regulierung der Zellsynthese und Sekretionsaktivität fördern Wachstumsfaktoren also den Wundheilungsprozess und die Regeneration entscheidend positiv mit.

## 1.4. Therapie der Sehnenruptur

Die Indikation zur konservativen oder operativen Therapie einer Sehnenverletzung hängt einerseits von der Art der Sehne ab, andererseits von vielen unterschiedlichen Faktoren wie beispielsweise Alter und Funktionsanspruch, Patient compliance und Vorerkrankungen oder Medikamenteneinnahme.

Die konservative Behandlung besteht im Allgemeinen aus Schonung, Frühmobilisation mithilfe von Physiotherapie sowie begleitender analgetischer und antiphlogistischer Medikation.

„Ziel der Operation ist die Adaption der Sehnenenden im ursprünglichen Spannungsverhältnis und die Fixierung bis zur stabilen Ausheilung“<sup>100</sup>.

Schnittverletzungen und scharfe Inzisionen sowie scharfe Rupturen werden meistens mit primär offenen oder perkutanen Sehnennahttechniken behandelt. Bei erheblichen Verletzungen mit Substanzdefekt müssen zudem Sehnentransplantationen in Erwägung gezogen werden<sup>101</sup>, ebenso Sehnentransfers wie z.B. der Transfer des M. latissimus dorsi bei einer Rotatorenmanschettenruptur oder der Ersatz der Achillessehne durch die Sehne des M. flexor hallucis longus.

Bei Sehnenrupturen wie z.B. der Patellarsehnenruptur, haben synthetische Sehnenimplantate gute Erfolge in der Regeneration gezeigt, jedoch sinken durch deren begrenzte Lebenszeit die mechanischen Funktionseigenschaften. Zudem kommt es vermehrt zu entzündlichen Reaktionen, Versagen der Fixationsstellen und zum Fehlen längerfristiger Biokompatibilität<sup>102 103</sup>. Allotransplante sind schwer erhältlich, teuer in der Anschaffung und tragen das Risiko der Abstoßung. Autologe Implantate zeigen zwar keine immunologischen Reaktionen, sind aber in gewissem Maße oft mit der Morbidität des Spenders verknüpft<sup>104</sup>.

Im Folgenden werden drei unterschiedliche Sehnen- bzw. Bandrupturen hervorgehoben, die aufgrund des folgenden, von uns durchgeführten Sehnenregenerations-Modells einen hohen Stellenwert und wegen ihrer Häufigkeit eine deutliche klinische Relevanz besitzen. Wie oben beschrieben ähneln sich Bänder und Sehnen unter anderem in Morphologie und Biomechanik sodass sie der Einfachheit halber hier zusammen behandelt werden.

### 1.4.1. Achillessehnenruptur (ASR)

Mit einer Länge von 10 – 12 cm ist die Achillessehne (mittlerer Querschnitt ca. 1 cm) die stärkste Sehne im menschlichen Körper und verbindet den M. triceps surae mit dem Kalkaneus, indem sie 2 Gelenke überbrückt.

Die Achillessehnenruptur ist bis zu 75 % bedingt durch Sportverletzungen und stellt mit 20 - 40 % die häufigste aller Sehnenrupturen dar<sup>105 106</sup>. Seit der ersten dokumentierten Achillessehnenruptur im Jahr 1575 (Ambrose Paré) ist die in der Literatur dokumentierte Inzidenz stetig gestiegen. Durch den zunehmenden Breitensport geht man in Deutschland von einem kontinuierlichen Anstieg von jährlich 15.000 – 20.000 Achillessehnenrupturen aus<sup>107-109</sup>. Das Verletzungsmuster ist multifaktoriell bedingt, tritt vermehrt bei Männern (2:1 – 12:1) im Alter von 40 – 60 Jahren auf und geht in den meisten Fällen mit einer indirekten Zugeinwirkung auf die Sehne einher<sup>110 111</sup>. Die folgenden drei Akzeleration/Dezeleration-Mechanismen sind von Bedeutung: plantarflektierter Fuß beim Abstoßen bei gleichzeitiger Extension des Knies (53 %); unerwartete Dorsalflexion im Sprunggelenk mit kräftiger Kontraktion der Wadenmuskulatur (17 %) und Aufkommen mit plantarflektiertem Fuß nach Sprung (10 %)<sup>80 100 111</sup>. Die maximale Belastung während dieser Einwirkungen kann bis zu 2233 N bzw. das 6 – 12-fache des Körpergewichtes reichen, was der physiologischen Belastungskapazität entspricht<sup>110</sup>. Die häufigste Rupturstelle liegt 3 – 6 cm proximal des Knochenansatzes. An dieser Stelle ist die Achillessehne am dünnsten und gefährdet für Minderdurchblutung. Auch ist sie hier besonders hohen Belastungskräften ausgesetzt. Folgende Ursachen spielen bei der Entstehung einer Rupturdisposition eine entscheidende Rolle<sup>100</sup>:

- Alter
- chronische Überlastungsschäden mit Mikrorupturen
- Medikamente (Kortison, Immunsuppressiva, Antibiotika etc.)
- Infektionen, Autoimmunerkrankungen.

Prinzip einer konservativen Therapie ist die Adaptation der Sehnenstümpfe durch eine Spitzfußstellung. Diese Art der Therapie eignet sich bei entsprechender Compliance für alle Patienten, unabhängig von Alter und zukünftigem Belastungsanspruch, vorausgesetzt die Therapie findet spätestens 24 h nach Ruptur statt<sup>107</sup>.

Schon 1968 konnten Lea und Smith mit einer konservativ-immobilisierenden Behandlungstherapie der Achillessehnenruptur vergleichbare Ergebnisse wie bei operativer Behandlung erzielen<sup>100 112</sup>. Der zu behandelnde Fuß wurde dabei für 8 Wochen in

Spitzfußstellung mit einem Gips immobilisiert und anschließend über weitere 8 Wochen stufenweise redressiert. Nachteil dieser Art der Behandlung kann jedoch, bedingt durch die limitierte Selbstheilungskapazität der Sehne, eine verlängerte Regeneration mit möglicher Schwächung, einer wiederkehrenden Verletzung und partiellen Funktionsverlust zur Folge haben. Die Re-Rupturrate lag in dieser Studie bei 5 – 25 %, zudem beschrieben die Autoren, dass es zu Muskelatrophien und Einbußen in der Koordination und Propriozeption kommen kann. Das Therapiekonzept von Lea und Smith wird heute als nicht mehr zeitgemäß angesehen. Ein schlüssigeres Konzept ist die konservativ-funktionelle Behandlung von Hübner et al.<sup>113</sup> mit dynamischen Ultraschalluntersuchungen sowie nach initialer Ruhigstellung in Spitzfußstellung, eine frühfunktionelle Therapie im Spezialstiefel mit Absatzerhöhung.

Eine operative Behandlung bietet den Vorteil einer frühen Mobilisation, die die korrekte Ausrichtung der Kollagenfasern und die Belastbarkeit der Muskulatur fördert. Zusätzlich ist die Re-Rupturrate erniedrigt. Die operative Behandlung wird empfohlen wenn keine Kontraindikationen vorhanden sind (Alter der Ruptur, Compliance des Patienten)<sup>100</sup>.

Im Interesse der Übersichtlichkeit wird hier nur kurz auf die Standardmethoden eingegangen. Die üblichen offenen Nahtmethoden bei der frischen Achillessehnenruptur sind die nach Bunell, Kessler (Standardmethode in Deutschland)<sup>109</sup> und Kleinert. Die Naht nach Krackow hat sich zuletzt in den Vereinigten Staaten etabliert<sup>114</sup>. Sie besitzt eine hohe mechanische Stabilität und erlaubt eine frühzeitige Mobilisation der Sehne. Insgesamt ist die Stabilität von offenen Nahttechniken jedoch eher gering und das Risiko der Wundheilungsstörung ist erhöht.

Die perkutane Naht, eingeführt von Ma und Griffith, wird mithilfe feinen Nahtmaterials perkutan durchgeführt. Vorteil dieser Methode ist das geringe Weichteiltrauma, jedoch ist das Risiko einer N. suralis-Verletzung erhöht.<sup>115</sup> Um dieses Risiko zu minimieren kann die endoskopisch assistierte Technik eingesetzt werden<sup>100</sup>.

Eine weitere Nahtmethode ist die „Klöppeltechnik“ nach Segesser. Sie berücksichtigt die spannungsgerechte Reinsertion der medialen Gastrocnemius-Soleusfasern. Postoperativ wird eine funktionelle Nachbehandlung im Spezialschuh (Variostabil®) empfohlen.<sup>116</sup>

Die Benutzung von Fibrinkleber zur Schließung von Achillessehnenrupturen erzeugt eine Erhöhung der Reißfestigkeit um fast das 3-fache und erlaubt eine genaue atraumatische, anatomische Rekonstruktion der Sehnenstümpfe ohne Längeneinbuße<sup>100</sup>. Zudem kann die Wahrscheinlichkeit einer Durchblutungsstörung vermindert und somit eine Revitalisierung

der Sehne gefördert werden. Die Fibrinklebung ist jedoch teuer und hat sich zu keinem Routineverfahren entwickelt.

Große Achillessehnendefekte wie z.B. nach Re-Rupturen oder notwendiger Resektionen erfordern alternative Operationen zur Deckung des Sehnendefektes. Dazu gehören z. B. die Griffelschachtelplastik nach Max Lange<sup>117</sup> und der Transfer der Sehne des M. flexor hallucis longus<sup>118-120</sup>, um nur 2 Methoden von vielen zu nennen.

Prospektiv randomisierte Metaanalysen konnten sich in der Vergangenheit bei der ASR auf keine bestimmte Therapie festlegen. Sowohl die operative als auch die konservative Therapie können bei richtiger Indikation zu guten funktionellen Ergebnissen führen. Jedoch besteht bei konservativer Therapie eine höhere Rate an Re-Rupturen verglichen mit einer operativen Behandlung, die eine höhere postoperative Komplikationsrate und Infekte mit sich bringen kann<sup>121-123</sup>.

#### **1.4.2. Rotatorenmanschettenruptur (RMR)**

Man unterscheidet zwischen Partial- und Totalrupturen von isolierten oder mehreren RM-Sehnen<sup>124 125</sup>. Die Prävalenz der RMR korreliert mit dem Alter und geht oft ohne klinische Symptome einher. Ab dem 50. Lebensjahr steigt die Prävalenz der Partial- und Totalrupturen rapide an. In der 7. Dekade weisen schon 50 % , in der 8. Dekade 80 % der Untersuchten eine RMR auf<sup>126</sup>. Der Ruptur geht meistens ein Trauma voran, das den meist degenerativen Zustand (50 % der Fälle) der Sehne verschlimmert<sup>127</sup>. Als Ursache der RM-Läsionen werden intrinsische und extrinsische Faktoren im Sinne einer multifaktoriellen Genese gesehen. Intrinsische Faktoren sind unter anderem verminderte Durchblutung, abnehmende Elastizität, Tendinosis calcarea und Alterungsprozesse. Neben dem Funktionsverlust kann es durch die Humeruskopfdezentrierung nach anterior-superior zu einer weiteren Stimulation degenerativer Prozesse und dem gehäuften Auftreten einer schmerzhaften Impingementsymptomatik kommen. Das Impingement-Syndrom<sup>128</sup>, chronische Faserüberdehnung sowie repetitive Mikrotraumen<sup>129</sup> und Makrotraumen (z. B. direktes Trauma, Luxation) gehören zu den extrinsischen Faktoren. Die besondere Anatomie und das Zusammenspiel der verschiedenen Muskeln (M. supraspinatus, M. infraspinatus, M. subscapularis, M. teres minor) heben die RMR unter den Sehnenrupturen hervor.

Die Entscheidung zur konservativen Therapie der RMR sollte individuell und mitunter anhand von folgenden Kriterien getroffen werden: degenerative Genese, inaktiver Patient, Non-Compliance. Eine konservative Therapie lässt sich nach Rockwood in 3 Phasen unterteilen (Wiederherstellung einer schmerzfreien RM, Kräftigung der Restmuskulatur und

Integration in Arbeits- und Freizeitleben) und wird initial unterstützt durch eine analgetische und antiphlogistische Medikation<sup>127</sup>.

Dem Erfolg der konservativen Behandlung sind jedoch deutliche Grenzen gesetzt. Boker et al. beschreiben eine persistierende Schwäche in 94 % und Muskelatrophien in 56 % der Fälle<sup>130</sup>. Auch Langzeitstudien konnten zeigen, dass dauerhafte positive Resultate oftmals ausbleiben<sup>131</sup>. Besonders bei akutem Trauma, aktiven Patienten sowie hohem Funktionsanspruch ist die frühestmögliche operative Therapie das Mittel der Wahl. Je nach Verletzungsgrad und Beteiligung der unterschiedlichen Sehnen der RM kann die RMR arthroskopisch, arthroskopisch-assistiert oder offen behandelt werden. Eine im Jahr 2005 an 470 deutschen orthopädischen und traumatologischen Kliniken durchgeführte Umfrage zeigte, dass 78,2 % der RMR in offener und nur 21,8 % in arthroskopischer Technik erfolgten<sup>132</sup>. Auch heute erfolgen noch ca. 50 % der Rekonstruktionen offen<sup>133</sup>. Hinsichtlich der mittel- und langfristigen Ergebnisse zeigen sich bis dato keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Operationstechniken. Re-Rupturen bei kleinen RMR (<1 cm) liegen bei 17 % , bei großen Rupturen (> 5 cm) sind es bis zu 69 %<sup>134 135</sup>.

### 1.4.3. Vordere Kreuzbandruptur (VKBR)

Immer populär werdende Extremsportarten tragen unter anderem zu einer steigenden Inzidenz der VKBR bei. Flexions-Rotations-Traumen, Valgusrotationstraumen und Hyperextensionstraumen sind die häufigsten Verletzungsmechanismen. Als Folge der Verletzung tritt häufig ein Stabilitätsverlust des Kniegelenks ein, der konsekutiv zu Meniskus- und Knorpelschäden sowie Seitenbandverletzungen führen kann<sup>136</sup>. Die Therapie der VKBR hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab wie z.B. Alter, Ausmaß der Instabilität und Begleitverletzungen, berufliches und sportliches Anspruchsniveau sowie Vorschäden und Vorerkrankungen. Dem geschuldet sollte die Therapieform individuell gewählt werden. Studien konnten in der Vergangenheit aufzeigen, dass es verglichen mit einer konservativen Therapie durch den operativen Kreuzbandersatz zu geringeren Raten sekundärer Meniskusläsionen, einer Verbesserung der Stabilität sowie einer Verbesserung des sportliches Aktivitätsgrades kommt<sup>136-139</sup>. In Deutschland werden aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Spendertransplantaten fast ausschließlich körpereigene Hamstrings-, Patellar- oder Quadrizepssehnenentransplantate verwendet, wohingegen in den USA die Verwendung von Spendertransplantaten gerade bei Sportlern aufgrund der geringeren Eingriffsmorbidität weit verbreitet ist<sup>140</sup>. Keine der oben genannten autologen Transplantate ist einem anderen in Bezug auf ihre Belastbarkeit und Reißfestigkeit überlegen<sup>141-144</sup>.

Neben einer erfolgreichen Operation hängt die Genesung auch wesentlich von der Nachbehandlung und Rehabilitation ab. Die meisten Rehabilitationskonzepte orientieren sich an den von Pässler und Shelbourne beschriebenen vier Heilungsphasen<sup>145</sup>. Im Besonderen ist zu erwähnen, dass gerade bei Sportlern eine frühfunktionelle Nachbehandlung mit schmerzadaptierten Bewegungs- und Belastungsaufbau sowie frühzeitigem Beginn koordinativer, neuromuskulärer Übungen von Vorteil zu sein scheint<sup>146-148</sup>.

## 1.5. „Tissue Engineering“ (TE)

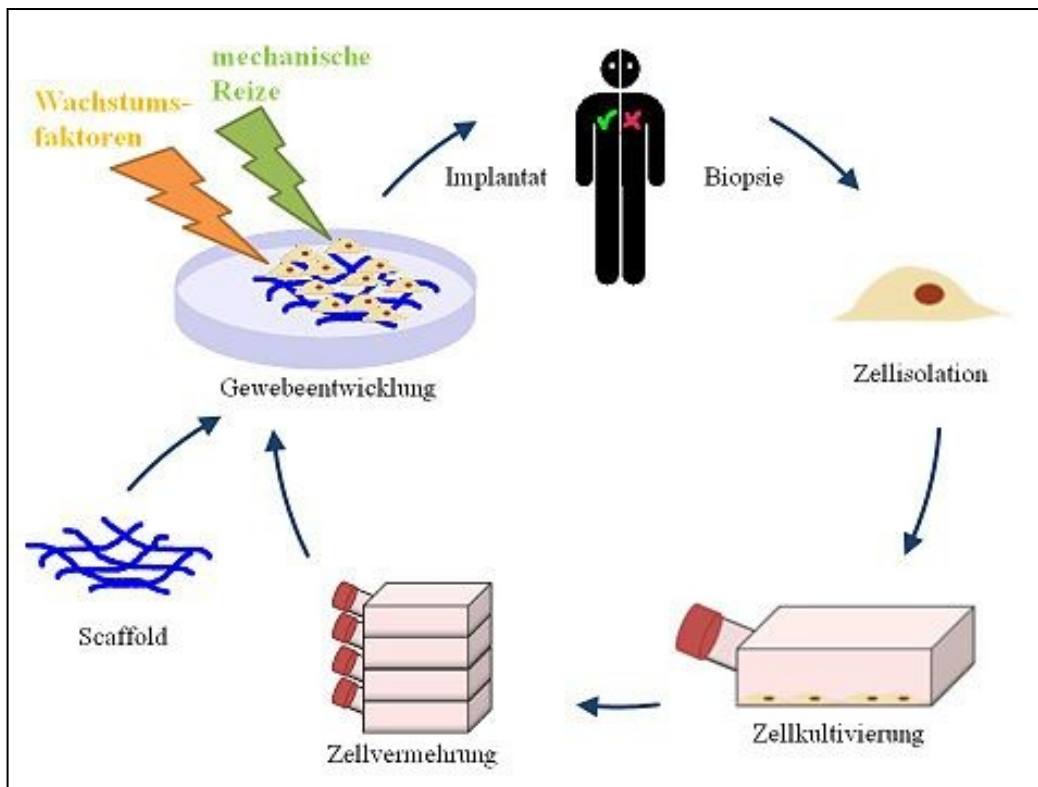
Wie bereits beschrieben sind die konservativen wie die operativen Behandlungsergebnisse der erwähnten Sehnenverletzungen in ihren Möglichkeiten begrenzt. Neuere Verfahren wie das „Tissue Engineering“ sind aus diesem Grund besonders interessant und eine Weiterentwicklung dieser Methode eine Notwendigkeit, um die Behandlungsergebnisse von Sehnenrupturen zu erweitern und zu verbessern. Durch die Zunahme an akuten, chronischen und degenerativen Sehnenenerkrankungen und den daraus resultierenden schwerwiegenden Verletzungen ist mit der Entwicklung des „Tissue Engineering“ die Hoffnung auf eine verbesserte Heilung und die Chance auf die komplette funktionelle Wiederherstellung der Sehne groß.

„Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säuger-Geweben sowie die Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion“<sup>149</sup>.

Das Prinzip des „Tissue Engineering“ kann die Heilung in vivo induzieren oder neues Gewebe in vitro produzieren, das dann in den Körper implantiert wird. Es beruht auf 3 allgemeinen Strategien<sup>150</sup> (Abb. 5):

- Applikation von isolierten Zellen und Zellkomponenten,
- Applikation spezifischer, gewebeinduzierender Substanzen (z.B. Wachstumshormone) und Gentherapie,
- Scaffolds (natürlicher oder synthetischer Herkunft) mit oder ohne Zellbesiedelung.





**Abb. 5** Prinzip des "Tissue Engineering". Quelle: Wikipedia online;  
[https://secure.wikimedia.org/wikipedia/de/wiki/Tissue\\_Engineering](https://secure.wikimedia.org/wikipedia/de/wiki/Tissue_Engineering)

Wachstumsfaktoren spielen zunehmend eine wichtige Rolle in der Sehnenregeneration und werden seit langem in der klinischen Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen angewendet. Sie sind u.a. von Bedeutung bei der Zell-Zell-Kommunikation und Zellmigration und regulieren beinahe alle wichtigen Zellvorgänge wie z.B. die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum sowie auch normale Entwicklungs- und Reparaturprozesse durch Aktivierung oder Inhibition von Enzymen (z.B. Kollagenasen)<sup>151</sup>. Auch beim TE der Sehnen gewinnen sie zunehmend an Bedeutung. Die Forschungsgruppe um Forslund et al. konnte mit einer einzigen Injektion von CDMP-2 in tenotomierten Achillessehnen von Hasen resistenzfähigere Regenerate ohne Induktion von Ossifikationen erzeugen.<sup>152</sup>

Das Prinzip der Gentherapie beschreibt ein weiteres Kapitel des TE und besteht im Transfer von Genen in ein Individuum zur Behandlung von Erkrankungen. Bei der Sehnenregeneration handelt es sich hier um die Veränderung spezifischer Genexpressionen mit dem Ziel, den regenerativen Vorgang zu beschleunigen und positiv zu beeinflussen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Durchzuführen:

(1) Entnahme von körpereigenen Zellen mit Infizierung des therapeutischen Gens und anschließender Implantation der Zellen in den Körper (*ex vivo*);

(2) Einsatz verschiedener Vektoren, die das veränderte Gen direkt zur lokalen Zelle führen (*in vivo*).

Bisher existiert eine Vielzahl an Vektoren wie z.B. virale, nichtvirale oder hybride Vektoren. Nakamura et al. benutzte nichtvirale Liposome für den Transfer von PDGF-B in das Regenerat der Patellarsehne von Ratten. Es zeigte sich 4 Wochen nach Transfektion eine Zunahme der Angiogenese und Bildung von Kollagen Typ I.<sup>153</sup> Gefahr beim Einbau von viralen Vektoren in die Wirt-DNA sind mögliche mutagene Nebenwirkungen. Aufgrund dieses unkalkulierbaren Risikos ist die Gentherapie zum jetzigen Zeitpunkt für die Anwendung in der Geweberegeneration von Sehnen von geringer klinischer Relevanz.

### 1.5.1. Tiermodell im TE von Sehnen

Im Vergleich zu Studien am Menschen ermöglichen Tierstudien invasive Eingriffs- und Auswertungsmöglichkeiten. Gewonnene humane Gewebeproben durch chirurgische Eingriffe oder Biopsien an Kadavern sind in großer Stückzahl oft nicht durchführbar. Zusätzlich können keine Vorgänge eines chronischen Prozesses untersucht werden, da diese in humanen Biopsien meist schon im finalen Stadium der Erkrankung sind. Tiermodelle hingegen erleichtern die Suche nach neuen pathologischen Krankheitswegen, indem sie dem Forscher die nötige Kontrolle über die Variabilität garantieren. Zudem ist es möglich, einzelne genetische und umweltbezogene Variablen zu isolieren<sup>154</sup>.

Die komplette Sequenzierung von Tieren ermöglichte es, spezifische Gene zu isolieren („knocked-out“) oder hervorzuheben („knocked-in“), um den Einfluss eines bestimmten Gens auf Pathologien zu bestimmen. Zusätzlich kann man Tiere eines Stammes, wie beispielsweise die Lewis-Ratte, mit verschiedenem („outbred“) oder gleichem („inbred“) Genmaterial züchten. Eine noch effektivere Forschungsplanung und Durchführung ist so möglich geworden.

Nichthumane Primaten eignen sich aufgrund ihrer menschenähnlichen Anatomie und Physiologie für Studien am besten. Unter Berücksichtigung ethischer Argumente und außergewöhnlich hoher Anschaffungskosten kommen diese Tiere heutzutage jedoch nicht mehr in Frage. Modelle großer Säugetieren wie z.B. Pferde, Ziegen oder Hunde bieten den Vorteil, dass bei ihnen die zu untersuchende Krankheit sehr wahrscheinlich auch auftreten kann (z. B. Tendinosis). Aufgrund ihrer beträchtlichen Größe ist jedoch die Durchführung der Versuche mit erheblichem personellen Aufwand verbunden. Hinzu kommen im Vergleich zu kleineren Tieren deutlich höhere Anschaffungs- und Unterhaltungskosten<sup>154</sup>.

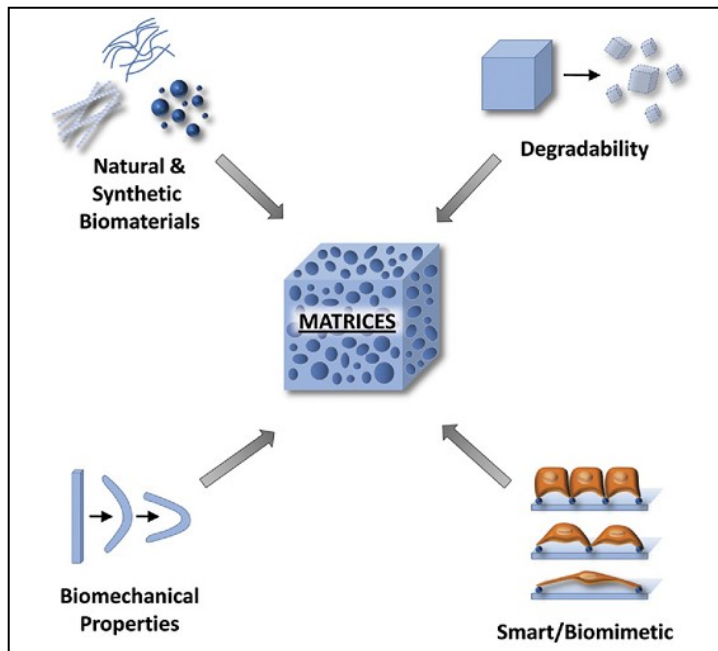
Aus diesen Gründen und nicht zuletzt durch eine ähnliche Physiologie und Anatomie der Extremitäten von Ratten zum Menschen, werden diese Tiere als geeignete Versuchsmodelle häufig eingesetzt. Vorteil im Besonderen für unsere Studie ist es, dass Achillessehnen von Ratten ebenfalls anfällig für Tendinopathien sind, was sich auch in der Homologie des Genoms reflektiert<sup>155 156</sup>. Die Achillessehne der Ratte ist operativ leicht zugänglich und eignet sich aufgrund ihrer Breite und Länge besser für defektfüllende Implantationen als z.B. die Sehnen von Mäusen. Dank der Größe der Sehne können, mit ausreichendem Abstand zum behandelten Sehnenteil, ebenfalls biomechanische Tests durchgeführt werden. Die Tiere sind leicht zu behandeln, wenig aggressiv und sind günstig in der Anschaffung, sowie in den Unterhaltungskosten<sup>154</sup>.

### 1.5.2. Scaffoldmaterialien im TE

Eine Möglichkeit des TE ist die *in vitro* Kombination von 3-dimensionalen Scaffolds, auch Trägermatrizen genannt. Ihre Zellen sind fähig in der Matrix zu überleben und neues Sehnengewebe zu produzieren. Diese Konstrukte werden in die Verletzungsstelle implantiert mit dem Ziel, physiologisches Gewebe zu bilden. Eine weitere Möglichkeit ist die alleinige Implantation des Scaffolds und die Besiedelung mit lokalen Zellen *in vivo*.

Verlässliche Scaffolds sind hohen Anforderungen ausgesetzt und sollten folgenden Kriterien entsprechen (Abb. 6):

- (1) Sie sollten die nötige Biokompatibilität haben, um keine inflammatorischen sowie immunologischen Reaktionen zu erzeugen<sup>157</sup>.
- (2) Die Resorptionszeit des Materials sollte der Wachstumsrate des neugebildeten Gewebes angepasst, d.h. nach abgeschlossener Heilung auch das Scaffold komplett resorbiert sein<sup>158</sup>.
- (3) Das Material sollte bioresorbierbar sein und alle Nebenprodukte über natürliche metabolische Wege eliminiert werden, um mögliche Nebenwirkungen durch verbliebene Residuen zu verhindern<sup>159</sup>.
- (4) Um die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen zu ermöglichen muss das Scaffold mit einer angemessenen Oberfläche (Architektur) ausgestattet sein und sich dem Gewebe anpassen können (biomimetisch); es benötigt eine ausgeprägte Porenstruktur um die Zellverteilung und den Transport von Nährstoffen zu erlauben<sup>160 161</sup>.



**Abb. 6** Wichtige Aspekte in der Scaffoldentwicklung. Schema übernommen von Glotzbach et al. 2011<sup>163</sup>.

zusammengesetzten EZM<sup>164</sup>. Vorteile der biologischen Scaffolds sind die erhöhte Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und die Anwesenheit von funktionierenden Bestandteilen der EZM auf der Scaffold-Struktur (wie z.B. Wachstumshormone, Membranrezeptoren und Proteoglykane). Zudem erleichtern sie die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Nachteile sind unbekannt chemische und biologische Eigenschaften, ein zu schneller Abbau und schwache mechanische Eigenschaften<sup>165</sup>. Einige natürliche Materialien für die Herstellung von biologischen Scaffolds sind Kollagene, Alginat, Gelatin, GAG, Fibrin und Chitosan.

Besonders Kollagen I spielt eine zentrale Rolle im TE der Sehne, da es mehr als 60 % der Trockenmasse ausmacht, besonders reißfest ist und eine hohe Affinität zu Wasser besitzt. Kollagen ist nur wenig zytotoxisch und die Bioresorbierbarkeit kann durch Vernetzungen unterschiedlicher Fasern verändert und angepasst werden. Die Quervernetzung der Fasern erhöht außerdem die mechanische Belastungsfähigkeit und kann durch eine chemische (z.B. Glutaraldehyd, Formaldehyd) und physikalische (z.B. Ultraviolett-, Gammastrahlung) Behandlung erreicht werden<sup>166-168</sup>.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Scaffold mit oder ohne Zellbesiedelung eine Verbesserung der biomechanischen und strukturellen Eigenschaften in heilenden Sehnen fördert<sup>5-7 169</sup>. Nachteil ist eine aufwändige und teure Herstellung und

(5) Die Scaffolds sollten eine angepasste mechanische Belastbarkeit besitzen, um den mechanischen Eigenschaften von funktionellen Geweben *in vivo* zu genügen<sup>162</sup>.

Man unterscheidet Trägermatrizen natürlicher (biologischer) und synthetischer Herkunft.

Biologische Scaffolds können aus dem Menschen (allogen) oder dem Tier (xenogen) gewonnen werden und bestehen je nach Gebrauch aus einer unterschiedlich

Anschaffung biologischer Scaffolds sowie schwierige Sterilisations- und Entnahmemethoden mit komplizierten Dekontaminationsverfahren für z.B. Viren<sup>170</sup>.

<i>Synthetic materials</i>	
Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)	Linear aliphatic polyester; co-polymer of polylactic acid and polyglycolic acid
Polyurethane (PU)	Elastomeric polymer made with diisocyanate/ polycaprolactone/ phenylalanine chain extender
Poly(glycerol sebacate) (PGS)	Condensation of glycerol and sebacic acid

**Abb. 7** Übersicht über die synthetischen Scaffoldmaterialien. Diagramm übernommen aus Chiu et al. 2011<sup>171</sup>.

Eine neue Herstellungsmethode von biologischen Scaffolds ist die Dezellularisierung des Organs selbst und die Wiederbesiedelung von vorher isolierten Zellen. Kryger et al. gelang 2007 eine erfolgreiche Besiedelung einer azellularisierten Sehne mit verschiedenen Zellarten (Tenozyten, Fibroblasten, BMSC und ASC)<sup>12</sup>.

Synthetisches Material für Scaffolds kann in 3 Kategorien unterteilt werden (Abb. 7): aliphatische Polyester, elastomerische Polyester und nichtpolymerische Polyester. Sie müssen nicht von Mikroorganismen gereinigt werden, sind gut reproduzierbar und

haben den Vorteil, dass ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften angepasst werden können. Die Porengröße, die Resorptionsrate und die biomechanischen Eigenschaften können genau kontrolliert werden. Nachteil ist, dass sie keine weiteren Bestandteile der EZM mehr besitzen wie z.B. Proteoglykane, die zur Interaktion mit der nativen EZM beitragen könnten. Aliphatische Polyester sind PGA (polyglycolic acid), PLA (polylactic acid) und PLGA (eine Kombination von PGA und PLA). Diese Ester sind hydrolytisch bioresorbierbar, doch die Abbauprodukte können lokale pH-Absenkungen, entzündliche Reaktionen und Gewebeschäden hervorrufen<sup>165 172</sup>. Elastomerische Materialien werden besonders im TE des Herzens angewandt.

PGA- und Kollagenscaffolds konnten bereits erfolgreich im TE von Sehnen eingesetzt werden<sup>8 9 173</sup>, doch ist es bisher nicht gelungen, das Sehnengewebe in toto wiederherzustellen. Eine weitere Möglichkeit ist die Kombination von biologischen und synthetischen Scaffolds, um die Vorteile beider Materialien (Biomimetik und biomechanische Eigenschaften) zu vereinen<sup>165</sup>.

### 1.5.3. Zellen für das TE

Zellen spielen eine Schlüsselrolle beim TE und sollten folgende allgemeinen Anforderungen besitzen:

- (1) Vermehrungsfähigkeit, um in ausreichender Menge vorhanden zu sein;
- (2) Überlebensfähigkeit und Aufrechterhaltung der Zellfunktion über einen bestimmten Zeitraum;
- (3) Biokompatibilität, um immunologische Reaktionen zu vermeiden<sup>171</sup>.

Zellen können autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs sein. Der Vorteil von autologen Zellen ist die verminderte Abstoßungswahrscheinlichkeit, jedoch ist die Entnahme einer ausreichenden Zellzahl aufwändig und bedeutet zusätzliche Schmerzen und Infektionsmöglichkeiten für den Patienten. Eine gebräuchliche autologe Zellquelle sind mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark und Fettgewebe, die sich in unterschiedliche Zelltypen differenzieren können<sup>174</sup>.

Allogene Zellen vom Spender der gleichen Spezies besitzen ein höheres Abstoßungsrisiko, haben aber bei alten und schwerkranken Patienten einen Vorteil gegenüber autologen Zellen. Xenogene Zellen stammen von einem Spender einer anderen Spezies und bieten die Möglichkeit großer Zellgewinne. Xenogene Transplantationen können Infektionen tierischen Ursprungs verursachen und haben genau wie allogene Zellen ein erhöhtes Abstoßungspotential.

Eine weitere Einteilung der Zellen findet aufgrund des Differenzierungsgrades statt:

- (1) differenzierte gewebespezifische Zellen,
- (2) Progenitorzellen,
- (3) Stammzellen.

#### 1.5.3.1. Differenzierte Zellen

Sehnenzellen sind heutzutage eine etablierte Zellquelle in Studien, da sie in hoher Anzahl in Sehnen und Bändern vorhanden sind. Differenzierte Zellen werden aus neonatalem oder adultem Gewebe gewonnen und können nach Expandierung sofort fürs TE benutzt werden, da sie alle gewebsrelevanten Funktionen bereits besitzen. In unserem Fall repräsentieren Tenozyten die differenzierten Zellen von Sehnen und Bändern. Nachteil ist, dass diese Zellen oft aufwändig zu gewinnen, häufig fest im umliegenden Bindegewebe verankert und nur sehr zeitintensiv zu isolieren sind. Sie besitzen zwar im Vergleich zu Progenitor- und Stammzellen

nur eine begrenzte Proliferationsfähigkeit, dies ist jedoch für unsere Untersuchungen aufgrund dieser sehnen-spezifischen Funktionen der Tenozyten von Vorteil und gewünscht.

Yao et al. konnten nachweisen, dass sich der Phenotyp von Tenozyten in vitro mit zunehmender Passage verändert kann. Im Gegensatz zu Stammzellen besteht bei differenzierten Zellen also eine erhöhte Dedifferenzierungsgefahr<sup>175</sup>. Trotz dieses Nachteils wurden differenzierte Tenozyten bereits vor Jahren erfolgreich auf PGA-Scaffolds in vivo getestet<sup>8</sup> und im Vergleich zu MSC konnten keine relevanten Unterschiede bezüglich der Sehnenhistologie festgestellt werden<sup>12</sup>. Trotz allem sind noch weitere Studien notwendig um das erhoffte Potential von Tenozyten im TE zu belegen.

#### 1.5.3.2. Progenitorzellen

Progenitorzellen können sich in bestimmte Zelltypen differenzieren, sind aber spezifischer als Stammzellen. Sie ersetzen im Körper geschädigte oder tote Zellen bei der Heilung von verletztem Gewebe, indem sie sich in die Zielzellen differenzieren.

#### 1.5.3.3. Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte, selbsterneuerungsfähige Zellen mit dem Potential, sich je nach Gewebeumfeld in spezifische Zellen zu differenzieren. Der Hauptvorteil von Stammzellen ist die Proliferationsfähigkeit, die die Gewinnung einer ausreichenden Zellzahl möglich macht. Man unterscheidet 3 unterschiedliche Kategorien: (1) embryonale Stammzellen, (2) adulte Stammzellen und (3) induzierte pluripotente Stammzellen.

Adulte Stammzellen sind im Vergleich zu den ethisch fragwürdigen embryonalen pluripotenten Stammzellen multipotent und besitzen die Fähigkeit, sich in mesenchymale (MSC) und hämatopoetische Zellen zu differenzieren. MSC existieren in vielen Organen und Bindegeweben (z.B. Knochenmark, Darm, Lunge, Leber, Fettgewebe u.v.a.) und können sich in Tenozyten, Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten differenzieren. Es gibt eine Vielzahl an Publikationen, die über die erfolgreiche Anwendung von MSC mit oder ohne Scaffoldbesiedelung im TE von Sehnen berichten. Young et al. beispielsweise konnte MSC aus dem Knochenmark auf einem bioresorbierbaren Scaffold ansiedeln und in einen ca. 1 cm großen Achillessehnendefekt von Hasen implantieren. Neues sehnenähnliches Gewebe konnte 12 Wochen nach Implantation nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Verbesserung der biomechanischen und strukturellen Eigenschaften der Regenerate im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Defektschließung mit herkömmlicher Naht) festgestellt werden<sup>5</sup>. 2006

definierte das Komitee der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie minimale Kriterien für die uniforme Charakterisierung von MSC<sup>176</sup>:

- (1) MSC müssen in einer *in vitro*-Kultur plastikadhärent sein;
- (2) MSC müssen CD105, CD73 und CD90 exprimieren und die Oberflächenmoleküle CD45; CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19 und HLA-DR müssen fehlen;
- (3) MSC müssen sich *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren können. Eine tenogene Differenzierungsmethode *in vitro* wurde bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht etabliert.

Die MSC stellen mit 0,003 – 0,015 % nur einen kleinen Anteil an der gesamten Zellpopulation im Knochenmark (BMSC – bone marrow stromal cells) dar<sup>87 177 178</sup> und werden mithilfe der Friedenstein-Methode mittels Plastikadhäsion isoliert<sup>87 179</sup>.

Die BMSC werden ebenfalls im TE von Sehnen verwendet und haben den Vorteil, dass sie sofort nach deren Gewinnung aus dem Donor in den Empfänger implantiert werden können, ohne kosten- und zeitaufwändige labortechnische Selektion wie es für die MSC der Fall ist<sup>87</sup>. Der Vorteil bei den MSC wiederum für das TE bei Sehnen ist der hohe Anteil an Zellen mit tenogenem Differenzierungspotential und die Abwesenheit von hämopoetischen und anderen mesodermalen Zellen<sup>87</sup>.

#### 1.5.4. Das Defektmodell im TE von Sehnen

Das sog. Defektmodell, besonders mit zusätzlicher Anwendung autologer Zellen, hat sich in den letzten Jahren zur Untersuchung von Sehnendefekten durchgesetzt. 2 Formen werden unterschieden:

Ein Totaldefekt bezeichnet die Herstellung einer Lücke durch eine komplette Exzision eines Abschnittes mit kritischer Länge (critical full-size defect) einer Sehne wie z.B. der Achillessehne. Dieser Defekt wird anschließend mithilfe von zellbesiedelten bzw. zelllosen Scaffolds wieder verschlossen<sup>87 180</sup>.

Im Gegensatz zum Totaldefekt unterscheidet man einen Partialdefekt, bei dem ein Teil der Sehne erhalten bleibt und nur ein Teil reseziert wird. In mehreren Studien konnte der Partialdefekt bereits erfolgreich untersucht werden. Awad et al. beispielsweise setzte einen zentralen Partialdefekt (3 x 3 mm) in Patellarsehnen von Hasen und konnte diesen anschließend mit autologen MSC-besiedelten Kollagenscaffolds unterschiedlicher Zelldichte verschließen. Die biomechanische und histologische Auswertung der Sehnenregenerate erfolgte nach 6, 12 und 26 Wochen. Die zellbesiedelten Regenerate zeigten eine signifikant höhere Ausreißkraft im Vergleich zu den Regeneraten mit natürlicher Sehnenheilung<sup>9</sup>.



