

**Modulation des Einwachsverhaltens kortikal
reinsertierter Sehnen und Ligamente durch
Wachstumsfaktoren**

*Veränderungen der Supraspinatussehne
im Zuge eines akuten Traumas*

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Anne Stephanie Lotz
geboren am 14.03.1978 in Freising**

Gutachter:

- 1. PD Dr.rer nat Dr.med J. Mollenhauer, Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH
Eisenberg**
- 2. Prof. Dr.rer nat R. Bräuer, Institut für Pathologie, Jena**
- 3. Prof. Dr.phil P. Bruckner, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie
Münster**

Tag der öffentlichen Disputation: 1. Dezember 2003

Tag des Abschlussexamens: 9. November 2005

1. Abkürzungen

a.d.	destilliertes Wasser (aqua dest)
aa	Aminosäuren
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cDNA	Copy-DNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
EthBr	Ethidium- Bromid
H&E	Hämatoxylin- Eosin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
kd	Kilodalton
mA	mAmpère
mRNA	Messenger- RNA
RM	Rotatorenmanschette
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSS	Supraspinatussehne
TBE	Tris-Bor-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1.1. Verwendete Einheiten

A	Ampère
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
rpm	Umdrehungen pro Minute

sec	Sekunden
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt

1.2. Präfixe

k	kilo
m	milli
μ	mikro
n	nano
p	piko

2. Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	I
1.1. Verwendete Einheiten	I
1.2. Präfixe	II
2. Inhaltsverzeichnis	III
3. Zusammenfassung.....	1
4. Einleitung.....	3
4.1. Problematik und Voruntersuchungen	3
4.2. Die Supraspinatussehne als Teil der Rotatorenmanschette	4
4.2.1. Funktion und Aufbau der Supraspinatussehne	5
4.2.2. Funktion und Aufbau der Bursa subacromialis als Teil des Schultergelenkes	8
4.2.2.1. Differenzierung von Zellen des Bindegewebes und des Stützgewebes unter dem Gesichtspunkt der chondrogenen Metaplasie	10
4.2.2.2. Heilung und Regeneration von Sehnen.....	11
4.3. Extrazelluläre Matrix (EZM) der Sehnen	12
4.3.1. Die Kollagene	12
4.3.1.1. Kollagen Typ I.....	13
4.3.1.2. Kollagen Typ II.....	14
4.3.1.3. Kollagen Typ X.....	14
4.3.1.4. Proteoglykans.....	15
4.4. Wachstumsfaktoren.....	16
4.4.1. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins).....	16
4.4.2. BMP-2 und BMP-7	17
4.4.3. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF).....	18
4.4.4. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	19
4.5. Reaktion auf Trauma und Entzündung des Sehngewebes	20
4.5.1. Entzündungsreaktion nach Läsion der SSS	20
4.5.2. Apoptosevorgang bei Gewebsumbildungen	22

5. Materialien.....	24
5.1. Geräte.....	24
5.2. Chemikalien.....	24
5.3. Enzyme.....	25
5.4. Färbungen.....	25
5.5. Antikörper.....	26
5.6. Test Kits.....	27
5.7. Verbrauchsmaterialien.....	27
5.8. Computersoftware.....	27
6. Methoden.....	28
6.1. Entnahme der Präparate.....	28
6.1.1. Supraspinatussehne.....	28
6.1.2. Bursa subacromialis.....	29
6.2. Herstellung von Puffern und Lösungen.....	30
6.3. Histologie.....	30
6.3.1. Herstellung von Gewebsschnitten.....	30
6.3.2. Vorbehandlung der Gewebeschnitte.....	31
6.3.3. Färbung.....	31
6.3.4. Immunhistochemie.....	32
6.4. Auswertung der histologischen Schnitte.....	33
6.5. Apoptose-Test.....	34
6.5.1. Auswertung des Apoptose-Tests.....	34
6.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	34
6.6.1. RNA Extraktion.....	34
6.6.2. Reverse Transkription.....	35
6.6.3. PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	35
6.6.4. Auswertung der RT-PCR.....	37
7. Ergebnisse.....	38
7.1. Histologische Auswertung des Supraspinatus- Sehnenansatzes.....	38
7.2. Expression von Extrazellulärer Matrix (EZM) in den Kaninchenschultern....	39
7.2.1. Histologische Auswertung.....	39
7.2.2. Immunhistologische Untersuchungen.....	42

7.2.3. mRNA Expression	44
7.3. Expression von Wachstumsfaktoren in der Supraspinatussehne des Kaninchens.....	46
7.3.1. Immunhistologische Untersuchungen.....	46
7.3.2. mRNA Expression	51
7.4. Entzündungsparameter.....	52
7.4.1. Immunologische Untersuchungen	52
7.4.2. mRNA Expression	54
7.5. Apoptose in der Supraspinatussehne	55
7.6. Untersuchungen an der humanen Bursa subacromialis	57
7.6.1. Immunhistologische Untersuchungen der EZM	57
7.6.2. Immunologische Untersuchungen der Wachstumsfaktoren	58
7.6.3. mRNA Expression	61
8. Diskussion	62
8.1. Die Expression von EZM in der heilenden Schulter	63
8.1.1. Kollagen Typ I	63
8.1.2. Kollagen Typ X.....	63
8.1.3. Kollagen Typ II und Beeinflussung durch Wachstumsfaktoren.....	64
8.2. Entzündungsreaktion im postoperativem Verlauf	66
8.3. Neue Ansatzzone	67
8.4. Bursa subacromialis	68
9. Schlussfolgerung	70
10. Literaturverzeichnis	72
11. Anhang.....	80
11.1. Ehrenwörtliche Erklärung.....	80
11.2. Lebenslauf.....	81
11.3. Danksagung.....	82

3. Zusammenfassung

Defekte der Rotatorenmanschette (RM) sind oft eine Ursache für Bewegungseinschränkungen der Schulter. Entzündungen der Bursa subacromialis werden hingegen für die Entstehung der Schmerzen im Zusammenhang mit Rotatorenmanschettendefekten gebracht. Am häufigsten ist hierbei die Supraspinatussehne (SSS) betroffen. Unabhängig von der Pathogenese werden diese Defekte operativ behoben. Ungeklärt ist jedoch trotz adäquater operativer Technik die Ursache für die hohe Rate an Rerupturen im postoperativen Verlauf.

Störungen der anatomischen Gegebenheiten des Schultergelenkes und der Mikrostruktur der Sehne führen zu pathologischen Veränderungen, welche die Gelenkfunktion einschränken können. Es ist anzunehmen, dass diese Vorgänge innerhalb der Sehne zu einer Dedifferenzierung von Zellen führen, in deren Folge es zum Entstehen von Knorpelarealen und ev. zur Mineralisation kommen kann. Diese pathologischen Veränderungen verursachen eine geringere Zugelastizität des Gewebes, wodurch Sehnen der RM für Rupturen anfälliger werden.

Diese Arbeit hatte folgende Ziele und Ergebnisse:

- Die Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM) nach einem tierexperimentell induzierten akuten Trauma breitflächig zu analysieren, um genauere Erkenntnisse über ablaufende Prozesse zu erhalten:

Mit Hilfe von klassisch-histologischen Färbemethoden und immunhistochemischen Verfahren wurden chondrogene Veränderungen innerhalb des Sehnenansatzes erfasst und lokalisiert. Insbesondere Kollagen Typ II und Proteoglykane ließen sich im Faserknorpel vermehrt darstellen. Ergebnisse der PCR (Polymerase Chain Reaktion) verifizierten diese Ergebnisse. Mit Hilfe eines Apoptose-Tests konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen regional von Apoptosen begleitet waren.

- Die im Zuge eines Traumas entstehenden entzündlichen Veränderungen zu analysieren:

Dazu wurden Nachweise von Markern für VEGF (Angiogenese), IL-1 β (Zytokine), CD3 (Lymphozyten) und RAM11 (Makrophagen) durch Immunhistochemie bzw. mRNA durch PCR erfasst. Hierdurch zeigte sich, dass es postoperativ zu keiner leukozytären Infiltration kam, Makrophagen hingegen stark vorhanden waren.

- Wachstumsfaktoren wie bFGF, dem BMP-2 und BMP-7 immunhistochemisch und mit PCR nachzuweisen, da sie für die Veränderungen verantwortlich sein können:

Die Untersuchungen über den postoperativen Verlauf zeigten, dass sich der Faserknorpel entlang der Sehne ausdehnte, um nach vier Wochen ein Maximum zu erreichen. Genauere Untersuchungen in Bezug auf vorhandene Wachstumsfaktoren zeigten eine Erhöhung an bFGF und BMP-7 in der heilenden SSS. Das bFGF schien im Heilungsverlauf in gesteigerten Mengen innerhalb der Sehne produziert zu werden. BMP-7 –Protein war in dem betroffenen Arealen in erhöhtem Maße vorhanden, obwohl BMP-7 mRNA vermindert vorkam. Es ist anzunehmen, dass diese beiden Wachstumsfaktoren in die Entstehung des Knorpelgewebes einbezogen sind. Der niedrige mRNA Gehalt vom BMP-7 innerhalb des Schultergelenkes lässt vermuten, dass dies auch außerhalb produziert wird. (Simultan durchgeführte Untersuchungen an der humanen Bursa subacromialis zeigten, dass BMP-7 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in den Bursateilen nachweisbar war.)

Diese Ergebnisse bringen neue Erkenntnisse in das Verhalten der SSS nach einem Trauma und können möglicherweise das zukünftige therapeutische Vorgehen bei Schulterläsionen beeinflussen. Nach diesen Untersuchungsergebnissen wäre es sinnvoll, eine Bursa frühzeitig operativ zu entfernen, um den Prozess der knorpeligen Dedifferenzierung zu unterbinden und damit einer Ruptur möglicherweise vorzubeugen.

4. Einleitung

4.1. Problematik und Voruntersuchungen

Degenerative Veränderungen der Rotatorenmanschette, Partialrupturen und Rupturen sind häufig Ursache für Schmerzen und Funktionseinschränkungen der Schulter. Gelegentlich sind die Veränderungen der Sehne auch von einer ausladenden Mineralisierung begleitet, deren Ursache unklar ist und die ihrerseits zu einer Verkleinerung des subakromialen Raums führen können (Rowe C.R., 1988). Studien haben gezeigt, dass 70% der Patienten über 60 Jahren, und über 80% der Patienten über 70 Jahren degenerative Veränderungen und Rupturen in der Rotatorenmanschette haben. (Murrell G.A.C. & Walton J.R., 2001), so dass eine Altersabhängigkeit unterstellt werden muss. Besonders häufig ist dabei die Supraspinatussehne (SSS), die am weitesten anterior liegt, von degenerativen Veränderungen betroffen. Funktionell ist sie wesentlich an der Abduktion und Außenrotation im Schultergelenk beteiligt (Rowe C.R., 1988; Putz R. & Pabst R., 1993).

Unabhängig von der bislang unzureichend bekannten Ätiologie der Partialrupturen oder kompletten Rupturen der Rotatorenmanschette müssen diese bei Versagen konservativer Therapiemaßnahmen operativ behoben werden, um einen annähernd normalen Bewegungsumfang und eine Schmerzlinderung zu erreichen. Dieser operative Eingriff beinhaltet eine Naht bzw. Reinsertion der rupturierten Sehne. Die Nachbehandlung besteht in einer 6 bis 12-wöchigen postoperativen Immobilisation der Schulter mit erheblichen persönlichen und volkswirtschaftlichen Konsequenzen. Selbst nach kompletter Ausheilung erreicht die Kraft des Armes nicht das Ausmaß der gesunden Schulter. (Rokito A. et al., 1999). Eine zusätzliche Problematik besteht darin, dass es trotz sorgfältiger Reinsertion und Rehabilitation häufig zu einer erneuten Ruptur kommen kann (Rickert M. et al., 1998; Gerber Ch. et al., 2000; Jost B. et al., 2000; Murrell G.A.C. & Walton J.R., 2001).

In vorangegangenen Untersuchungen am Tiermodell, bei denen die Supraspinatussehne nach Desinsertion am Knochen durch einen Fadenanker am Humeruskopf reinsertiert wurde, war eine Ausdehnung der fibrocartilaginären Ansatzzone in der Sehne zu beobachten (Fuhrmann R. et al., 2002).