Der erhaltene gesunde Sehnenanteil stabilisiert hierbei die Sehne und kann ihre Funktion aufrecht erhalten sowie die Heilung des Defektes unterstützen. Der Partialdefekt entspricht dabei klinisch eher einem künstlichen Defekt wie z.B. bei der Entnahme des zentralen Sehnenabschnittes der Patellarsehne für die Rekonstruktion des Kreuzbandes, und simuliert somit nicht die natürliche Sehnenruptur wie sie *in vivo* überwiegend vorkommt.

Der Totaldefekt hingegen simuliert die physiologische Sehnenruptur und hat daher eine höhere klinische Relevanz beim Defektmodell der Sehnenheilung.

## 1.6. Ziel der Studie

Nach derzeitigem Wissensstand ist es bisher noch keiner Studie gelungen, verletztes Sehngewebe so zu beeinflussen, dass das Regeneratgewebe nativem Sehngewebe in Bezug auf histologische, biomechanische und biochemische Eigenschaften gleichzusetzen ist<sup>11</sup>. Gerade hinsichtlich Sehnenrupturen der Rotatorenmanschette, deren konservative sowie operative Behandlungen teilweise an ihre Grenzen stoßen und zu qualitativ unzureichender Sehnenheilung führen, soll hier mithilfe des „Tissue Engineering“ und Tenozyten ein neuer, vielversprechender Ansatz zur Sehnenheilung weiterverfolgt werden. Bereits Cao et al. konnte in einer experimentellen Untersuchung feststellen, dass die Anwendung von Tenozyten in einem Sehnenmodell zu einer Verbesserung der biomechanischen Funktion führte<sup>8</sup>. Mithilfe dieser differenzierten Zellen erhoffen wir uns mit unserem vorliegenden Untersuchungsmodell eine Optimierung beim TE und der Regeneration von Sehnen.

Erstes Ziel dieser Studie ist es zunächst, die Regeneration von rupturierten Sehnen mithilfe neuester Erkenntnisse des „Tissue Engineering“ und Tenozyten so zu verbessern, dass sie nativen Sehnen in deren Eigenschaften gleichwertig sind. Unsere daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen dann im weiteren Verlauf als neue Ansatzpunkte in der klinischen Therapie von RMR oder anderen Sehnenrupturen dienen.

Ein weiteres Ziel dieser Studie ist der direkte Vergleich von Tenozyten und MSC auf die Sehnenheilung. Dabei möchten wir vergleichend auf die Ergebnisse der Dissertation von Dr. Frankewycz eingehen, die uns als Vorversuch bzw. Teilarbeit mit exakt dem gleichen Studienaufbau dient<sup>1</sup>. Frankewycz erforschte die Sehnenregeneration am gleichen Totaldefektmodell von Achillessehnen in Ratten und ersetzte den substanzialen Defekt einerseits einmal mit unbesiedelten PGA- und Kollagen-Scaffolds und andererseits mit den gleichen Scaffolds, die im Voraus mit MSC besiedelt wurden.

Zudem war es von Interesse, ob die alleinige Implantation von Scaffolds in einen Totaldefekt zu einer vergleichbaren Sehnenregeneration kommt in der Annahme, dass ortsständige Tenozyten in die künstliche Matrix einwandern und so zur Heilung beitragen.

Frankewycz musste während seiner Arbeit feststellen, dass seine behandelten Sehnenregenerate nicht den qualitativen Ansprüchen einer nativen Sehne entsprachen und es zudem zu einem hohen Verknöcherungsanteil in allen Sehnenregeneraten kam.

Auch Awad et al. beschrieb in seiner Partial-Defekt-Studie in 28 % der Sehnenregenerate mit MSC-besiedelten Scaffolds unerwünschte Verknöcherungen, die zu einer erhöhten Rigidität der Sehnen führten<sup>9</sup>.

Durch die Anwendung Sehnen-spezifischer Zellen (Tenozyten) erwarten wir somit, dass es zu keiner Gewebedifferenzierung kommt und die Verknöcherungen in den Sehnenregeneraten nicht auftreten.

## 1.7. Hypothesen

Diese Arbeit soll folgende Hypothesen aufgreifen:

**Hypothese 1: Die Verwendung von autologen Tenozyten in einem substanziellen totalen Achillessehnendefekt führt zur Bildung hochwertiger Sehnenregenerate, die den histologischen und biomechanischen Eigenschaften nativer Sehne entsprechen (Outcome).**

**Hypothese 2: Die Implantation von bereits differenzierten Zellen (Tenozyten) in einen substanziellen Totaldefekt mithilfe von 2 verschiedenen Scaffolds (PGA und Col I) führt, im direkten Vergleich zur Verwendung von MSC, zu einem besseren Outcome.**

**Hypothese 3: Die unterschiedlichen Scaffolds (PGA oder Col I) haben einen signifikanten Einfluß auf das Outcome.**

**Hypothese 4: Die Verwendung von Tenozyten führt insgesamt zu weniger Ossifikationen in den Regeneraten.**

## **2. Material und Methoden**

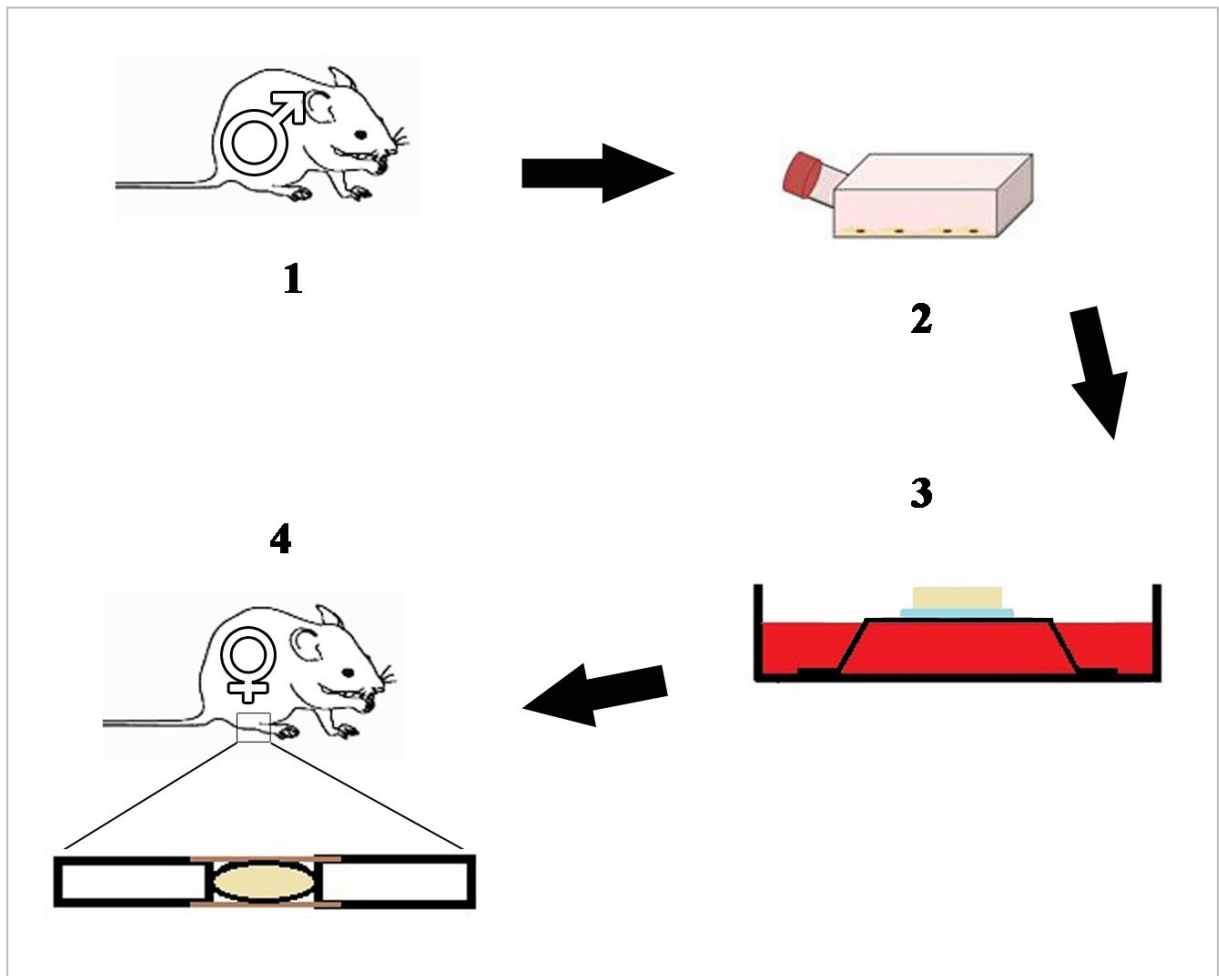
### **2.1. Übersicht und allgemeiner Studienaufbau**

In experimentellen Versuchen wurde ein Totaldefekt in der Achillessehne bei Lewis-Ratten von 3 mm Länge im mittleren Sehnendrittel zwischen Ansatz am Kalkaneus und dem Ansatz am M. Gastrocnemius gesetzt. Zur Schließung des Defekts wurden 2 verschiedene Scaffolds benutzt: a) Kollagen I (Col I) und b) Polyglykolsäure (PGA) (Abb. 15). Die Besiedelung der Scaffolds erfolgte mittels autologen Tenozyten (TC) (Col I + TC, PGA + TC), die aus Sehnenmaterial von männlichen Lewis-Ratten gewonnen wurden. Nach Zellgewinnung, Kultivierung und Aufbereitung der Tenozyten in der Zellkultur wurden diese in weibliche Lewis-Ratten des gleichen Inzuchtstammes implantiert (s. unten). Die Abbildung 8 dient dabei einem ersten Überblick über den Verlauf und Aufbau der Studie.

Zusätzlich zu diesen Versuchsgruppen, in denen der Totaldefekt mittels besiedelten Scaffolds geschlossen wurde, erfolgte bei einer weiteren Gruppe zur Defektüberbrückung nur eine Naht mit zusätzlicher Implantation von Tenozyten (Naht + TC). Bei einer anderen Gruppe erfolgte keine Defektüberbrückung und auch keine Anwendung oder Implantation von Tenozyten (Gruppe Defekt). Als Nativgruppe diente eine Gruppe von Tieren, die unter gleichen Bedingungen operiert wurde, bei der aber kein künstlicher Totaldefekt durchgeführt und auch keine Implantation von Scaffolds bzw. Tenozyten stattfand.

Zum besseren Verständnis werden in Tabelle 2 einmal alle Gruppen der gesamten Studie aufgeführt.

Der Fokus im Material und Methoden-Teil liegt aus Gründen der Übersichtlichkeit ausschließlich auf den von uns durchgeführten Versuchen mit Tenozyten. Viele der bereits etablierten Methoden wurden von der Arbeitsgruppe um Frankewycz übernommen und sind dementsprechend gekennzeichnet. Für eine detaillierte Beschreibung der Methoden zur Gewinnung, Kultivierung und Aufbereitung der Stammzellen wird an dieser Stelle auf die Dissertation von Frankewycz verwiesen<sup>1</sup>. Im Ergebnisteil werden die Ergebnisse von Frankewycz zum Teil eingefügt um sie statistisch besser vergleichen zu können.



**Abb. 8** Grobe schematische Übersicht des Studienablaufes. Siehe Erläuterungen dazu auch in Tabelle 4. **1:** Zellentnahme aus männlichen Lewisratten (Abb. übernommen aus Stocchi et al. 1985<sup>181</sup>). **2:** Kultivierung der Zellen (Abb. aus [https://secure.wikimedia.org/wikipedia/de/wiki/Tissue\\_Engineering](https://secure.wikimedia.org/wikipedia/de/wiki/Tissue_Engineering).) **3:** Aufbereitung der Zellen und 3D-High-Density Kultur auf Scaffold (PGA/Kollagen I) **4:** Implantation der besiedelten Scaffolds in das Totaldefekt der Achillessehne von weiblichen Lewis-Ratten. Nach insgesamt 16 Wochen wird der Effekt der Tenozyten auf die biomechanischen Eigenschaften, die histologischen Strukturen und die molekularbiologische Auswertung untersucht. Schema der Maus aus Schenkel, Transgene Tiere 2. Auflage 2006, ISBN-10 3-540-28267-X.

Gruppen-Nr.	Anzahl Tiere	Bezeichnung	Defektüberbrückung
1	12	Nativ	Nativsehne; Kontrollgruppe
2	12	Col I + TC	Kollagen I – Scaffold <b>plus</b> Tenozyten
3	12	PGA + TC	PGA – Scaffold <b>plus</b> Tenozyten
4	12	Defekt	Defekt ohne Scaffold <b>ohne</b> Tenozyten
5	12	Naht + TC	Naht ohne Scaffold <b>plus</b> Tenozyten
6	<i>11</i>	<i>Col I + MSC</i>	<i>Kollagen I – Scaffold <b>plus</b> MSC<sup>1</sup></i>
7	<i>11</i>	<i>PGA + MSC</i>	<i>PGA – Scaffold <b>plus</b> MSC<sup>1</sup></i>
8	<i>11</i>	<i>Col I</i>	<i>Kollagen I – Scaffold <b>ohne</b> Zellen<sup>1</sup></i>
9	<i>11</i>	<i>PGA</i>	<i>PGA – Scaffold <b>ohne</b> Zellen<sup>1</sup></i>

**Tab. 2** Übersicht der unterschiedlichen Methoden der Defektüberbrückung der Versuchsgruppen 1 – 9. Die Arbeitsschritte der Gruppen 1 – 5 werden in dieser Arbeit im Detail beschrieben. Für Erläuterungen zu den Gruppen 6 – 9 (in *Italic-Schrift*) wird auf die Dissertation von Frankewycz verwiesen<sup>1</sup>.

Nach 16 Wochen Regenerationszeit wurden die Versuchstiere euthanasiert und die Sehnenregenerate aus den operierten Gruppen sowie die Sehnen aus der Nativgruppe operativ explantiert. Die resezierten Proben wurden verschiedenen, vorher festgelegten Auswertungsmethoden unterzogen, die anhand der Tabelle 3 dargestellt sind:

Anzahl der Sehnenproben (n)	Auswertungsmethoden
6	Biomechanik und anschließende Molekularbiologie
4	Makroskopische Beurteilung, Histologie und Immunhistochemie
2	Transmissionselektronenmikroskopie
Total = 12/Gruppe	

**Tab. 3** Allgemeine Auswertungsübersicht der Proben (n = 12) der Gruppen 1 - 5.

Die präoperativen Arbeitsschritte, die Biomechanik sowie die Immunhistochemie wurden im Labor für Biomechanik, Orthopädische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, Standort Großhadern durchgeführt<sup>1</sup>.

Die Molekularbiologie fand in Zusammenarbeit mit der Experimentellen Chirurgie und Regenerativen Medizin (ExperiMed) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München statt<sup>1</sup>.

Die operativen Maßnahmen sowie tierpflegerische Tätigkeiten erfolgten im Institut für Chirurgische Forschung im Walter Brendel Zentrum, Klinikum der Universität München<sup>1</sup>.

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde in Kooperation mit der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt<sup>1</sup>.

## **2.2. Verwendete Tiere**

Insgesamt wurden 14 männliche Lewis-Ratten für die präoperativen Arbeitsschritte, d.h. allgemeine Vorversuche, Isolation und Kultivierung von Tenozyten aus Sehngewebe und 56 weibliche Lewis-Ratten des gleichen Inzuchtstammes für die operativen Hauptversuche benötigt. 7 Wochen alte Tiere mit einem Gewicht von ca. 197 g (Mittelwert) hatten nach Anlieferung im Tierstall eine zweiwöchige Anpassungszeit.

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 55.2-1-54-2531.8-62-07), gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes, erlassen vom Bundesministerium der Justiz<sup>1</sup>. Die Haltung, die artgerechte Pflege und Euthanasie der Tiere sowie alle weiteren Eingriffe an den Ratten fanden gemäß dem Tierschutzgesetz sowie den Behandlungsstandards des Versuchslabors im Walter Brendel Zentrum statt.

In Makrolonkäfigen (59,5 cm lang, 38 cm breit) konnten sich die Tiere, zu je 4 Versuchstieren pro Käfig, prä- und postoperativ frei bewegen. Die Tiere wurden mit Wasser ad libitum und Tierfutter („Sniff-Diet“; Fa. Sniff, Soest) versorgt. Die Käfige waren mit Standardstreu für Ratten gefüllt und wurden zweimal pro Woche gereinigt. Die zugelassenen Räumlichkeiten für die Tierhaltung und die artgerechte Pflege waren nach Standardparametern klimatisiert ( $20 \pm 2$  °C Raumtemperatur, 45-60 % relative Luftfeuchte, 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus)<sup>1</sup>. Um einen hohen Hygienestandard zu garantieren, war das Betreten der gesamten Anlage nur mit spezieller Schutzkleidung erlaubt und die Nutzung des Tierstalls nur zugangsberechtigten Personen gewährt<sup>1</sup>.

Die Sehnenentnahme und Gewinnung von Tenozyten erfolgte aus den Faszikeln der Schwänze von männlichen Lewis-Ratten. Die Tenozyten wurden nach der Aufbereitung in der Zellkultur (siehe 2.3.2. ) in weibliche Lewis-Ratten des gleichen Inzuchtstammes implantiert. Die Wahl eines Inzuchtstammes der Lewis-Ratte erlaubte die Implantation von männlichen Tenozyten in weibliche Tiere ohne, dass eine Abstoßungsreaktion zu erwarten wäre und ermöglichte später den Nachweis des SRY-Gen auf dem Y-Chromosoms mittels PCR in den weiblichen explantierten Sehnenproben (siehe weiter unten).

Anhand der folgenden Tabelle wird noch ein Mal die Verwendung der männlichen und weiblichen Tiere sowie die folgenden Arbeitsschritte verdeutlicht:

Arbeitsschritte	Erklärung
1	Operative Sehnenresektion aus <b>männlichen</b> Spenderratten (Lewis-Stamm)
2	Enzymverdauung des präparierten Sehnenmaterials mittels Collagenase I
3	Kultivierung und Expandierung der isolierten Tenozyten in der Zellkultur
4	Aufbereitung der Tenozyten und 3D-High-Density Kultur auf Scaffold (PGA/Kollagen I)
5	Implantation der Tenozyten in <b>weibliche</b> Ratten vom gleichen Inzuchtstamm (Lewis-Ratte)

**Tab. 4** Übersicht der verschiedenen Arbeitsschritte von der Entnahme, Kultur und Aufbereitung bis hin zur Implantation der Tenozyten.

## 2.3. Zellgewinnung und Scaffoldbesiedelung

### 2.3.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur

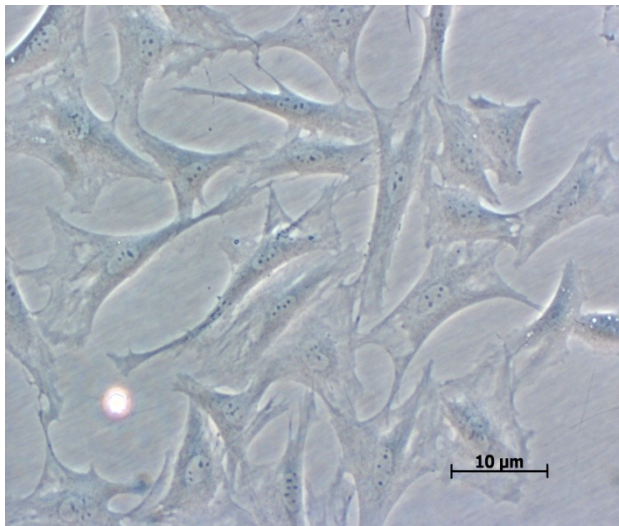
Die Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen und unter Berücksichtigung der Sicherheitsmaßnahmen, in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.



### 2.3.1.1. Kultivierung der Tenozyten

Die Monolayer-Kultivierung der isolierten Tenozyten erfolgte in Zellkulturflaschen mit 175 cm<sup>2</sup> Grundfläche (T-175 Flask) in einem Flüssigmedium. Als Expansionsmedium diente Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM; siehe Protokoll 1) mit 10 % fetalem bovinem Serum (FBS) sowie 50 IU/ml Antibiotikumzusatz (Penicillin-G und Streptomycin). Die Dosierung des Mediums betrug ca. 0,15 ml pro cm<sup>2</sup> Flaschenboden. Nach Beschriftung der Kulturflaschen mit Datum und Tiernummer erfolgte die Lagerung der Zellen in einem Brutschrank unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit). Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage und der Konfluenzgrad wurde per Lichtmikroskop kontrolliert.

Das Passagieren der Monolayer-Zellkultur erfolgte ab einer Zellkonfluenz von 80 % (Abb. 9).



**Abb. 9** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Monolayerkultur von Tenozyten kurz vor der nächsten Passage bei 80 % Konfluenz.

Dazu wurde in einem ersten Schritt der Mediumüberstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, ohne die Zellen zu beschädigen und die Kulturflasche zweimal mit 5 ml steriler Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Protokoll 2) gespült. Um ein Ablösen der Tenozyten vom Boden zu ermöglichen, wurden 5 ml Trypsin/ETDA-Lösung (0,5 %/0,2 %) bedeckt.

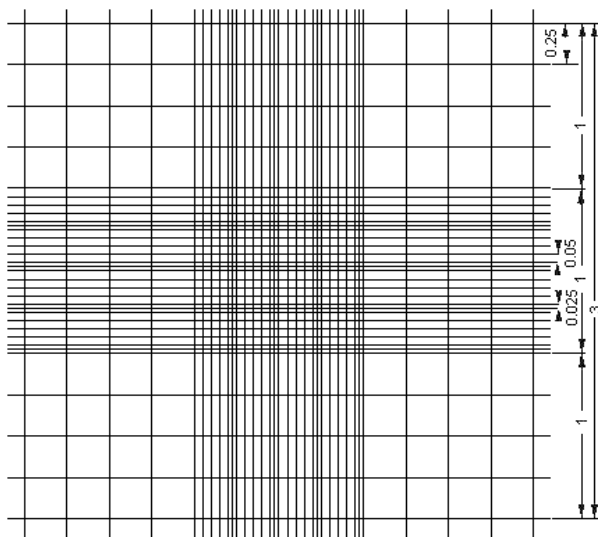
Unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle konnte beobachtet werden, wie die Tenozyten eine rundliche Form annahmen und in der Lösung flottierten. Nach fünfminütiger Inkubation im Brutschrank und der vollständigen Lösung der Tenozyten vom Boden der Kulturflaschen wurde der Trypsin/EDTA-Lösung in einem weiteren Schritt nun die gleiche Menge Medium hinzugefügt, um mit dem im FBS enthaltenen  $\alpha$ 1-Protease-Inhibitor-Komplex die Trypsinwirkung zu neutralisieren. Die komplette Trypsin-Medium-Zell-Flüssigkeit wurde mithilfe einer Pipette abgesaugt und in ein Röhrchen umgefüllt und dann für 5 Minuten mit 500 G zentrifugiert. Nach vorsichtiger Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet mit neuem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (s. 2.3.1.2. ). Für die Zellexpansion wurden die Tenozyten in einer Konzentration von 300.000 Zellen/Kulturflasche in neue, mit Medium gefüllte Flaschen überführt. Diese Zelldichte

erwies sich in eigenen Vorversuchen als günstiger Wert für das Wachstum der Tenozyten. Ab der 2. Passage wurden die Tenozyten für weitere Versuchsdurchführungen aufbereitet (s. weiter unten).

### 2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Grundsätzlich wurde die Zellzahlbestimmung beim Passagieren vorgenommen (s. oben), um die adäquate Verteilung auf neue Kulturflaschen zu garantieren. Die mit Trypsin abgelösten Tenozyten wurden in einem Röhrchen für 5 Minuten mit 500 G zentrifugiert und der Mediumüberstand vom generierten Zellpellet abgesaugt.

Je nach Größe des Pellets und geschätzter Zellzahl wurden 5, 10, 20 bzw. 50 ml Medium ins



**Abb. 10** Definierte Messbereiche eines Neubauer Hämatocytozometer. Alle Maße der Kammern in mm: Großquadrat, 1 mm<sup>2</sup>; Gruppenquadrat, 0,04 mm<sup>2</sup>; Kleinstquadrat, 0,0025 mm<sup>2</sup>; Kammertiefe, 0,1 mm. Quelle: [www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/zaehl.html](http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/zaehl.html).

Röhrchen hinzugeben (Verdünnung) und die Zellsuspension mit einer 1000er Pipette resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit einer Tripanblaulösung vermischt und die gefärbte Zelllösung mit einer 20 µl Pipette in die Zählkammer des mit einem Deckglas bedeckten Hämatocytozometers gefüllt. Alle 4 Großquadrate sollten vollständig mit der Suspension bedeckt sein. Das Mikroskop wurde so eingestellt, dass die Einteilungslinien der Kammer sichtbar waren (Abb. 10).

Bei der Zellzahlbestimmung musste darauf geachtet werden, dass Zellen, die auf den Begrenzungslinien lagen, nicht doppelt gezählt wurden. Die Gesamtzahl der Tenozyten der 4 großen Quadrate, d.h. die gefärbten und ungefärbten Zellen, wurde erfasst, wobei nur die ungefärbten für die Zellzahlbestimmung herangezogen wurden. Der Prozentsatz der ungefärbten Zellen entsprach dem Anteil vitaler Zellen.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte anhand der Formel in Abbildung 11. Die Gesamtzellzahl wurde durch den Faktor 4 geteilt, um den Mittelwert pro Quadrat zu ermitteln. Der Verdünnungsfaktor errechnete sich durch das hinzugefügte Mediumvolumen (5, 10, 20 bzw. 50 ml) und den Faktor 2 aufgrund der 1:1 Verdünnung der Zellsuspension mit der

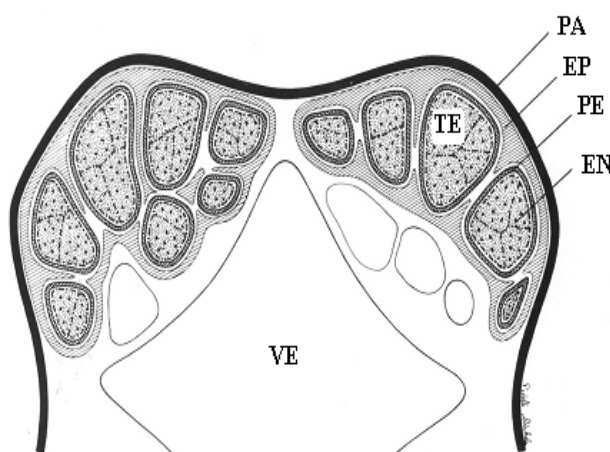
Trypanblaulösung.  $10^4$  war ein konstanter Faktor, der sich aus der Größe der Zellkammer ergab (Abb. 10).

$$\frac{\text{Ausgezählte Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4}{4} = \text{Gesamtzellzahl}$$

**Abb. 11.** Berechnungsformel zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Zelllösung. Siehe Erläuterungen im Text.

### 2.3.1.3. Einfrierung und Auftauung der Tenozyten

Vorerst nicht verwendete Tenozyten wurden mittels eines Gefriermediums, bestehend aus 70 % Medium, 20 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), eingefroren. Nach dem



**Abb. 12** Querschnitt der oberen 2 Quadranten durch einen Rattenschwanz mit den dazugehörigen Sehnggruppen. PA, Paratenon; EP, Epitenon; PE, Peritenon; EN, Endotenon; VE, Wirbelkörper; TE, Sehne. Schema übernommen aus Strocchi et al. 1985<sup>181</sup>.

Passagieren wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen für 5 Minuten mit 500 G zentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet im Anschluss mit dem rezent hergestellten Gefriermedium resuspendiert und in spezielle Gefrieröhrchen ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml) überführt. Die Lagerung erfolgte zuerst bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  und bei längerfristiger Aufbewahrung nach einigen Tagen dann im Stickstofftank bei ca.  $-200 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen in Gefrieröhrchen erfolgte zunächst kurz im Wasserbad bis zu dem Zeitpunkt, wo vom Eisblock nur noch eine dünne Eissäule übrig

war. Um einer Schädigung der eingefrorenen Tenozyten vorzubeugen, wurden sie in dem beschriebenen Zustand in ein 15 ml Röhrchen mit raumtemperiertem Medium überführt, das nachfolgend für 5 Minuten mit 500 G zentrifugiert wurde. Der DMSO-haltige Überstand wurde in einem weiteren Schritt abgesaugt und verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Nach erneuter Zellzahl und Vitalitätsbestimmung konnten die Tenozyten nun in mit Medium gefüllten Kulturflaschen kultiviert werden.

### 2.3.2. Präparation von Sehngewebe und Zellisolation

Die Resektion von Sehnenmaterial für die Isolation der Tenozyten erfolgte aus dem Schwanz von männlichen Tieren (Abb. 12), um später die männlichen Zellen in weibliche Tiere der gleichen Inzuchtlinie zu transplantieren. Das benutzte Instrumentarium sowie die Stoffabdeckungen wurden am Vortag unter Standardbedingungen (bei 134 °C und 2 Bar) sterilisiert.

Im Tierstall des Institut für Chirurgische Forschung wurde, sofort nach Euthanasie der Tiere in einer CO<sub>2</sub>-Box, der Schwanz der Ratte rasiert und mit Octenisept® desinfiziert. Auf einer sterilen Abdeckung wurde der Schwanz der Ratte mit einer chirurgischen Schere vom Körper abgetrennt und mithilfe einer Pinzette auf eine neue Abdeckung gelegt.

Das Schwanzfell wurde vorsichtig mit 2 länglichen, sich gegenüberliegenden Schnitten, vom Sehnen-Knochen-Gewebe abpräpariert. Die abgetrennten Proben wurden anschließend vom restlichen, lockeren Bindegewebe gesäubert und in 50 ml, mit Medium gefüllte Röhrchen gegeben, um die Zeit zur weiteren Verarbeitung in einer Sicherheitswerkbank zu überbrücken.

Die weitere Präparation der Proben erfolgte in der Sicherheitswerkbank in PBS-gefüllten Petrischalen, um sie vor Austrocknung zu bewahren. Von den Sehnen-Knochen-Präparaten wurden aus den Sehnensträngen einzelne Sehnenfaszikel und Kollagenfaserbündel vom



**Abb. 13** Präparierte Kollagenfaserbündel in einer PBS-gefüllten Petrischale. Die EZM und umliegende Strukturen wurden mithilfe eines Skalpells aufgebrochen, um der späteren Gewebeerddauung eine bessere Angriffsfläche zu bieten.

Knochen abpräpariert und in eine neue PBS-gefüllte Petrischale gegeben (Abb. 13). Mit der anatomischen Pinzette wurde dann jedes Kollagenfaszikel an einem Ende fixiert und mithilfe eines Skalpells zerfranst, um die EZM aufzubrechen.

Nach erfolgreicher Präparation wurden die Sehnenfaszikel zuerst mit steriler PBS-Lösung gespült, in kleine Stücke geschnitten und dann in einem 50 ml Röhrchen mit 5 ml steriler Kollagenase-I-Lösung (Kollagenase Typ I, 0,2 %; 1:1 mit Medium vermischt) verdaut.

Die Verdauung des Sehngewebes diente der Isolation von Tenozyten, die dadurch von der restlichen EZM herausgelöst wurden. Die Menge der Lösung war so

ausgewählt, dass die Präparate komplett von der Lösung umgeben und bedeckt waren. Die Proben wurden, entsprechend eines modifizierten Protokolls von Chen et al.<sup>13</sup>, für 12 Stunden mit leicht geöffnetem Röhrchendeckel bei Standardbedingungen in einem Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit war der Großteil des Sehngewebes aufgelöst und vermischte sich mit der Kollagenase-I-Lösung zu einer trüben, weißlichen Flüssigkeit. Mithilfe eines 70 µm porengroßen Zellsiebes (Nylon Cell Strainer) wurde die Mischlösung gefiltert und die Zellen von verdautem Kollagengewebe getrennt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Viabilität (ca. 90 %) und der Zellzahl; je nach Menge des gewonnenen Sehnenmaterials konnten pro Spendertier ca. 800.000 bis 1,5 Millionen Tenozyten isoliert werden. Diese Tenozyten wurden in Kulturflaschen mit einer Konzentration von 300.000 Zellen/Flasche überführt und bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Pro Passage mit 80 % Konfluenz konnten weitere 2 - 2,5 Millionen Zellen gewonnen werden. Desweiteren wurden im Verlauf der Kultivierung regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen zum Progress des Zellwachstums und Konfluenzgrades durchgeführt.

Nach der zweiten Passage und bei 80 % Konfluenz wurden erneut die Sehnenzellzahl bestimmt (s. 2.3.1.2. ) und die Zellen für die weitere Scaffoldbesiedelung bzw. Implantation (s. 2.3.3. ) genutzt.

### **2.3.3. Besiedelung der Scaffolds**

#### **2.3.3.1. Einleitung**

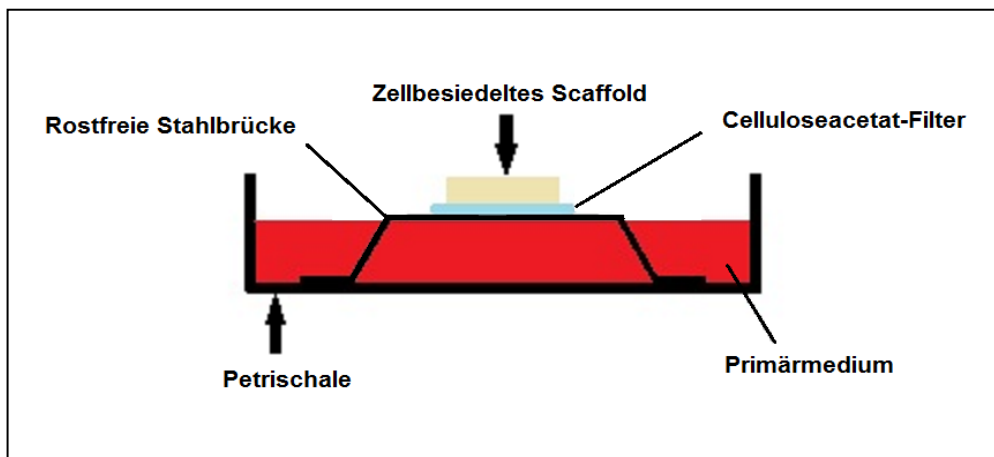
Der Bauplan für die Konstruktion zur Besiedelung der Scaffolds entstammte einem abgewandelten Protokoll von Shakibaei et al.<sup>182</sup>. Shakibaei etablierte eine Methode für die *in vitro* Kultivierung von Chondrozyten in einer 3D-high-density Kultur. Die eigens dafür entwickelte Konstruktion diente der optimalen Simulation eines Knorpelmilieus, in dem eine hohe Zelldichte *in vitro* generiert und die Ernährung der Zellen über Diffusion gewährleistet wurde.

Die Methode wurde ebenfalls erfolgreich für Tenozyten angewandt<sup>183 184</sup> und schien eine optimale Lösung zu sein, die Tenozyten in einer *in vitro* Kultivierung über mehrere Tage vor der Dedifferenzierung zu bewahren. Die 3D-high-density Kultur unterstützte somit die Differenzierung von Tenozyten und stabilisierte den Tenozyten-Phänotyp *in vitro* durch eine Annäherung an spezifische und mechanische Sehnenbedingungen *in vivo*.

In dieser Studie wurde die modifizierte Konstruktion dafür benutzt, die Scaffolds zu besiedeln, indem wir diese zusätzlich auf den Celluloseacetat-Filter platzierten (Abb. 14). Die Vorteile der milieugerechten Ernährung über Diffusion an einer Luft-Medium-Grenze ließen die Konstruktion für unsere Versuche als optimal erscheinen, da die Zellen nicht vom Medium weggeschwemmt werden konnten.

### 2.3.3.2. Aufbau der Brücken-Matrix-Konstruktion

Die Brücken-Matrix-Konstruktion diente der milieugerechten Ernährung der Tenozyten auf dem Scaffold. In der Sicherheitswerkbank wurde eine sterile, rostfreie und gelöcherte Stahlbrücke in der Mitte einer Petrischale platziert, die bis zur Höhe der Brücke mit Medium gefüllt war (Abb. 14).



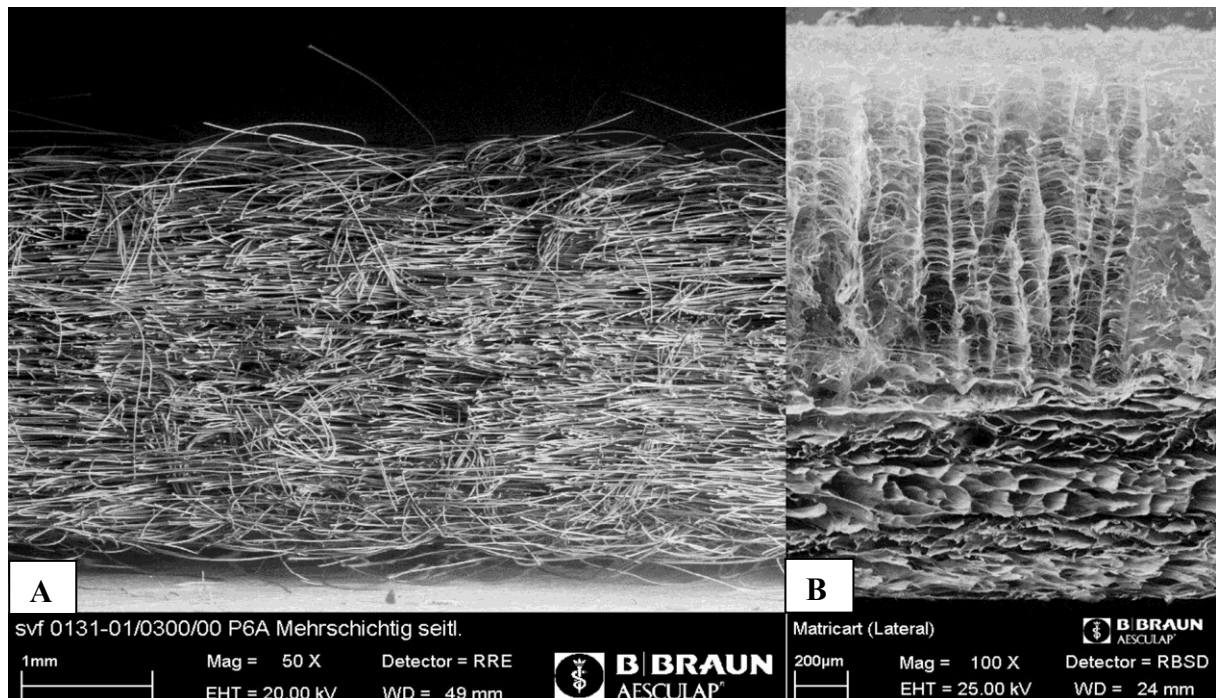
**Abb. 14** Schematische Darstellung der Brücken-Matrix-Konstruktion. Siehe Erläuterungen im Text.

Ein ebenfalls steriler Celluloseacetat Filter wurde auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten und mit der glatten Seite auf die gitterartige Stahlbrücke platziert. Die raue Seite diente der effektiven Absorption und Weiterleitung des Mediums per Kappilareffekt und der optimalen Adhäsion des Scaffolds auf dem Filter. Vor der Anwendung wurden die Scaffolds unter sterilen Bedingungen unter einem Abzug in 3 x 3 x 2 mm große Streifen geschnitten und dann vorsichtig mithilfe einer Pinzette auf den Filter gelegt<sup>1</sup>. Es wurde gewartet bis der Filter und das Scaffold über die Stahlbrücke mit Medium vollgesogen waren, um sie dann vor der Zellbesiedlung 30 Minuten lang im Brutschrank den Standard-Kultivierungsbedingungen anzupassen.

Um die Zellen auf die porenreiche Schwammseite zu pipettieren, musste bei den Kollagenscaffolds besonders darauf geachtet werden, dass die Lyoplantseite nach unten hin gelegt war.

### 2.3.3.3. Polyglykolsäure-Scaffold (PGA)

Das PGA-Material (s. Abb. 15. A) wurde nach dem Spinnfaservliesverfahren hergestellt und von der Firma ITV in Denkendorf bezogen. Dabei wurden ca. 20 – 100 µm kurze und ca. 14 µm dünne Fasern durch Zuschneiden, Waschung und zusätzlicher Schrumpfung zu einem homogenen Vlies verarbeitet. Die Fasern besaßen eine 48 – 56 % Kompressionsdichte und eine Druckverformung von 6 – 7 %. Mit Nachverfestigungsmethoden wie der Vernadelungstechnik wurde das Vlies insgesamt verdichtet und die druckelastischen Eigenschaften verbessert. Hierbei wurde das dreischichtige Vlies 4-fach vernadelt und anschließend mit der Di-Lour-Nadelmaschine behandelt wobei sich ein Teil der Fasern vertikal ausrichteten. Die Dicke der Scaffolds betrug laut Herstellerangaben ca. 1 mm und das Porenvolumen machte 95-98 % des Gesamtvolumens aus<sup>1</sup>. Die Resorptionszeit des Materials betrug insgesamt 3 Monate.