Diese Veränderung der Gewebzusammensetzung ist möglicherweise eine Erklärung für die Rupturen, da Faserknorpel zwar vermehrt druckstabil ist, jedoch nicht die für die Sehne typische Zugelastizität aufweist. Die biomechanischen Ausrissversuche der reinsertierten Supraspinatussehne am Kaninchen bestätigten diese Theorie, da zu erkennen war, dass selbst nach 12 Wochen die Gewebestabilität nicht der unverletzten Gegenseite entsprach (Carpenter J.E. et al., 1998; Fuhrmann R. et al., 2002; Uthoff H.K. et al., 2002).

Um den Einfluss der operativen Intervention auszuschließen und eine Aussage zur Spontanheilung der Supraspinatussehne nach knöchernem Ausriss machen zu können, wurde die Sehne ohne Reinsertion am Humeruskopf abgetrennt und aus dem Verbund der Rotatorenmanschette so gelöst, dass sie sich retrahieren konnte. Zur Kontrolle wurden gesunde Schulterpräparate des Kaninchens der gleichen Altersklasse entnommen und mituntersucht.

Es stellt sich dabei die Frage, welches die molekularen und zellulären Mechanismen sind, die nach der Durchtrennung der Supraspinatussehne auftreten und die die nachfolgend einsetzenden Heilungsvorgänge charakterisieren.

4.2. Die Supraspinatussehne als Teil der Rotatorenmanschette

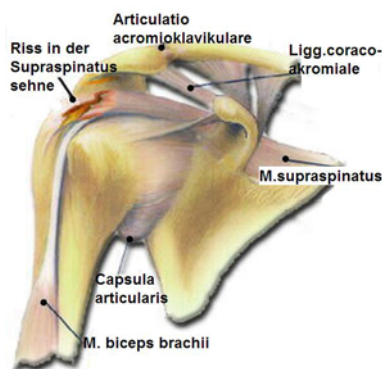


Abb. 1 Schulteraufsicht von vorne. Zu sehen ist die Lage der Supraspinatussehne. Hier mit einem Riss abgebildet. Modifiziert übernommen aus <http://www.skihealth.com>

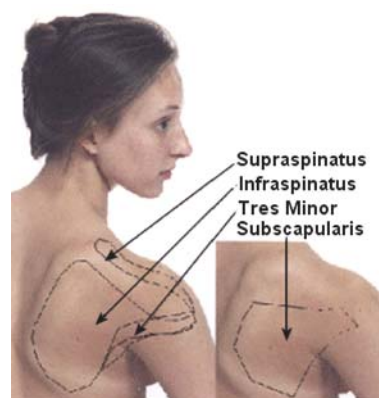


Abb. 2 Rotatorenmanschette. Übersicht. Sie besteht aus dem M. supraspinatus, M. infraspinatus, M. teres minor und dem M. subscapularis. Übernommen aus <http://danke.com>

4.2.1. Funktion und Aufbau der Supraspinatussehne

Der M. supraspinatus entstammt der Fossa supraspinata am Schulterblatt. Er entwickelt eine Endsehne, die unter dem knöchernen Schulterdach (Akromion) hinweg zum oberen Feld des Tuberculum majus am Humeruskopf zieht. Durch ihre Lage ist die Supraspinatussehne in die kapsuloligamentären Strukturen integriert.

Der M. supraspinatus ist bevorzugt ein Abduktor des Schultergelenks und ist bei der Hebung des Armes nach vorne außen beteiligt. Zusätzlich rotiert er den adduzierten Arm nach außen (Abb. 1+2). Zwischen dem korakoakromialen Bogen und der SSS liegt die Bursa subacromialis (Abb. 6). Bei Abduktion im Schultergelenk erfolgt durch das Einschwenken des Tuberculum majus unter das Akromion eine mechanische Einengung der Bursa und der Rotatorenmanschette. Dies ist besonders ausgeprägt zwischen einer Abduktion von 60° und 90°. Ab 90° Abduktion wird das Schulterblatt im Schultergelenk mitgedreht und entlastet dabei die Bursa subacromialis und die SSS (Abb. 7)(Lippert H., 1996).

Sehnen dienen der Zugkraftübertragung zwischen dem Muskel und dem Knochen und ermöglichen dadurch Gelenkbewegungen. Die sehnige Endstrecke des Muskels kann in Abhängigkeit von den anatomischen Gegebenheiten eine unterschiedliche Dicke und Länge haben, um so die erforderliche Funktion zu ermöglichen. Charakteristisch für Sehnen sind eine hohe mechanische Belastbarkeit und eine große Zugelastizität. Makroskopisch sind sie weiß-glänzend und von faser-elastischer Konsistenz.

Sie bestehen zum größten Teil aus Kollagen Typ I (65-80% der Trockenmasse) und Elastin (1-2% der Trockenmasse) (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996 a; Löffler G. und Petrides P., 1997), das in eine Wasser-Proteoglykan-Matrix eingebettet ist. Zwischen den Kollagenfibrillen liegen wenige ovaläre Tenozyten (Kannus P., 2000).

Die unmittelbare fibrokartilaginäre Ansatzzone der Supraspinatussehne (SSS) besteht zum größten Teil aus nichtmineralisiertem Faserknorpel, der hauptsächlich aus Kollagen Typ II besteht. Die Kollagenbündel ziehen der Konvexität des Humeruskopfes folgend bogenförmig von der Sehne zum Tuberculum majus. Zusätzlich sind im Faserknorpel noch Proteoglykane vorhanden, welche speziell mit dem Kollagen Typ II in Verbindung treten (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996 b; Löffler G. und Petrides P., 1997; Fuhrmann R. et al., 2002).

Faserknorpel hat sowohl Eigenschaften von dichtem Bindegewebe als auch von hyalinem Knorpel. Weitere Lokalisationen von Faserknorpel sind neben den Disci intervertebrales die knöchernen Ansätze verschiedener Bänder und Sehnen sowie die Symphysis pubica. Weiterhin ist Faserknorpel innerhalb von Sehnen und Ligamenten zu finden, an denen diese einer vermehrten Druck- oder Scherbelastung ausgesetzt werden. Dazu gehört beispielsweise der retromalleoläre Verlauf der Tibialis posterior-Sehne oder das Lig. suprascapularis (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996b; Benjamin M. & Ralphs J.R., 1998; Clark J. & Stechschulte jr.D.J., 1998; Kannus P., 2000).

Der Ansatz der Supraspinatussehne am Knochen kann in vier Regionen eingeteilt werden (Woo SL. et.al., 1987). Die erste Region besteht aus der Sehne selbst, als zweite Region wird der nicht mineralisierte Sehnenknorpelansatz bezeichnet, übergehend in die dritte Region, die aus dem mineralisierten Sehnenknorpelansatz, beginnend mit der Tidemark, besteht. Die vierte Region ist der Knochen selbst.

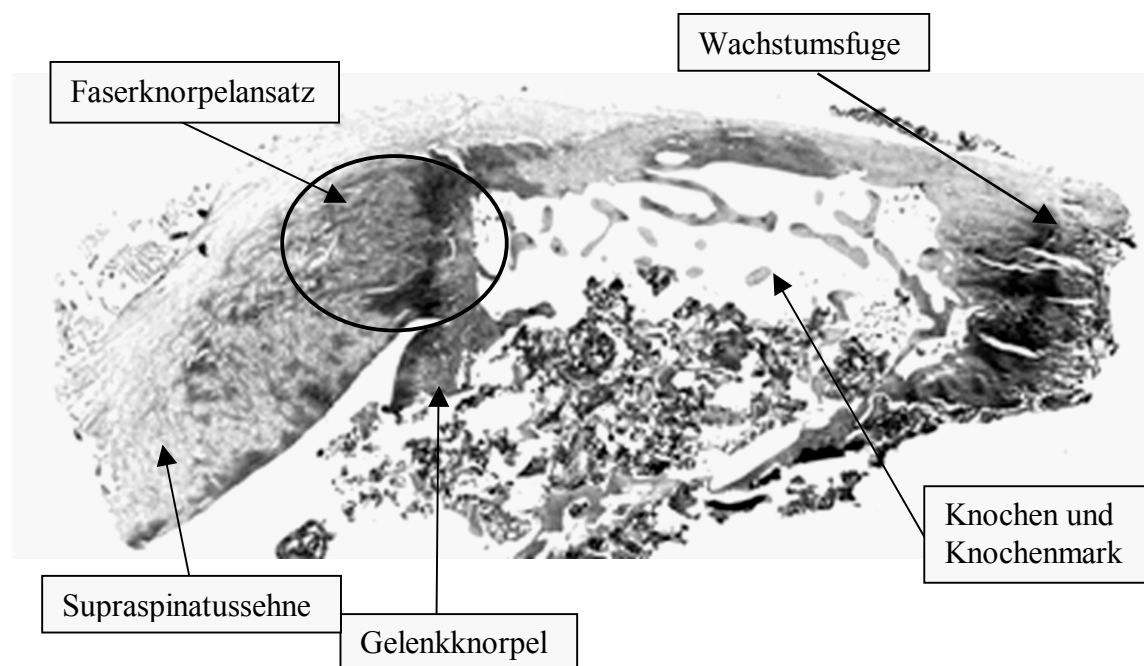


Abb. 3 Schematische Darstellung des Sehnenansatzes der Supraspinatussehne (SSS) am Humeruskopf.

In der ersten Region, der Sehne, liegen die schmalen und länglichen Tenozyten vereinzelt zwischen den parallel angeordneten Kollagenfasern. In Nähe des knöchernen Ansatzes werden die Zellen runder (chondrozytenähnlich) und liegen verstreut oder paarweise im Bindegewebe. Bei einer gesunden Supraspinatussehne ziehen die Fasern in

den knöchernen Ansatz hinein, und bilden somit eine feste Verankerung (Abb. 4) (Clark J. & Stechschulte jr. D.J., 1998; Oguma H. et al., 2001). Sie ziehen bis in die Lamellen des Knochens. Auf diese Art und Weise wird eine starke und reißfeste Verbindung hergestellt. Im Faserknorpelansatz liegen die Fasern in einer Rasterform vor, bei der die Fasern teilweise senkrecht zueinander stehen (Abb. 5) (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996b).

Faserknorpel ist im Gegensatz zum Sehngewebe dadurch charakterisiert, dass Chondrozyten zwischen den Sehnenfasern ausdifferenziert und diese in eine knorpeltypische Matrix eingebettet sind. Die Kollagenfaserbündel treten quantitativ in den Hintergrund (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996 b; Akeson W. et al., 2001).

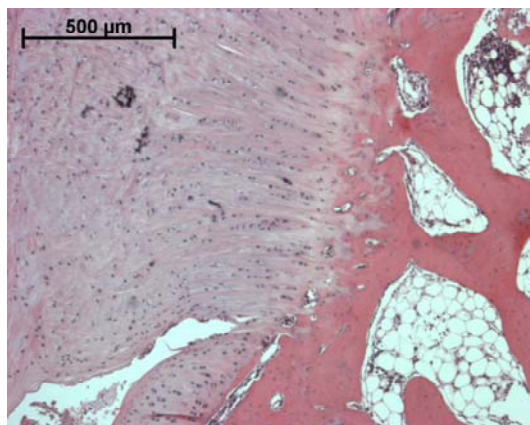


Abb. 4 Übersicht aus der physiologischen fibrokartilaginären Zone des Supraspinatussehnenansatzes. Färbung H&E-Objektivvergrößerung 5X

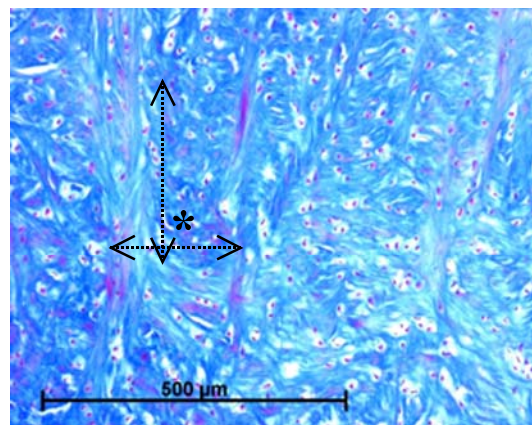


Abb. 5 Übersicht über die Ansatzzone der gesunden Supraspinatussehne mit den senkrecht zueinander stehenden Fasern (*). Die Knorpelfasern sind an den rötlich gefärbten Fasern zu erkennen. Objektivvergrößerung 10 X. Azan-Färbung

4.2.2. Funktion und Aufbau der Bursa subacromialis als Teil des Schultergelenkes

Die Supraspinatussehne steht in engem Kontakt mit ihrer Umgebung. Während ihres Verlaufes unterhalb des korakoakromialen Bogens und über dem Humeruskopf wird sie kranial durch die Bursa subacromialis überdeckt (Abb. 6). Vermutlich dient die Bursa dazu, die SSS während der Abduktionsbewegung des Arms gegenüber dem knöchernen Schulterdach abzupolstern (Abb. 7). Deshalb kann man sie aus klinischer Sicht neben der Tatsache, dass sie die größte Bursa im Organismus ist, als essentielle Struktur für das Schultergelenk betrachten (Birnbauer K. & Lierse W., 1992).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Bursa ein dünner, lang gezogener, mit mukösem Sekret gefüllter Hohlraum im Subacromialbereich. Sie liegt kaudal des Schulterdaches. Ventral und anterior wird die Bursa durch das Lig. coracoacromiale begrenzt. Sie liegt kranial über der SSS und ihrem Ansatz und bedeckt auch Anteile des M. infraspinatus.