**Abb. 15** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Scaffolds im Querschnitt: **A.** PGA **B.** Kollagen I. Quelle: Firma Aesculap, Tuttlingen.



#### 2.3.3.4. Kollagen-Scaffold

Das Vlies setzte sich laut Herstellerangaben aus einer abdeckenden Membran (Fa. Jotec, Hechingen; Fa. Aesculap, Tuttlingen) und einem Schwamm (Fa. Jotec, Hechingen) zusammen (s. Abb. 15. B). Die säulenartig ausgerichteten, 90 – 130 µm großen Poren des 2 mm dicken Schwamms begünstigten die Verteilung und Adhäsion von Zellen *in vitro* und verbesserten dadurch die Heilungsbedingungen des Regenerats *in vivo*. Das Material der 0,4 mm dicken Membran, wie auch des Schwamms, bestand aus Kollagen Typ I und wurde aus bovinem Perikard gewonnen. Über einen Lyophilisationsprozess wurde die Membran stabil mit dem Schwamm verbunden und durch ein besonderes Aufbereitungsverfahren von nicht kollagenen Bestandteilen wie z.B. Enzymen, Fett und Proteinen gereinigt. Durch die hohe mechanische Stabilität des Schwamms wurden die darin enthaltenen Zellen vor Scherbeanspruchungen geschützt. Außerdem verhinderte die reißfeste Membran die ungezielte Verbreitung der Zellen über den Defekt hinaus und minimierte das Einwandern unspezifischer Bindegewebszellen in den Regeneratbereich.

#### 2.3.3.5. Aufbereitung der Tenozyten und Scaffoldbesiedelung

Die vorher isolierten Tenozyten wurden in der Zellkultur bis zur 2. Passage kultiviert und die Zellzahl der Tenozyten bestimmt; im Anschluss wurden die Tenozyten in Mediumgefüllte Röhrchen zu je  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Ansatz aliquotiert. Die Zelllösung wurde für 5 Minuten mit 500 G zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Röhrchen ein zweites Mal mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert. Das Absaugen des Überstandes erfolgte diesmal so, dass nur noch ein schmaler Flüssigkeitsspiegel übrig war.

Bei den Versuchsgruppen, in denen der Defekt mit einer zellbesiedelten Scaffoldüberbrückung durchgeführt wurde (Col I + TC, PGA + TC), wurde wie folgt vorgegangen (Tab. 5):

Die hochkonzentrierte Zellemulsion wurde mithilfe einer Pipette zu einer homogenen Lösung umgerührt und vorsichtig auf das vorbereitete Scaffold aufgetragen. Der komplette Ansatz ( $1 \cdot 10^6$  Tenozyten) wurde homogen auf dem Scaffold verteilt und es wurde berücksichtigt, dass alle Zellrückstände an den Wänden der Röhrchen und der Pipettenspitze verwendet wurden. Die Kultivierung der Scaffolds erfolgte anschließend für 48 h bei Standardbedingungen und täglichem Mediumwechsel im Brutschrank. Zusätzlich zu den zu implantierenden zellbesiedelten Scaffolds wurden nach dem gleichen Prinzip noch weitere



besiedelte PGA- und Kollagenscaffolds hergestellt, die nicht der Implantation, sondern nur zur Bewertung der Verteilung und Adhäsion der Tenozyten im Scaffold dienten.

Die aufbereiteten Tenozyten für die Gruppe Naht + TC wurden direkt in den Nahtüberbrückten Defekt implantiert. Alle restlichen Gruppen (Defekt- und Nativgruppe) erhielten keine Implantation von Tenozyten.

<b>Gruppen</b>	<b>Zeitpunkt der letzten bzw. 2. Passage</b>	<b>Defektüberbrückung</b>
Col I + TC	Kurz vor Scaffoldbesiedelung	Kollagen I – Scaffold <b>plus</b> Tenozyten
PGA + TC	Kurz vor Scaffoldbesiedelung	PGA – Scaffold <b>plus</b> Tenozyten
Defekt	Keine Manipulation mit Zellen oder Scaffold	Defekt ohne Scaffold <b>ohne</b> Tenozyten
Naht + TC	Kurz vor Implantation der Tenozyten in weibliche Tiere	Naht ohne Scaffold <b>plus</b> Tenozyten
Nativ	Keine Manipulation mit Zellen oder Scaffold	Nativsehne; kein Defekt

**Tab. 5** Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Anwendungen von Tenozyten. Nach der letzten bzw. 2. Passage wurden die Tenozyten aufbereitet und in den Gruppen Col I + TC und PGA + TC für die Scaffoldbesiedelung verwendet und anschließend nach 48 h in weibliche Lewis-Ratten implantiert. Die aufbereiteten Tenozyten für die Gruppe Naht + TC wurden direkt in den nahtüberbrückten Defekt implantiert. Alle restlichen Gruppen erhielten keine Implantation von Tenozyten. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

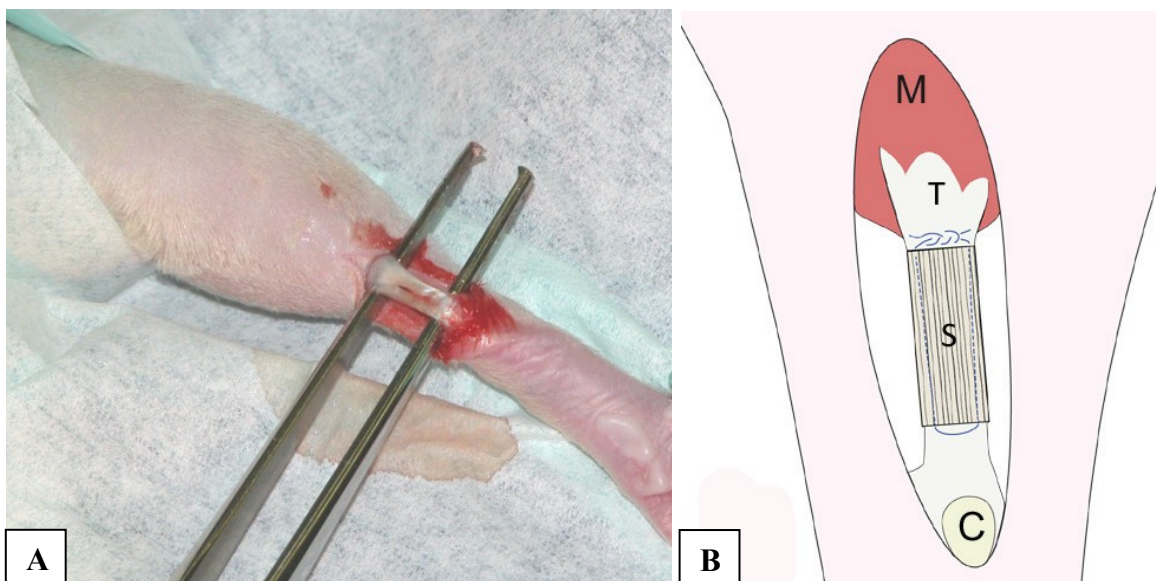
## 2.4. Hauptversuche

Die im OP des Tierstalls durchgeführten Operationen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Der Operateur trug einen sterilen Kittel, Handschuhe, einen Mundschutz sowie eine OP-Haube. Der OP-Tisch war steril abgedeckt und das ganze Instrumentarium sowie die Stoffabdeckungen wurden im Voraus unter standardisierten Bedingungen sterilisiert (bei 134 °C und 2 Bar). Die Verteilung der Tiere zu den unterschiedlichen Versuchsgruppen war randomisiert. Die besiedelten Kollagen- und PGA-Scaffolds wurden, in einer abschirmenden Styroporkiste, mitsamt der Aufhängekonstruktion in der mit Medium gefüllten Petrischale nach 48 h im Brutschrank zum Operationsort transportiert.

### 2.4.1. Operative Durchführung

Es erfolgte zuerst die Präparation des Gewebes und der Achillessehne, dann wurde der Totaldefekt gesetzt und je nach Gruppe (s. Tab. 5) eine Implantation vorgenommen.

Der ca. 2 cm lange Schnitt wurde parallel zur Achillessehne durchgeführt. Er begann distal am Ansatz der Sehne am Kalkaneus und endete proximal in der Hälfte des M. gastrocnemius. Die rasierte Haut mit dem darunterbefindlichen Bindegewebe wurde abpräpariert, bis die komplette Achillessehne sichtbar war (Abb. 16. A).



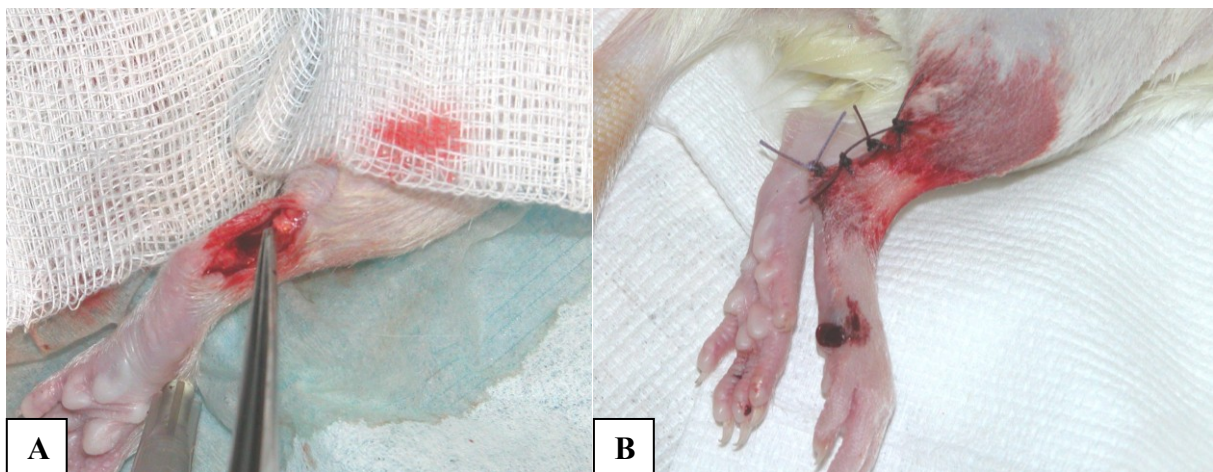
**Abb. 16** **A.** Fotografische Sicht auf die präparierte Achillessehne und Plantarissehne. Fixierung des rechten Hinterlaufes mit einer Kanüle und Abdeckung mithilfe eines sterilen Schlitztuches. **B.** Schema einer Sehne (T) mit Totaldefekt und implantiertem Scaffold (S). M = Muskel; C = Kalkaneus. Schema übernommen von Frankewydz<sup>1</sup> (Dissertation LMU 2013).

Der ebenfalls sichtbare M. plantaris wurde distal an seinem Ansatz am Kalkaneus und proximal reseziert, so weit er abpräpariert wurde. Vor der Durchführung des Totaldefektes wurde 1 mm distal des Sehnen-Muskel-Übergangs, eine Naht (4-0 Vicryl<sup>®</sup>-Faden) eingeführt. Der Totaldefekt wurde 1 mm distal von dieser Naht angesetzt; insgesamt wurden 3 mm reseziert.

Es wurde darauf geachtet, dass proximal des Sehnen-Knochen-Übergangs und distal des Sehnen-Muskel-Übergangs immer mindestens 1 mm der nativen Sehne vorhanden war, um eine adäquate Fadenverankerung zu gewährleisten.

Im Falle einer zellbesiedelten Scaffoldimplantation (s. Tab. 5) wurde das besiedelte Scaffold mit äußerster Vorsicht von der Brückenkonstruktion genommen und behutsam mithilfe einer anatomischen Pinzette in den Defekt gelegt. Das zellbesiedelte Scaffold wurde mit dem Faden

der vorher angelegten Naht verbunden und mit dem distalen Stumpf der Achillessehne vernäht. Das Scaffold füllte somit den vorher gesetzten Totaldefekt komplett aus (s. Abb. 16. B<sup>87</sup>). Die Naht des Scaffolds mit den Sehnenenden der Achillessehnen fungierte somit als eine Art Rahmennaht. Bei der Gruppe Naht + TC wurde eine Rahmennaht ohne Implantation eines Scaffolds durchgeführt und die Tenozyten wurden vorsichtig in den Defekt hineinpipettiert. Die Versuchsgruppe Defekt wurde keiner besiedelten Scaffold- bzw. Zellimplantation unterzogen; d.h. es fand keine Defektüberbrückung statt (Abb. 17 A.). Nach Abschluss der Implantationen wurde die Wunde jeweils mit einem Hautfaden (Vicryl<sup>®</sup>-4-0) verschlossen (Abb. 17 B.).



**Abb. 17 A.** In der Versuchsgruppe Defekt (ohne Scaffoldimplantat) wird der Defekt nicht überbrückt und der proximale und distale Sehnenstumpf werden so belassen. **B.** Versuchstier mit Wundnaht nach Operation.

#### 2.4.2. Anästhesie und perioperative Behandlung

Die Sedation der Tiere erfolgte in einem Äthertopf mit Diethylether. Anschließend wurden die Ratten sukzessiv mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Analgetikum) und 5 mg/kg KG Xylazin (Sedativum) intramuskulär (i.m.) in den Oberschenkel narkotisiert und anschließend gewogen<sup>1</sup>. Der Verlauf der Narkose wurde über die Flankenatmung und den sichtbaren Herzschlag überwacht. Nach Eintreten der Narkose wurde der rechte Hinterlauf komplett rasiert und mit Octenisept<sup>®</sup> desinfiziert. Danach erfolgte die Fixierung des Hinterlaufes mit einer dünnen Kanüle an einem Styroporbrett und die Abdeckung mithilfe eines sterilen Schlitztuches. Die Tiere wurden in Bauchlage gelagert und die Augen mit Augen- und Nasensalbe (Bepanthen<sup>®</sup>) vor eventuellen Fremdkontakten geschützt.

Die Tiere sollten sich postoperativ (p.op.) frei bewegen können; somit wurde auf eine Anlegung eines Gipses im Sinne einer langfristigen Immobilisation des operierten Beines verzichtet. Jedoch war eine kurzfristige Schonung in den ersten Tagen postoperativ

erwünscht; deshalb wurden den Tieren Stützverbände angelegt (1 cm breite und nicht dehnbare Leukoplast<sup>®</sup>-Streifen), um eine spannungsfreie Position der Achillessehne zu sichern<sup>1 185 186</sup>. Ein großer Streifen bedeckte dabei den kompletten Wundbereich am Bein, zwei weitere kleine Streifen wurden jeweils proximal und distal der Narbe in Querrichtung angebracht. Zum Schutz vor Auskühlung wurden die Ratten p.op. mit einer UV-Lampe bestrahlt (4 Tiere pro Käfig). Zur Vorbeugung von postoperativen Schmerzen und Entzündungen wurden jeweils 1,25 ml Metamizol 10 % subkutan und 50 mg Enrofloxacin pro Liter Trinkwasser zur Antibiose für fünf Tage gegeben.

Ab dem ersten Tag p.op. wurden die Tiere bezüglich ihres sozialen Verhaltens und ihrer Beinbeweglichkeit mithilfe von Videoaufnahmen überwacht.

### **2.4.3. Explantation der Sehnen**

Nach einer 16 Wochen langen Regenerationszeit wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und die operierten Achillessehnen unmittelbar danach aus den weiblichen Lewis-Ratten explantiert. Der operierte Hinterlauf wurde in einem ersten Schritt komplett rasiert und mit Octenisept<sup>®</sup> desinfiziert. Der Eröffnungsschnitt am rechten Hinterlauf orientierte sich am Implantationsschnitt; in einem weiteren Schritt wurde die Achillessehne, wie unter 2.4.1. beschrieben, zuerst vom lockeren Bindegewebe freipräpariert und zusammen mit einem Teil des Kalkaneus und dem distalen Teil des M. gastrocnemius mithilfe einer chirurgischen Zange in einem Stück reseziert.

Bei den Sehnenproben für die Transmissionselektronenmikroskopie wurde auf die Resektion von Knochen und Muskel verzichtet und die Sehne wurde jeweils am Sehnen-Muskel- bzw. Sehnen-Knochen-Übergang abgetrennt.

Die Zuordnung der Versuchstiere zu den verschiedenen Auswertungsmethoden innerhalb einer Gruppe erfolgte randomisiert.

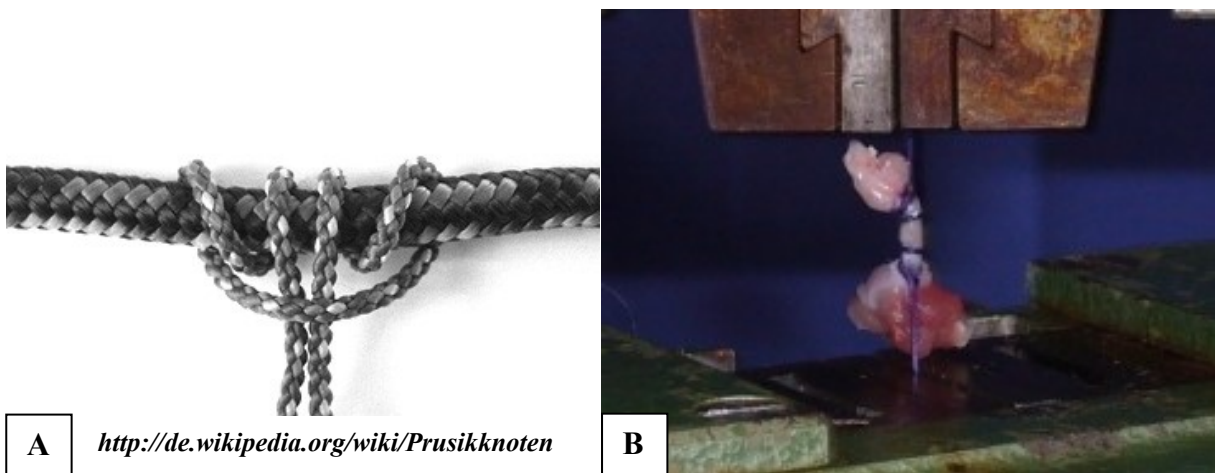
Gleich nach Explantation wurden die einzelnen Sehnenpräparate gewogen und vermessen (Höhe, Dicke und Querschnittfläche) und das äußere Erscheinungsbild, die Farbe und die Konsistenz der Sehnenproben beurteilt.

## **2.5. Biomechanik**

Die Sehnenpräparate für die Biomechanik wurden nach der Explantation in mit PBS befeuchtete und beschriftete Kompressen eingewickelt und innerhalb von 2 Stunden getestet.

Die Durchführung der biomechanischen Ausreißversuche erfolgte mithilfe eines Längenänderungsaufnehmers (Modell Z010/TN2A, Fa. Zwick, Ulm; Tab. 6).

Es war nicht möglich, die Widerstandsfähigkeit der Proben mit den herkömmlichen Probenhaltern zu testen, da diese zu groß waren und die Muskel- bzw. Knochenenden in Vorversuchen zerdrückten oder zerrissen. Die Proben wurden nach einem modifizierten Protokoll der Forschungsgruppe Krappinger et al.<sup>187</sup> mithilfe eines 0-Vicryl®-Faden jeweils am Muskel- und Knochen-Sehnen-Übergang anhand eines Prusikknotens (Abb. 18. A) befestigt. Der Prusikknoten ist ein Klemmknoten und zeichnete sich durch die Fähigkeit aus, sich bei Belastung zuzuziehen und bei Entlastung wieder zu lockern. Die Fäden wurden unter Zugspannung an beiden Enden in dem Längenänderungsaufnehmer eingeklemmt (Abb. 18.B).



**Abb. 18** A. Aufnahme eines Prusikknotens zur Fixierung der explantierten Sehnen an beiden Enden im Längenänderungsaufnehmer; Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Prusikknoten>. B. Explantierte Sehnen über Fäden an den Muskel- und Knochen-Sehnen-Übergängen im Längenänderungsaufnehmer fixiert.

Um eine Standardisierung in Bezug auf den Einfluss der Fadendehnung zu erhalten, wurden die Fäden jeweils 1 cm von der Fixierung entfernt, eingeklemmt.

Die verwendeten Sehnen wurden mit einer Vorlast (20 N) und einer linearen Zuggeschwindigkeit von 20 mm/min gedehnt, bis es zu deren kompletten Zerreiung oder einer Teilzerreiung kam und die bis dahin angewandte Zugkraft wieder zu sinken begann<sup>1</sup>. Das Zugkraftmaximum wurde mit einer Software (testXpert V5.0) aufgezeichnet und mit der GraphPad Prism Software ausgewertet.

Nach den biomechanischen Ausreißversuchen wurden die getesteten Sehnen mithilfe einer chirurgischen Zange von den Muskel- und Knochenenden abgetrennt und in 2 ml Reagenzgefäen bei -20 °C gelagert.

<b>Längenänderungsaufnehmer (Modell Z010/TN2A)</b>	<b>Herstellerdaten</b>
Messbereich	20 N – 10 kN
Traversengeschwindigkeit	0,001 – 1800 mm/min
Messgenauigkeit	0,21 %

**Tab. 6** Tabellenübersicht der laut Hersteller angegebenen Daten des verwendeten Längenänderungsaufnehmers (Modell Z010/TN2A).

## 2.6. Molekularbiologie

### 2.6.1. Isolation und Messung der genomischen DNA

Die Isolation der genomischen DNA aus explantierten Sehnen fand unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank statt. Der Lysis-Puffer zum Aufbrechen der EZM und Auflösung der Zellstruktur entstammte einem modifizierten Protokoll aus der Forschungsgruppe Topic et al.<sup>188</sup> (siehe Protokoll 4 für die genaue Zusammensetzung des Puffers).

Die bei -20 °C gelagerten Sehnenproben wurden unverzüglich mithilfe eines Skalpell in kleine Teile geschnitten und in 2 ml Röhrchen für den Prozess der DNA-Isolation überführt.

Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

- Die Sehnenstücke wurden komplett mit dem Lysis-Puffer bedeckt.
- Danach für 12 h bei 55 °C auf einem Shaker bei 1100 rpm gelagert.
- Nach kompletter Gewebelyse wurde 1 ml der Suspension mit der gleichen Menge an Phenol-Chloroform-Lösung (1:1) vermischt und umgerührt.
- Sofort im Anschluss wurde die Mischlösung für 5 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert.
- Absaugung des Überstandes und Hinzugabe von Isopropanol (1:1 mit der Überstandslösung).
- 5 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugieren.
- Die Pellets wurden dann mit 70 % Ethanol gewaschen.
- DNA-Proben wurden trocken gelassen und in 100 µl destilliertem Wasser resuspendiert.

Nach der erfolgreichen Isolation, wurde die genaue Konzentration jeder DNA-Probe mit einem Spektrophotometer ermittelt. Hierzu war es notwendig, eine Verdünnung von 1:50 der

Probe in einer Messküvette zu erstellen. Im Spektrophotometer wurde die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Probe danach verworfen.

### 2.6.2. Nachweis des SRY-Gens

PCR 10 x Puffer	2 $\mu$ l
Mg <sub>2</sub> Cl	0,6 $\mu$ l
dNTP's	0,4 $\mu$ l
Primer forward	0,5 $\mu$ l
Primer reward	0,5 $\mu$ l
Q-Solution	4 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1,8 $\mu$ l
gesamt	10 $\mu$ l

**Tab. 7** Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes, der mit 250 ng DNA-Probe pro Ansatz vermischt wurde. 10  $\mu$ l PCR-Mix wurden mit unterschiedlich errechneten Volumina der DNA-Probe vermischt. Um das Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l zu erreichen wurde das fehlende Volumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Anhand der photometrischen Messungen konnten die einzusetzenden Volumina der DNA-Probe (250 ng) exakt errechnet werden. Das Volumen des PCR-Reaktionmixes betrug pro Ansatz 10  $\mu$ l, um den unterschiedlichen Volumina der DNA-Proben Rechnung zu tragen (Tab. 7). Das Volumen, das noch fehlte um das Gesamtvolumen zu erreichen, wurde mit destilliertem Wasser ergänzt. Es musste darauf geachtet werden, dass die Taq-Polymerase erst zuletzt dem Reaktionsansatz hinzugefügt wurde, um einen frühzeitigen Reaktionsanfang zu verhindern.

Die von Kuddus et al. dargelegten Sequenzen für das SRY-Gen (392 Basenpaare) auf dem Y-Chromosom der Ratte wurden als Primer verwendet (Tab. 8)<sup>190</sup>.

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode, die dazu dient spezifische DNA-Abschnitte wie z.B. das SRY-Gen auf dem Y-Chromosom mittels DNA-Polymerase selektiv zu amplifizieren, um sie dann in einem weiteren Schritt in der Gelelektrophorese nachweisen zu können. Nakamura konnte das SRY-Gen vom Y-Chromosom bereits erfolgreich in einem solchen heterosexuellen Transplantationsmodell an der Lewis-Ratte testen<sup>189</sup>.

Für die Amplifizierung des SRY-Gens im PCR-Cycler wurden pro Probe 250 ng genomische DNA und ein PCR-Reaktionsansatz (Tab. 7) zusammen mit destilliertem Wasser auf ein maximales Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l vermischt.

Primer	Nukleinsequenzen
Primer forward	5'GGCTTCAAAGTAGATTAGTTGGG3'
Primer reward	5'ATGCATTCATGGGGCGCTTGAC3'

**Tab. 8** Übersicht der verwendeten Primer für die Amplifizierung des SRY-Gen auf dem Y-Chromosom<sup>1</sup>.

Die Proben wurden behutsam in den vorgewärmten PCR-Cycler platziert und mit 35 Zyklen amplifiziert (Tab. 9). Nach Beendigung des Programms wurde darauf geachtet, dass die Proben bis zur weiteren Verarbeitung immer kühl lagerten (ca. 4 °C).

Denaturierung	95 °C	5 Min.	
Amplifikation	95 °C	30 Sek.	<b>35x Zyklen</b>
	52 °C	30 Sek.	
	72 °C	1 Min.	
Endpolymerisation	72 °C	10 Min.	
Ende	4 °C	forever	

**Tab. 9** Verwendetes Cycler Programm zur Amplifikation der selektiven DNA-Sequenz.

### 2.6.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, in dem das Agarose-Gel als Trägermaterial dient und die Trennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe visualisiert wird.

Für das ca. 400 Basenpaar große SRY-Gen wurde ein 1,8 % Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurden 1,8 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer (für genaue Zusammensetzung siehe Protokoll 5) vermischt und 3 Minuten lang bei 600 W in der Mikrowelle aufgekocht. Nach vorsichtigem Vermischen und Abkühlung auf ca. 50 °C wurden 3 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und mit dem Gel vermischt. Das flüssige Gel wurde nun in einen dafür vorgesehenen Gelträger mit Taschenkamm gegossen und nach Aushärtung komplett mit TAE-Puffer bedeckt.

Die amplifizierten und gefärbten DNA-Proben (20 µl) konnten in einem ersten Schritt mit jeweils 3 µl eines Ladepuffers (6 x Blue Loading Dye) versetzt werden, der dazu diente, die spezifischen DNA-Abschnitte zu beschweren, sodass sie in der puffergefüllten Gelkammer absanken. Die in die Kammern pipettierten DNA-Proben wurden in einem weiteren Schritt einem Spannungsfeld (100 V/cm) für ungefähr 2 Stunden ausgesetzt. Die negativ geladenen DNA-Proben wanderten in Richtung Anode, bis sie sich auf einer bestimmten Höhe zu einer



Bande akkumulierten. Als Referenz diente ein 100 Basenpaar großer Ladder (= Marker aus DNA-Molekülen, deren Länge bekannt ist).

Nach Beendigung des Spannungsfeldes wurden die Banden auf dem Gel unter UV-Licht photographisch festgehalten; die Banden waren aufgrund der Fluoreszenz des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar.

## 2.7. Histologie und Immunhistochemie

### 2.7.1. Anfertigung der Kryoschnitte

Die explantierten Sehnenproben für die Histologie und die Immunhistochemie wurden zuerst in 15 ml Röhrchen mit einer Lösung aus 95 % purem Ethanol und 5 % Hydroxyessigsäure komplett bedeckt und für 24 Stunden bei + 4 °C gelagert.

Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Sehnenproben gründlich mit einer PBS-Lösung 10 Minuten lang gespült. Im Anschluss erfolgte eine Entkalkung (Medium: EDTA und NaOH, pH8 im Verhältnis 1:10) während 4 Wochen bei Raumtemperatur (RT) auf einem niedrig eingestellten Shaker; das Medium wurde alle 3 Tage erneuert.

Nach erfolgreicher Entkalkung wurden die Sehnenproben 3 x 5 Minuten lang mit PBS gespült und dann einer Sucrose-Spülung unterzogen (s. Tab. 10).

Im Anschluss wurden die Sehnenproben mithilfe von Tissue-Tek-Medium blasenfrei in Plastikformen eingebettet und kurzfristig bei -20 °C Grad gelagert. Nachfolgend wurden die Proben am bereits gekühlten Kryotom eingespannt und es wurden 12 µm dicke Längsschnitte manuell angefertigt. Im Inneren der gekühlten Schneidekammer konnten die Schnitte auf mit Silane bedeckte und beschriftete Objektträger platziert werden. Nach kompletter Trocknung der Schnitte wurden sie anschließend während 10 Minuten in Aceton fixiert und über Nacht erneut getrocknet.

Lösung	Dauer der Spülung
PBS + 5 % Succrose	2 h
PBS + 10 % Succrose	24 h
PBS + 20 % Succrose	24 h

**Tab. 10** Protokollübersicht der verschiedenen Succrosespülungen der vorher entkalkten Sehnenproben.

### 2.7.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E)

Die H/E-Färbung ist eine sehr verbreitete Färbung in der Histologie. Die Durchführung der Färbung erfolgte anhand eines Standardprotokolls (s. Tab. 11). Die Kryoschnitte wurden hierzu, je nach Dauer, mit dem kompletten Objektglas in die verschiedenen Lösungen getaucht.

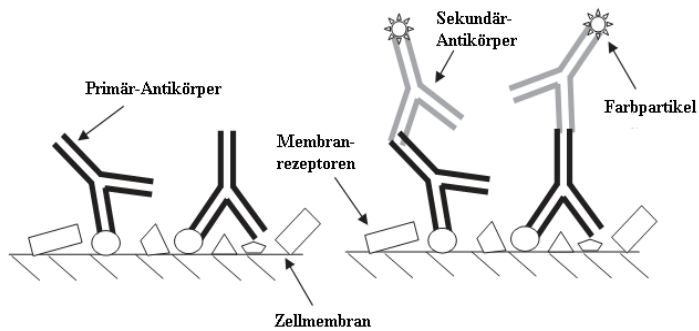
Eintauchmedium	Dauer	Erläuterung
Destilliertes Wasser	Kurz auswaschen	
Hämalaun nach Meyer's	5 Minuten	Blaufärbung der DNA und Zellkerne
Leitungswasser	kurz wässern bis das Wasser klar ist	
Eosin	1 - 2 Minuten	Rotfärbung vor allem der Zellplasmaproteine
70 % Alkohol	kurz differenzieren	Dehydrierung
80 % Alkohol	2 Minuten	Dehydrierung
100 % Alkohol	2 Minuten	Dehydrierung
100 % Alkohol	2 Minuten	Dehydrierung
Xylol	5 Minuten	Klärung
Xylol	5 Minuten	Klärung

**Tab. 11** Die Färbung der Kryoschnitte mit Hämatoxylin-Eosin erfolgte nach einem Standardfärbeprotokoll.

Die gefärbten Schnitten wurden anschließend mit Eindeckmittel (Eukitt®) eingebettet und mit einem adäquaten Deckglas gedeckelt.

### 2.7.3. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei dem Proteine mithilfe von Antikörpern in bestimmten Geweben sichtbar gemacht werden. Das Ziel der immunhistochemischen Färbung hier ist der Nachweis des Proteins Osteopontin, das bei allen höheren Säugetieren in der Matrix von Knochen vorhanden ist. Somit wird mit der Markierung (Färbung) von Osteopontin-Proteinen mit spezifischen Antikörpern (AK) eine genaue Differenzierung zwischen Knochengewebe und Sehngewebe möglich.



**Abb. 19** Prinzip der indirekten Methode der immunhistochemischen Färbung. Modifiziertes Schema nach Doroski et al. 2006<sup>191</sup>.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht auf der Bildung von sogenannten Antigen-Antikörper-Reaktionen, wobei das Antigen in diesem Fall das Osteopontin-Protein darstellt. Der spezifische Osteopontin-Antikörper (Primär-Antikörper) sollte nur eine starke Bindung mit dem Antigen (Epitop) eingehen. Mithilfe bestimmter

Detektionssysteme können Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar gemacht und gleichzeitig verstärkt werden (Abb. 19).

Vor dem Auftragen des Primär-Antikörpers wurden die Schnitte mit PBS rehydriert und mittels Wasserstoffperoxid die Aktivität endogener Peroxidasen verhindert (Tab. 12). Nach mehrmaligem Waschen wurde die EZM mittels Chondroitinase verdaut, um die Antigene optimal freizulegen und sie für die AK erreichbar zu machen. In der Folge wurden die unspezifischen Rezeptoren mit Ziegen-Serum blockiert, um eine spätere Färbung unspezifischer Gewebeareale zu verhindern; anschließend konnten die Primär-AK aufgetragen werden.

Nach erneutem Waschen der Schnitte wurde zur Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion ein biotinylierter Antikörper von der Maus (Sekundär-Antikörper) eingesetzt, der spezifisch an den Primär-Antikörper band. Nach definierter Einwirkung wurde der Sekundär-AK abgewaschen und ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex auf die Schnitte (ABC Elite Kit, VECTOR Laboratories Inc.) hinzugegeben. Um die Reaktionsfähigkeit des Avidin-Biotin-Enzymkomplexes zu garantieren, wurde dieser bereits 30 Minuten vor Anwendung hergestellt. Über das Protein Avidin, das eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, wurde über spezifische Rezeptoren eine Bindung an den Sekundär-AK hergestellt. Nach wiederholtem Waschen wurde zuletzt 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat-Chromogen-Lösung hinzugefügt. Das farblose Chromogen wurde dabei zu seinem farbigen Endprodukt (braunes Präzipitat) unter Bildung von Wasser oxidiert und als Farbreaktion sichtbar. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von DAB wurde die DAB-Wirklösung erst kurz vor Anwendung gemischt und beim Einwirken auf das Gewebe vor Licht geschützt. Nachfolgend wurde die Färbung mittels Leitungswasser gestoppt und die Schnitte für 1 Minute mit Hämalaun nach

Meyer's gegengefärbt. Nach erneutem Stoppen der Färbung in Leitungswasser erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Aquatex® und die Deckelung mittels Deckglas.

Arbeitsschritte	Dauer
Schnitte in PBS + 0,1 % Tween 20 rehydrieren	15 Minuten
Blockierung der endogenen Peroxidase: 22 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % pro Küvette	ab sprudeln 30 Minuten
Waschen in PBS + 0,1 % Tween 20	5 Minuten
Verdau der EZM mit Chondroitinase (Endkonzentration 0,25 U/ml): Enzym mit 0,1 M Tris-Puffer, pH7 vermischen (1:8)	30 Min. bei 37 °C im Trocken-schrank lagern
Blockierung der unspezifischen Rezeptoren mit Ziegen-Serum: Serum mit PBS/3 % BSA verdünnen (1:20)	60 Min. bei RT in feuchter Kammer
Osteopontin-AK mit PBS/3 % BSA verdünnen (1:10)	bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank in feuchter Kammer
Waschen in PBS + 0,1 % Tween 20	3x5 Minuten
Anti-Maus-Biotin-Ak mit PBS + 0,1 % Tween 20 verdünnen (1:200)	60 Min. bei RT in feuchter Kammer
Waschen in PBS + 0,1 % Tween 20	3 x 5 Minuten
ABC-Komplex 30 Min. vorm Auftragen mischen: 1 ml PBS + Tween 20 + 20 µl ABC-A + 20 µl ABC-B	30 Min. bei RT in feuchter Kammer
Waschen in PBS + 0,1 % Tween 20	3 x 5 Minuten
DAB auftragen: 2,5 ml dest. Wasser + 2 Tropfen Puffer + 2 Tropfen DAB + 1 Tropfen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 1 Tropfen Nickel	4 - 8 Min. bei RT in feuchter Kammer; Lichtschutz!!

**Tab. 12** Tabellarische Übersicht des Färbeprotokolls von Kryoschnitten mit Osteopontin-AK. Nach jedem Arbeitsschritt wurde die vorhandene Lösung auf den Schnitten auf Papier abgeklopft. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte immer mit ausreichender Flüssigkeit bedeckt waren, um eine Austrocknung zu vermeiden. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

#### **2.7.4. Digitale Aufnahme und qualitative Beurteilung der Kryoschnitte**

Mithilfe eines Carl-Zeiss-Mikroskops und der dazugehörigen Software (AxioVision) wurden in verschiedenen Vergrößerungen digitale Bildaufnahmen der getrockneten H/E- und Osteopontin-gefärbten Schnitte angefertigt. Die Zusammensetzung und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit Photoshop 6.0 von Adobe.

Die Schnitte wurden von einem unabhängigen Anatom und zwei wissenschaftlichen Mitarbeitern hinsichtlich der Struktur des neugebildeten Gewebes beurteilt. Es wurden die Merkmale des Aufbaus und Morphologie der extrazellulären Matrix und Zellen festgehalten.

### **2.8. Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Fixierung der explantierten Sehnenproben erfolgte in Röhrchen, gefüllt mit Karnowsky-Lösung (für genaue Zusammensetzung der Lösung siehe Protokoll 3). Nachfolgend wurden die Präparate, die schon frei von Muskel- und Knochengewebe waren, in ca. 2 mm große Teile geschnitten. Nach der Vorkontrastierung mit Osmiumtetroxid und der Entwässerung in unvergälltem Ethanol sind die Sehnenproben in Epon Harz eingebettet worden (s. Tab. 13 + 14).

Mithilfe eines Mikrotom (Ultracut OM U3; Fa. Reichert, Wien) konnten aus den Eponblöcken 0,5 - 1 µm Semidünnschnitte und 70 nm Ultradünnschnitte in sagittaler und axialer Ebene hergestellt werden<sup>1</sup>. Es wurden Schnitte aus oberflächlichen (superfizialen) und tiefen (profunden) Arealen der Sehnenproben erstellt.

Die Semidünnschnitte wurden für die spätere Auswertung mit Toluidinblau-O gefärbt (1 Minute bei 60 °C in Toluidinblau; danach kurz in destilliertem Wasser gespült)<sup>1</sup>. Die Ultradünnschnitte trockneten zwei Tage bei Raumtemperatur und die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit gesättigter Uranylacetatlösung (70 % Methanol) für ca. 40 Minuten und mit anschließender Bleilösung nach Reynolds für ca. 3 Minuten.

Arbeitsschritte	Dauer
<b>Vorkontrastierung</b>	
Spülen der Sehnenproben in 0,1 Mol Phosphatpuffer	15 Minuten
0,2 Mol Phosphatpuffer + 2 % Osmiumtetroxid 1:1	2 Stunden
Spülen der Sehnenproben in 0,1 Mol Phosphatpuffer	2 x 5 Minuten
Entwässerung in 30 % Ethanol	10 Minuten
Entwässerung in 50 % Ethanol	10 Stunden
Lagerung der Proben in 70 % Ethanol	bis zur Einbettung

**Tab. 13** Tabellarische Übersicht des Protokolls für die Vorkontrastierung von Sehnenewebe mittels Osmiumtetroxids<sup>1</sup>.

<b>Einbettung in Epon Harz</b>	
Spülen der Sehnenproben in 70 % Ethanol	10 Minuten
Entwässerung in Ethanol 100 %	3 x 20 Minuten
Styrol	15 Minuten
Epon + Styrol (1:1)	24 Stunden
Epon	24 Stunden
In Einbettform bringen	1 Stunde
Aushärten bei 60 °C	2 – 3 Tage

**Tab. 14** Tabellarische Übersicht des Protokolls für die Einbettung der Sehnenproben in Epon Harz und die weitere Anfertigung von Ultradünnschnitten in der Transmissionselektronenmikroskopie<sup>1</sup>.

## 2.9. Quantifizierung der Verknöcherungsfläche

Die Quantifizierung der Verknöcherungsfläche wurde mithilfe der Osteopontin- und HE-gefärbten Schnitte (Übersichtsaufnahmen) erstellt; aus jeder Gruppe wurden pro Tier 2 Schnitte ausgewählt<sup>1</sup>.