Die Bursa subacromialis ist ein Schleimbeutel mit Drüsenfunktion. Da sie sich häufig im Zusammenhang mit Defekten in der Rotatorenmanschette entzündlich verändert, ist es naheliegend zu vermuten, dass die Bursaentzündung die Sehne in irgendeiner Weise beeinflusst. Dies wurde auch schon in der Literatur hypothetisch erwogen (Uthoff HK et al., 2000; Kobayashi K. et al., 2001; Yanagisawa K. et al., 2001).

Eine besondere Rolle scheint die muköse Bursa subacromialis in der Pathogenese von Subakromialsyndromen zu besitzen. Durch ihre Lage ist sie bei einer Abduktion des Arms einer mechanischen Beengung durch das Einschwenken des Tuberkulum majus unter das knöcherne Schulterdach, dem sogenannten „Impingement“, ausgesetzt. Alle Veränderungen am Schultergelenk, die zu einer mangelnden Zentrierung des Humeruskopfs in der Gelenkpfanne führen, können durch den Humeruskopfhochstand zu einer vermehrten mechanischen Belastung der Bursa mit Auslösung reaktiver entzündlicher Veränderungen führen. Im Zuge einer solchen Entzündung verdickt sich die Bursa und kann wie jede akute Bursitis zu Schmerzen sowie einer sekundären Bewegungseinschränkung führen (Rowe C.R., 1988; Birnbauer K. & Lierse W., 1992).

Die Rolle, welche die Bursa subacromialis bei Defekten und degenerativen Veränderungen der Rotatorenmanschette hat, wurde noch nicht hinreichend geklärt.

Es gibt Arbeiten, die belegen, dass diese beiden anatomischen Strukturen in engerem Zusammenhang stehen als bisher vermutet wurde (Rowe C.R., 1988; Sakai H. et al., 2001; Tillander B. et al., 2001; Yanagisawa K. et al., 2001).

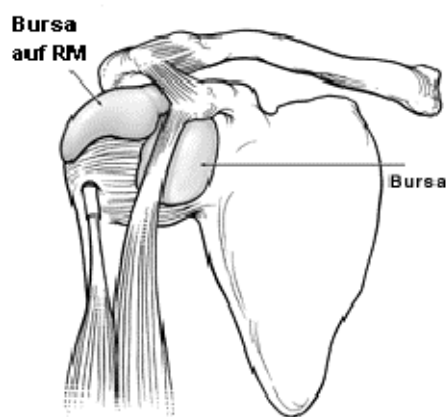


Abb. 6 Schulteraufsicht von vorne mit Darstellung der Bursa subacromialis. Zu sehen ist die Lage zwischen Akromion und Rotatorenmanschette (RM). Mit Änderungen aus <http://www.clevelandclinic.org> übernommen

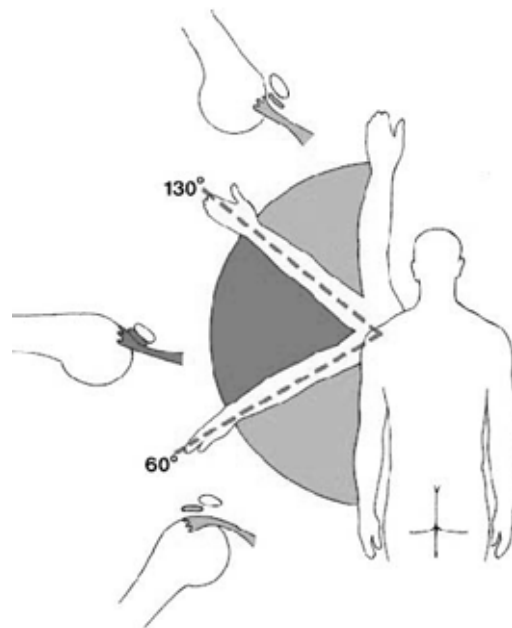


Abb. 7 Bewegungsumfang des Schultergelenkes bei Abduktion. Die mechanische Einengung der Bursa ist besonders zwischen 60° und 90° ausgeprägt. Ab 90° Abduktion im Schultergelenk wird das Schulterblatt mitgedreht. Übernommen aus <http://www.uni.rostock.de/.../anatomie>

4.2.2.1. Differenzierung von Zellen des Bindegewebes und des Stützgewebes unter dem Gesichtspunkt der chondrogenen Metaplasie

Zellen des Binde- und Stützgewebes stammen entwicklungsgeschichtlich aus Mesenchymgewebe, welches frühembryonal aus dem Mesoderm hervorgeht. Aus mesenchymalen Vorläuferzellen entwickeln sich eine Vielzahl von Zellen wie Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten oder Myoblasten (Abb. 8). Es wird vermutet, dass eine Metaplasie zwischen verschiedenen Zellarten möglich ist. So können Fibroblasten bei bestimmten Stimulationen zu Zellen differenzieren, welche den Chondrozyten sehr ähnlich sind und umgekehrt (Benya P.D. et al., 1978). Dies kann in der Zellkultur beobachtet werden. *In vivo* wird dieser Mechanismus auch diskutiert, und könnte z.B. bei der fibrokartilaginären Umdifferenzierung von Sehnenansatzzonen eine Rolle spielen.

Knorpelzellen können auch zu hypertrophen Knorpelzellen differenzieren, was im Wachstum, besonders der Röhrenknochen, essentiell für die Kalzifikation und spätere Mineralisation ist (Reddi A. et al., 1977; Weisser J. et al., 2002). Beim adulten Organismus ist eine solche Differenzierung meist pathologisch bedingt und kann zu Mineralisationen im Gewebe führen (Girkkontaite I. et al., 1996; Aigner T. et al., 1998).

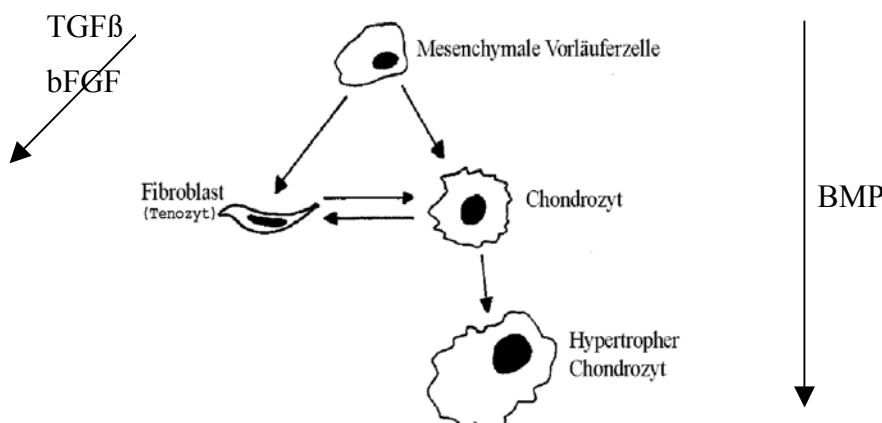


Abb. 8 Differenzierungsschema für die aus mesenchymalen Vorläuferzellen entstandenen Zellen.

4.2.2.2. *Heilung und Regeneration von Sehnen*

Sehnen sind bradytrophes Gewebe und regenerieren somit sehr langsam bis gar nicht. Die Heilung der Sehnen erfolgt in drei biologischen Phasen:

1. die zelluläre Reaktionsphase,
2. eine Phase in der Faserproteine synthetisiert werden und
3. abschließend die Restrukturierungsphase.

Die erste Phase, bestimmt durch die Entzündungsreaktion, ist bis zum 7. postoperativen Tag abgeschlossen. Sie wird durch die Fibroplasie und eine schnelle Fibrillogenese abgelöst. Ab dem 12. postoperativem Tag beginnt die parallel laufende Reorganisation der Fasern (Hefti F. und Stoll T.M., 1995). Erst wenn diese abgeschlossen ist, ist die Sehne wieder annähernd funktionsfähig. Der klassische Ablauf der Sehnenheilung ist nur begrenzt auf die Supraspinatussehne zu übertragen, da die degenerativen Veränderungen überwiegend in dem Faserknorpelansatz auftreten. Untersuchungen am Tiermodell zeigten eine postoperative unspezifische Zellreaktion in der ersten Woche. Eine Restrukturierung und ein vermehrtes Vorhandensein von Kollagen Typ II konnten in zunehmendem Maße erst ab der zweiten postoperativen Woche beobachtet werden, und selbst nach sechzehn Wochen war die ursprüngliche Struktur nicht komplett wiederhergestellt. Es zeigte sich eine Verschiebung der EZM- Synthese zu Gunsten der Knorpelkomponenten (Carpenter J.E. et al., 1998; Uthoff HK et al., 2000; Thomopoulos S. et al., 2002; Uthoff H.K. et al., 2002).

Die SSS der menschlichen Rotatorenmanschette ist nur bedingt regenerationsfähig (Rowe C.R., 1988; Yamanaka K. & Matsumoto T., 1994; Rickert M. et al., 1998; Rokito A. et al., 1999). Ihre anatomisch exponierte Lage unter dem knöchernen Schulterdach, die schlechte Blutversorgung, eine geringe Zellzahl im Faserknorpel und degenerative Veränderungen sind möglicherweise für die unzureichende Regeneration verantwortlich zu machen. Daraus erklärt sich auch das schlechte Ansprechen von Rotatorenmanschettenläsionen auf konservative Behandlungsmethoden (Carpenter J.E. et al., 1998; Akeson W. et al., 2001).

4.3. Extrazelluläre Matrix (EZM) der Sehnen

4.3.1. Die Kollagene

Kollagene sind Strukturproteine der extrazellulären Matrix, die mindestens eine Domäne von tripelhelikaler Struktur aufweisen. Diese Proteinfamilie stellt mit 30-50% den Hauptanteil der Proteine eines Vertebratenorganismus.

Charakteristisches Merkmal der Kollagene sind lange tripelhelikale Strukturen unterschiedlicher Länge, in denen sich drei annähernd lineare Polypeptidketten, auch α -Ketten genannt, umeinander winden, um eine Dreifachhelix zu bilden (Hofman H., et al., 1978; Kühn K., 1986; v.d.Mark K., 1999).

α - Ketten enthalten vor allem Glyzin in jeder dritten Position, was die klassische repetitive Struktur der Kollagene $(\text{Gly-X-Y})_n$ ergibt. Prolin stabilisiert mit seinem Bindungswinkel in der Peptidkette die α -Ketten. Das 4-Hydroxyprolin bildet Wasserstoffbrücken aus und bewirkt die thermische Stabilität der Kollagene. (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996 a; Löffler G. und Petrides P., 1997). Es sind bis jetzt 25 α -Ketten bekannt, welche, je nach Kombination, die inzwischen über 20 bekannten Kollagentypen bilden. Diese werden nach Strukturmerkmalen in folgende Gruppen eingeteilt (Tab.1) (v.d.Mark K., 1999).

Gruppe	Kollagen Typ
<ul style="list-style-type: none"> Fibrillenbildende Kollagene 	I, II, III, V, XI
<ul style="list-style-type: none"> FACITs (Fibrillen- assoziierte- Kollagene mit unterbrochener Tripelhelix) 	IX, XII, XIV, XVI, XIX
<ul style="list-style-type: none"> Netzwerkbildende Kollagene 	IV, VIII, X
<ul style="list-style-type: none"> „beaded filament-forming Collagen“ 	VI
<ul style="list-style-type: none"> Kollagene mit Tranmembrandomänen 	XIII, XVII
<ul style="list-style-type: none"> Verankerungsfibrillenbildende Kollagene der Basalmembran 	VII
<ul style="list-style-type: none"> Sonstige 	XV, XVIII

Tabelle 1: Einteilung der Kollagene nach Strukturmerkmalen

Kollagene werden aus einer Vielzahl von Zellen als Pro-Kollagen mit Amino- (NH₂-) und Carboxyl- (COOH-) Telozeptiden im rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und sezerniert. Extrazellulär wird das Propeptid gespalten, wobei das reife Kollagenmolekül entsteht. Dieses faltet sich eigenständig zu Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 10-300 nm aus (Abb. 9) (Fessler J.H., et al., 1985; Doege K.J. et al., 1986). Bei Kollagen Typ III und V gibt es auch Hinweise darauf, dass das Propeptid im reifen Kollagen noch vorhanden ist. Dies kann eine Rolle bei der Fibrillognese oder der Kontrolle der Kollagensynthese spielen.