Mithilfe der Adobe Photoshop Software wurde in einem ersten Schritt die Gesamtsehnenfläche definiert; d.h. die komplette Fläche zwischen dem Kalkaneus und dem M. gastrocnemius mit jeweils 100 µm Sicherheitsabstand an jedem Ende. Als zweiter Schritt wurden die anhand der Osteopontin-gefärbten Kryoschnitte sichtbaren Verknöcherungsflächen im Sehnenewebe festgelegt<sup>1</sup>.

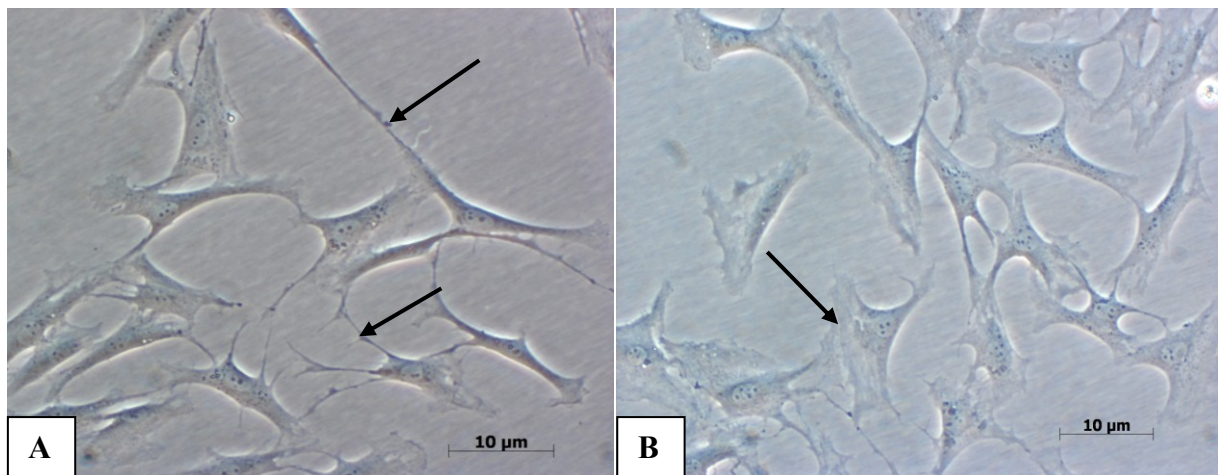
Der Verknöcherungsanteil errechnete sich durch Subtraktion der Verknöcherungsfläche von der Gesamtsehnenfläche; pro Gruppe wurden die Durchschnittswerte ermittelt und anschließend in Prozentwerte umgewandelt<sup>1</sup>.

Um eventuell unterschiedlich starke Farbwerte der verschiedenen Kryoschnitte auszugleichen, wurden die Farbwerte homogenisiert, in dem die Aufnahmen auf 8 Bit Formatgröße reduziert und anschließend skaliert wurden<sup>1</sup>.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Zellkultur der isolierten Tenozyten

Die isolierten Tenozyten aus Sehngewebe von männlichen Lewis-Ratten zeigten in der *in vitro* Zellkultur das typische äußere Erscheinungsbild von Tenozyten-ähnlichen Zellen (Abb. 20. A).



**Abb. 20** **A.** Lichtmikroskopische Aufnahme von Tenozyten-ähnlichen Zellen in der Monolayerkultur *in vitro*. Die vergrößerte Aufnahme zeigte die Zellkultur mit einem Konfluenzgrad von ca 60 %. Die Zellen bildeten mit langen, schmalen Ausläufern untereinander Zellverbindungen aus (Pfeile). **B.** Nach längerer Kultivierungszeit zeigten einige Zellen eine etwas abgeflachte Zellform im Vergleich zu den Tenozyten-ähnlichen Zellen (Pfeil).

Der Zellkörper war spindelförmig und gestreckt; das Zytoplasma war reich an Organellen und bildete viele, lange und schmale Ausläufer aus. In den ovalen Zellkernen waren die Nucleoli sichtbar. Die Tenozyten-ähnlichen Zellen bildeten, gleichzeitig mit mehreren Nachbarzellen, Zellverbindungen untereinander aus.

Nach höherer Passage und längerer Zeit in der *in vitro* Kultur zeigten einige Zellen eine leicht abgewandelte Zellmorphologie. Diese Zellen hatten einen flacheren Körper, ein breites bis rundliches Zellplasma und eine pflasterähnliche Zellform. Sie bildeten weniger typische, lange Zellausläufer aus und adhärten öfters flach am Kulturflaschenboden (Abb. 20. B).

Die Zellen gruppierten sich anfangs in kleinen Kolonien, die stetig an Größe zunahmten. Die Kolonien setzten sich aus Tenozyten-ähnlichen Zellen und leicht modifizierten Zellen zusammen. Bei den Zellzählungen konnte der vitale Anschein der Zellen bestätigt werden.



### **3.2. Postoperatives Laufverhalten der Ratten**

Am 1. postoperativen Tag, konnte bei den operierten Tieren (Gruppen 2 – 5), mithilfe von Videoaufnahmen, eine gewisse Einschränkung des Laufmusters erkannt werden. Die Bewegungsdynamik der Tiere war gestört; der operierte Hinterlauf nahm nicht am normalen Bewegungsablauf teil, sondern wurde nach kurzem Absetzen reflexartig zurückgezogen, was mit einer verstärkten und verlängerten Aufsetzzeit des nicht operierten, gesunden Hinterlaufs kompensiert wurde. Durch die Anwendung des Stützverbandes konnte eine Hyperdorsalflexion des Fußes sichtbar vermieden werden und die operierte Achillessehne in den ersten Tagen p.op. geschont werden. Der Wundverband wurde bis zum 5. Tag p.op. komplett abgenagt und die Wunde verheilte komplikationslos.

Am 10. Tag p.op. war bei den operierten Tieren immer noch ein deutliches Hinken sichtbar, das sich aber im Vergleich zum 1. Tag p.op. deutlich verringerte; teilweise konnte bereits ein völlig normales Laufmuster erkannt werden.

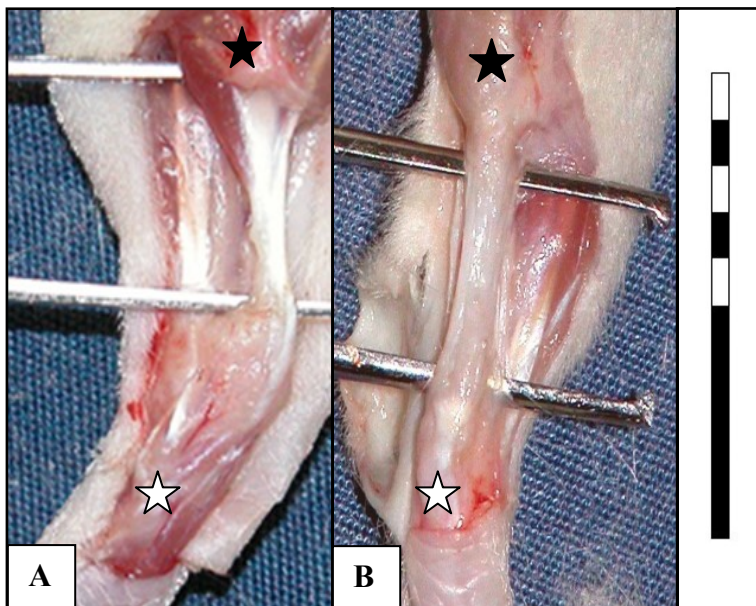
Nachfolgend verbesserte sich das Laufverhalten zunehmend und auch die Laufstrecken verlängerten sich. Ab der 4. Woche p.op. normalisierte sich das Laufverhalten komplett bei allen operierten Tieren und es konnte kein Unterschied mehr zu gesunden, nicht operierten Tieren festgestellt werden.

### **3.1. Makroskopische Beurteilung und Vermessung der explantierten Sehnen**

Die Lücke des Totaldefektes war in allen explantierten Sehnenproben der operierten Versuchsgruppen (2 - 9) komplett mithilfe von neugebildetem Bindegewebe überbrückt.

Die explantierten Sehnenproben hatten, im Vergleich zu den nativen, nicht manipulierten Sehnenproben (Nativgruppe, Gruppe 1), ein insgesamt gräuliches, mattes Aussehen und wiesen in ihrer Beschaffenheit, von der normalen glatten Oberflächenstruktur abweichend, lokale Unebenheiten auf (Abb. 21. A + B). Zusätzlich waren vermehrt kleine, oberflächliche Blutgefäße in den Sehnenregeneraten zu erkennen, die von peripher in den zentralen Teil der Sehnenproben reinwuchsen.

Die Konsistenz der explantierten Sehnenproben war überwiegend weich und elastisch, doch konnten bei der manuellen Palpation in allen Gruppen auch vereinzelt Gewebeverhärtungen getastet werden, die nicht nur auf Höhe der Defektlücke zu finden waren, sondern die

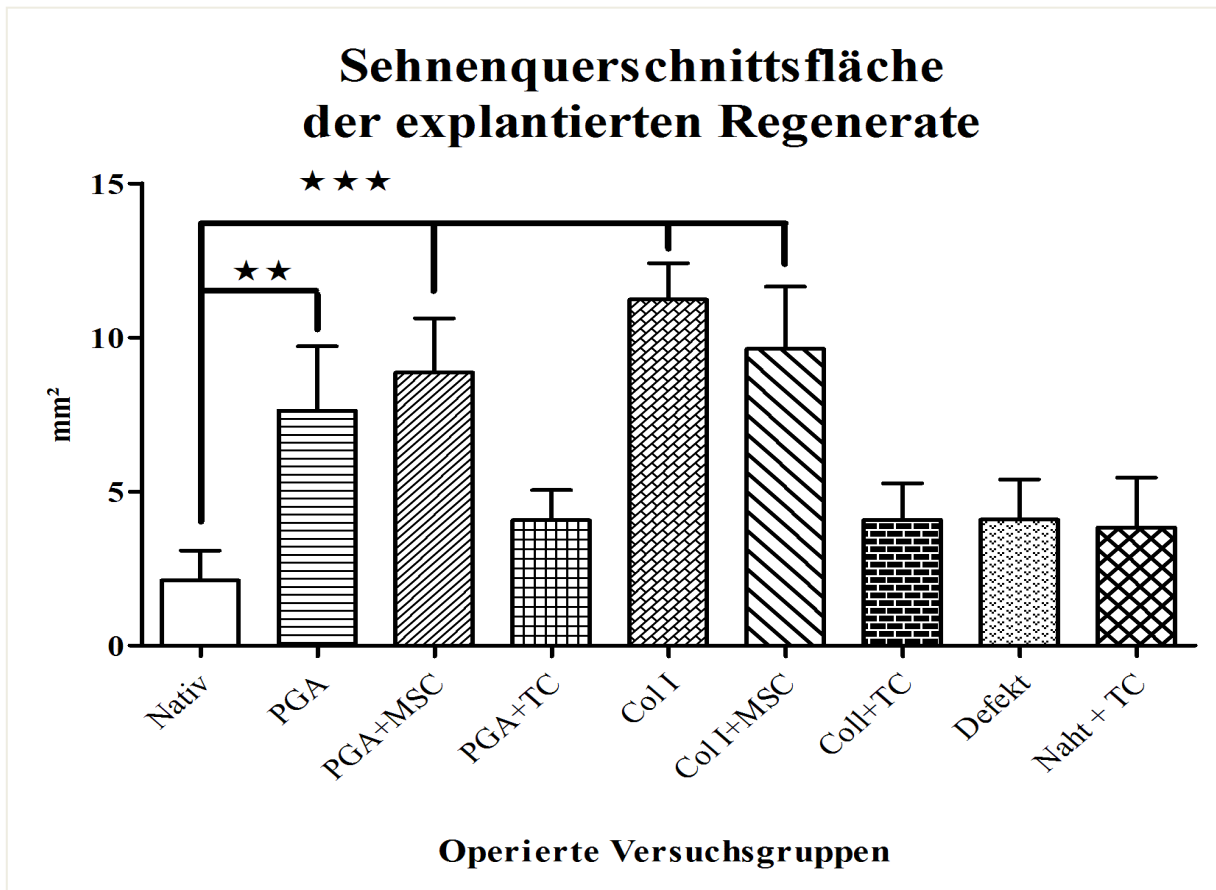


**Abb. 21** Bildaufnahmen von operierten, freipräparierten Achillessehnen kurz vor der Explantation. **A.** Native Achillessehne (Nativgruppe) mit weiß, glänzender Sehnenmorphologie<sup>192</sup>. **B.** Operierte Achillessehne 12 Wochen nach Scaffoldimplantation<sup>192</sup>. Die Sehnenprobe hatte ein gräuliches Aussehen und zeigte palpable Verhärtungen und Unebenheiten auf. Insgesamt konnte bei der Sehnenvermessung ein vergrößerter Querschnitt festgestellt werden; siehe Erläuterungen im Text. Schwarzer Stern = M. gastrocnemius. Weißer Stern = Kalkaneus. (Maßstab balken = 20 mm)<sup>87</sup>.

komplette Sehne von distal nach proximal erfassten.

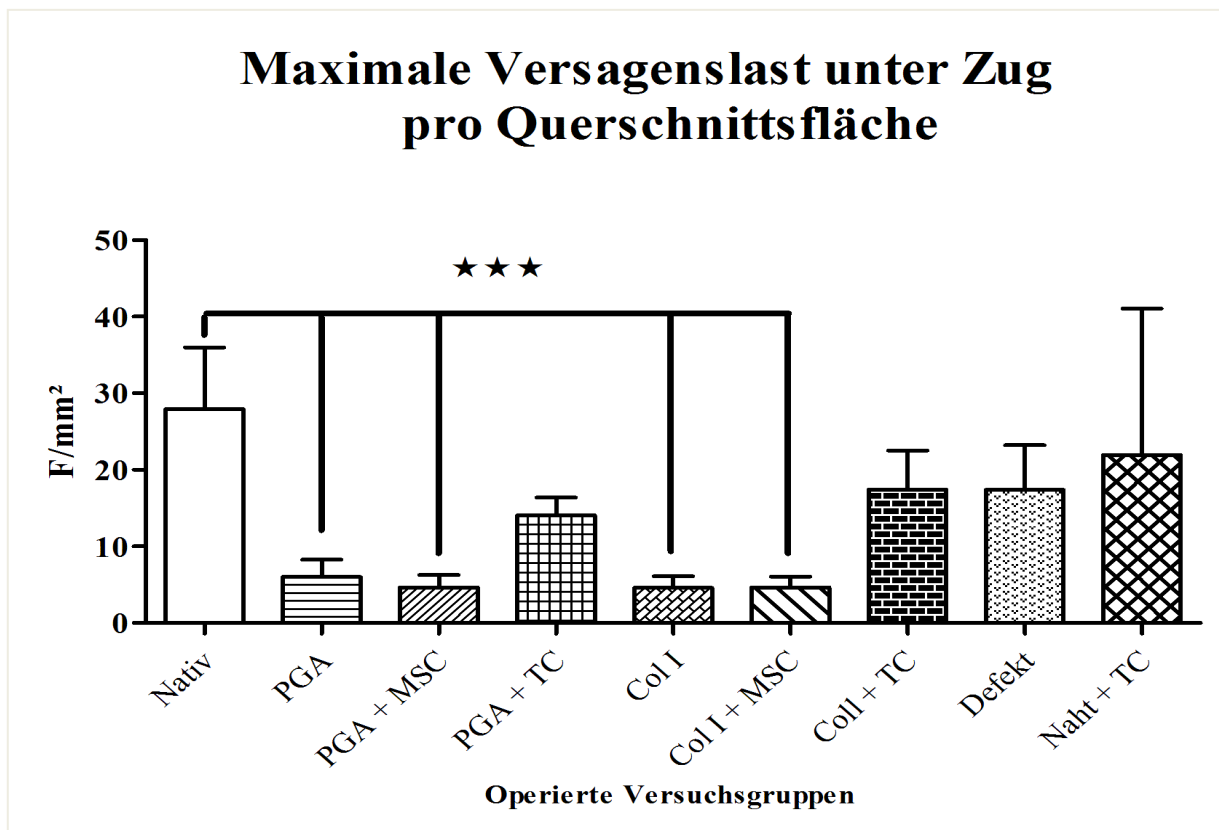
Die Vermessung der explantierten Sehnenproben ergab eine signifikante Zunahme in der Sehnenquerschnittsfläche der Gruppen PGA ( $p < 0,01$ ), PGA + MSC, Col I, Col I + MSC ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Nativgruppe (Abb. 22). Die mit Tenozyten behandelten Gruppen sowie auch die Defekt-Gruppe besaßen tendenziell eine etwas größere Querschnittsfläche als die Nativsehne, jedoch ohne signifikantes Ausmaß. Zwischen der PGA und der Col I Gruppe sowie den Gruppen PGA + MSC und Col I + MSC gab es keinen

relevanten Unterschied. Die Nativgruppe wurde zusammen mit der Kontrollgruppe aus der Studie von Frankewycz<sup>1</sup> gepoolt. Gleiches galt auch für die Nativgruppe in der Biomechanik. Die Scaffold-Gruppen ohne Zellbesiedelung wie auch die MSC-Gruppen wurden ebenfalls aus der Dissertation von Frankewycz übernommen und zum direkten Vergleich mit unseren Gruppen herangezogen.



**Abb. 22** Diagramm der Sehnenquerschnittsfläche der explantierten Regenerate. Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen (Average und SD pro Gruppe): Nativ ( $2,1 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ ), PGA ( $7,6 \pm 2,1 \text{ mm}^2$ ), PGA + MSC ( $8,9 \pm 1,8 \text{ mm}^2$ ), PGA + TC ( $4,1 \pm 0,9 \text{ mm}^2$ ), Col I ( $11,2 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ ), Col I + MSC ( $9,6 \pm 2 \text{ mm}^2$ ), Col I + TC ( $4,1 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ ), Defekt ( $4,1 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ ), Naht + TC ( $3,8 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ ). Die Gruppen wurden mit der Kruskal-Wallis (Anova on Ranks) auf signifikante Unterschiede untersucht (gestrichelte Linie) und mit dem Dunns Post Test überprüft. Die Signifikanz wurde auf  $* = p < 0,05$  festgesetzt.  $*** = p < 0,001$ ,  $** = p < 0,01$ . Die Versuchsgruppen PGA, PGA + MSC, Col I und Col I + MSC wurden von Frankewycz übernommen<sup>1</sup>. Für weitere Erläuterungen siehe im Text.

### 3.2. Biomechanik



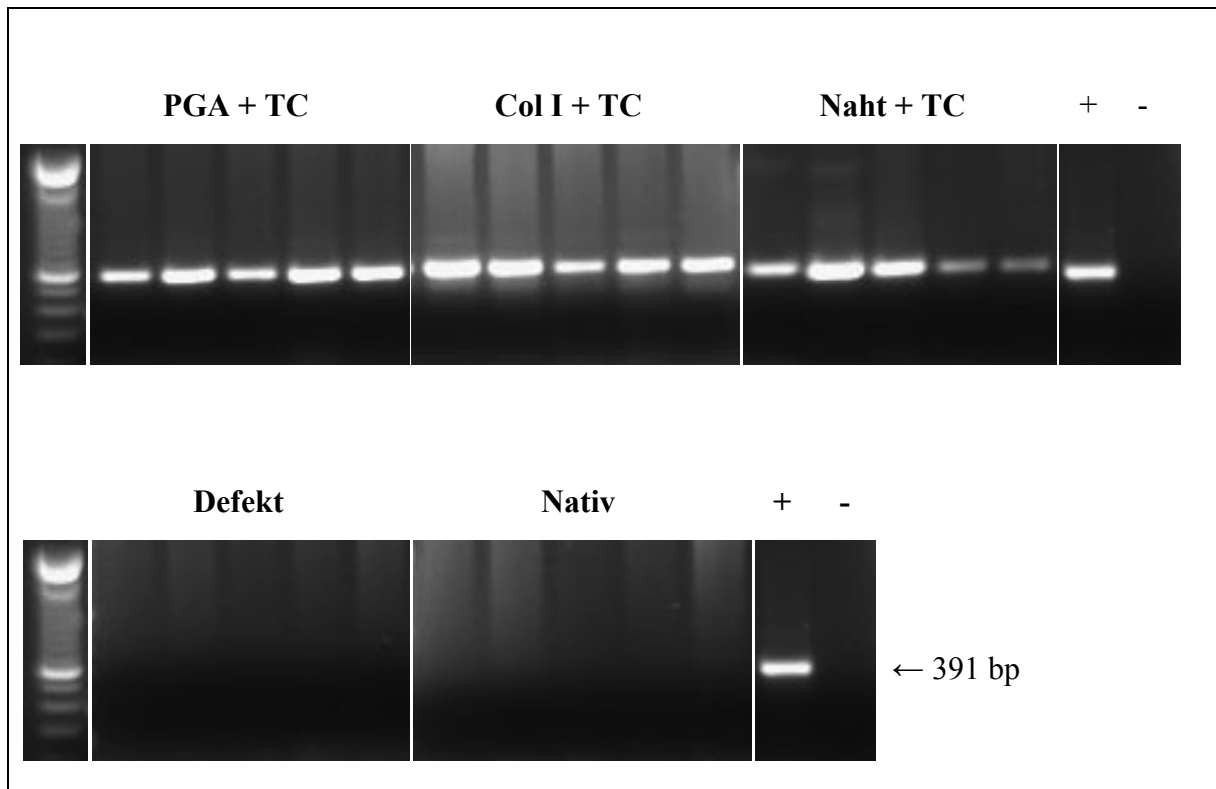
**Abb. 23** Diagramm der maximalen Ausreißkraft pro gemessener Sehnenquerschnittsfläche der Sehnenproben aller Versuchsgruppen im Vergleich. Die Ausreißkraft pro mm<sup>2</sup> war in der Kontrollgruppe mit  $27,9 \pm 8,0$  N/mm<sup>2</sup> (Average und SD pro Gruppe) signifikant höher als in den Versuchsgruppen PGA ( $6,0 \pm 2,2$  N/mm<sup>2</sup>), PGA + MSC ( $4,6 \pm 1,6$  N/mm<sup>2</sup>), Col I ( $4,6 \pm 1,5$  N/mm<sup>2</sup>) und Col I + MSC ( $4,7 \pm 1,4$  N/mm<sup>2</sup>). In allen restlichen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede: PGA + TC ( $14,2 \pm 2,1$  N/mm<sup>2</sup>), Col I + TC ( $17,5 \pm 5,1$  N/mm<sup>2</sup>), Defekt ( $17,4 \pm 5,8$  N/mm<sup>2</sup>), Naht + TC ( $21,9 \pm 19,1$  N/mm<sup>2</sup>). Die Gruppen wurden mit der Kruskal-Wallis (Anova on Ranks) auf signifikante Unterschiede untersucht und mit dem Dunns Post Test überprüft. Die Signifikanz wurde auf  $* = p < 0,05$  festgesetzt.  $*** = p < 0,001$ . Die Versuchsgruppen PGA, PGA + MSC, Col I und Col I + MSC wurden von Frankewycz übernommen<sup>1</sup>.

In der Abbildung 23 ist die maximale Ausreißkraft pro Sehnenquerschnittsfläche dargestellt. Die Auswertung dieser biomechanischen Untersuchungen zeigte deutlich, dass die Gruppen mit zelllosen Scaffolds sowie die Gruppen mit Implantation von MSC eine signifikant schlechtere Ausreißkraft pro Querschnittsfläche ( $p < 0,001$ ) hervorbrachten als die Nativgruppe (siehe Abbildungstext für die Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen). Die mit Tenozyten-behandelten Gruppen sowie auch die Defektgruppe waren zwar tendenziell etwas schwächer in der Ausreißkraft pro Fläche, aber ohne signifikanten Unterschied zur Nativgruppe und somit ohne signifikanten Nachweis funktioneller bzw. qualitativer

Einbußen. Die Scaffolds an sich machten untereinander keinen Unterschied, aus sondern nur die zusätzliche Verwendung von Tenozyten mit Ausnahme der Defekt-Gruppe führten zu einem Signifikanzunterschied.

### 3.3. Molekularbiologie – PCR-basierter Nachweis des SRY-Gens

Der PCR-basierte Nachweis von Tenozyten aus männlichen Lewis-Ratten, implantiert in weibliche Tiere, konnte erfolgreich qualitativ in den sehnenzellbehandelten Gruppen nachgewiesen werden. Mithilfe der Gelelektrophorese konnten die amplifizierten DNA-Abschnitte (SRY-Gen) mit der Größe von 391 Basenpaaren (bp) sichtbar gemacht und unter UV-Licht fotografiert werden (Abb. 24).



**Abb. 24** Aufnahmen von Banden spezifischer DNA-Abschnitte (SRY-Gen; 391 bp) auf einem Agarose-Gel. Bei den explantierten, mit Tenozyten manipulierten Sehnenproben (Gruppe PGA + TC, Col I + TC und Naht + TC), konnte das SRY-Gen ausnahmslos mittels PCR nachgewiesen werden. Es waren unterschiedlich helle Banden zu erkennen, die allesamt auf einer Basenpaarhöhe von 391 bp sichtbar waren. In der Kontrollgruppe und der Defektgruppe wurden keine DNA-Abschnitte sichtbar.

In den operierten Gruppen (Col I + TC, PGA + TC und Naht + TC), in denen die Sehnenregeneration unter Einfluss von Tenozyten erfolgte, waren auf den PCR-Aufnahmen unterschiedlich helle Banden (Akkumulation der spezifischen DNA-Abschnitte) auf gleicher Basenpaarhöhe zu erkennen. In den Gruppen Defekt und Nativ, in denen keine Anwendung von Tenozyten erfolgte, fehlten diese Banden. Zum Nachweis des SRY-Gens in den mit Stammzellen behandelten Gruppen (6 – 9) wird auf die Dissertation von Frankewycz verwiesen<sup>1</sup>.

### **3.4. Histologie und Immunhistochemie**

#### **3.4.1. Beurteilung der H/E-gefärbten Kryoschnitte**

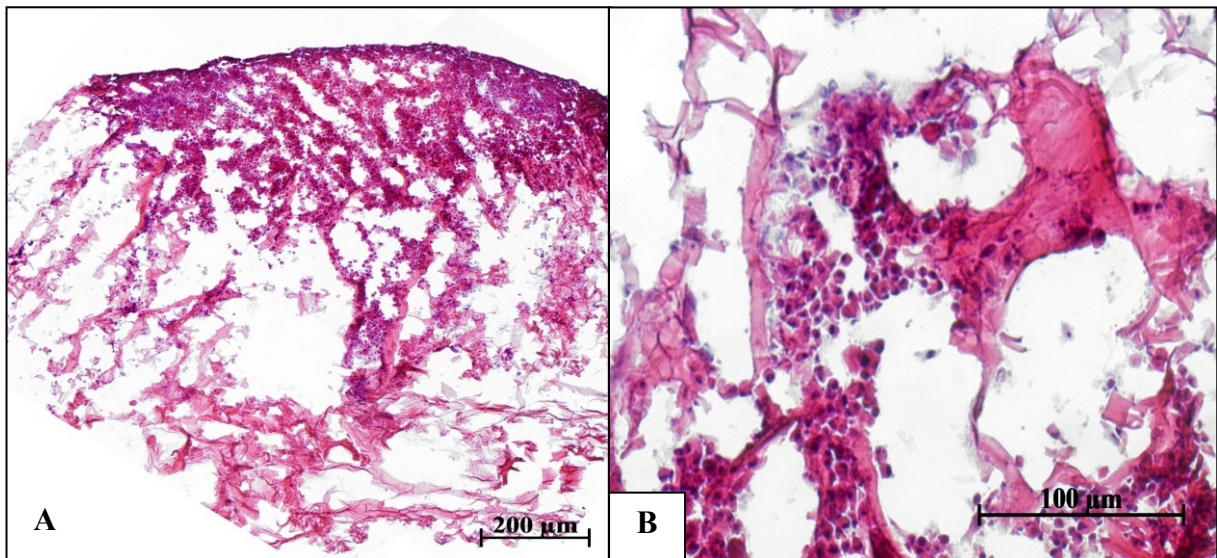
Die Verteilung der Tenozyten auf den Kollagen- und PGA-Scaffolds nach 48 h Besiedelungszeit erfolgte anhand von ausgewählten H/E-gefärbten Kryoschnitten.

Die horizontale und flächenmäßige Verteilung der Tenozyten auf den besiedelten Kollagen-I-Scaffolds war einheitlich und homogen. Die obere Hälfte des Schnittes war durch die blau-violette Färbung der Zellkerne deutlich von der rosa gefärbten unteren Hälfte zu unterscheiden (Abb. 25. A). Zwischen den säulenartigen Strukturen des Kollagenschwammes versammelten sich die rundlichen Tenozyten in großer Zahl in kleinen Gruppen und bildeten augenscheinlich eine Vielzahl an Zell-Zell-Kontakten. Das rosa gefärbte Kollagenmaterial der Schwamm- und Lyoplantphase war deutlich zu erkennen; in höheren Vergrößerungen war die stabile Adhäsion von Tenozyten an Kollagenteilen und -fasern sowie möglichen Ausbildungen von Zell-Kollagen-Kontakten zu sehen (Abb. 25. B). Dank der säulenartig angelegten Kollagen-I-Fasern konnten die Tenozyten bis fast zum senkrecht angelegten tiefen Teil des Scaffolds abwandern. Der Dichtegrad der Tenozyten in der Tiefe des Scaffolds war jedoch vermindert und die Verteilung unregelmäßiger.

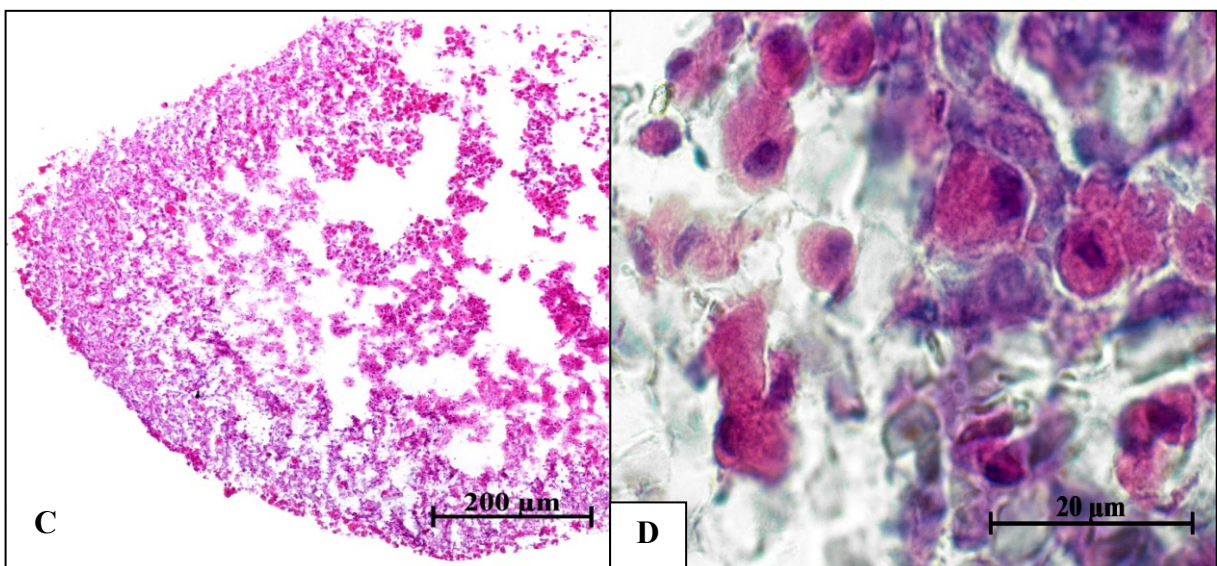
Die Verteilung der Tenozyten auf den PGA-Scaffolds war oberflächlich sowie auch in der Tiefe insgesamt regelmäßiger und homogener als auf den Kollagenscaffolds (Abb. 25. C). In der Übersichtsaufnahme war das PGA-Scaffold gleichmäßig intensiv gefärbt; zentral wie peripher konnten blau-violett gefärbte Zellkerne von Tenozyten erkannt werden. In höheren Vergrößerungen wurde die gleichmäßige Verteilung der rundlichen bis kubischen Tenozyten im PGA-Scaffold noch deutlicher; das kreuz und quer liegende PGA-Material war ungefärbt und die Tenozyten ruhten einzeln zwischen den Faser.



### Kollagenscaffold + Tenozyten (Col I + TC)



### PGA-Scaffold + Tenozyten (PGA + TC)

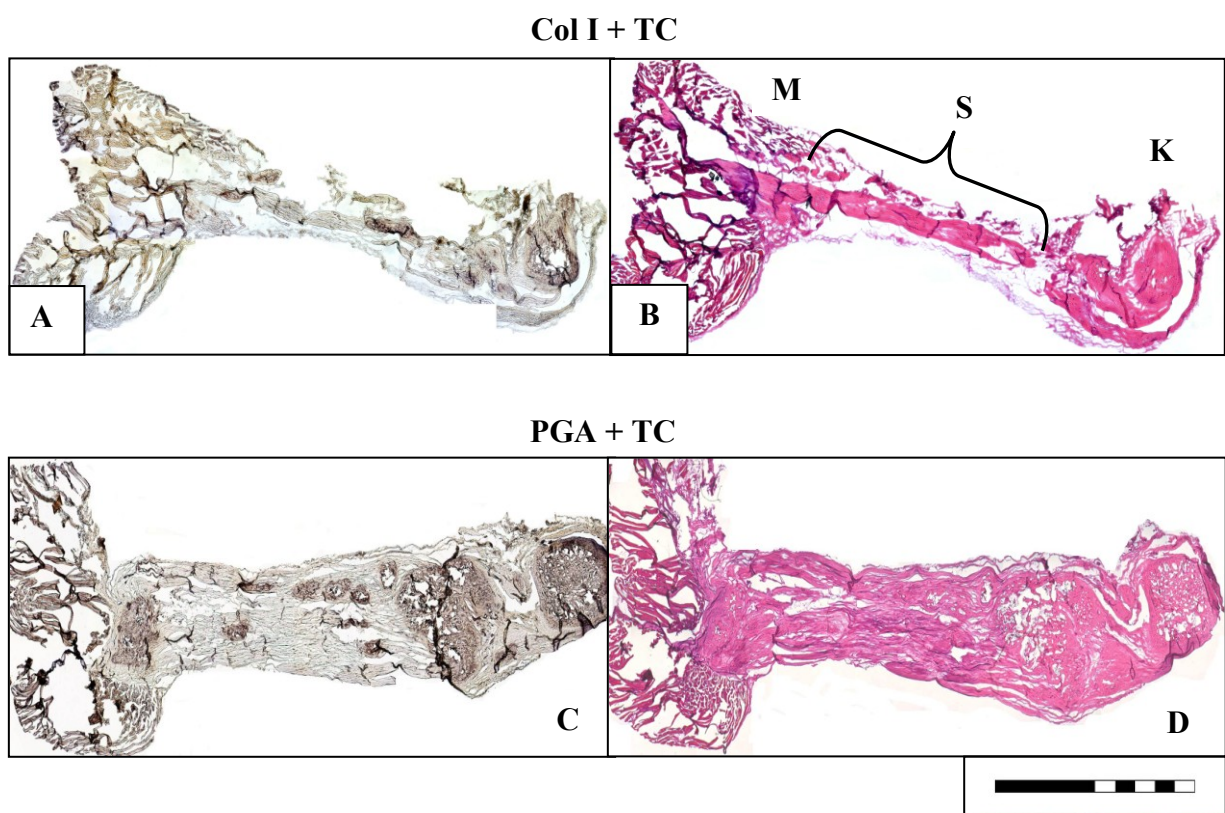


**Abb. 25** H/E-gefärbte Kryoschnitte von Sehnenzellbesiedelten Scaffolds. **A:** Übersichtsaufnahme eines zellbesiedelten Kollagen-I-Scaffolds. Die intensiv gefärbte obere Schicht des Scaffolds stellte die Oberfläche des Kollagenscaffolds dar und war dicht besiedelt mit Tenozyten. Die Zelldichte nahm mit der Tiefe im Scaffold deutlich ab. **B:** Höhere Vergrößerung eines zellbesiedelten Kollagenscaffolds. Die Tenozyten formierten sich in kleinen Gruppen und adhärten intensiv an den Kollagenfasern. Untereinander bildeten die Tenozyten augenscheinlich viele Zellkontakte aus. **C:** Übersichtsaufnahme eines zellbesiedelten PGA-Scaffolds. Die blauviolett gefärbten Zellkerne der Tenozyten waren homogen auf dem ganzen Scaffold verteilt. **D:** Höhere Vergrößerung eines zellbesiedelten PGA-Scaffolds. Die Tenozyten verteilten sich einzeln zwischen dem ungefärbten PGA-Material und nahmen eine rundliche bis kubische Zellform an. An mehreren Stellen bildeten sie enge Kontakte mit den PGA-Fasern aus.

Die Adhäsion der Tenozyten mit dem PGA-Material schien intensiver zu sein als beim Kollagenscaffold; augenscheinlich konnten zwar weniger Zellgruppen beobachtet werden und somit weniger Zell-Zell-Kontakte, jedoch waren erheblich mehr Zell-PGA-Kontakte in den Poren des Scaffolds zu erkennen (Abb. 25. D).

Die Beschreibung der Verteilung und Adhäsion von mesenchymalen Stammzellen auf die Scaffolds erfolgte im Detail in der Vorstudie von Frankewycz<sup>1</sup>.

### 3.4.2. Vergleich der H/E- und Osteopontin-gefärbten Kryoschnitte



**Abb. 26** Übersichtsaufnahmen von gefärbten Kryoschnitten aus unterschiedlich manipulierten Versuchsgruppen. Anhand der Aufnahme **B** wurde nochmals die Orientierung am Schnitt verdeutlicht: **M** = M. gastrocnemius; **S** = Abschnitt der Achillessehne; **K** = Kalkaneus. Osteopontin-gefärbte Kryoschnitte (**A**, **C**): In diesen Aufnahmen wurden der Muskelteil und der gefärbte Kalkaneusteil vernachlässigt und nur die markierten Osteopontin-Proteine im Sehnenabschnitt berücksichtigt. Deutlich zu erkennen waren dunkel gefärbte, rundliche Areale im Abschnitt der Sehne mit gewebefreien Lücken in deren Zentrum. Diese Osteopontin-gefärbten Stellen waren besonders in der Gruppe PGA + TC nicht nur auf die überbrückte Defektlücke begrenzt, sondern waren auch im Bereich des Muskel-Sehnen- und Knochen-Sehnen-Übergangs anzutreffen. Insgesamt war in den Kryoschnitten der Gruppe Col I + TC die Tendenz zu einer geringeren Bildung von gefärbten Arealen zu erkennen. H/E-gefärbte Kryoschnitte (**B**, **D**<sup>192</sup>): Im Bereich der Sehne überwog die H/E-Färbung der Kollagenfasern. Die Zellkerne der Tenozyten waren nur ansatzweise oder in höheren Vergrößerungen zu erkennen. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen war die Dicke der Achillessehne der Gruppe Col I + TC dünner und schmaler. Maßstab Balken = 10 mm.