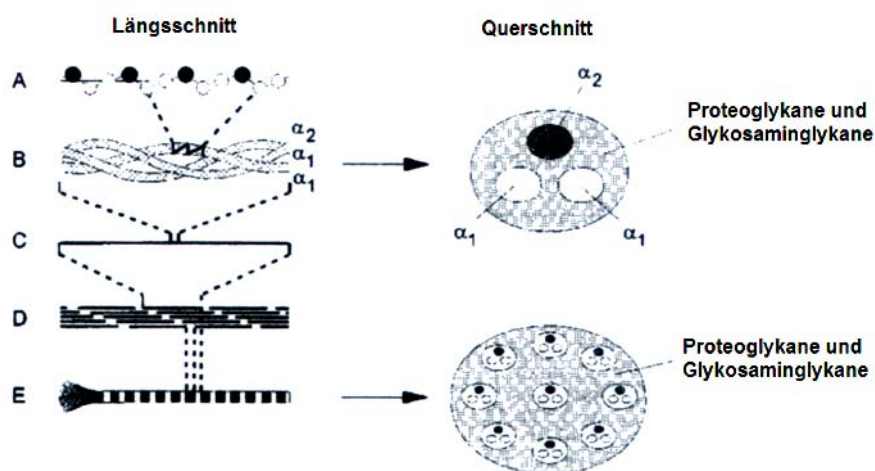


Abb. 9 Bildung von Kollagen Typ I. (A) Aminosäuren bilden α -Kette. Schwarz sind die Glyzine, welche jede dritte Position einnehmen. (B)(C) Drei α -Ketten vereinigen sich, um ein rechtsdrehendes Kollagenmolekül zu bilden. Die Kollagene sind von Proteoglykanen und Glykosaminglykanen umgeben. (D) Die Kollagenmoleküle vernetzen sich zu Mikrofibrillen. (E) Kollagenfibrille. Die Mikrofibrillen sind mit Proteoglykanen und Glykosaminglykanen umgeben. Mit Änderungen entnommen. (Kannus, 2000)

4.3.1.1. Kollagen Typ I

Kollagen Typ I ist das am längsten bekannte, meist vorhandene und best untersuchte Kollagen der Vertebraten. Es wird aus zwei α 1-Ketten und einer α 2- Kette zusammengesetzt (Kuivaniemi H. et al., 1988). Es bildet zu 90% die Grundmasse von Knochen und Sehnen und ist das Hauptkollagen der Haut, der Ligamente und Sehnen, der Hornhaut und des interstitiellen Bindegewebes. Es wird von fast allen Bindegewebszellen, besonders aber von Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten in unterschiedlicher Quantität synthetisiert. Es ist auch in retikulären Fasern, mit Ausnahme des hyalinen Knorpels und des Gehirns vorhanden (v.d.Mark K., 1981).

Neben biomechanischen Funktionen des Kollagen Typ I, ist dieses auch essentiell an der Embryogenese des Gewebes und der Organe, der Zellproliferation, der Zellmigration, der Wundheilung und der Hämostasis beteiligt.

4.3.1.2. Kollagen Typ II

Kollagen Typ II wird vor allem im hyalinen Knorpel gefunden, dessen Trockenmasse zu 80 % aus Kollagen Typ II besteht (v.d.Mark K., 1981; Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996 b; Löffler G. und Petrides P., 1997; v.d.Mark K., 1999). Es ist dem Kollagen Typ I in Größe und biomechanischer Eigenschaft sehr ähnlich. Es ist im Gegensatz zum Kollagen Typ I ein Homotrimer bestehend aus drei $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten. Das adulte Kollagen Typ II $\alpha 1$ (B) unterscheidet sich vom embryonalen Typ II $\alpha 1$ (A) durch das Fehlen einer zusätzlichen 69 Aminosäuren langen Domäne der N-terminalen Propeptidregion (Maureen C. et al., 1990).

In Knorpelgewebe ist die EZM aus Hybridfibrillen, bestehend aus Kollagen Typ II (95%), IX (1%) und XI (3%) sowie VI, X und den Proteoglykanen zusammengesetzt (Löffler G. und Petrides P., 1997).

4.3.1.3. Kollagen Typ X

Kollagen Typ X wird nur von hypertrophen Chondrozyten produziert. Es ist ein kurzes homotrimeres Kollagen mit physiologischem Vorkommen nur im Knorpel der Wachstumsfuge der Röhrenknochen, den Rippen, der Wirbelsäule und in der Regeneration von Knorpel bzw. Knochen (Kühn K., 1986; Löffler G. und Petrides P., 1997).

4.3.1.4. *Proteoglykane*

Proteoglykane sind ein Komplex aus Glykosaminoglykanen und Proteinen, welche, je nach Lokalisation im Organismus, unterschiedlich zusammengesetzt sind. Im Knorpel bilden Proteoglykane einen Komplex mit Hyaluronsäure und Kollagen Typ II (Abb. 10). Diese Komplexe sind sehr starke und flexible Verbände (Ruoslahti E., 1988; Löffler G. und Petrides P., 1997). Glykosamioglykane sind Polysaccharide, dessen Bausteine aus abgewandelte Monosacchariden bestehen.