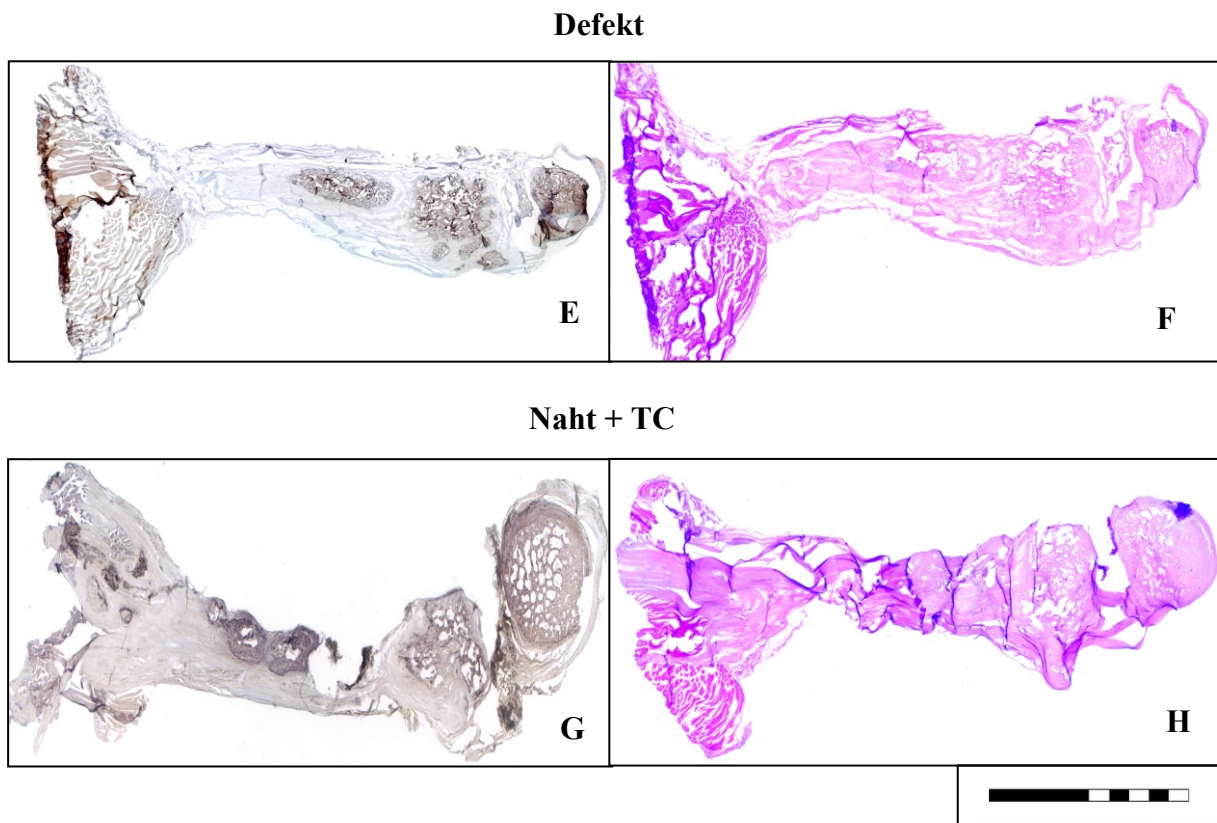
Anhand der immunhistochemisch-gefärbten Aufnahmen, (Abb. 26. A, C und Abb. 27. E, G) konnten durch die Markierung der Osteopontin-Proteine im Sehnenewebe, je nach Versuchsgruppe, neben den überwiegend weißlich bis gräulich gefärbten Kollagenfasern unterschiedlich viele dunkel bzw. schwarz gefärbte Areale ausgemacht werden. Diese Areale wiesen sich oft durch eine rundliche Form aus und besaßen in ihrem Zentrum vermehrt gewebefreie Flächen.

Nach Identifizierung dieser Flächen in den H/E-gefärbten Kryoschnitten der gleichen Sehnenprobe konnte in der Beurteilung von Aufnahmen mit höherer Vergrößerung festgestellt werden, dass die freie Flächen zwischen Gewebebälkchen knochenähnlichen Gewebes eingeschlossen waren (s. weiter unten und Abb. 28). Die Muskel- und Knochenteile wurden in der Beurteilung der gefärbten Kryoschnitte vernachlässigt, jedoch konnte beobachtet werden, dass die Färbungsintensität des Kalkaneusgewebes den rundlichen und Osteopontin-positiven Arealen im Sehnenabschnitt annähernd gleich waren. In höheren Vergrößerungen betrachtet, bestanden die knochenähnlichen Gewebeeinseln aus feinen bis groben Knochenbälkchen mit dazwischenliegendem Knochenmark, das wahrscheinlich artefaktbedingt nicht zu erkennen war. Die Knochenbälkchen bildeten ein dreidimensionales Netzwerk, in dem die Kollagenfibrillen, im Gegensatz zur nativen Sehne, orientierungslos verliefen. Es waren keine Osteone mit Lamellen zu erkennen, die für Lamellenknochen gesprochen hätten. In den Knochenbälkchen konnten Osteoblasten, Osteoklasten oder Osteozyten erkannt werden.

Aufgrund dieser Vergleichsschnitten konnten wir diese Areale eindeutig als Verknöcherungen identifizieren.

Diese knochenähnlichen Areale waren nicht ausschließlich auf die operierte und überbrückte Defektlücke beschränkt, sondern waren darüber hinaus auch implantationsfern in den Muskel-Sehnen- und Knochen-Sehnen-Übergängen vorzufinden und dehnten sich bei verschiedenen Schnitten über die gesamte Sehne aus. In der Gruppe Col I + TC (Kollagenscaffold und Tenozyten) gab es eine Tendenz zu geringerer Breite bzw. Dicke der Regenerate im Vergleich zu den restlichen Versuchsgruppen.

Am Sehnen-Muskel-Übergang überwiegte straffes Sehnenewebe; das Kollagenfasermuster war wellenartig und die Tenozyten waren mit ihrem schmalen Zellplasmaum, der Zugrichtung entsprechend, parallel zu den dicht gebündelten Kollagenfasern angeordnet.

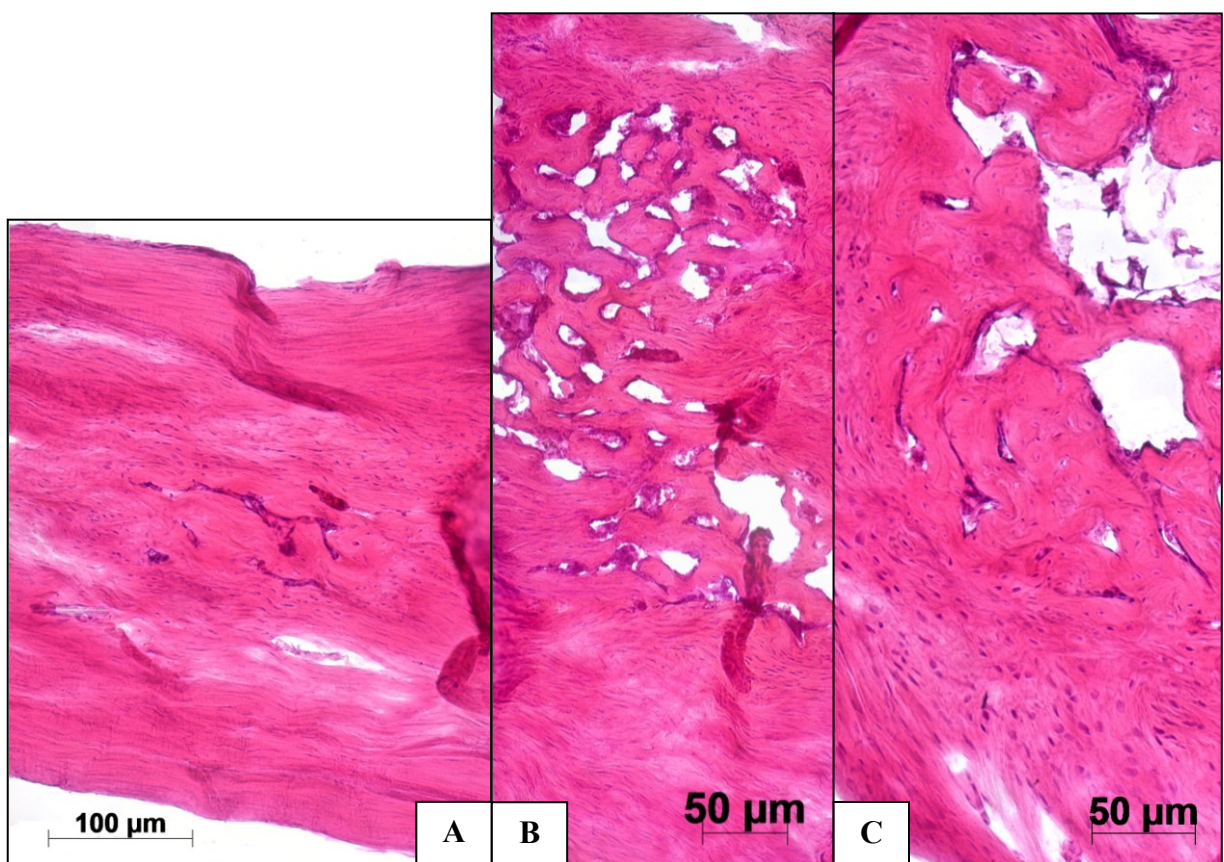


**Abb. 27** Übersichtsaufnahmen von gefärbten Kryoschnitten aus unterschiedlich manipulierten Versuchsgruppen. Zur Verdeutlichung der Schnittanatomie s. 26.B. Osteopontin-gefärbter Kryoschnitt (E): In dieser Aufnahme wurde der Muskel- und der gefärbte Kalkaneusteil vernachlässigt und nur die markierten Osteopontin-Proteine im Sehnenabschnitt berücksichtigt. Deutlich zu erkennen waren dunkel gefärbte, rundliche Areale im Abschnitt der Sehne mit hellen, gewebefreien Flächen in deren Zentrum. Auch in den Gruppen Defekt waren diese rundlichen Areale nicht auf die operierte Defektlücke begrenzt, sondern auch darüber hinaus angesiedelt. H/E-gefärbter Kryoschnitt (F): Die gefärbten Schnitte der explantierten Sehnenproben waren von unterschiedlicher Dicke und Größe und zeigten vermehrt großflächige gewebefreie Areale auf, die wahrscheinlich durch schnittbedingte Artefakte verursacht wurden. Im Vergleich zu diesen beiden Gruppen mit der Gruppe Col I + TC aus Abb. 26 konnte auch hier eine erhöhte Tendenz zu einer verringerten Dicke der Sehnenabschnitte festgestellt werden. Maßstab Balken = 10 mm. Weitere Erläuterungen im Text.

In der Nähe und auch am Übergang vom straffen Sehngewebe zu den knochenähnlichen Gewebeinseln fand sich häufig ein lockeres Bindegewebe mit unregelmäßig angeordneten Kollagenfasern und Zellen. Das typische Zickzack-Muster der Kollagenfasern war an diesen Stellen gestört und unterbrochen.

Die H/E-Schnitte waren durch die flächenmäßige Rosafärbung der Kollagenfasern geprägt; nur vereinzelt oder in höheren Vergrößerungen waren blau-violett gefärbte Zellkerne zu erkennen (Abb. 28).

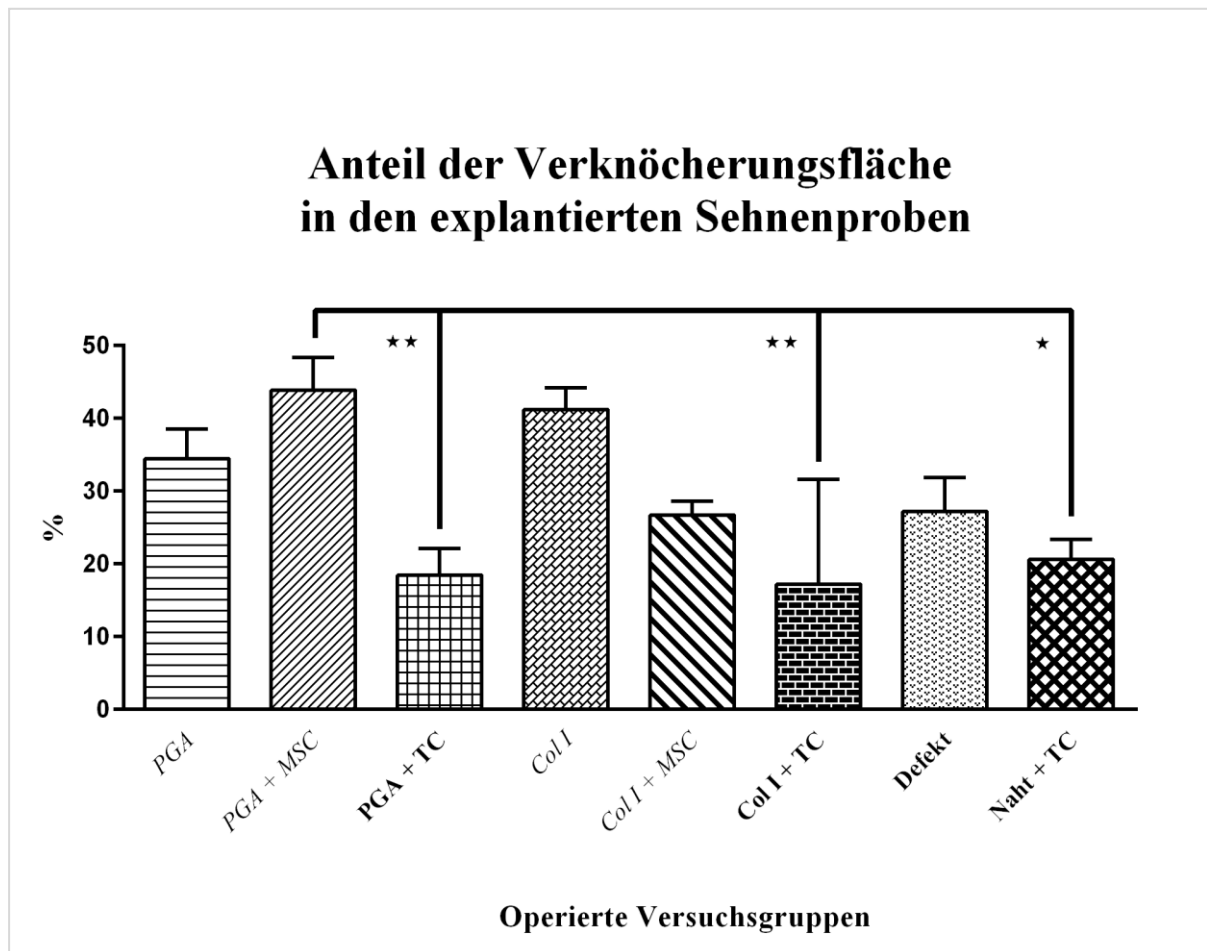
Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Anordnung und Morphologie des neugebildeten Gewebes und der Ultrastruktur und Anzahl von Tenozyten. Auch im Vergleich der hier beschriebenen Gruppen mit den Versuchsgruppen in denen Stammzellen benutzt wurden (Gruppen 6 – 9; siehe dazu die Dissertation von Frankewycz<sup>1</sup>) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Anteil der prozentualen Verknöcherung wurde weiter unten quantifiziert.



**Abb. 28** Ausgewählte, gruppenunspezifische Aufnahmen H/E-gefärbter Kryoschnitte der Sehnenregenerate in höherer Vergrößerung. **A:** Im Zentrum der Sehnenprobe ist eine Insel knochenähnlichen Gewebes zu erkennen, umgeben von sehnenartigem Bindegewebe an den Außenrändern des Präparates und lockerem Bindegewebe in unmittelbarer Nähe der Verknöcherungsinsel. **B:** Nahtloser Übergang von sehnenartigem Gewebe in knochenähnliches Gewebe. Gut zu erkennen sind die Knochenbälkchen im oberen Teil der Aufnahme und das wellenförmige Muster des Sehngewebes im unteren Teil. **C:** Rechts oben und im Zentrum der Aufnahme sind einige Knochenbälkchen mit Knochenmarkräumen zu erkennen und unten in der Aufnahme Tenozyten mit umliegendem Kollagengewebe, die nahtlos in das knochenähnliche Gewebe übergangen.

### 3.5. Quantifizierung des Knochenflächenanteils

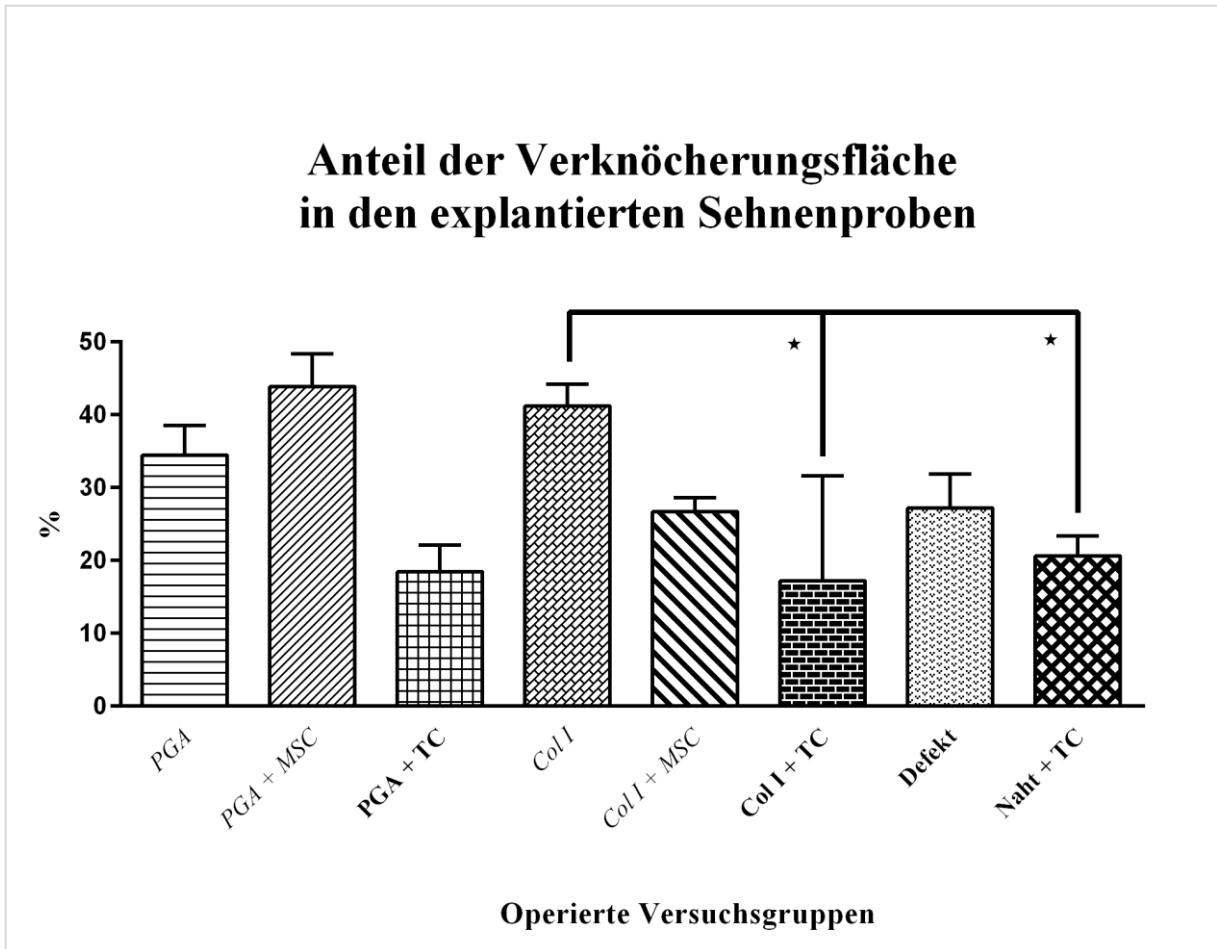
Anhand der Kryoschnitte wurde die Verknöcherungsfläche an der gesamten Sehnenfläche der operierten und explantierten Sehnenproben in allen Versuchsgruppen ermittelt (Abb. 29a + b).



**Abb. 29a** Quantifizierung des Verknöcherungsanteils (Average und SD) an der gesamten Sehnenfläche der operierten und explantierten Sehnenproben. In den Gruppen PGA + TC (18,44 % ± 11), Col I + TC (17,2 % ± 14,4) und Naht + TC (20,6 % ± 7,8) gab es signifikant weniger Verknöcherungsfläche als in der PGA + MSC – Gruppe (43,81 % ± 13,6). Insgesamt waren die Ossifikationen in den Tenozyten-behandelten Gruppen geringer als in den restlichen Gruppen: PGA (34,4 % ± 12,2), Col I (41,2 % ± 9), Col I + MSC (26,68 % ± 5,6), Defekt (27,2 % ± 13,05). Die Gruppen wurden mit der Kruskal-Wallis (Anova on Ranks) auf signifikante Unterschiede untersucht und mit dem Dunns Post Test überprüft. Die Signifikanz wurde auf \* =  $p < 0,05$  festgesetzt. \*\* =  $p < 0,01$ . Die nicht fett gedruckten und kursiv dargestellten Versuchsgruppen wurden von Frankewycz übernommen<sup>1</sup>.

Die Diagramme (Abb. 29 a + b) zeigten deutlich, dass die mit Tenozyten-behandelten Gruppen tendenziell weniger Verknöcherungsflächen aufwiesen als die mit MSC-behandelten und nur mit Scaffolds behandelten Gruppen. Statistisch signifikant war der Unterschied im Besonderen in der PGA-Sektion zwischen der Gruppe PGA + MSC und den Gruppen PGA +

TC ( $p < 0,01$ ) und Naht + TC ( $p < 0,05$ ) sowie in der Col I - Sektion zwischen der Gruppe Col I und den Gruppen Col I + TC und Naht + TC ( $p < 0,05$ ).

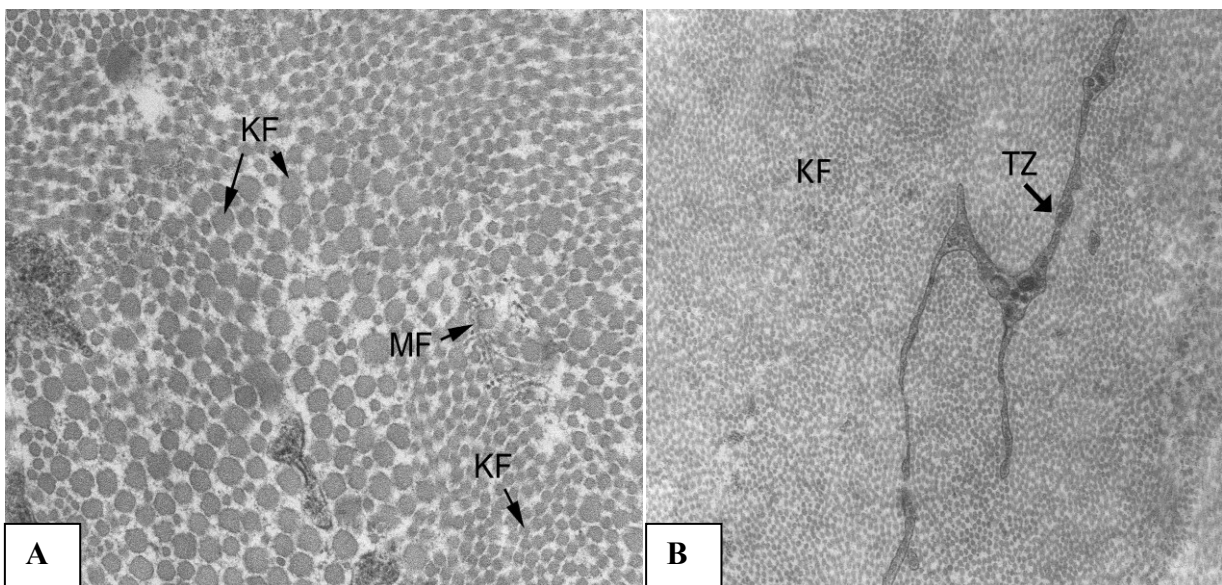


**Abb. 29b** Quantifizierung des Verknöcherungsanteils an der gesamten Sehnenfläche der operierten und explantierten Sehnenproben. An der gleichen Statistik wurde nochmal eine andere Signifikanz verdeutlicht. Im Vergleich zur Gruppe Col I hatten die Gruppen Col I + TC und Naht + TC signifikant weniger prozentuale Verknöcherungsfläche. Die Gruppen wurden mit der Kruskal-Wallis (Anova on Ranks) auf signifikante Unterschiede getestet und mit dem Dunns Post Test geprüft. Die Signifikanz wurde auf  $* = p < 0,05$  angesetzt. Die nicht fett gedruckten und kursiv dargestellten Versuchsgruppen wurden von Frankewycz übernommen<sup>1</sup>.

### 3.6. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

A priori soll betont werden, dass keine signifikanten Unterschiede bzgl. der strukturellen und zellmorphologischen Beschaffenheit der Ultrastruktur des Sehngewebes in den operierten Gruppen festgelegt wurden.

In den TEM-Aufnahmen der verschiedenen, operierten Versuchsgruppen aber wurden beträchtliche Unterschiede im Durchmesser der Kollagenfibrillen festgestellt.

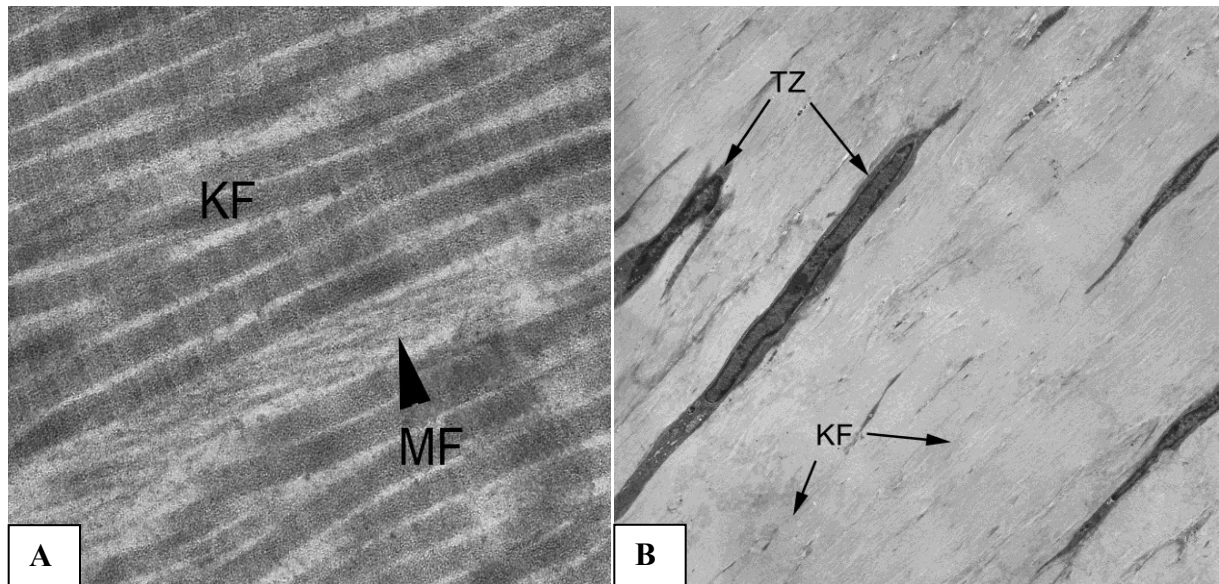


**Abb. 30** **A.** Hohe Vergrößerung von Kollagenfibrillen (KF, Pfeile) im superfizialen Teil der Sehne: Die quergeschnittenen Kollagenfibrillen waren von unterschiedlicher Dicke (multimodale Fibrillen). Dies war eventuell ein Hinweis auf eine gestörte Kollagenbildung (siehe Diskussion). Zwischen den Kollagenfibrillen erkannte man, sporadisch verteilt, Bündel von Mikrofibrillen (MF, Pfeile). Vergrößerung 56700-fach. **B.** Kollagenfibrillen und Tenozyt mit Fortsätzen einer nativen Sehne. (Kontrollgruppe). Die Kollagenfibrillen waren im Vergleich zu denen operierter Sehnen homogener und dünner im Durchmesser (5 – 30  $\mu\text{m}$ ). Vergrößerung 15500-fach.

Die Kollagenfibrillen-Durchmesser der operierten Gruppen wurde stichprobenartig gemessen und rangierten zwischen 38 und 80 nm. Auch innerhalb einer Gruppe variierte der Fibrillendurchmesser deutlich in Dicke, Form und Helligkeit bzw. Dichte (Abb. 30. A + B<sup>1</sup>). Die Kollagenfibrillen mit großem Durchmesser und Querschnitt nahmen überwiegend eine rundliche bis ovale Form an; einige Fibrillenformen jedoch waren „unrund“ und besaßen mehrere Ausbeulungen („bulges“).



Der Teil der dünneren Kollagenfibrillen erschien in seiner Form etwas homogener; dennoch konnten auch hier einige Fibrillen mit Unregelmäßigkeiten, in Form von sogenannten Ausbeulungen, beobachtet werden. In der Verteilung der dicken und dünnen Kollagenfibrillen war keine systematische Ordnung zu erkennen.

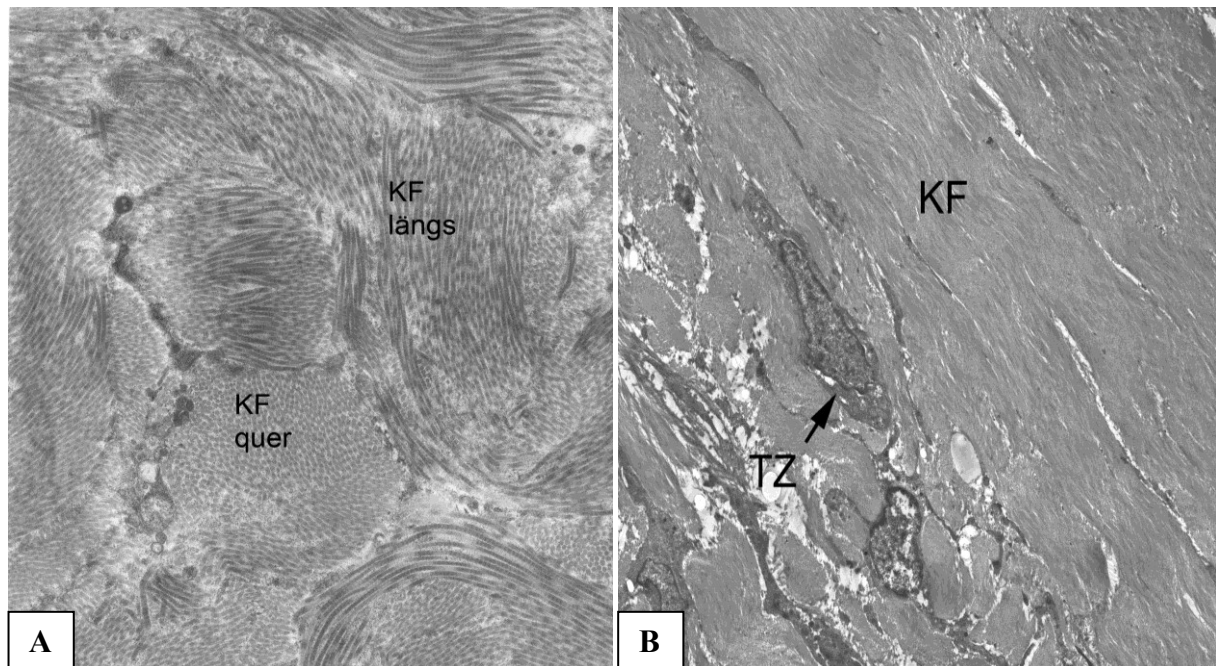


**Abb. 31** **A.** Hohe Vergrößerung einer TEM-Aufnahme von Kollagenfibrillen im superfizialen Teil einer operierten Sehnenprobe (gruppenunspezifisch): Dicht gelagerte, homogen angeordnete Kollagenfibrillen (KF) verliefen parallel in eine der Zugkraft entsprechenden Richtung. Die typischen regelmäßigen D-Perioden der Kollagenfibrillen konnten erkannt werden. Zwischen den Kollagenfibrillen lagerten vereinzelt auch Mikrofibrillen (MF, Pfeilkopf), die manchmal zu einem größeren Saum konfluieren. Vergrößerung 77.000-fach. **B.** Übersichtsaufnahme von Regenerat-fernem Sehnengewebe einer operierten Sehnenprobe: die Tenozyten (TZ, Pfeile) besaßen größtenteils ein flaches Soma und lange, dünne Fortsätze, die parallel zur Zugrichtung ausgerichtet waren. Kollagenfibrillen (KF, Pfeile). Vergrößerung 3.900-fach.

Im Folgenden werden die TEM-Aufnahmen gruppenunspezifisch beurteilt und zwischen Aufnahmen aus dem oberflächlichen, superfizialen bzw. tiefen, profunden Areal der operierten Sehnenproben unterschieden.

Die Kollagenfibrillen im oberflächlichen Areal der Sehnenproben waren überwiegend, entsprechend der Zugrichtung, parallel ausgerichtet und wiesen in höherer Vergrößerung das für Kollagen I typische D-Perioden Muster auf (Abb. 31. A).

In niedriger Vergrößerung ergaben die Kollagenfibrillen bündelförmige Einheiten höherer Ordnung, die auch lichtmikroskopisch als Kollagenfasern erkennbar waren. Elektronenmikroskopisch waren die Kollagenfasern, die zusammen mit den parallelen Tenozyten ein wellenförmiges Muster ergaben, größtenteils parallel zur physiologischen Zugrichtung der Achillessehne ausgerichtet (Abb. 31. B).

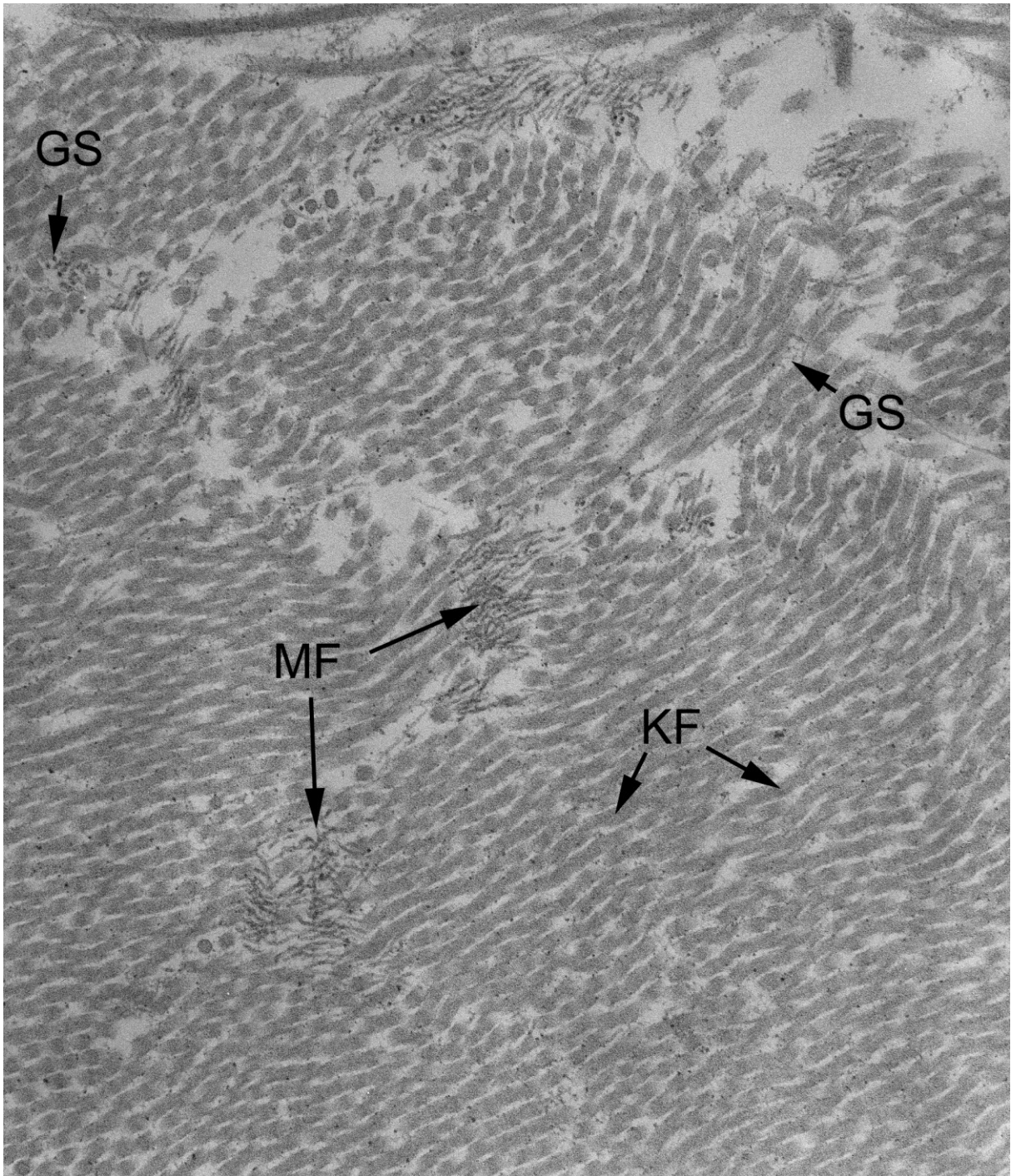


**Abb. 32** 2 TEM-Aufnahmen von Sehngewebe einer operierten Sehnenprobe in Regeneratnähe (gruppenunspezifisch). **A:** Insgesamt war das Gewebe nicht sehnenpezifisch strukturiert. In dieser „unruhigen“ Gewebezone lagen die Bündel aus Kollagenfibrillen (KF) quer und längs, und die Fibrillen schienen ihre Richtung spontan zu wechseln. Vergrößerung 24.000-fach. **B:** Übergang zwischen „ruhigem“ und „unruhigem“ bzw. strukturiertem und unstrukturiertem Gewebe. Der Tenozyt (TZ, Pfeil) bildete hier die Grenze zwischen den 2 unterschiedlich geformten Sehngewebszonen. Vergrößerung 2.850-fach.

Im tiefen, profunden Teil der Sehnen, im Regenerat oder in dessen Nähe, war das Sehngewebe in allen operierten Versuchsgruppen überwiegend unruhig und unregelmäßig gegliedert. Die wellenförmige Ausrichtung (Zigzag-Muster) der Kollagenfibrillen war gestört und es konnte ein spiralförmiges und heterogenes Muster (Abb. 32. A) beobachtet werden: der Verlauf der Kollagenfibrillen war unterbrochen und deren Richtung wechselte oft abrupt.

In einem Blickfeld konnten gleichzeitig querverlaufende und längsverlaufende Kollagenfasern beobachtet werden, die ihre Richtung spontan wechselten. Solche senkrecht zueinander ausgerichteten Kollagenfibrillenbündel waren in allen angefertigten Aufnahmen der profunden Ebene auffällig.



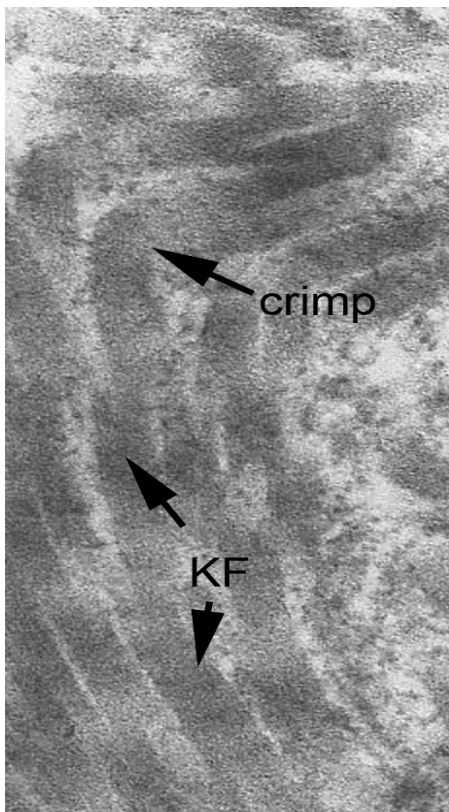


**Abb. 33** Hohe Vergrößerung einer TEM-Aufnahme einer operierten Sehnenprobe. Deutlich zu erkennen waren die sporadisch verteilten Bündel von Mikrofibrillen (MF), die zwischen den querschnittenen Kollagenfibrillen (KF) lagerten und augenscheinlich an einigen Stellen an ihnen hafteten; die Durchmessergröße der Kollagenfibrillen war in diesem Sichtfeld sehr homogen. Die feinen dichten Körperchen und die granulöse, spinnengewebsartige Substanz (GS), die an den Kollagenfibrillen angelagert schienen, waren Teil der interzellulären Substanz und könnten einen Hinweis auf das Vorkommen von Proteoglykanen (SLRP) sein. Vergrößerung 50.000-fach.

Die Bündel lagen dicht beieinander, ohne eine regelmäßige, sinnvolle Struktur zu ergeben (Abb. 32. A). Der Übergang von unstrukturiertem Gewebe zu normalem, strukturiertem Gewebe war stets deutlich zu erkennen. (Abb. 32. B). Dieses Bild ist typisch bei spontan rupturierten Sehnen und spricht für den normalen Regenerationsverlauf bei konservativ therapierten Sehnen, wo es zu einem bestimmten Zeitpunkt der Sehnenheilung wieder zu einer physiologischen Umstrukturierung des Sehngewebes kommt.

In den meisten TEM-Aufnahmen waren in der tiefen und oberflächlichen Schnittebene feine granulöse Komponenten im interfibrillären Raum zu erkennen, die aussahen wie feine dichte Körperchen; sie schienen an den Kollagenfibrillen zu haften (Abb. 33).

Zusätzlich zu den Körperchen waren dünne, spinnengewebsähnliche Strukturen zu beobachten, die ebenfalls den interfibrillären Raum auszufüllen und benachbarte Kollagenfibrillen miteinander zu verbinden schienen.



**Abb. 34** TEM-Aufnahme von einzelnen Kollagenfibrillen (KF), die sogenannte Knicke oder auch „crimp“ genannt, in ihrem Verlauf aufzeigten. Vergrößerung 21000-fach.

Sogenannte Mikrofibrillen-Bündel verteilten sich sporadisch zwischen den Kollagenfasern (KF) (Abb. 30, Abb. 31, Abb. 33) sowie in unmittelbarer Zellnähe und waren dünner (Mittelwert = 17 nm) und dunkler bzw. dichter als die KF. Ihre Ausrichtung in Bezug auf die Kollagenfibrillen wechselte zwischen komplett chaotisch und gegenläufig bis hin zu regelmäßig und parallel. Die Natur von den hier beschriebenen Mikrofibrillen war nicht eindeutig zu definieren, doch sie könnten vermutlich Vorstufen von elastischen Fasern sein, sogenannte Oxytalanfasern<sup>193</sup>. Die Präsenz solcher Mikrofibrillen („microfibrils“) in regenerierendem Sehngewebe ist ein Hinweis auf die kontinuierliche Neubildung von elastischen Fasern, die bei der Bildung von Knicken und dem für die elastische Funktion der Sehne so wichtigen wellenförmigen Muster („crimp“) der Kollagenfibrillen eine Rolle spielen<sup>194</sup>.

Die Kollagenfasern verliefen auch nicht immer parallel zueinander, sondern bildeten an bestimmten Stellen einen Knick (englisch: „fibrillar crimp“). Dieser

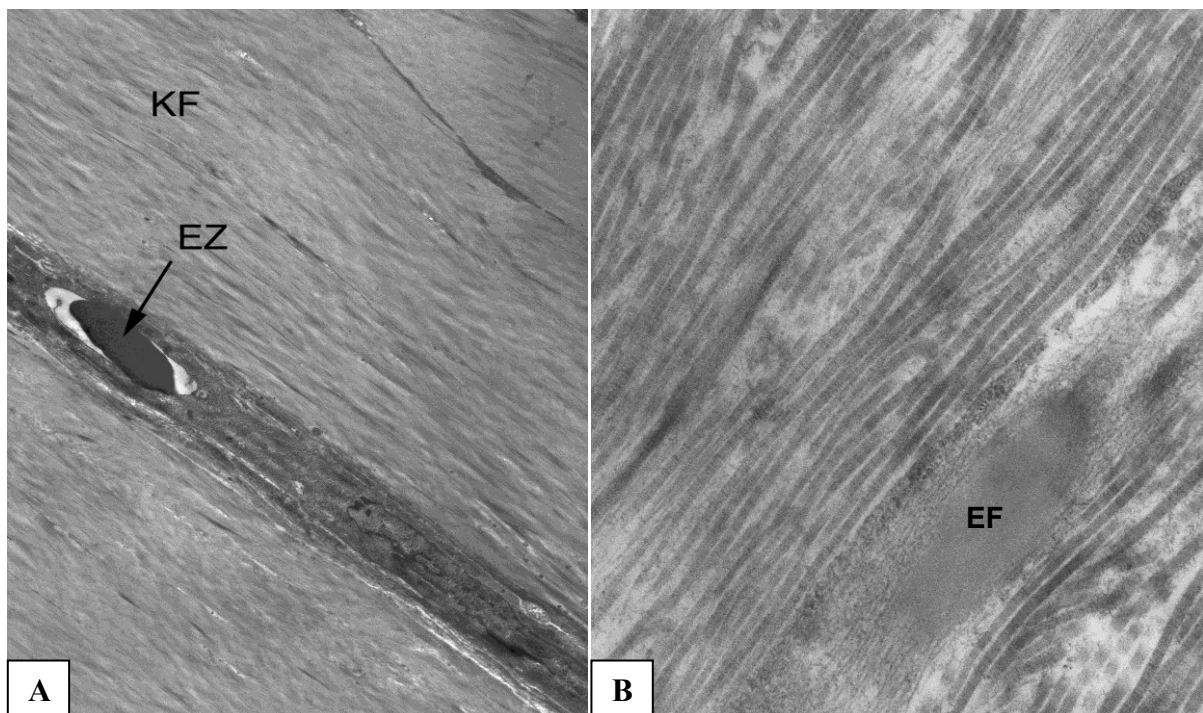
spontane Richtungswechsel war sowohl einzeln als auch gleichzeitig bei mehreren Fasern zu sehen. (Abb. 34). Sie gaben dem Sehngewebe in kleineren Vergrößerungen den typisch wellenartigen Verlauf.

Reife elastische Fasern konnte man nur vereinzelt und zufällig beobachten (Abb. 35. B). Im Zentrum besaßen sie einen Kern aus Elastin, der von einzelnen Mikrofibrillen umgeben war. Sie gliederten sich zwischen den dicht gepackten Kollagenfibrillen ein.

Die Anzahl, die Größe und der Aktivitätsgrad der Tenozyten variierten von Feld zu Feld.

Im gesunden, normal geordneten Sehngewebe, besaßen die Tenozyten größtenteils ein flaches Soma und lange dünne Fortsätze, die parallel zur Zugrichtung ausgerichtet waren.

Die zelltypischen, oval bis flachen Nuclei wiesen ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Hetero- und Euchromatin auf. Manche Tenozyten waren mit viel rER, einem Golgi-Apparat und exozytotischen Vesikeln ausgerüstet, was auf eine rege Proteinsynthese deutete.

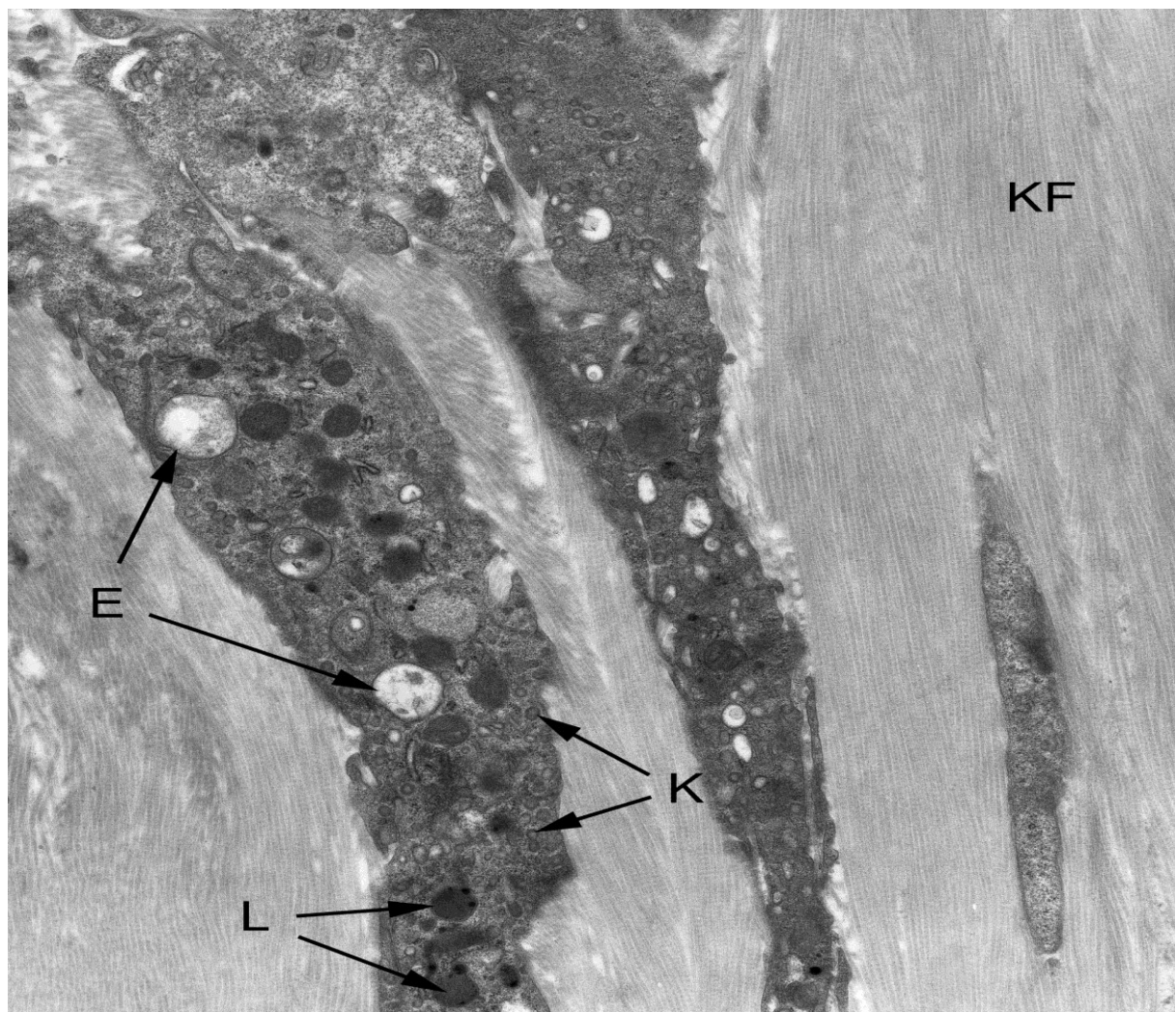


**Abb. 35** **A.** TEM-Aufnahme einer Kapillare mit einem Erythrozyt (EZ, Pfeil) in ordnungsgemäß angeordnetem Sehngewebe: entlang den parallel ausgerichteten Kollagenfibrillen (KF) waren Tenozyten zu erkennen. Vergrößerung 5.100-fach. **B.** Reife elastische Faser (EF) mit Elastinkern von Kollagenfasern nicht-homogener Ausrichtung umgeben. Vergrößerung 56.700 – fach.

In der Nähe des Regenerats kamen oft große Zellen vor, vermutlich Makrophagen. Deren Zellausläufer waren mit zahlreichen klatrinbedeckten Endozytosevesikeln gefüllt, die ein Hinweis auf intensive rezeptorvermittelte Endozytose sind (Abb. 36). Eine ungewöhnlich große Zahl von Endosomen und Lysosomen im Zellplasma dieser vermutlichen Makrophagen

ergänzten das Bild eines langanhaltenden Abbaus von Gewebe. Zwischen den unregelmäßig angeordneten Kollagenfibrillenbündeln lagen viele geschädigte und vermutlich absterbende Tenozyten. Der helle, aktive Zellkern ließ vermuten, dass diese Zellen durch mechanische Quetschung und nicht durch Apoptose beschädigt wurden. In der Umgebung dieser geschädigten Zellen, konnten helle Regionen erkannt werden, die ein Artefakt darstellten, oder Räume zugrundegegangener Zellen waren.

Sowohl im nicht manipulierten als auch im regenerierten Sehngewebe traten an manchen Stellen kleine Blutgefäße auf (Abb. 35. A).



**Abb. 36** TEM-Aufnahme von zwei Zellausläufern von vermutlichen Makrophagen; das Zytoplasma dieser aktiven Zellen enthielt eine ungewöhnlich große Zahl an Endosomen (hell, E), Lysosomen (dunkel, L) und klatrinbedeckten Endozytosevesikeln (K). Alles wies auf einen langanhaltenden Abbau von Gewebe hin. Kollagenfibrillen (KF). Tenozyt (T). Vergrößerung 15.300-fach.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1. Isolation der Tenozyten**

Die Isolation der Tenozyten aus den Sehnenfaszikeln durch Verdauung von Sehngewebe mit Kollagenase I 0,2 % erlaubte eine leichte, zeitschonende Handhabung und ermöglichte die Gewinnung einer hohen Sehnenzellzahl. Eine weitere Methode der Zellisolation ist die chemotaktische Zellauswanderung der Tenozyten aus Sehngewebe nach Schulze-Tanzil et al.<sup>183</sup> Die präparierten Sehnenfaszikel werden dabei in kleine Stücke geschnitten und in einem speziellen Medium bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Diese Methode erfordert einen hohen Zeitaufwand, da die Tenozyten oft erst nach ca. 5 - 8 Tagen und in geringer Anzahl aus dem Gewebe auswandern. Bis zu 10 Passagen sind nötig, um die gewünschte Zellzahl zu erhalten, die für die Besiedelung der Scaffolds erforderlich sind. Dies führt folglich zu einer längeren Aufenthaltsdauer der Tenozyten unter nicht spezifischen Umgebungskonditionen *in vitro* und zu einer erhöhten Dedifferenzierungsgefahr<sup>175</sup>; das Kollagenverhältnis Typ III/Typ I steigt und der Tenozyten-Phenotyp verändert sich mit zunehmender Passage. Die Tenozyten verlieren dabei ihr spindelförmiges Aussehen und es kommt zu einer gestörten Genexpression von Dekorin, das bekannterweise für die interfibrilläre Stabilität der Kollagenfasern, den Faserdurchmesser und deren Ausrichtung zuständig ist. Zusätzlich kann es durch den fehlenden mechanischen Reiz zu einer minderbelastbaren Sehne führen. Signifikante Veränderungen im Zell-Phenotyp treten bereits ab der 4. Passage auf. Diesbezüglich schien die Verdauungsmethode zur Isolation von Tenozyten von Vorteil, da die Tenozyten bereits ab der 2. Passage in ausreichender Zellzahl für die Scaffoldbesiedelung verwendbar waren.

#### **4.1.2. Scaffoldauswahl**

Studien haben gezeigt, dass durch die Benutzung von zellbesiedelten Scaffolds die Regeneration von rupturierten Sehnen verbessert werden kann<sup>8 9</sup>. Durch die Anwendung von zellbesiedelten Scaffolds sollte die fehlende EZM in der Defektlücke ersetzt werden und als adäquates Milieu für die implantierten Tenozyten dienen. Die Tenozyten benutzen dabei die

Scaffoldmatrix als Adhäsionsmöglichkeit und sollen so unter sehnengerechten Bedingungen zur Proliferation angeregt werden um zur Heilung der Sehne beizutragen.

Für unsere Studie wurden 2 unterschiedliche bioresorbierbare Scaffolds (biologisch und synthetisch) verwendet, die sich in der Klinik einer großen Beliebtheit erfreuen: ein biologisches Kollagen I – Scaffold und ein synthetisches Polyglykolsäure Scaffold (PGA).

In der praktischen Anwendung war das PGA-Scaffold relativ schwer zu handhaben. Aufgrund der geringen Dichte und der weichen sowie leicht eindrückbaren Matrix war das Zuschneiden und die Implantation des besiedelten Scaffold schwierig. Beim Vernähen des Scaffolds mit den zwei Sehnenstümpfen konnte die Matrix leicht beschädigt werden. Die Kollagenscaffolds waren aufgrund ihrer stabilen Lyoplastseite widerstandsfähiger, jedoch gestaltete sich das Auftragen der Zell-Lösung auf das Scaffold augenscheinlich inhomogener und die Lösung adhärierte nur sehr träge an der Kollagenmatrix. .

#### 4.1.2.1. Angewandte Zellzahl zur adäquaten Besiedelung der Scaffolds

In der Literatur schwankt die Angabe über die Höhe der Zellzahl von Tenozyten/ml bzw. Tenozyten/Fläche für die Besiedelung der Scaffolds<sup>8 12 13 195 196</sup>. Awad et al. zeigte, dass unterschiedliche Zellbesiedelungsdichten von Scaffolds zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften p.op. von regenerierten Scaffoldimplantierten Sehnenproben haben<sup>9</sup>. Zunehmende Zellbesiedelungsdichten scheinen also keinen zusätzlichen Nutzen für die Sehnenregeneration zu haben. Daher wurden aus Gründen der labortechnischen und organisatorischen Möglichkeiten für die Besiedelung die höchstmögliche Konzentration benutzt (1 Million Tenozyten/Scaffold). In Vorversuchen wählten wir einen Kompromiss zwischen einer relativ kleinen Fläche der Scaffolds (3 x 3 x 2 mm) und deren maximaler Volumenaufnahmekapazität.

Die präoperative Besiedelungszeit der Scaffolds von 48 h wurde so ausgewählt, dass sich die Tenozyten ausreichend verteilen konnten und adäquat in der Matrix des Scaffolds adhärirten<sup>87</sup>. Ebenfalls konnte mit dieser relativ kurzen Besiedelungszeit eine relevante Zelldifferenzierung der Tenozyten vermieden werden.

#### 4.1.3. Angewandtes Versuchs- und Tiermodell

Um eine komplette Durchtrennung der Sehne zu erzeugen, wie sie meistens aus einer Sehnen- oder Bänderverletzung resultiert, wurde in diesem Versuch der Totaldefekt am Achillessehnen-Modell der Ratte ausgewählt.



Das Modell entsprach einer kompletten Durchtrennung mit einer Defektsetzung am zentralen Teil der Achillessehne von 3 mm Länge. Auf diese Weise sollte eine komplette Ruptur von humanen Rotatorenmanschetten-, Kreuzband- und Achillessehnen mit Substanzdefekt simuliert werden. Dieses Modell wurde durch die Einsetzung eines zellbesiedelten Implantats geschlossen und berücksichtigte die Wiederherstellung der ursprünglichen Sehnenlänge wie es bei der herkömmlichen Behandlung von kompletten Sehnenrupturen mit retrahierten Sehnenenden und eingesetzter Sehnen transplantation durchgeführt wird<sup>197</sup>. Die Regeneration der Sehne erfolgte ohne restliches natives Sehnenmaterial sowie ohne Kontakt zwischen den beiden Sehnenenden und erforderte so eine Neubildung des Sehngewebes durch Unterstützung der zellbesiedelten Scaffolds. Demgegenüber stehen die Partialdefekte in Sehnen, die im zentralen oder lateralen Teil einer Sehne gesetzt werden<sup>9 198 199</sup>. Dabei kann ein Großteil der Sehnen-Restfunktion erhalten bleiben und der Nachteil einer defektstabilisierenden Naht umgangen werden. Die p.op. Mobilisation der operierten Tiere bzw. die mechanische Belastung der Sehnenregenerate unterscheidet sich somit grundlegend im direkten Vergleich der beiden Defektmodelle. Jedoch tritt ein Partialdefekt nur selten klinisch in Erscheinung und ist aus diesem Grund kein adäquates Defektmodell<sup>199</sup>. Totaldefekt-Modelle hingegen sind gut reproduzierbar in Bezug auf Studienaufbau, die Stelle des Schnittes sowie das Ausmaß des Defektes<sup>200</sup>.

Die Benutzung der Rahmennaht (modifizierte Naht nach Kirchmayr-Kessler) zur Behandlung des Totaldefekts ermöglichte einen wichtigen Vorteil im Vergleich zur herkömmlichen Sehnennaht, die bei der Versorgung von scharf durchtrennten Sehnen angewandt wird<sup>180</sup>. Bei der herkömmlichen Sehnennaht kann die intrinsische Blutversorgung sowie die maximale Reißkraft reduziert sein. Die Rahmennaht hingegen schränkte den physiologischen Bewegungsablauf des Beines nicht ein, erlaubte eine frühe Mobilisation des operierten Hinterlaufes und garantierte aufgrund des absorbierbaren Nahtmaterials eine kontinuierliche Steigerung der Belastung von peripher nach zentral auf das Präparat. Die Unversehrtheit und Stabilität des eingesetzten Materials in der Sehne wurde garantiert, ohne Verzicht auf den Belastungsreiz der für die tensile Stimulation der implantierten Tenozyten unabdingbar ist.

Ab dem 2. Monat p.op. sollte der Erwerb der vollen Leistungsfähigkeit das Ziel sein<sup>201</sup>. Studien haben gezeigt, dass gezielt frühe Mobilisation (ab 1. - 3. Woche p.op.) ein besseres Outcome auf die Heilung hat als eine ausgedehnte Immobilisation<sup>100 202-205</sup>. Frühe Mobilisation erhöht die Belastbarkeit der Sehne und die tensilen, viskoelastischen Eigenschaften<sup>206</sup> und fördert die sehngerechte Ausrichtung und Organisation der Kollagenfasern<sup>207</sup>. Zusätzlich kann die Gleitfähigkeit verbessert und eventuelle

Verwachsungen verhindert werden<sup>65</sup>. Die Sehnenbelastung führt ebenfalls zur Proliferation von Sehnenstammzellen (TSC) und vermehrter Produktion von Kollagen Typ I<sup>208</sup>.

Aus diesen Gründen wurde bewusst auf eine Ruhigstellung des operierten Hinterlaufes der Ratte verzichtet<sup>100 202 203</sup> um einen kontinuierlich steigenden spezifischen Reiz auf die implantierten Zellen bzw. ortständigen Zellen zu garantieren und eine Verringerung der Durchblutung zu vermeiden<sup>209</sup>. Somit konnte nach der inflammatorischen Phase eine gezielt kontrollierte Mobilisation eingesetzt werden um eine Atrophie zu verhindern und den Heilungsvorgang zu unterstützen.

Die in diesem Versuch angewandte postoperative (p.op.) „free cage“ Mobilisation<sup>210</sup> ermöglichte somit die gewünschte frühe und vorsichtige Anpassung an die Belastung. Anfangs war das Laufverhalten der Ratten eingeschränkt und zeigte eine natürliche Schonhaltung des Hinterlaufs. Mit zunehmender Erholung normalisierte sich das Laufverhalten und die Tiere belasteten das operierte Bein nach einigen Wochen (3 – 4 Wochen) voll.

Die Ratte eignete sich aufgrund der homologen Anatomie des Hinterlaufes, der einfachen Handhabung sowie der Kostenersparnis optimal als Tiermodell für die vorliegende Studie. Die Größe der Achillessehne erlaubte die Implantation von Scaffolds und die Durchführung von biomechanischen Tests. Die Wahl eines Inzuchtstammes der Lewis-Ratte ermöglichte die Implantation von männlichen Tenozyten in weibliche Tiere ohne dass eine Abstoßungsreaktion zu erwarten wäre und befähigte, mittels PCR, den Nachweis des SRY-Gens auf dem Y-Chromosom in den weiblichen explantierten Sehnenproben.

#### **4.1.4. Auswertung mittels Histologie, Immunhistochemie und TEM**

Die angewandten Auswertungsmethoden der Ergebnisse in der Histologie, Immunhistochemie und TEM durch einen unabhängigen Anatom führten zu nicht statistisch auswertbaren Daten, sondern sollten lediglich Tendenzen aufzeigen, die die Ergebnisse in der Biomechanik und der Quantifizierung der Verknöcherungsfläche unterstützen.



## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1. Isolierung unterschiedlicher Zellen

Bei der Isolierung der Tenozyten aus den männlichen Rattensehnen war auffällig, dass wir nicht nur einen Zelltyp isolierten. Die beschriebene Morphologie der isolierten Tenozyten aus Sehngewebe in der Zellkultur entsprach der in der Literatur beschriebenen Tenozyten. Durch die zusätzliche Anwesenheit unterschiedlicher Zellen war die Zellkultur jedoch keine pure homogene Tenozytenkultur sondern formte einen heterogenen Zellmix.

Die Herkunft dieser Tenozyten-ähnlichen Zellen mit leicht abgewandelter Zellmorphologie in der Monolayerkultur von Kollagenase-behandelten Sehnenfaszikeln war auf 3 mögliche Ursachen zurückzuführen.

(1) Diese Zellen haben ihren Ursprung aus dem sehnenumliegenden Gewebe (Endotenon bzw. Paratenon) und könnten somit fibrozyten-ähnlichen Charakters gewesen sein. Diese Zellen können für eine adäquate Sehnenregeneration hilfreich sein, da die Regeneration von verletzten Sehnen auch von diesen Zellen ausgehen kann<sup>211</sup>.

(2) Die Zellen, die aufgrund der unspezifischen Konditionen *in vitro* keinem tenogenem Stimulus unterlagen, differenzierten schon nach kurzer Zeit von Tenozyten zu Fibrozyten-ähnlichen Zellen. Es ist belegt, dass Veränderungen des Zellphänotyps in der *in vitro* Zellkultur von humanen Tenozyten schon ab der 4. Passage manifest sind und es zu einer Zunahme des Kollagen Typ III:I Verhältnisses kommt<sup>175 183</sup>.

Durch die ausschließliche Benutzung von isolierten Tenozyten aus Passage 2 für die Besiedelung der Scaffolds und Sehnenzellimplantation war die Wahrscheinlichkeit einer Dedifferenzierung der Tenozyten eher unplausibel.

(3) Die Tenozyten-ähnlichen Zellen entsprachen den rezent entdeckten Sehnenstammzellen (TSC)<sup>212</sup>.

Salingarnboriboon deutete schon 2003 durch die angestellten Versuche an, dass vermutlich auch Tenozyten-ähnliche Zellen aus dem Sehngewebe von Mäusen pluripotente Eigenschaften besitzen<sup>213</sup>. Kürzlich ist der Forschungsgruppe um Bi Y et al. der endgültige Nachweis von Sehnenstammzellen (TSC) gelungen. Diese Zellen besitzen Multidifferenzierungspotential und können sich in Nicht-Tenozyten wie z.B. Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren<sup>212</sup>. In der *in vitro* Kultur haften die TSC flach am Boden der Kulturflasche und bildeten ab dem 3. Tag verstreute Zellkolonien. Ab der 10. Passage besitzen die TSC eine pflasterstein-ähnliche Morphologie und exprimieren folgende

bekannte Stammzellenmarker: Oct-4, SSEA-4 und Nucleostemin. Die Tenozyten exprimieren diese Marker nicht<sup>14</sup> und sind hingegen wesentlich gestreckter und spindelförmiger in ihrer Zellform.

Es ist anzunehmen, dass die isolierte Sehnenzellkultur in diesem Experiment ebenfalls TSC enthielten. Mehrere Studien belegen, dass Tenozyten, die auf konventionelle Weise aus Sehngewebe isoliert wurden, auch das spezifische TSC-Differenzierungspotential besitzen<sup>214</sup>. Die Zellkultur der isolierten Tenozyten bestand somit nicht zu 100 % aus Tenozyten, sondern entsprach einem Mix, ähnlich der natürlichen Zellverteilung einer Sehne, aus Tenozyten, Fibrozyten-ähnlichen Zellen und Sehnenstammzellen (TSC).

#### **4.2.2. Ektope Verknöcherungen**

Genau wie Frankewycz in seinen Ergebnissen mussten auch wir Verknöcherungen in ausnahmslos allen mit Tenozyten behandelten Versuchsgruppen feststellen<sup>1</sup>. Im Vergleich war der prozentuale Anteil der Verknöcherungsfläche in der Tenozyten-Sektion jedoch niedriger als bei den MSC-Gruppen von Frankewycz (Tenozyten: 17,2 - 20,6 %, MSC: 26,7 - 43,8 %). In allen Tenozyten-Gruppen waren die Verknöcherungen verglichen zur PGA + MSC sogar signifikant vermindert ( $p < 0,01$ ). Ebenso zeigten sich die Verknöcherungen in den Gruppen Col I + TC und Naht + TC im Vergleich zur Col I - Gruppe signifikant verringert ( $p < 0,05$ ). Die reinen Scaffoldgruppen (PGA und Col I) unterschieden sich nicht voneinander. Genauso wenig schienen die MSC einen positiven Effekt auf die Verknöcherungsfläche zu haben. Die zusätzliche Implantation von MSC auf die PGA-Scaffolds führte eher zu vermehrten Ossifikationen.

Unsere aufgestellte Hypothese 4, dass die Verwendung von Tenozyten zu weniger Ossifikationen in den Regeneraten führt, kann somit bestätigt werden. Die Verknöcherungen in den Tenozyten-Gruppen waren alle vermindert, teilweise sogar signifikant. Da auch die Gruppe Naht + TC weniger Ossifikation besaß, kann man davon ausgehen, dass dieser Effekt unabhängig von den benutzten Scaffolds war.

Auffällig waren zudem die geringen Ossifikationen in der Defekt-Gruppe. Wie bereits oben beschrieben kann es bei Achillessehnen unter bestimmten Voraussetzungen zur spontanen Heilung kommen. Durch den Stützverband musste es zu einer adäquaten Anpassung der Sehnenenden gekommen sein, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es bei der Regeneration zusätzlich zur Einwanderung von ortsständigen Sehnenzellen in die Defektzone gekommen war. Aus diesem Grund kann diese Gruppe nicht zum Vergleich mit anderen Sehnengruppen herangezogen werden und stellt somit eine Limitierung dieser Studie dar.

Interessanterweise zeigen die biomechanischen Auswertungen auch, dass die Gruppen mit den meisten Verknöcherungen (PGA, PGA + MSC, Col I, Col I + MSC) ebenfalls signifikante Einschränkungen ( $p < 0,001$ ) in der maximalen Ausreißkraft pro Querschnittsfläche bedeuteten. Somit gibt es eine Korrelation zwischen prozentualem Anteil der Verknöcherungsfläche und der maximalen Ausreißkraft/Fläche.

Um zu bestätigen, ob die Verwendung autologer Tenozyten in einem substanziellen totalen Achillessehnendefekt zur Bildung hochwertiger Sehnenregenerate führt, die den histologischen und biomechanischen Eigenschaften nativer Sehnen entsprechen (Hypothese 1), müssen die histologischen Auswertungen näher betrachtet werden.

In der Histologie und Immunhistochemie zeigten die operierten Sehnenproben peripher auf Höhe des Defekts eine „normale“, sehnergerechte Struktur (gruppenunspezifisch). In diesem dünnen Saum waren keine ektopen Verknöcherungen vorhanden, die Kollagenfasern waren parallel zur Beanspruchung der Sehne ausgerichtet und makroskopisch konnte der typische wellenförmige Verlauf („crimp-Muster“)<sup>215</sup> beschrieben werden.

Ansonsten wiesen die Sehnenproben in allen operierten Gruppen mehr oder weniger zentrale, ektople Verknöcherungen auf. Die unregelmäßige Verteilung der Knochenbälkchen, die Präsenz von Knochenmark und die orientierungslose Ausrichtung der Kollagenfibrillen entsprach der Architektur von Geflechtknochen<sup>216</sup>. Geflechtknochen tritt vor allem im frühen Stadium der Knochenbildung (desmale und enchondrale Ossifikation), aber auch bei der Knochenbruchheilung zur Überbrückung des Frakturspaltes auf<sup>217</sup>. Überwiegend differenziert sich Geflechtknochen später in Lamellenknochen um<sup>216</sup>. Da es in der Regenerationstelle keinen direkten Kontakt zu Knochen oder Knochensplinter gab, wie es bei der Frakturheilung der Fall ist, sind diese Verknöcherungsstellen wohl autonom entstanden.

Die Knochenmineralisation von Sehnen wurde schon bei verschiedenen Vogelarten beschrieben und ist hier ein normales Erscheinungsbild<sup>218</sup>. Die Ursachen für Ossifikationen in der humanen Achillessehne jedoch sind pathologischen Ursprungs und können z.B. nach Traumen (Ruptur oder Mikrotrauma)<sup>219-221</sup>, nach Operationen<sup>221 222</sup> und bei Diabetes<sup>223</sup> auftreten. Eine genaue Erklärung für das Phänomen der Sehnenmineralisation ist unbekannt, es wird jedoch eine Kombination von biologischen, physikalisch-chemischen und biomechanischen Einflüssen vermutet.

Die Auswertungen auf transmissionselektronischer Ebene unterstrichen insgesamt das Bild der Verteilung von einem gestörten Aufbau des Sehngewebes im zentralen, tiefen Teil

des Regenerats und des überwiegend neugebildeten, sehnengerechten Gewebe im oberflächlichen, superfiziellen Teil des Regenerats.

Die Kollagenfibrillen im oberflächlichen Areal der Sehnenproben waren überwiegend entsprechend der Zugrichtung parallel ausgerichtet und wiesen in höherer Vergrößerung das für Kollagen I typische D-Perioden Muster auf.

Der gestörte Aufbau im profunden Regeneratgewebe äußerte sich hauptsächlich durch eine unregelmäßige Ausrichtung der Kollagenfasern. Die wellenförmige Ausrichtung der Kollagenfasern („Zickzackmuster“<sup>215</sup>) war in der unmittelbaren Nähe zu den Implantaten gestört und unterbrochen. Die Kollagenfasern waren spiralförmig ausgerichtet und das Gesamtbild war unregelmäßig und unruhig.

Es zeigte sich ebenfalls eine auffällige Heterogenität im Kollagenfaserdurchmesser, die eventuell auf eine gestörte Fibrillogenese<sup>32</sup> mit gehemmter Lateralfusion der Fibrillen im Narben- und Regeneratbereich hinweist<sup>35</sup> und während der Heilungsphase zu einer Verringerung des Faserdurchmesser aufgrund einer Dysregulation der SLRP-Expression führte. Zu nennen sind hier die wichtigsten Vertreter der SLRP wie zum Beispiel Fibromodulin, Biglycan, Lumican und Decorin<sup>27 28 31 33 34 37 215 224</sup>. Erst kürzlich konnte Lui et al. zeigen, dass die Dysregulation von Biglykan, Aggrekan und Decorin möglicherweise eine Rolle in der Chondro- und Osteogenese bei der Regeneration von Patellasehnenverletzungen von Ratten spielen.<sup>225</sup>

Auf Höhe des Regenerats konnten vermehrt Makrophagen beschrieben werden. Eine ungewöhnlich große Zahl von Endosomen und Lysosomen im Zellplasma dieser vermutlichen Makrophagen wiesen auf einen aktiven Umbau in diesem Teil der Sehne hin. Auch an den aktiven Tenozyten war erkennbar, dass eine rege Umstrukturierung stattfand die von EZM-Abbau aber auch EZM-Aufbau geprägt war.

Diese Umstrukturierung lässt hoffen, dass sich nach Bildung festeren Stützgewebes bzw. nach kompletter Resorption des Fadens (Absorptionszeit ca. 70 Tage) auch im zentralen Teil der Sehne bzw. des Implantats, wieder sehnengerechtere Bedingungen einstellen. Ob und wann sich nach Einstellung normaler Sehnenverhältnisse die Umstrukturierung von Knochengewebe auf Sehngewebe stattfindet ist nicht vorherzusehen und müsste durch weitere Studien eruiert werden. Es gibt Hinweise, dass bereits vorhandene Verknöcherungen in Sehnen bis zu 6 Monaten nach Trauma bzw. Operation anhalten können<sup>225</sup>.

Die Verwendung von Tenozyten führte in unseren Versuchen somit zu hochwertigeren Sehnenregeneraten mit weniger Verknöcherungen und daraus resultierend zu einer adäquaten

biomechanischen Funktion, die sich nicht in einem signifikantem Ausmaß von nativen Sehnen unterscheidet. Jedoch enthielt das Regenerat auf histologischer und transmissionselektronischer Ebene pathologische Ossifikationen (vermutlich noch in der Umstrukturierungsphase) und entsprach deshalb im Aufbau nicht einer nativen Sehne. Somit kann aus unserer Sicht Hypothese 1 nicht bestätigt werden.

### **Totaldefektmodell bzw. Rahmennaht als Ursache der Ossifikationen**

Um ein Zerreißen der Sehne zu vermeiden war es aufgrund der Porösität und der Fragilität der Scaffolds unmöglich, diese direkt mit den Sehnenstümpfen zu verbinden. Die Zugkraft des Muskels (Fz), die bei der Plantarflexion des Hinterlaufes der Ratte entstand, wurde daher mithilfe einer Rahmennaht indirekt auf den Kalkaneus übertragen.

Wie wichtig die richtige Belastung für die Differenzierung von Zellen ist, haben rezente Studien gezeigt. Durch adäquate mechanische Stimulation und Belastung ist die Differenzierung von Nicht-Tenozyten in Tenozyten oder Bänder- und Sehnenspezifische Zellen möglich. Altmann et al. gelang es z.B. BMSC in Bänderzellen umzuwandeln<sup>226</sup>, Deng et al. konnte sogar humane dermale Fibroblasten zur Bildung von Sehnengewebe anregen<sup>227</sup>. Nach dem Prinzip von „form follows function“ ist der mechanische Stimulus im Sinne einer Dehnung ein entscheidender Faktor in der Entstehung von Sehnengewebe<sup>209</sup>. Studien zeigen, dass angewandte uniaxiale Dehnung die Differenzierung von TSC und anderen Stammzellen beeinflussen<sup>227</sup> sowie den Metabolismus und die Genexpression von Tenozyten steigern können, um den Prozess der Sehnenregeneration zu beschleunigen<sup>63 228</sup>.

Doch nicht nur die Art der Belastung, auch die Intensität scheint eine Rolle zu spielen. In einem in-vitro-Versuchsmodell von Zhang et al. wurden mehrere Belastungsgrade einer uniaxialen Dehnung auf TSC von Hasen (Patellar- und Achillessehne) angewendet. Eine Dehnung von 4 % förderte die Proliferation von TSC, jedoch konnte eine Dehnung von 8 % bereits die Differenzierung TSC in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten beeinflussen<sup>229</sup>. Die Art sowie auch die Intensität der Belastung bzw. Dehnung hat also einen entscheidenden Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften einer Sehne und im Besonderen auf die Differenzierung von Sehnenstammzellen (TSC) in Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten und auch Tenozyten<sup>230</sup>.

Durch die Erkenntnisse rezenterer Studien konnte Pauwels Theorie weiterentwickelt und für die Interpretation von Knochenbildung in Sehnengewebe adaptiert werden. Die neuen Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass Tenozyten bzw. TSC unter gewissen

Umgebungsbedingungen fehlerhaft differenzieren und zur ektopen Knochenbildung führen. Rooney et al. konnten die ektote Knochenbildung in Achillessehnen nach zentraler Tenotomie der direkten Konversion von Sehne in Knorpelgewebe zurechnen<sup>231</sup>. Rui et al. vermuten, dass die Veränderung der biologischen und mechanischen Umgebung der Sehne zur Dedifferenzierung der TSC in Osteozyten bzw. Chondrozyten führt<sup>232</sup>.

Aus diesen Erkenntnissen ist daher anzunehmen, dass es in unserer Studie bei der Anwendung der Rahmennaht in den operierten Versuchsgruppen zu einem unspezifischen Stimulus auf das Scaffoldimplantat bzw. auf bereits gebildetes Granulationsgewebe (Defektgruppe) kam und dieser zur osteogenen Differenzierung der implantierten Tenozyten beitrug.

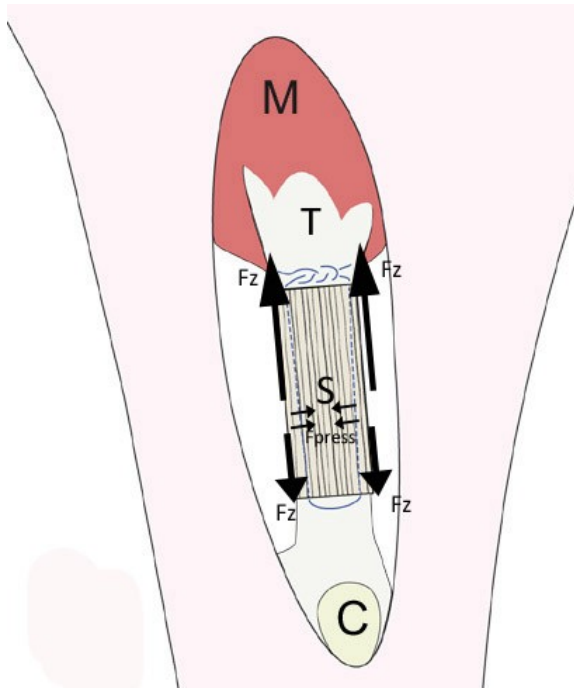
Da es unabhängig der Versuchsgruppen in allen Regeneraten zu ektopen, zentralen Ossifikationen kam, kann davon ausgegangen werden, dass das Totaldefektmodell bzw. die Rahmennaht der entscheidende Faktor in der Bildung von Verknöcherungen war, und nicht die verwendeten Scaffolds, die Tenozyten oder die mesenchymalen Stammzellen (s. Dissertation von Frankewycz<sup>1</sup>).

Es ist anzunehmen, dass es aufgrund des Totaldefektes bzw. der benutzten Rahmennaht unerwarteterweise zu inadäquaten Belastungsstimuli im Regenerat kam.

Bei jeder Plantarflexion der Ratte entstand womöglich nicht nur eine parallel verlaufende Zugspannung bzw. Dehnung (Fz) über die Rahmennaht, durch die starke Spannung der peripher gelegenen Fäden kam es zusätzlich zu einem nach innen bzw. senkrecht gerichteten Druck (Fpress) von beiden Seiten auf den zentralen Teil des Scaffolds (siehe Abb. 37).

Dieser unerwünscht entstandene Druck (Fpress) auf das Scaffoldimplantat kombiniert mit der Zugspannung kann im Sinne eines hydrostatischen Drucks bzw. Dehnung wie von Pauwels in seiner Theorie der „Kausalen Histiogenese“ beschrieben, zur Bildung von Bindegewebe bzw. Knorpelgewebe geführt haben<sup>60</sup>. Pauwels zufolge diente das Stützgewebe als schützendes, die mechanische Belastung aufnehmendes Gerüst für die Vorläuferzellen des Knochengewebes und führte so zur Bildung von desmalen bzw. chondralen Ossifikationen.

Es ist bereits bekannt, dass mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitorzellen aus der Blutbahn in das Wundgebiet bzw. die Regeneratstelle einwandern und Ossifikationen stimulieren können<sup>233-235</sup>.



**Abb. 37** Kräfte die bei Muskelzug auf die Sehne bzw. das Scaffold einwirken. M = Muskel; T = Sehne; S = Scaffold; C = Kalkaneus; Fz = Zug; Fpress = Druck. Modifiziertes Schema von Frankewycz<sup>1</sup>.

Die Untersuchungen der Forschungsgruppe um Claes zeigen weiterhin, dass zur Bildung von Knochengewebe stets ein gewisser Druck sowie eine Dehnung vorhanden sein müssen. Bei geringen Dehnungen um die  $\pm 5\%$  und einem hydrostatischen Druck von  $\pm 0,15$  Mpa kommt es überwiegend zu einer desmalen Ossifikation. Bei stärkerer Dehnung im Bereich von  $\pm 15\%$  und Drücken unter  $-0,15$  Mpa tritt eher eine chondrale Ossifikation auf<sup>236-239</sup>.

In unserer Versuchsgruppe D (Defekt ohne Scaffold und ohne Tenozyten) kam es anscheinend zu einer spontanen Heilung der Sehne, im Sinne einer Überbrückung des Defektes mit Granulationsgewebe, wie sie Lipscomb et al. in früheren Versuchen auch bereits aufzeigen konnten<sup>240</sup>. Möglich ist, dass

sich in unserem Versuch frühzeitig einzelne Sehnenstränge bildeten, auf die sich die anfängliche Zugspannung konzentrierte. Anschließend kam es konsekutiv, wie oben beschrieben, zu einem unspezifischen Reiz, der zur Bildung von Knochengewebe beitrug.

Dieser Theorie zufolge scheint es im Bereich der Rahmennaht zu einem spezifischen, tenogenen Reiz in der Peripherie der Sehne gekommen zu sein, da dieser Sehnenteil im Aufbau und der Struktur dem nativer Sehnen entspricht (s. histologische und elektronenmikroskopische Ergebnisse).

Auch in bereits publizierten Studien über das TE von Sehnen in vivo wurden ektopische Knochenbildung beschrieben. Je nach Versuchsmodell und verwendeter Zellart kam es zu unterschiedlicher Ausprägung von Ossifikationen. Die meisten Studienmodelle benutzten MSC in einem Partialdefektmodell<sup>9 198 241</sup>. Beispielsweise verwendeten Awad et al. autologe MSC in einem Partialdefektmodell von Patellarsehnen bei Hasen. In 28 % der Proben konnten bei der Auswertung Verknöcherungen nachgewiesen werden<sup>9</sup>. Chen et al. implantierten Tenozyten auf zwei unterschiedlichen Scaffolds in einen Partialdefekt von Sehnen der Rotatorenmanschette von Hasen. In 2 Proben konnten Ossifikationen beobachtet werden<sup>13</sup>.

Im Gegensatz dazu setzte Cao et al. in einem Totaldefektmodell Tenozyten in Hühner-Beugesehnen ein und ermöglichte damit eine Sehnenregeneration ohne Ossifikationen<sup>8</sup>.

Die Wahl des Defektmodells bzw. der Nahttechnik scheinen in Anbetracht dieser Erkenntnisse eine entscheidende Rolle zu spielen und sind als eine der Ursache für Verknöcherungen in den Sehnenregeneraten anzusehen. Kritisch betrachtet sind die vorliegenden unterschiedlichen Ergebnisse jedoch schwierig zu vergleichen. Dabei sei insbesondere auf die einzelnen Abweichungen in den Versuchsmodellen und auf die unterschiedlichen Tiermodelle hingewiesen.

### **Hypoxie induziert über HIF-1 $\alpha$ und VEGF die Chondro- und Osteogenese**

Hinreichend bekannt ist, dass ein Sauerstoffmangel im Knochengewebe ein wichtiger Trigger von HIF-1  $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) und VEGF ist und zur Angiogenese und Osteogenese beiträgt<sup>242-245</sup>. Dies könnte eine weitere Erklärung als Ursache für die ektopen Verknöcherungen in unseren Sehnenregeneraten sein.

Auch in Sehnen konnte Petersen et al. zeigen, dass Tenozyten von Ratten, welche einem Sauerstoffmangel in vitro ausgesetzt waren, vermehrt VEGF produzierten<sup>246</sup>. Neuere Forschungsergebnisse gehen mittlerweile davon aus, dass eine Hypoxie-bedingte Freisetzung von HIF-1  $\alpha$  und VEGF in Sehnen eine entscheidende Rolle in der Chondro- und Osteogenese sowie in der Entstehung von ektopen Ossifikationen spielt<sup>247-249</sup>.

Diese Erkenntnisse passen mit unseren Auswertungen aus Histologie, Immunhistochemie und TEM überein. Im Inneren des Scaffolds bzw. des Defektes kam es aufgrund der Gefäßdurchtrennung beim Setzen des Totaldefekts zu einer längerfristigen Hypoxie, welche der Anstoss für die beschriebene kaskadenartige Freisetzung an verschiedenen Faktoren gewesen sein könnte und letztendlich zu den teils irreversiblen ektopen Ossifikationen führte. Hingegen zeigte sich bei der Bildung neuen Sehnengewebes an der Oberfläche der Regenerate – im Aufbau und Struktur nativer Sehnen entsprechend – eine frühe Einsprossung von Blutgefäßen (s. auch makroskopische Ergebnisse), die scheinbar einen länger andauernden Sauerstoffmangel und somit eine Osteogenese verhindert haben könnte.

### **4.2.3. Einfluss der unterschiedlichen Scaffolds auf die Sehnenheilung**

Nach 48 h Besiedelungszeit zeigte sich auf dem PGA-Scaffold insgesamt eine homogene Verteilung der Tenozyten. Diese gleichmäßige Verteilung in den weichen und lockeren PGA-Scaffolds könnte eventuell auf die strukturelle Musterung der PGA-Fasern und die homogene Porenverteilung zurückgeführt werden.



Bei den Kollagenscaffolds hingegen konzentrierten sich die Tenozyten überwiegend auf den oberflächlichen Teil der Schwammschicht. Die Abwanderung der Tenozyten aus der oberflächlichen in die tiefe Schicht wurde wahrscheinlich durch die starre Struktur des Schwammes wie auch durch die querliegenden Fasern der unteren Schicht erschwert.

Um eine Verbesserung der Zellbesiedelung auf den Kollagenscaffolds zu erreichen wäre eventuell von Vorteil, das Medium/Zell-Verhältnis zu erhöhen um eine flüssigere Zellemlusion zu erzeugen. Als eine andere Möglichkeit käme eine Erhöhung der Besiedelungszeit in Frage, um den Zellen genügend Zeit beim Abwandern zu geben.

Jedoch konnte die Präsenz der implantierten männlichen Tenozyten in allen explantierten Sehnenproben weiblicher Ratten mittels PCR-Nachweis des SRY-Gens bestätigt werden. Kryger et al. vermutete zudem, dass die Tiefe des Eindringens und die Verteilung der Zellen in das Scaffold *in vitro* nicht auf die Eindringtiefe und Verteilung der Zellen *in vivo* übertragbar ist<sup>12</sup>.

Eine rezent erschienene Arbeit um die Forschergruppe Zi Yin et al. konnte weiterhin nachweisen, dass die Ausrichtung der Scaffoldfasern eine entscheidende Rolle in der Regeneration der Sehne spielt<sup>250</sup>. Hierbei besiedelte Zi Yin synthetische Scaffolds, die parallel und nicht-parallel ausgerichtete Fasern beinhalteten, mit humanen Sehnenstammzellen (TSC). Die parallel ausgerichteten Fasern unterschieden sich im Winkel maximal zwischen 0 – 10 ° in Bezug auf die vertikale Achse. Diese besiedelten Scaffolds wurden in entsprechenden *in vitro* und *in vivo* Experimenten verwendet, um das jeweilige Regenerationspotential zu ermitteln. Die Proben mit den parallel ausgerichteten Scaffoldfasern wiesen eine sehnengerechte Regeneration auf. Die Morphologie und die Ausrichtung der Tenozyten entsprach der nativer Sehnen. Die Expression von sehnenspezifischen Genen unterstützte die Differenzierung der TSC in Tenozyten. Auch war die Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  erhöht. Diese Integrine fördern die Ausrichtung der Zellen und des Kollagen parallel zur Beanspruchung<sup>251</sup>. Die TSC auf diesen Scaffolds vermieden sogar die Differenzierung in Osteozyten (Ossifikation) in einem knochenstimulierenden Medium. Die Zellen auf den nicht-parallel ausgerichteten Scaffoldfasern hingegen besaßen keine tenozytentypischen Ausläufer und waren nicht einheitlich ausgerichtet. Zudem war die Expression der knochenspezifischen Gene erhöht.

Es scheint demnach, dass das Scaffold mit parallel ausgerichteten Fasern die Differenzierung der TSC in Tenozyten stimuliert und hierdurch die Sehnenregeneration gefördert sowie die Differenzierung der Zellen in Knochenzellen unter osteogenen Konditionen verhindert wird.

Die Topografie der EZM spielt ebenso eine wichtige Rolle in der zellulären Aktivität, von der Adhäsion und Morphologie bis zur Proliferation und Differenzierung<sup>252-255</sup>. Die elastische Kapazität der EZM und das Substratmuster beeinflussen die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC)<sup>256 257</sup>. Ebenso bekannt ist, dass das Umfeld der humanen TSC vorwiegend aus parallel ausgerichteten Kollagenfasern besteht und dieses in großem Maße die Funktion und Differenzierung der Sehnenstammzellen (TSC) beeinflusst<sup>16 212 258</sup>. Es ist somit anzunehmen, dass die nicht-parallele Ausrichtung der Fasern in den von uns verwendeten Kollagen- und PGA-Scaffolds eventuell einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Heilung hatten.

Zusätzlich ist bekannt, dass es beim schnellen hydrolytischen Abbau des PGA-Scaffold zur Inflammation kommt<sup>259</sup>. Diese toxischen Abbauprodukte, wie Glykolsäure und Milchsäure, verschieben den pH-Wert in den sauren Bereich<sup>260</sup>.

In der genaueren Auswertung der Scaffoldgruppen mit MSC und ohne Zellen, war die Sehnenquerschnittsfläche der Regenerate signifikant größer als die der nativen Sehne ( $p < 0,01$ ,  $p > 0,001$ ). Ebenso war auch der Ossifikationsanteil in diesen Scaffoldgruppen erhöht (zum Teil signifikant,  $p < 0,01$ ) und somit die maximale Versagenslast pro Querschnittsfläche signifikant ( $p < 0,001$ ) vermindert im Vergleich zu den mit Tenozyten behandelten Versuchsgruppen. Jedoch waren die Scaffoldgruppen, die mit Tenozyten behandelt nicht signifikant unterlegen in Bezug auf die maximale Versagenslast nativer Sehnen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Art des Scaffold in diesem Versuch keinen ausschlaggebenden Faktor ausmacht. Tendenziell führten die Tenozyten zu einer Verbesserung des Outcomes. Unsere Hypothese, dass die Scaffolds PGA und Col I einen signifikanten Einfluss auf das Outcome haben (Hypothese 3), kann demzufolge nicht bestätigt werden.

#### **4.2.4. Einfluss der Tenozyten auf die Sehnenregeneration**

Wie bereits erwähnt, zeigte sich in allen Regeneraten eine Vergrößerung der Sehnenquerschnittsfläche im Vergleich zu nativen Sehnen. Dies könnte zum Einen auf den physiologischen Heilungsprozess bzw. die Heilungsphase von rupturierten Sehnen zurückgeführt werden: Bruns et al. konnte nachweisen, dass die Sehnenquerschnittsfläche von tenotomierten Achillessehnen bei Schafen nach 3-monatiger konservativer Therapie vergrößert war<sup>261</sup>. Auch bei der Behandlung von rupturierten Sehnen mit Unterstützung zellbesiedelter Scaffolds konnten bereits verdickte Sehnen beobachtet werden, die sich nach 3 Monaten postoperativ meist jedoch wieder verringerten<sup>8 9 13 196</sup>.

Zum Anderen könnte der Grund für die vergrößerten Sehnenquerschnitte die Verknöcherungen sein, die in allen Proben vorhanden waren. Wir konnten in unseren Gruppen hinsichtlich des Sehnenquerschnitts und der prozentualen Verknöcherungsfläche einen Zusammenhang erkennen. Bei der Auswertung unserer Ergebnisse zeigte sich eine deutliche Verminderung der Knochenfläche in den Gruppen, bei denen auch der Sehnenquerschnitt im Vergleich zu den anderen Gruppen geringer war. Dabei waren die Ossifikationen der Gruppe PGA + TC signifikant geringer als die der Gruppe PGA + MSC ( $p < 0,01$ ). Signifikant war auch der Unterschied zwischen den Gruppen Col I + TC und Col I ( $p < 0,05$ ) sowie den Gruppen Naht + TC und Col I ( $p < 0,05$ ) und zwischen Naht + TC und PGA + MSC ( $p < 0,05$ ).

In der Zusammenschau der Ergebnisse wird deutlich, dass die Regenerate durch die Verwendung von Tenozyten unabhängig von den verwendeten Scaffold-Materialien eine geringere Querschnittsfläche aufzeigten.

Es scheint als könnten die Tenozyten die Ossifikationen zwar nicht verhindern, wohl aber sind die mit Tenozyten behandelten Sehnen im Querschnitt schmaler. Dieser „Vorteil“ scheint mit einer Reduktion der Ossifikation einher zu gehen und so im Verlauf zu einer besseren Reißkraft bzw. Sehnenfunktion zu führen.

Betrachtet man nun hierbei auch die funktionellen Auswertungen der Biomechanik (maximale Zuglast pro Querschnitt), dann unterschied sich die maximale Zuglast pro Querschnitt der Gruppen PGA + TC, Col I + TC, Defekt und Naht + TC nicht signifikant von der Nativgruppe. Die leeren Scaffold-Gruppen und die mit MSC-behandelten Gruppen hingegen besaßen eine signifikant schlechtere Zuglast als die native Sehne ( $p < 0,001$ ).

Wie bereits beschrieben, zeigte sich bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Scaffolds (PGA und Kollagen I) kein Einfluss auf eine optimierte Sehnenheilung. Allein der Einfluss der Tenozyten scheint also eine Verbesserung der Zuglast pro Querschnittsfläche zu induzieren, die vergleichbar mit der Zugkraft nativer Sehnen ist. Diese Behauptung wird dadurch unterstützt, dass die leeren Scaffoldgruppen sich untereinander nicht signifikant unterschieden. Und auch die mit MSC-behandelten Gruppen (PGA + MSC und Col I + MSC) waren weniger widerstandsfähig als die mit Tenozyten besiedelten Scaffoldgruppen.

Die Ossifikationen in den Regeneraten sind, wie bereits erwähnt, durch die Rahmennaht bzw. das Totaldefekt bedingt. Die Verwendung von Tenozyten erzeugt unabhängig vom verwendeten Scaffold zu einer besseren Sehnebelastung im Vergleich zu den MSC-Gruppen.

Somit kann unsere Hypothese 2, dass die Implantation von Tenozyten im Vergleich zu MSC zu einem verbesserten Outcome führt, bestätigt werden.

### 4.3. Limitierungen

Wie bereits beschrieben haben Tenozyten gewebs- und spezienspezifischen Eigenschaften. Scutt et al.<sup>262</sup> konnte Unterschiede im Proliferationsverhalten und der Expression von Zellmarkern von Tenozyten aus verschiedenen Lokalisationen und Spezies (Mensch und Ratte) nachweisen. Diese Tatsache sollte bei der Ergebnisübertagung von Ratten auf eine andere Spezies mit berücksichtigt werden. Verschiedene angeborene biologische Variabilitäten, metabolische und hormonelle Unterschiede zum Menschen sowie Noncompliance sollte ebenfalls mit in Betracht gezogen werden bei der klinischen Anwendung von *in vivo* gewonnenen Versuchsergebnissen in Tiermodellen.

Ein weitere Limitierung ist die Tatsache, dass es bei Achillessehnenrupturen von Ratten zur spontanen Heilung kommen kann<sup>240</sup>. Auch wir konnten zeigen, dass bei den Sehnenregeneraten einer Versuchsgruppe (Versuchsgruppe „Defekt“) die Lücke allein durch eine spontane Heilung überbrückt werden konnte. Dies gilt jedoch nicht bzw. nur in eingeschränktem Maße für die Rupturen humaner Achillessehnen oder anderen humanen Sehnen wie der Rotatorenmanschette-Sehnen oder dem VKB.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt sind bestimmte Arten von humanen Achillessehnenrupturen unter gewissen Voraussetzungen konservativ zu behandeln. Durch die relativ adäquate Adaption der zwei Sehnenstümpfe der Achillessehne mithilfe der Spitzfußposition kann die Voraussetzung für eine Sehnenheilung erreicht werden. Für die Sehnen der RMR bzw. VKBR ist dies nicht der Fall, weshalb diese Sehnen einer spontanen Heilung auch nicht zugänglich sind.

Dass die Defektgruppe den Tenozytengruppen insgesamt nicht unterlegen war und sich auch nicht signifikant von der Nativgruppe unterschied, kann andererseits auch am Defektmodell und im Besonderen an der Rahmennaht liegen. Da in der Defektgruppe keine Rahmennaht angewandt wurde, konnte sich der oben beschriebene negative Effekt (inadäquater tenogener Stimulus) nicht auf die gleiche Art und Weise auf das Sehnenregenerat ausgewirkt haben. Aus diesem Grund sei zu bedenken, dass die Defektgruppe nicht unmittelbar mit den restlichen Gruppen verglichen werden kann.

Die Implantation von Tenozyten auf die bereits genähte Sehne (Gruppe Naht + TC) führte zur Optimierung der Sehnenfunktion bei den Regeneraten. Leider fehlen Erkenntnisse zur Implantation von MSC in einer solchen Versuchsgruppe (z.B. Naht + MSC), d.h. ob auch die reine Implantation von MSC unabhängig von Scaffolds zu einer "verbesserten" Sehnenheilung führen würde, wie bei den Tenozytengruppen schon gezeigt. In der Planung der Studie haben wir uns ganz bewusst nur für die vielversprechendste Zellart (Tenozyten) entschieden, um den Einfluss der Zellen auf die Sehnenheilung im Allgemeinen weiter zu untersuchen. Trotz allem ist dies als eine methodische Limitierung anzusehen.

#### 4.4. Ausblick

Im verwendeten Totaldefekt-Modell kommt es bei der Rahmennaht zu nicht-tenogenen Stimuli, die zu histologisch nachweisbaren Ossifikationen führen und konsekutiv die biomechanische Funktion der Sehne beeinträchtigen können. Weitere Studien mithilfe von nahtfesten Scaffolds und parallel ausgerichteten Fasern (s. oben) wären hilfreich, um eine verbesserte Kraftübertragung, eine optimierte Überbrückung und somit eine Vermeidung von Ossifikationen zu erreichen. Eine Weiterentwicklung sogenannter „smart biomaterials“<sup>263</sup>, die alle Aspekte der EZM und des zu behandelnden Gewebes in Betracht ziehen, wäre in diesem Zusammenhang besonders wünschenswert.

Hinsichtlich der verhältnismäßig langen Heilungszeit von Sehnen und der erwähnten Umstrukturierung im Bereich des Regenerates wären weitere Studien erforderlich, die die Regenerate auch auf längere Sicht (z.B. 6 – 12 Monate) auf Verknöcherungen untersuchen. Interessant wäre zu erfahren, ob die Regenerate dann im Verlauf, nach einer längeren Erholungsphase, mit adäquaten Stimuli in einem ähnlichen Versuchsmodell die Verknöcherungen eventuell komplett zurückbilden.

Weiterhin bleibt das „Tissue Engineering“ von Sehnen ein weites Forschungsfeld mit dem Ziel der optimierten Sehnenheilung und einer Vielzahl an Ansatzmöglichkeiten<sup>264</sup>. Mittlerweile sind auch die Sehnenstammzellen zunehmend in den Fokus gerückt<sup>11</sup>, hier bleibt abzuwarten welche Vorteile diese Zellen auf die optimierte Sehnenheilung haben.

## **5. Zusammenfassung**

### **Zielsetzung und Fragestellung:**

Das Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung, ob sich durch die Anwendung von Tenozyten in einem Totaldefektmodell, die Achillessehnen von Ratten *de novo* regenerieren und den histologischen und biomechanischen Eigenschaften nativer Sehne, ohne Bildung von Ossifikationen, entsprechen. Außerdem wurde untersucht, ob mit oder ohne Hilfe von zwei unterschiedlichen Scaffolds aus Polyglycolsäure (PGA) und Kollagen, die Verwendung von Tenozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen zu einer Verbesserung des Outcomes führt.

### **Material und Methoden:**

Die Tenozyten wurden aus dem Schwanz von männlichen Ratten gewonnen und in der Zellkultur isoliert und vermehrt. In einem weiteren Schritt wurden diese auf die PGA- und Kollagenscaffolds versetzt und in toto in einen Totaldefekt (3 mm) einer Achillessehne einer weiblichen Ratte über eine Rahmennaht eingefügt. Die Gruppen mit den Scaffolds ohne Zellbesiedelung sowie den Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. B. Frankewycz durchgeführt und zum direkten Vergleich herangezogen<sup>1</sup>. In zwei weiteren Vergleichsgruppen wurde einmal der Defekt mithilfe einer Rahmennaht und zusätzlicher Implantation von Tenozyten überbrückt und einmal der Totaldefekt belassen ohne jegliche Überbrückungshilfe oder Implantation von Zellen (Defekt-Gruppe). 16 Wochen nach Implantation wurden die Regenerate gewonnen und histologisch, immunhistologisch und elektronenmikroskopisch analysiert. Zudem wurde die maximale Reißkraft pro Querschnittsfläche sowie die Verknöcherungsfläche ermittelt, statistisch untersucht sowie das SRY-Gen der implantierten Zellen in den weiblichen Regeneraten per PCR nachgewiesen.

### **Ergebnisse:**

In allen operierten Versuchsgruppen wiesen die Sehnenregenerate Verknöcherungen auf. Jedoch war der prozentuale Anteil der Verknöcherungsfläche bei den Tenozyten-behandelten Gruppen insgesamt niedriger als bei den MSC-behandelten Gruppen. In den histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen waren die Ossifikationen gruppenunabhängig ausschließlich in den tiefen zentralen Anteilen der Regenerate (Kern) zu finden. Im oberflächlichen Teil der Sehne war vorwiegend neu gebildetes Sehngewebe

ohne Verknöcherungen vorhanden. Die biomechanischen Ergebnisse konnten zeigen, dass sich die maximale Reißkraft pro Querschnittsfläche der mit Tenozyten-behandelten Gruppen sowie auch in der Defekt-Gruppe im Gegensatz zu den scaffoldfreien und mit MSC-behandelten Gruppen im Vergleich zur Nativsehne nicht unterschied. Mittels PCR konnten die implantierten Tenozyten in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

### **Schlussfolgerungen:**

Die Ossifikationen konnten in allen operierten Regeneraten inklusive den Gruppen ohne Scaffold bzw. ohne Zellimplantation und unabhängig von der Zellart oder dem Scaffold nachgewiesen werden. Wir führten diese unerwünschten Verknöcherungen im Inneren des Regenerats überwiegend auf das Totaldefektmodell zurück. Einerseits kann es durch die angewandte Rahmennaht zu einem nicht tenogenen Stimulus in diesem Bereich und konsekutiv zur Dedifferenzierung der Tenozyten bzw. zu einem osteogenen Reiz gekommen sein. Andererseits können die Verknöcherungen nach erfolgter Durchtrennung der Gefäße im Defekt-Bereich ebenfalls zur hypoxisch-induzierten Osteogenese geführt haben. Erfreulich waren erkennbare Umstrukturierungsprozesse im den Verknöcherungen, die im Sinne einer Umwandlung von Knochen in Sehnen gewertet werden können.

Nach dieser Theorie kann die Bildung von Sehnengewebe im peripheren, oberflächlichen Teil der Regenerate ein Hinweis darauf sein, dass durch den Zug der Rahmennaht ein adäquater tenogener Reiz auf die Zellen vorherrschte bzw. eine frühere Heilung durch das schnellere Einwachsen von Blutgefäßen in den oberflächlichen Teil stattfand.

Hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften war deutlich, dass sich die mit Tenozyten-behandelten Gruppen unabhängig vom Scaffold, nicht von der Reißkraft der nativen Sehne unterschieden. Die Tenozyten schienen die Entstehung von Verknöcherungen und den damit einhergehenden vergrößerten Sehnenquerschnitten sowie die reduzierte biomechanische Funktion der Regenerate abgemildert zu haben bzw. waren die Tenozyten aufgrund ihres Differenzierungsstatus besser in der Lage aus der Ausgangssituation erneut funktionsfähiges Sehnengewebe zu bilden. Auch die Defekt-Gruppe unterschied sich in der maximalen Reißkraft pro Querschnittsfläche nicht von einer nativen Sehne.

Die Achillessehnenruptur kann unter bestimmten Umständen spontan heilen. Deshalb können die Ergebnisse dieser Gruppe nicht auf andere Sehnen wie z.B. die der Rotatorenmanschette übertragen werden und somit stellt das Modell der Achillessehne in dieser Form eine Limitierung der Studie dar.

Abschließend wird durch unsere Studie sichtbar, dass weder die unterschiedlichen Scaffolds noch die MSC, sondern allein die Tenozyten das Outcome in dem hier angewandten Totaldefektmodell verbesserten.



## Literaturverzeichnis

1. Frankewycz B. Untersuchung der Sehnenregeneration mittels zellbesiedelter (BMSC und MSC) resorbierbarer Scaffolds am Achillessehnenmodell der Ratte. Dissertation, LMU München: Faculty of Medicine Ludwig-Maximilians-Universität München, 2013.
2. Sharma P, Maffulli N. Tendinopathy and tendon injury: the future. *Disabil Rehabil* 2008;30(20-22):1733-45.
3. Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin* 2005;10(2):255-66.
4. Towler DA, Gelberman RH. The alchemy of tendon repair: a primer for the (S)mad scientist. *J Clin Invest* 2006;116(4):863-6.
5. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16(4):406-13.
6. Nirmalanandhan VS, Rao M, Shearn JT, Juncosa-Melvin N, Gooch C, Butler DL. Effect of scaffold material, construct length and mechanical stimulation on the in vitro stiffness of the engineered tendon construct. *J Biomech* 2008;41(4):822-8.
7. Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Shearn JT, Gooch C, et al. Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res* 2008;26(1):1-9.
8. Cao Y, Liu Y, Liu W, Shan Q, Buonocore SD, Cui L. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. *Plast Reconstr Surg* 2002;110(5):1280-9.
9. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003;21(3):420-31.
10. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 1999;5(3):267-77.
11. Mir S, Mafi R, Mafi P, Khan W. Tissue Engineering In Achilles Tendon Reconstruction: A Systematic Review Of Preclinical Studies. *Curr Stem Cell Res Ther* 2017.
12. Kryger GS, Chong AK, Costa M, Pham H, Bates SJ, Chang J. A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering. *J Hand Surg Am* 2007;32(5):597-605.
13. Chen JM, Willers C, Xu J, Wang A, Zheng MH. Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits. *Tissue Eng* 2007;13(7):1479-91.
14. Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:10.
15. Drenckenhahn DA, Benninghoff, editor. *Anatomie; Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 17 ed. München: Elsevier, 1942.
16. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10(6):312-20.
17. Benjamin M, Kaiser E, Milz S. Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat* 2008;212(3):211-28.
18. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7(2):55-61.
19. Milz S, Ockert B, Putz R. [Tenocytes and the extracellular matrix : a reciprocal relationship]. *Orthopade* 2009;38(11):1071-9.

20. Schiebler T.H KH. Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates. *Anatomie*. Heidelberg: Steinkopff, 2007.
21. Zschabitz A. [Structure and behavior of tendons and ligaments]. *Orthopade* 2005;34(6):516-25.
22. Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat* 1998;193 ( Pt 4):481-94.
23. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 7):1341-53.
24. Bonfanti L, Mironov AA, Jr., Martinez-Menarguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, et al. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 1998;95(7):993-1003.
25. Liu Y, Ramanath HS, Wang DA. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. *Trends Biotechnol* 2008;26(4):201-9.
26. Bozec L, van der Heijden G, Horton M. Collagen fibrils: nanoscale ropes. *Biophys J* 2007;92(1):70-5.
27. Franchi M, Trire A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal* 2007;7:404-20.
28. Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, et al. Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5(1):5-21.
29. Franchi M, Fini M, Quaranta M, De Pasquale V, Raspanti M, Giavaresi G, et al. Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. *J Anat* 2007;210(1):1-7.
30. McNeilly CM, Banes AJ, Benjamin M, Ralphs JR. Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat* 1996;189 ( Pt 3):593-600.
31. Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5(1):22-34.
32. Boykiw R, Sciore P, Reno C, Marchuk L, Frank CB, Hart DA. Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. *Matrix Biol* 1998;17(5):371-8.
33. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* 2002;17(7):1180-9.
34. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997;136(3):729-43.
35. Frank CB, Hart DA, Shrive NG. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(1):130-40.
36. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-52.
37. Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, et al. Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. *J Orthop Res* 2000;18(4):517-23.
38. Vogel KG, Trotter JA. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res* 1987;7(2):105-14.
39. Kalamajski S, Oldberg A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 2010;29(4):248-53.
40. Ameye L, Aria D, Jepsen K, Oldberg A, Xu T, Young MF. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J* 2002;16(7):673-80.

41. Canty EG, Kadler KE. Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002;133(4):979-85.
42. Edom-Vovard F, Duprez D. Signals regulating tendon formation during chick embryonic development. *Dev Dyn* 2004;229(3):449-57.
43. Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, et al. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 2001;128(19):3855-66.
44. Docheva D, Hunziker EB, Fassler R, Brandau O. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol* 2005;25(2):699-705.
45. Provenzano PP, Vanderby R, Jr. Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol* 2006;25(2):71-84.
46. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 4. Mechanical influences on intact fibrous tissues. *Anat Rec* 1990;226(4):433-9.
47. Hansen KA, Weiss JA, Barton JK. Recruitment of tendon crimp with applied tensile strain. *J Biomech Eng* 2002;124(1):72-7.
48. Holmes DF, Graham HK, Trotter JA, Kadler KE. STEM/TEM studies of collagen fibril assembly. *Micron* 2001;32(3):273-85.
49. Kannus P, Natri A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7(2):107-12.
50. Birch HL, Bailey JV, Bailey AJ, Goodship AE. Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. *Equine Vet J* 1999;31(5):391-6.
51. Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Kvist M, Hurme T, et al. Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *J Cell Sci* 1999;112 Pt 18:3157-66.
52. Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23(3):245-54.
53. Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13(4):211-23.
54. Patterson-Kane JC, Parry DA, Birch HL, Goodship AE, Firth EC. An age-related study of morphology and cross-link composition of collagen fibrils in the digital flexor tendons of young thoroughbred horses. *Connect Tissue Res* 1997;36(3):253-60.
55. Wood TO, Cooke PH, Goodship AE. The effect of exercise and anabolic steroids on the mechanical properties and crimp morphology of the rat tendon. *Am J Sports Med* 1988;16(2):153-8.
56. Jarvinen TA, Kannus P, Paavola M, Jarvinen TL, Jozsa L, Jarvinen M. Achilles tendon injuries. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13(2):150-5.
57. Nakagawa Y, Totsuka M, Sato T, Fukuda Y, Hirota K. Effect of disuse on the ultrastructure of the achilles tendon in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1989;59(3):239-42.
58. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Hirschwald, 1892.
59. Roux W, editor. *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen*: Leipzig : Wilhelm Engelmann, 1895.
60. Pauwels F. [A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure]. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1960;121:478-515.
61. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 2006;39(9):1563-82.

62. Buchanan CI, Marsh RL. Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002;133(4):1101-7.
63. Crockett RJ, Centrella M, McCarthy TL, Grant Thomson J. Effects of cyclic strain on rat tail tenocytes. *Mol Biol Rep* 2010;37(6):2629-34.
64. Hannafin JA, Arnoczky SP, Hoonjan A, Torzilli PA. Effect of stress deprivation and cyclic tensile loading on the material and morphologic properties of canine flexor digitorum profundus tendon: an in vitro study. *J Orthop Res* 1995;13(6):907-14.
65. Kannus P, Jozsa L, Natri A, Jarvinen M. Effects of training, immobilization and remobilization on tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7(2):67-71.
66. Michna H, Hartmann G. Adaptation of tendon collagen to exercise. *Int Orthop* 1989;13(3):161-5.
67. Hoffmann A, Gross G. Tendon and ligament engineering: from cell biology to in vivo application. *Regen Med* 2006;1(4):563-74.
68. Kieny M, Chevallier A. Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. *J Embryol Exp Morphol* 1979;49:153-65.
69. Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 1998;125(20):4019-32.
70. Kellis E. Quantification of quadriceps and hamstring antagonist activity. *Sports Med* 1998;25(1):37-62.
71. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *Eur J Appl Physiol* 2001;86(1):48-52.
72. Yang G, Crawford RC, Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech* 2004;37(10):1543-50.
73. Janmey PA. Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3(1):4-11.
74. Ingber D. How cells (might) sense microgravity. *FASEB J* 1999;13 Suppl:S3-15.
75. Langberg H, Rosendal L, Kjaer M. Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 2001;534(Pt 1):297-302.
76. Curwin SL, Vailas AC, Wood J. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J Appl Physiol* 1988;65(5):2297-301.
77. Yasuda T, Kinoshita M, Abe M, Shibayama Y. Unfavorable effect of knee immobilization on Achilles tendon healing in rabbits. *Acta Orthop Scand* 2000;71(1):69-73.
78. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6(2):181-90.
79. Kannus P, Paavola M, Paakkala T, Parkkari J, Jarvinen T, Jarvinen M. [Pathophysiology of overuse tendon injury]. *Radiologe* 2002;42(10):766-70.
80. Hess GW. Achilles tendon rupture: a review of etiology, population, anatomy, risk factors, and injury prevention. *Foot Ankle Spec* 2010;3(1):29-32.
81. Lin TW, Cardenas L, Soslowky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004;37(6):865-77.
82. Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73(10):1507-25.
83. Jozsa L, Lehto M, Kvist M, Balint JB, Reffy A. Alterations in dry mass content of collagen fibers in degenerative tendinopathy and tendon-rupture. *Matrix* 1989;9(2):140-6.

84. Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, Rosager S, Hanson P, Aagaard P, et al. Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix Biol* 2002;21(4):369-77.
85. Tillander B, Franzen L, Norlin R. Fibronectin, MMP-1 and histologic changes in rotator cuff disease. *J Orthop Res* 2002;20(6):1358-64.
86. Dressler MR, Butler DL, Wenstrup R, Awad HA, Smith F, Boivin GP. A potential mechanism for age-related declines in patellar tendon biomechanics. *J Orthop Res* 2002;20(6):1315-22.
87. Frankewycz B. Untersuchung zweier bioresorbierbarer Matrizen (PGA und Kollagen I) auf ihr tenogenes Regenerationspotential unter Einfluss zweier unterschiedlich vorbehandelter mesenchymaler Stammzellen (BMSC und MSC) beim Totaldefekt der Achillessehne der Ratte Ludwig-Maximilians-Universität München, 2012.
88. Seradge H. Elongation of the repair configuration following flexor tendon repair. *J Hand Surg Am* 1983;8(2):182-5.
89. Moller HD, Evans CH, Maffulli N. [Current aspects of tendon healing]. *Orthopade* 2000;29(3):182-7.
90. Lapiere CM, Nusgens B, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res* 1977;5(1):21-9.
91. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand* 2000;71(5):513-8.
92. Hildebrand KA, Woo SL, Smith DW, Allen CR, Deie M, Taylor BJ, et al. The effects of platelet-derived growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study. *Am J Sports Med* 1998;26(4):549-54.
93. Chan BP, Fu SC, Qin L, Rolf C, Chan KM. Supplementation-time dependence of growth factors in promoting tendon healing. *Clin Orthop Relat Res* 2006;448:240-7.
94. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med* 1999;27(3):363-9.
95. Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 1994;368(6472):639-43.
96. Settle SH, Jr., Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol* 2003;254(1):116-30.
97. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 1997;100(2):321-30.
98. Lou J, Tu Y, Burns M, Silva MJ, Manske P. BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. *J Orthop Res* 2001;19(6):1199-202.
99. Hudson-Goodman P, Girard N, Jones MB. Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart Lung* 1990;19(4):379-84.
100. Thermann H, Hufner T, Tscherne H. [Achilles tendon rupture]. *Orthopade* 2000;29(3):235-50.
101. Miller D, Waterston S, Reaper J, Barrass V, Maffulli N. Conservative management, percutaneous or open repair of acute Achilles tendon rupture: a retrospective study. *Scott Med J* 2005;50(4):160-5.
102. Mahoney JL, Farkas LG, Lindsay WK. Quality of tendon graft healing in silastic pseudosheaths: breaking-strength studies. *Surg Forum* 1976;27(62):572-3.

103. Beris AE, Darlis NA, Korompilias AV, Vekris MD, Mitsionis GI, Soucacos PN. Two-stage flexor tendon reconstruction in zone II using a silicone rod and a pedicled intrasynovial graft. *J Hand Surg Am* 2003;28(4):652-60.
104. Wang S, Zinderman C, Wise R, Braun M. Infections and human tissue transplants: review of FDA MedWatch reports 2001-2004. *Cell Tissue Bank* 2007;8(3):211-9.
105. Gillies H, Chalmers J. The management of fresh ruptures of the tendo achillis. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52(2):337-43.
106. Jozsa L, Kvist M, Balint BJ, Reffy A, Jarvinen M, Lehto M, et al. The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. *Am J Sports Med* 1989;17(3):338-43.
107. Ulmar B, Simon S, Eschler A, Mittlmeier T. [Rupture of the Achilles tendon]. *Unfallchirurg* 2014;117(10):921-37; quiz 38-9.
108. Majewski M, Rickert M, Steinbruck K. [Achilles tendon rupture. A prospective study assessing various treatment possibilities]. *Orthopade* 2000;29(7):670-6.
109. Lill H, Moor C, Schmidt A, Echtermeyer V. [Current status of treatment of Achilles tendon ruptures. Results of a nationwide survey in Germany]. *Chirurg* 1996;67(11):1160-5.
110. Schepsis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *Am J Sports Med* 2002;30(2):287-305.
111. Thermann H. [Treatment of Achilles tendon rupture]. *Unfallchirurg* 1998;101(4):299-314.
112. Lea RB, Smith L. Rupture of the achilles tendon. Nonsurgical treatment. *Clin Orthop Relat Res* 1968;60:115-8.
113. Hufner T, Gaulke R, Imrecke J, Krettek C, Stubig T. [Conservative functional treatment of Achilles tendon ruptures]. *Unfallchirurg* 2010;113(9):699-702, 04.
114. Mandelbaum BR, Myerson MS, Forster R. Achilles tendon ruptures. A new method of repair, early range of motion, and functional rehabilitation. *Am J Sports Med* 1995;23(4):392-5.
115. Ma GW, Griffith TG. Percutaneous repair of acute closed ruptured achilles tendon: a new technique. *Clin Orthop Relat Res* 1977(128):247-55.
116. Segesser B, Goesele A, Renggli P. [The Achilles tendon in sports]. *Orthopade* 1995;24(3):252-67.
117. Krueger-Franke M, Siebert CH, Scherzer S. Surgical treatment of ruptures of the Achilles tendon: a review of long-term results. *Br J Sports Med* 1995;29(2):121-5.
118. Lerch K, Caro W, Perlick L, Baer W, Schubert T, Grifka J. [Unrecognized and untreated rupture of the Achilles tendon-operative treatment in cases of unstable scar tissue]. *Orthopade* 2003;32(9):816-23.
119. Amlang MH, Rosenow M, Rammelt S, Heineck J, Zwipp H. [Transfer of the flexor hallucis longus to replace the Achilles tendon: indications, technique and results]. *Unfallchirurg* 2008;111(7):499-506.
120. Walther M, Dorfer B, Ishak B, Dreyer F, Mayer B, Roser A. [Reconstructive of extensive Achilles tendon defects by musculus flexor hallucis longus transfer]. *Oper Orthop Traumatol* 2011;23(4):328-36.
121. Amlang MH, Maffuli N, Longo UG, Stubig T, Imrecke J, Hufner T. [Surgical treatment of Achilles tendon rupture]. *Unfallchirurg* 2010;113(9):712-20.
122. Khan RJ, Fick D, Keogh A, Crawford J, Brammar T, Parker M. Treatment of acute achilles tendon ruptures. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(10):2202-10.
123. Olsson N, Silbernagel KG, Eriksson BI, Sansone M, Brorsson A, Nilsson-Helander K, et al. Stable surgical repair with accelerated rehabilitation versus nonsurgical treatment

- for acute Achilles tendon ruptures: a randomized controlled study. *Am J Sports Med* 2013;41(12):2867-76.
124. Ellman H, Kay SP, Wirth M. Arthroscopic treatment of full-thickness rotator cuff tears: 2- to 7-year follow-up study. *Arthroscopy* 1993;9(2):195-200.
125. Bateman JE. The Diagnosis and Treatment of Ruptures of the Rotator Cuff. *Surg Clin North Am* 1963;43:1523-30.
126. Milgrom C, Schaffler M, Gilbert S, van Holsbeeck M. Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77(2):296-8.
127. Habermeyer P, Lehmann L, Lichtenberg S. [Rotator cuff tears: diagnosis and therapy]. *Orthopade* 2000;29(3):196-208.
128. Neer CS, 2nd. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder. 1972. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(6):1399.
129. Yadav H, Nho S, Romeo A, MacGillivray JD. Rotator cuff tears: pathology and repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(4):409-21.
130. Bokor DJ, Hawkins RJ, Huckell GH, Angelo RL, Schickendantz MS. Results of nonoperative management of full-thickness tears of the rotator cuff. *Clin Orthop Relat Res* 1993(294):103-10.
131. Itoi E, Tabata S. Conservative treatment of rotator cuff tears. *Clin Orthop Relat Res* 1992(275):165-73.
132. Luring C, Diedrich O, Kock FX, Grifka J, Tingart M. [Current operative strategies for rotator cuff tears in German hospitals]. *Orthopade* 2007;36(9):810-6.
133. Robinson PM, Doll HA, Roy BR. Treating the torn rotator cuff: current practice in the UK. *Ann R Coll Surg Engl* 2011;93(7):532-6.
134. Duquin TR, Buyea C, Bisson LJ. Which method of rotator cuff repair leads to the highest rate of structural healing? A systematic review. *Am J Sports Med* 2010;38(4):835-41.
135. Maier D, Jaeger M, Izadpanah K, Herschel D, Ogon P, Strohm PC, et al. [Open transosseous reconstruction of the rotator cuff: clinical outcome, influencing factors and complications]. *Chirurg* 2012;83(12):1068-77.
136. Shafizadeh S, Schneider MM, Bouillon B. [Injuries of the anterior cruciate ligament in athletes]. *Chirurg* 2014;85(10):888-94.
137. Hinterwimmer S, Engelschalk M, Sauerland S, Eitel F, Mutschler W. [Operative or conservative treatment of anterior cruciate ligament rupture: a systematic review of the literature]. *Unfallchirurg* 2003;106(5):374-9.
138. Kessler MA, Behrend H, Henz S, Stutz G, Rukavina A, Kuster MS. Function, osteoarthritis and activity after ACL-rupture: 11 years follow-up results of conservative versus reconstructive treatment. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(5):442-8.
139. Strehl A, Egli S. The value of conservative treatment in ruptures of the anterior cruciate ligament (ACL). *J Trauma* 2007;62(5):1159-62.
140. Foster TE, Wolfe BL, Ryan S, Silvestri L, Kaye EK. Does the graft source really matter in the outcome of patients undergoing anterior cruciate ligament reconstruction? An evaluation of autograft versus allograft reconstruction results: a systematic review. *Am J Sports Med* 2010;38(1):189-99.
141. Beynon BD, Johnson RJ, Fleming BC, Kannus P, Kaplan M, Samani J, et al. Anterior cruciate ligament replacement: comparison of bone-patellar tendon-bone grafts with two-strand hamstring grafts. A prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(9):1503-13.
142. Ejerhed L, Kartus J, Sernert N, Kohler K, Karlsson J. Patellar tendon or semitendinosus tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction? A prospective randomized study with a two-year follow-up. *Am J Sports Med* 2003;31(1):19-25.

143. Jansson KA, Linko E, Sandelin J, Harilainen A. A prospective randomized study of patellar versus hamstring tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2003;31(1):12-8.
144. Weiler A, Scheffler S, Hoher J. [Transplant selection for primary replacement of the anterior cruciate ligament]. *Orthopade* 2002;31(8):731-40.
145. Passler HH, Shelbourne KD. [Biological, biomechanical and clinical concepts of after-care following knee ligament surgery]. *Orthopade* 1993;22(6):421-35.
146. Beynon BD, Johnson RJ, Abate JA, Fleming BC, Nichols CE. Treatment of anterior cruciate ligament injuries, part 2. *Am J Sports Med* 2005;33(11):1751-67.
147. Beynon BD, Uh BS, Johnson RJ, Abate JA, Nichols CE, Fleming BC, et al. Rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized, double-blind comparison of programs administered over 2 different time intervals. *Am J Sports Med* 2005;33(3):347-59.
148. Tyler TF, McHugh MP, Gleim GW, Nicholas SJ. The effect of immediate weightbearing after anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* 1998(357):141-8.
149. Skalak R. *Tissue Engineering*. New York: A.R.Liss, Februar 1989.
150. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
151. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am* 2004;29(4):551-63.
152. Forslund C, Aspenberg P. Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage-derived morphogenetic protein-2. *Am J Sports Med* 2003;31(4):555-9.
153. Nakamura N, Shino K, Natsuume T, Horibe S, Matsumoto N, Kaneda Y, 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):1165-70.
154. Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med* 2007;41(4):232-40.
155. Soslowky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996;5(5):383-92.
156. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004;428(6982):493-521.
157. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(18):3413-31.
158. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4(8):743-65.
159. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003;5:1-16; discussion 16.
160. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001;7(6):679-89.
161. Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2004;61:113-34.
162. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 2003;5:29-39; discussion 39-40.
163. Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Regenerative medicine. *Curr Probl Surg* 2011;48(3):148-212.



164. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007;28(25):3587-93.
165. Jawad H, Lyon AR, Harding SE, Ali NN, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering. *Br Med Bull* 2008;87:31-47.
166. Gorham SD, Light ND, Diamond AM, Willins MJ, Bailey AJ, Wess TJ, et al. Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking. *Int J Biol Macromol* 1992;14(3):129-38.
167. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001;221(1-2):1-22.
168. Miyata T, Sode T, Rubin AL, Stenzel KH. Effects of ultraviolet irradiation on native and telopeptide-poor collagen. *Biochim Biophys Acta* 1971;229(3):672-80.
169. Takakuda K, Miyairi H. Tensile behaviour of fibroblasts cultured in collagen gel. *Biomaterials* 1996;17(14):1393-7.
170. De Deyne PG, Kladakis SM. Bioscaffolds in tissue engineering: a rationale for use in the reconstruction of musculoskeletal soft tissues. *Clin Podiatr Med Surg* 2005;22(4):521-32, v.
171. Chiu LLY. Tissue Engineering. In: David L. Andrews GDS, and Gary P. Wiederrecht, editor. *Comprehensive Nanoscience and Technology* Elsevier B.V., 2011:Pages 175-21.
172. Osathanon T, Linnes ML, Rajachar RM, Ratner BD, Somerman MJ, Giachelli CM. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29(30):4091-9.
173. Sahoo S, Ouyang H, Goh JC, Tay TE, Toh SL. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Eng* 2006;12(1):91-9.
174. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 2008;26(9):2201-10.
175. Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue Eng* 2006;12(7):1843-9.
176. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
177. Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2007;83(8):1019-26.
178. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121(2):368-74.
179. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2(2):83-92.
180. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, et al. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 2008;14(1):79-88.
181. Strocchi R, Leonardi L, Guizzardi S, Marchini M, Ruggeri A. Ultrastructural aspects of rat tail tendon sheaths. *J Anat* 1985;140 ( Pt 1):57-67.

182. Shakibaei M, Zimmermann B, Merker HJ. Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* 1995;43(10):1061-9.
183. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, Sendzik J, John T, Shakibaei M. Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol* 2004;122(3):219-28.
184. Gungormus C, Kolankaya D. Characterization of type I, III and V collagens in high-density cultured tenocytes by triple-immunofluorescence technique. *Cytotechnology* 2008;58(3):145-52.
185. Kasten P, Loew M. Differenzialtherapie massiver Rotatorenmanschettenlasionen. *Orthopade* 2007;36(9):855-61.
186. Thermann H, Zwipp H, Tscherne H. Funktionelles Behandlungskonzept der frischen Achillessehnenruptur. Zweijahresergebnisse einer prospektiv-randomisierten Studie. *Unfallchirurg* 1995;98(1):21-32.
187. Krappinger D, Kralinger FS, El Attal R, Hackl W, Haid C. Modified Prusik knot versus whipstitch technique for soft tissue fixation in anterior cruciate ligament reconstruction: a biomechanical analysis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15(4):418-23.
188. Topic E, Gluhak J. Isolation of restrictible DNA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29(5):327-30.
189. Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD, Li RK. Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(2):H939-47.
190. Kuddus RH, Lee YH, Valdivia LA. A semiquantitative PCR technique for detecting chimerism in hamster-to-rat bone marrow xenotransplantation. *J Immunol Methods* 2004;285(2):245-51.
191. Doroski DM, Brink KS, Temenoff JS. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament. *Biomaterials* 2007;28(2):187-202.
192. Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Sievers B, Jansson V, et al. Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model. *J Mater Sci Mater Med* 2012.
193. Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J Oral Pathol* 1974;3(6):291-316.
194. Oryan A, Shoushtari AH. Histology and ultrastructure of the developing superficial digital flexor tendon in rabbits. *Anat Histol Embryol* 2008;37(2):134-40.
195. Chong AK, Riboh J, Smith RL, Lindsey DP, Pham HM, Chang J. Flexor tendon tissue engineering: acellularized and reseeded tendon constructs. *Plast Reconstr Surg* 2009;123(6):1759-66.
196. Liu W, Chen B, Deng D, Xu F, Cui L, Cao Y. Repair of tendon defect with dermal fibroblast engineered tendon in a porcine model. *Tissue Eng* 2006;12(4):775-88.
197. Kasten P, Loew M, Rickert M. [Intramuscular lengthening and range of motion after local tendon transfer for repair of retracted supraspinatus tendon defects. A biomechanical study]. *Orthopade* 2006;35(1):102-6.
198. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ. Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *J Orthop Res* 2004;22(5):998-1003.
199. Chan BP, Fu SC, Qin L, Rolf C, Chan KM. Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing: an animal study. *J Orthop Res* 1998;16(5):597-603.
200. Walsh S, Frank C. Two methods of ligament injury: a morphological comparison in a rabbit model. *J Surg Res* 1988;45(2):159-66.
201. Kannus P. Immobilization or early mobilization after an acute soft-tissue injury? *Phys Sportsmed* 2000;28(3):55-63.

202. Murrell GA, Lilly EG, 3rd, Goldner RD, Seaber AV, Best TM. Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *J Orthop Res* 1994;12(4):582-91.
203. Mortensen HM, Skov O, Jensen PE. Early motion of the ankle after operative treatment of a rupture of the Achilles tendon. A prospective, randomized clinical and radiographic study. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81(7):983-90.
204. Wada A, Kubota H, Miyanishi K, Hatanaka H, Miura H, Iwamoto Y. Comparison of postoperative early active mobilization and immobilization in vivo utilising a four-strand flexor tendon repair. *J Hand Surg Br* 2001;26(4):301-6.
205. Bring D, Reno C, Renstrom P, Salo P, Hart D, Ackermann P. Prolonged immobilization compromises up-regulation of repair genes after tendon rupture in a rat model. *Scand J Med Sci Sports* 2010;20(3):411-7.
206. Enwemeka CS, Spielholz NI, Nelson AJ. The effect of early functional activities on experimentally tenotomized Achilles tendons in rats. *Am J Phys Med Rehabil* 1988;67(6):264-9.
207. Gelberman RH, Manske PR, Vande Berg JS, Lesker PA, Akeson WH. Flexor tendon repair in vitro: a comparative histologic study of the rabbit, chicken, dog, and monkey. *J Orthop Res* 1984;2(1):39-48.
208. Zhang J, Pan T, Liu Y, Wang JH. Mouse treadmill running enhances tendons by expanding the pool of tendon stem cells (TSCs) and TSC-related cellular production of collagen. *J Orthop Res* 2010;28(9):1178-83.
209. Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol* 2009;107(2):399-407.
210. Murrell GA, Lilly EG, 3rd, Collins A, Seaber AV, Goldner RD, Best TM. Achilles tendon injuries: a comparison of surgical repair versus no repair in a rat model. *Foot Ankle* 1993;14(7):400-6.
211. Slack C, Bradley G, Beaumont B, Poole A, Flint M. Changes in the morphology and synthetic activity of cultured rat tail tendon. *Cell Tissue Res* 1986;245(2):359-68.
212. Bi Y, Ehrlichou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007;13(10):1219-27.
213. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 2003;287(2):289-300.
214. de Mos M, Koevoet WJ, Jahr H, Versteegen MM, Heijboer MP, Kops N, et al. Intrinsic differentiation potential of adolescent human tendon tissue: an in-vitro cell differentiation study. *BMC Musculoskelet Disord* 2007;8:16.
215. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kannus P, Jozsa L, Jarvinen M. Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J Orthop Res* 2004;22(6):1303-9.
216. Welsch U, editor. *Lehrbuch Histologie*. München: Elsevier GmbH, 2006.
217. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008;15:53-76.
218. Landis WJ, Silver FH. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002;133(4):1135-57.
219. Richards PJ, Braid JC, Carmont MR, Maffulli N. Achilles tendon ossification: pathology, imaging and aetiology. *Disabil Rehabil* 2008;30(20-22):1651-65.
220. Postacchini F, Di Castro A. Subtotal ossification of the Achilles tendon. Case report. *Ital J Orthop Traumatol* 1983;9(4):529-32.
221. Yu JS, Witte D, Resnick D, Pogue W. Ossification of the Achilles tendon: imaging abnormalities in 12 patients. *Skeletal Radiol* 1994;23(2):127-31.

222. Brown H, Ehrlich HP, Newberne PM, Kiyozumi T. Para osteo arthropathy--ectopic ossification of healing tendon about the rodent ankle joint: histologic and type V collagen changes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986;183(2):214-20.
223. Sobel E, Giorgini R, Hilfer J, Rostkowski T. Ossification of a ruptured achilles tendon: a case report in a diabetic patient. *J Foot Ankle Surg* 2002;41(5):330-4.
224. Orgel JP, Irving TC, Miller A, Wess TJ. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(24):9001-5.
225. Lui PP, Cheuk YC, Lee YW, Chan KM. Ectopic chondro-ossification and erroneous extracellular matrix deposition in a tendon window injury model. *J Orthop Res* 2012;30(1):37-46.
226. Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002;16(2):270-2.
227. Deng D, Liu W, Xu F, Yang Y, Zhou G, Zhang WJ, et al. Engineering human neo-tendon tissue in vitro with human dermal fibroblasts under static mechanical strain. *Biomaterials* 2009;30(35):6724-30.
228. Andersson T, Eliasson P, Aspenberg P. Tissue memory in healing tendons: short loading episodes stimulate healing. *J Appl Physiol* 2009;107(2):417-21.
229. Zhang J, Wang JHC. Mechanobiological response of tendon stem cells: implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2010;28(5):639-43.
230. Rui YF, Lui PP, Li G, Fu SC, Lee YW, Chan KM. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16(5):1549-58.
231. Rooney P, Walker D, Grant ME, McClure J. Cartilage and bone formation in repairing Achilles tendons within diffusion chambers: evidence for tendon-cartilage and cartilage-bone conversion in vivo. *J Pathol* 1993;169(3):375-81.
232. Rui YF, Lui PP, Chan LS, Chan KM, Fu SC, Li G. Does erroneous differentiation of tendon-derived stem cells contribute to the pathogenesis of calcifying tendinopathy? *Chin Med J (Engl)* 2011;124(4):606-10.
233. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352(19):1959-66.
234. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2(6):477-88.
235. Zantop T, Gilbert TW, Yoder MC, Badylak SF. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction. *J Orthop Res* 2006;24(6):1299-309.
236. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 1997;15(4):577-84.
237. Claes L, Wolf S, Augat P. [Mechanical modification of callus healing]. *Chirurg* 2000;71(9):989-94.
238. Claes LE, Heigele CA. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 1999;32(3):255-66.
239. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, et al. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 1998(355 Suppl):S132-47.
240. Lipscomb PR, Wakim KG. Further observations in the healing of severed tendons: an experimental study. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1961;36:277-82.
241. Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J Orthop Res* 2005;23(2):287-93.

242. Emans PJ, Spaapen F, Surtel DA, Reilly KM, Cremers A, van Rhijn LW, et al. A novel in vivo model to study endochondral bone formation; HIF-1 $\alpha$  activation and BMP expression. *Bone* 2007;40(2):409-18.
243. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, et al. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278(4):C853-60.
244. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 2007;117(6):1616-26.
245. Wang Y, Wan C, Gilbert SR, Clemens TL. Oxygen sensing and osteogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:1-11.
246. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R. Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003;123(9):485-8.
247. Lin L, Shen Q, Xue T, Yu C. Heterotopic ossification induced by Achilles tenotomy via endochondral bone formation: expression of bone and cartilage related genes. *Bone* 2010;46(2):425-31.
248. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:15-35; discussion 35-6.
249. Lakemeier S, Reichelt JJ, Patzer T, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JR, Schofer MD. The association between retraction of the torn rotator cuff and increasing expression of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor expression: an immunohistological study. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:230.
250. Yin Z, Chen X, Chen JL, Shen WL, Hieu Nguyen TM, Gao L, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials* 2010;31(8):2163-75.
251. Henshaw DR, Attia E, Bhargava M, Hannafin JA. Canine ACL fibroblast integrin expression and cell alignment in response to cyclic tensile strain in three-dimensional collagen gels. *J Orthop Res* 2006;24(3):481-90.
252. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials* 2006;27(15):2980-7.
253. Recknor JB, Recknor JC, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. Oriented astroglial cell growth on micropatterned polystyrene substrates. *Biomaterials* 2004;25(14):2753-67.
254. Recknor JB, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. Directed growth and selective differentiation of neural progenitor cells on micropatterned polymer substrates. *Biomaterials* 2006;27(22):4098-108.
255. Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):17-26.
256. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126(4):677-89.
257. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 2007;6(12):997-1003.
258. Hoffmann A, Gross G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *Int Orthop* 2007;31(6):791-7.

259. Ceonzo K, Gaynor A, Shaffer L, Kojima K, Vacanti CA, Stahl GL. Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng* 2006;12(2):301-8.
260. Spain TL, Agrawal CM, Athanasiou KA. New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant. *Tissue Eng* 1998;4(4):343-52.
261. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W. Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;8(6):364-9.
262. Scutt N, Rolf CG, Scutt A. Tissue specific characteristics of cells isolated from human and rat tendons and ligaments. *J Orthop Surg Res* 2008;3:32.
263. Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 2007;28(34):5068-73.
264. Sahni V, Tibrewal S, Bissell L, Khan WS. The role of tissue engineering in achilles tendon repair: a review. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015;10(1):31-6.

## Anhang

### Arbeitsprotokolle

#### **Protokoll 1    Zusammensetzung von DMEM**

- DMEM
- 4,5 g/l D-Glukose
- 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>
- Stabiler L-Glutamin 1 %
- Na-Pyruvate

#### **Protokoll 2    Zubereitung der PBS-Lösung**

- PBS-Stocklösung:
  - Natriumhydrogenophosphat Dihydrat 14,8 g
  - Kaliumhydrogenophosphat 2,3 g
  - Natriumchlorid 90 g
  - Gereinigtes Wasser zu 1 L
- PBS-Stocklösung mit destillierten Wasser mischen (1:10)

#### **Protokoll 3    Zusammensetzung der Karnowski-Lösung**

- 2 ml    25 % Glutaraldehyd
- 5 ml    8 % Paraformaldehyd
- 3 ml    destilliertes Wasser
- 10 ml   0,2 M Na-Cacodylat

#### **Protokoll 4    Zusammensetzung des Lysis-Puffer**

- Lysis-Puffer (1 L); bei RT lagern und erst kurz vor Gebrauch mischen
- 100 mM Tris-HCL pH 8,5
- 5 mM EDTA
- 0,2 % SDS
- 200 mM NaCl
- 100 µg/ml Proteinkinase K (Stocklösung: 20 mg/ml; Merck #107393)

## Protokoll 5 Zusammensetzung des TAE-Puffers

- TAE-Puffer (Vorbereitung im Erlenkolbenmeyer und mit Magnetführer)
  - 242 g Trizma Base
  - 57 ml 100 % Essigsäure
  - EDTA 0,5 M (pH 8,0)

## Verwendete Materialien

### Zellkultur und Isolation der Tenozyten

Brutschrank	Binder	Tuttlingen
Collagenase Typ I Stocklösung 1 g/ml C0130	Sigma-Aldrich	München
Desinfektionsmittel (Kodan)	Schülke & Mayr	Norderstedt
Destilliertes Wasser		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom/Seromed	Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	München
Einfrierröhrchen	Nunc	Wiesbaden
Einmal-Handschuhe S, M, L (Peha-Soft)	Hartmann	Heidenheim
Einmal-Skalpell (No. 11,15 + 20)	Feather Safety Razor Co.	Tokyo, Japan
Einweg-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sigma-Aldrich	München
Erlenkolbenmeyer	Schott	Mainz
Falcon (15 ml + 50 ml)	BD Biosciences	Heidelberg
FCS	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Filter	Whatman	Dassel
Händedesinfektion (Sterilium)	Bode	Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss	München
Lichtmikroskopobjektive	Zeiss	München
Mycoplasma Detection Kit VenorGem	Minerva Biolabs	Berlin
Neubauer-Kammer	Brand	Wertheim
Petrischale	BD Biosciences	Heidelberg
Pipetten (1-10 µl, 2-20 µl, 20-100µl, 200-1000µl)	Gilson	Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Gilson	Limburg-Offheim
PBS - Puffer	Apothek e Innenstadt Uni München	München
Penicillin/Streptomycin	Biochrom/Seromed	Berlin
Reaktionsgefäße (0,5 ml + 1 ml + 1,5 ml + 2 ml)	Sarstedt	Nürnbergrecht
Sicherheitswerkbank	Heraeus	Hanau
Stickstofftank	Biosafe	Zürich, Schweiz
Tiefkühlschränke (-20 °C + -80 °C)	Heraeus	Hanau
Tripan Blau	Sigma-Aldrich	München
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom/Seromed	Berlin
Wasserbad	Julabo	Seelbach
Zellfilter (70 µm + 100 µm)	BD Biosciences	Heidelberg
Zellkulturflasche (T-75, T-175, T-225?)	Nunc	Wiesbaden
Zentrifuge (klein)	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge (groß)	Heraeus	Hanau
96-Well-Platte	Nunc	Wiesbaden



**Sehnenpräparation**

chirurgische Pinzette	Sigma-Aldrich	München
chirurgische Schere	Sigma-Aldrich	München
Desinfektionsmittel (Kodan)	Schülke & Mayr	Norderstedt
Einmal-Skalpell (No. 11,15 + 20)	Feather	Köln
Falcon (15 ml + 50 ml)	BD Biosciences	Heidelberg
Händedesinfektion (Sterilium)	Bode	Hamburg
Lewis-Ratten	Charles River Laboratories, Inc.	Sulzfeld
Medium	Biochrom/Seromed	Berlin
Mundschutz		
OP-Haube		
PBS - Puffer	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Sterile Unterlage 45 x 75 cm (Secu-Drape)	Swindon	England
Sterile Einmal-Handschuhe		

**Scaffoldbesiedelung**

Anatomische Pinzette (klein, groß)	Sigma-Aldrich	München
Aqua ad injectabilia	Braun	Melsungen
Bunsenbrenner		
Celluloseacetat - Filter	Sartorius	Göttingen
Einmal-Pinzette (anatomische Form)	Seidel Medizin	Gauting
Einmal-Skalpell (No. 11,15 + 20)	Feather	Köln
Erlenkolbenmeyer	Schott	Mainz
Kollagen - Scaffold	Jotec	Hechingen
Medium	Biochrom/Seromed	Berlin
Petrischale (Falcon)	BD Biosciences	Heidelberg
PGA-Scaffold	ITV	Denkendorf
Schere	Sigma-Aldrich	München
Stahlbrücke		

**Operation und Entnahme**

Äthertopf		
Augensalbe (Bepanthen)	Bayer	Leverkusen
Autoklav Typ Varioklav 300	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
Chirurgische Pinzette (klein, groß)	Sigma-Aldrich	München
Chirurgische Schere (klein, groß)	Sigma-Aldrich	München
Desinfektionsmittel (Kodan)	Schülke & Mayr	Norderstedt
Händedesinfektionsmittel (Sterilium)	Bode	Hamburg
Diethylether	Sigma-Aldrich	München
Einmal - Handschuhe		
Einmal-Skalpell (No. 11,15 + 20)	Feather	Köln
Enrofloxacin (Baytril)	Bayer	Leverkusen
Fadenschere	Sigma-Aldrich	München
Falcon (15 ml + 50 ml)	BD Biosciences	Heidelberg
gebogene anatomische Pinzette	Sigma-Aldrich	München
Kanüle 22 G (Mikrolance 3)	BD Biosciences	Heidelberg
Ketamin (Ketanest)		
Kompressen (klein, groß)		
Leukoplast	BSN Medical GmbH	Hamburg
Lewis-Ratten	Charles River Laboratories Inc.	Sulzfeld
Makrolon Käfige 1354 G Eurostandard Typ 4		
Medium	Tecniplast GmbH	Hohenpeißenberg
Messinstrument	Biochrom/Seromed	Berlin
Metamizol (Novalgin)		
Mundschutz		
Nadelhalter	Sigma-Aldrich	München

OP-Haube		
PBS - Puffer	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Pipetten (1-10 µl, 2-20 µl, 20-100µl, 200-1000µl)	Gilson	Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Gilson	Limburg-Offheim
Rasierer		
Reaktionsgefäße (0,5 ml + 1 ml + 1,5 ml + 2 ml)	Sarstedt	Nürnbrecht
Schutzkleidung		
Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	BD Biosciences	Heidelberg
Sterile Einmal-Handschuhe		
Sterile Kittel		
Sterile Schlitztücher		
Sterile Unterlage (45 x 75 cm) (Secu-Drape)	Swindon	England
Stoffabdeckungen		
Styroporkiste		
Tierfutter (Sniff-Diet)	Sniff	Soest
Trinkflaschen (500 ml) mit Kugeldeckel	Tecniplast GmbH	Hohenpeißenberg
Tierkäfig		
Vicryl Faden 4-0	Ethicon GmbH	Norderstedt
UV-Lampe		
Waage		
Xylazin (Rompun)		
<b>Histologie und Immunhistologie</b>		
ABC - Kit (Vectastain Elite)	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA
Aceton	Merck	Darmstadt
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Inc.	San Jose, USA
Ammonium-Lösung	BDH Prolabo	Bangkok, Thailand
Anti-Maus-Biotin-Ak	University of Iowa	Iowa, USA
Aquatex	Merck	Darmstadt
Axiocam	Zeiss	München
AxioVisio 2.0	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Jena
BSA	Sigma-Aldrich	München
Chondroitinase	Sigma-Aldrich	München
Deckgläser (24 x 50 mm)	Menzel-Gläser	Braunschweig
DPX	Sigma-Aldrich	München
EDTA (Ethylenediaminatetraacetic acid)	AppliChem	Darmstadt
Einbettmedium (Eukitt)	Electron Microscopy Sciences	Hatfield, USA
Einbettmedium (Tissue-Tek)	Sakura	Staufen
Einmal-Handschuhe S, M, L (Peha-Soft)	Hartmann	Heidenheim
Endogene Peroxidase	Merck	Darmstadt
Erlenkolbenmeyer	Schott	Mainz
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich	München
Ethanol (70 %, 80 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Falcon (15 ml + 50 ml)	BD Biosciences	Heidelberg
Hydroxyessigsäure	Merck	Darmstadt
Image J Ver. 1.41.0	National Institute of Health	USA
Kryomesser	Edgar Hefele	München
Kryostat (CM3050)	Leica	Wetzlar
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss	München
Magnetrührer		
Methanol	Merck	Darmstadt
Mixer	LMS Group	Tokyo, Japan

Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich	München
Objektträger (Superfrost)	Menzel-Gläser	Braunschweig
Osteopontin Antikörper MPIIB <sub>101</sub>	Developmental Studies Hybridoma Bank	Iowa, USA
PBS - Puffer	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Peroxidase Substrate Kit (DAB)	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA
Pipetten (1-10 µl, 2-20 µl, 20-100µl, 200-1000µl)	Gilson	Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Gilson	Limburg-Offheim
Plastikformen (Tissue-Tek)	Sakura	Staufen
Reaktionsgefäße (0,5 ml + 1 ml + 1,5 ml + 2 ml)	Sarstedt	Nürnbrecht
Saure Hämalunlösung (Mayer)	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Sekundärer Antikörper Maus	Sigma-Aldrich	München
Shaker	Sartorius	Göttingen
Sucrose	Sigma-Aldrich	München
Thermomixer	Eppendorf	Hamburg
Toluidinblau-O	Sigma-Aldrich	München
Tris-HCL pH 8,5		
Tween 20	Merck	Darmstadt
Waage (Feinanalyse)	Sartorius	Göttingen
Wasserstoffperoxid	Merck	Darmstadt
Xylol	Merck	Darmstadt
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich	München
<b>Biomechanik</b>		
Chirurgische Pinzette (klein, groß)	Sigma-Aldrich	München
GraphPad Prism Ver. 3.02	GraphPad Software Inc.	San Diego, USA
Kanüle 22 G (Mikrolance 3)	BD Biosciences	Heidelberg
Kompressen		
PBS - Puffer	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Längenänderungsaufnehmer	Zwick	Ulm
Mersilene Faden 0 Sutupak (12 x 45 cm)	Ethicon GmbH	Norderstedt
Schere (klein)	Sigma-Aldrich	München
testXpert V5.0	Zwick	Ulm
<b>PCR</b>		
Agarose	Invitrogen	Darmstadt
Agarosegelkammer		
Aqua ad injectabilia	Braun	Melsungen
Biophotometer	Eppendorf	Hamburg
Blue Loading Dye 6x	Fermentas	St. Leon-Rot
Chloroform	Sigma-Aldrich	München
dNTP-Mix	Qiagen	Hilden
EDTA (Ethylenediaminatetraacetic acid)	AppliChem	Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck	Darmstadt
EtBr	Merck	Darmstadt
Ethanol (70 %, 80 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt Uni München	München
Isopropanol	Merck	Darmstadt
Mg <sub>2</sub> Cl	Qiagen	Hilden
Mikrowelle		
Mixer	LMS Group	Tokyo, Japan
NaCl		
PCR-Cycler, Typ Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research	Watertown, USA

Phenol (Roti)	Roth	Karlsruhe
Pipetten (1-10 µl, 2-20 µl, 20-100µl, 200-1000µl)	Gilson	Limburg-Offheim Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Gilson	Limburg-Offheim
Proteinkinase K	Merck	Darmstadt
Q-Solution	Qiagen	Hilden
Reaktionsgefäße (0,5 ml + 1 ml + 1,5 ml + 2 ml)	Sarstedt	Nürnbrecht
Salzsäure	Merck	Darmstadt
Shaker-Micrplate	Grant	Essex, England
SDS		
SRY-Primer (forward & reward)	Invitrogen	Karlsruhe
Taq-Polymerase	Qiagen	Hilden
Thermomixer	Eppendorf	Hamburg
Trizma Base	Sigma-Aldrich	München
10x PCR-Puffer	Qiagen	Hilden
<b>EM</b>		
Aqua ad injectabilia	Braun	Melsungen
Eponharz	Plano	Marburg
Glutaraldehyd	Merck	Darmstadt
Na-Cacodylat	Merck	Darmstadt
Osmiumtetroxid		
Paraformaldehyd 8 %	Sigma-Aldrich	München
Phosphatpuffer		
Styrol		
Transmissionselektronenmikroskop	Philips	Hamburg
Ultracut Mikrotom OmV3	Reichert	Wien, Österreich

## Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
anschl.	anschließend
bp	Basenpaare
BMSC	Knochenmarksstammzellen
BSA	Bovines Serum Albumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (+ L-glutamine + sodium pyruvate)
DNA	Desoxyribonkleinsäure
evtl.	eventuell
EZM	extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FBS (HI)	Fetal bovine serum (hitzeinaktiviert)
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
Gruppe C	Gruppe Collagen + Tenozyten
Gruppe D	Gruppe Defekt ohne Zellen
Gruppe N	Gruppe Naht + Tenozyten
Gruppe P	Gruppe polyglycolic acid = Polyglycolsäure + Zellen

h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
hMSC	Humane Mesenchymale Stammzellen
i.m.	intramuskulär
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K	Kilo Newton
L	Liter
M.	musculus
max.	maximal
Min.	Minute
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
N	Newton
nm	Nanometer
OP	Operation
PBS	Phosphat gepuffte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PG	Proteoglykane
PGA	Polyglykolsäure
p.op.	post operationem
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.c.	subkutan
SD	standard deviation
sek.	Sekunden

---

SLRP	Small leucine-rich proteoglycans
Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
TIFF	Tagged Image File Format, ein Bildformat
µm	Mikrometer
UV	Ultra-violett
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Schematischer Aufbau einer Sehne .....	4
<b>Abb. 2</b>	<b>A.</b> Longitudinalschnitt durch eine Sehne <b>B.</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme.....	6
<b>Abb. 3</b>	Eine schematische Darstellung der Dehnungskapazität von Sehnen.....	11
<b>Abb. 4</b>	Zeitliche Übersicht der Wundheilung von Sehnen.....	16
<b>Abb. 5</b>	Prinzip des Tissue Engineerings.....	25
<b>Abb. 6</b>	Wichtige Aspekte in der Scaffoldentwicklung.....	27
<b>Abb. 7</b>	Übersicht über die synthetischen Scaffoldmaterialien.....	28
<b>Abb. 8</b>	Übersicht des Studienablaufes.....	36
<b>Abb. 9</b>	Lichtmikroskopische Aufnahme einer Monolayerkultur von Tenozyten.....	40
<b>Abb. 10</b>	Definierte Messbereiche eines Neubauer Hämatozytometer.....	41
<b>Abb. 11</b>	Berechnungsformel zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Zellolösung.....	42
<b>Abb. 12</b>	Querschnitt der oberen 2 Quadranten durch einen Rattenschwanz.....	42
<b>Abb. 13</b>	Präparierte Kollagenfaserbündel in einer PBS-gefüllten Petrischale.....	43
<b>Abb. 14</b>	Schematische Darstellung der Brücken-Matrix-Konstruktion.....	45
<b>Abb. 15</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Scaffolds im Querschnitt.....	46
<b>Abb. 16</b>	<b>A.</b> Fotografische Sicht auf die präparierte Achillessehne <b>B.</b> Schema einer Sehne.....	49
<b>Abb. 17</b>	<b>A.</b> Defekt ohne Scaffoldimplantat <b>B.</b> Versuchstier mit Wundnaht.....	50
<b>Abb. 18</b>	<b>A.</b> Aufnahme eines Prusikknötens <b>B.</b> Explantierte Sehnen.....	52
<b>Abb. 19</b>	Prinzip der indirekten Methode der immunhistochemischen Färbung.....	58
<b>Abb. 20</b>	<b>A.</b> Lichtmikroskopische Aufnahme von Tenozyten <b>B.</b> Nach längerer Kultivierungszeit.....	63
<b>Abb. 21</b>	Bildaufnahmen von operierten, freipräparierten Achillessehnen kurz vor der Explantation.....	65
<b>Abb. 22</b>	Diagramm der Sehnenquerschnittsfläche der explantierten Regenerate.....	66
<b>Abb. 23</b>	Diagramm der maximalen Ausreißkraft pro gemessener Sehnenquerschnittsfläche.....	67
<b>Abb. 24</b>	Aufnahmen von Banden spezifischer DNA-Abschnitte.....	68
<b>Abb. 25</b>	H/E-gefärbte Kryoschnitte von Sehnenzellbesiedelten Scaffolds.....	70
<b>Abb. 26</b>	Übersichtsaufnahmen von gefärbten Kryoschnitten.....	71
<b>Abb. 27</b>	Übersichtsaufnahmen von gefärbten Kryoschnitten.....	73
<b>Abb. 28</b>	Ausgewählte, gruppenunspezifische Aufnahmen H/E-gefärbter Kryoschnitte.....	74
<b>Abb. 29a</b>	Quantifizierung des Verknöcherungsanteils.....	75
<b>Abb. 29b</b>	Quantifizierung des Verknöcherungsanteils.....	76
<b>Abb. 30</b>	<b>A.</b> Hohe Vergrößerung von Kollagenfibrillen <b>B.</b> Kollagenfibrillen.....	77
<b>Abb. 31</b>	<b>A.</b> Hohe Vergrößerung einer TEM-Aufnahme <b>B.</b> Übersichtsaufnahme von Regenerat.....	78
<b>Abb. 32</b>	2 TEM-Aufnahmen von Sehngewebe.....	79
<b>Abb. 33</b>	Hohe Vergrößerung einer TEM-Aufnahme einer operierten Sehnenprobe.....	80
<b>Abb. 34</b>	TEM-Aufnahme von einzelnen Kollagenfibrillen.....	81
<b>Abb. 35</b>	<b>A.</b> TEM-Aufnahme einer Kapillare <b>B.</b> Reife elastische Faser.....	82
<b>Abb. 36</b>	TEM-Aufnahme von zwei Zellausläufern.....	83
<b>Abb. 37</b>	Kräfte die bei Muskelzug auf die Sehne.....	94



## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	Durchschnittlicher Durchmesser der Kollagenorganisationsebenen.....	5
<b>Tab. 2</b>	Übersicht der unterschiedlichen Methoden der Defektüberbrückung.....	37
<b>Tab. 3</b>	Allgemeine Auswertungsübersicht der Proben.....	37
<b>Tab. 4</b>	Übersicht der verschiedenen Arbeitsschritte.....	39
<b>Tab. 5</b>	Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Anwendungen von Tenozyten.....	48
<b>Tab. 6</b>	Tabellenübersicht der laut Hersteller angegebenen Daten.....	53
<b>Tab. 7</b>	Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes.....	54
<b>Tab. 8</b>	Übersicht der verwendeten Primer für die Amplifizierung des SRY-Gen.....	55
<b>Tab. 9</b>	Verwendetes Cyclor Programm zur Amplifikation der selektiven DNA-Sequenz.....	55
<b>Tab. 10</b>	Protokollübersicht der verschiedenen Succrospülungen der vorher entkalkten Sehnenproben.	56
<b>Tab. 11</b>	Die Färbung der Kryoschnitte mit Hämatoxylin-Eosin.....	57
<b>Tab. 12</b>	Tabellarische Übersicht des Färbeprotokolls.....	59
<b>Tab. 13</b>	Tabellarische Übersicht des Protokolls für die Vorkontrastierung.....	61
<b>Tab. 14</b>	Tabellarische Übersicht des Protokolls für die Einbettung der Sehnenproben.....	61

## Danksagung

In besonderem Maße und in aller Form möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ärztlichen Kollegen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere gilt mein größter Dank Prof. Dr. Müller und Prof. Dr. Pietschmann für die Möglichkeit dieser Arbeit sowie die hervorragende und langjährige Unterstützung bis hin zur Promotion!

Des Weiteren danke ich Prof. Schieker und PD Dr. Docheva vom ExperiMed Labor, Prof. Welsch von der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität, Prof. Plitz, Fr. Sievers und Fr. Schmitt aus dem Labor für Biomechanik der Orthopädischen Klinik und Poliklinik sowie Dr. Thein vom Walter Brendel Zentrum und Prof. Shakibaei aus der Anatomischen Anstalt für die unkomplizierte Kooperation und Zusammenarbeit.

Aus tiefstem Herzen danke ich meinem Freund Dr. Borys Frankewycz für den unbezahlbaren Beistand und den unermüdlichen Einsatz!

Zu guter Letzt widme ich diese Arbeit meiner Familie und im Speziellen meiner Frau, Christin Schmitz, ohne die mein Glück nicht wäre!

## Publikationen

### Originalarbeiten

Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Sievers B, Jansson V, Schieker M, Müller PE

*Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model*

J Mater Sci Mater Med. 2013 Jan;24(1):211-20

### Poster

Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Schieker M, Jansson V, Müller PE

*Tendon regeneration using cell seeded scaffolds in a rat model*

EORS Meeting, Juni 2010, Davos (Schweiz); Prämierung mit dem 1. Posterpreis

### Sonstige

Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Sievers B, Jansson V, Schieker M, Müller PE

*Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells in a full size tendon regeneration model in-vivo seeded on biodegradable scaffolds*

AFOR 2010; Prämierung mit dem AFOR Wissenschaftspreis 2010

## Eidesstattliche Versicherung

Schmitz, Pierre

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

**„Untersuchung der Sehnenregeneration mithilfe von zwei verschiedenen bioresorbierbaren Scaffolds (PGA und Kollagen I) unter Einfluss autologer Tenozyten nach künstlichem Totaldefekt an der Achillessehne von Ratten“**

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.

Augsburg, den 03.10.17