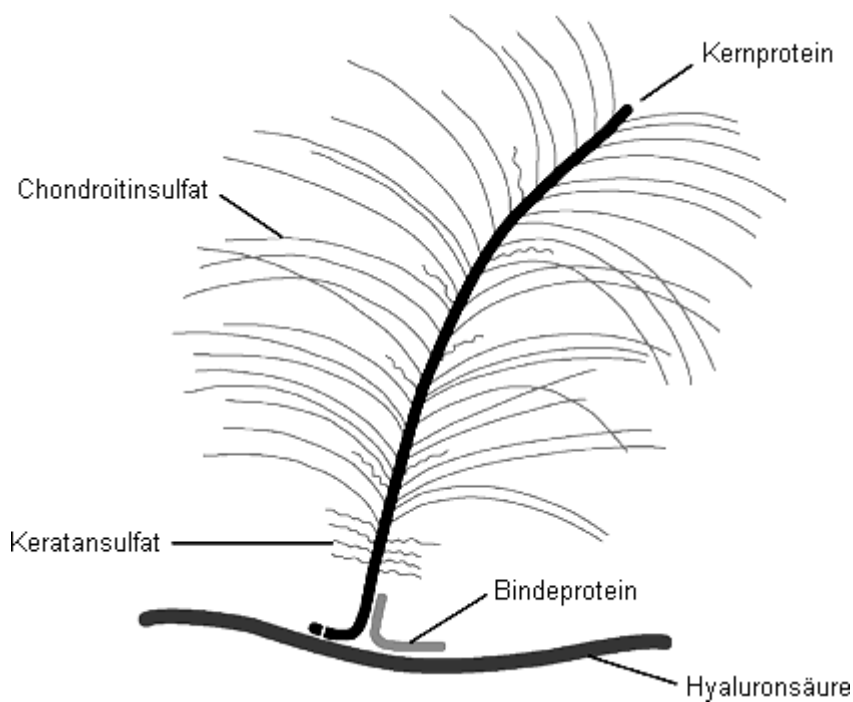


Abb. 10 Schema der Struktur des Proteoglykans Aggrecan aus dem Knorpel, bestehend aus einem Kernprotein, an das verschiedene Glykosaminoglykaneseitenketten gebunden sind (Chondroitin-, Keratansulfat). Mit Änderungen übernommen aus Roche Lexikon ®

4.4. Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind eine Gruppe von potenten hormonähnlichen Polypeptiden, welche ein breites Spektrum von biologischen Abläufen regulieren. Sie werden von Zellen produziert und wirken als mitogene und differenzierende Faktoren.

4.4.1. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

BMPs sind Teil der TGF β (transforming growth factor β)- Superfamilie, einer Gruppe von Peptidwachstumsfaktoren, unter denen 30 BMPs identifiziert wurden (Ducy P. & Karsenty G., 2000).

Mitglieder der TGF β -Superfamilie werden aus einem großen Vorgängermolekül synthetisiert und durch proteolytische Spaltung des Propeptids in die reife und aktive Form überführt. BMPs bestehen aus Dimeren, welche über sieben Disulfidbindungen verbunden sind. Sie sind entweder als Homodimere sowie auch als Heterodimere aktiv, wobei letztere aktiver sind (Riley E. et al., 1996; Wozney J. & Rosen V., 1998).

Die Wirkung von BMPs wird über einen transmembranalen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor übermittelt (Abb. 11). Dieser besteht aus einem Heterodimerkomplex, der sich aus Rezeptor Typ I (BMPR I A+B) und Rezeptor Typ II (BMPR II) zusammensetzt (Groeneveld E.H.J. et al., 2000; Nakayama T. et al., 2000). Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion über Smad-Proteine, welche regulierende Funktionen haben (Abb. 8) (Nakayama T. et al., 2000).

Ihren Namen verdanken die BMPs, auch OPs (Osteogenetic Proteins) genannt, ihrem Entdeckungsort in demineralisierter Knochenmatrix. Urist et al. (1965) zeigten, dass Knochenmatrix, wenn sie subkutan bzw. intramuskulär bei Nagern injiziert wurde, zu einer ektopen Knochenbildung führte.

Außer ihren chondrogenen und osteogenetischen Wirkungen sind noch zusätzliche Funktionen bekannt. Einfluss haben sie unter anderem bei der Embryogenese des normalen Skeletts und der Organogenese. In der Organogenese ist auch ein Synergismus

mit FGFs (Fibroblast Growth Factor) bekannt (Riley E. et al., 1996; Wozney J. & Rosen V., 1998; Duncan St. & Watt A.J., 2001; Gould S.E. et al., 2002).

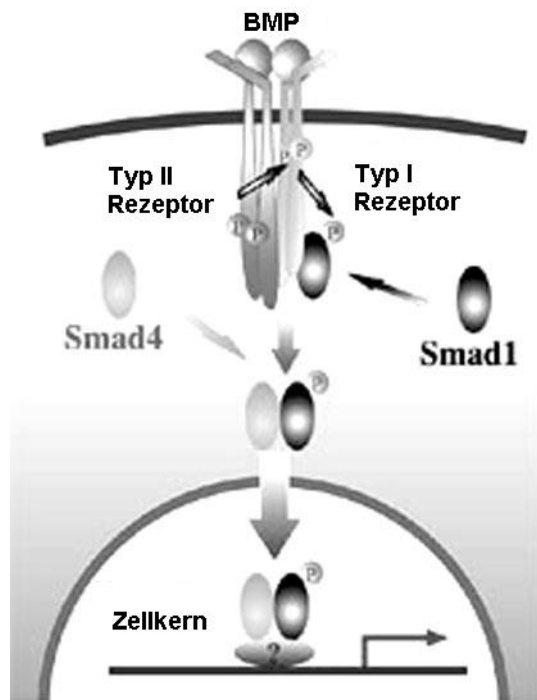


Abb. 11 Signaltransduktion der BMPs über Rezeptoren I und II. Intrazellulär verläuft die Transduktion über SmadProteine in den Zellkern. Mit Änderungen entnommen. <http://www.ahsu.edu>



Abb. 12 BMP-2 Strukturmolekül. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. P.Hortschansky.

4.4.2. BMP-2 und BMP-7

Aus Sicht der Chondrogenese sind das BMP-2 und das BMP-7 (OP-1) von besonderem Interesse. Beide sind sich sehr ähnlich und dafür bekannt, Knorpelgewebe zu induzieren. Präparationen aus isolierten bovinen BMPs haben gezeigt, dass diese aus Dimeren bestehen, wobei die 18kd Untereinheit dem BMP-7 und die 16kd Untereinheit dem BMP-2 entsprechen. In der Literatur ist auch beschrieben, dass Heterodimere mit BMP-2 und BMP-7 eine stärkere Wirkung entfalten als die jeweiligen Homodimere (Abb. 12) (Cook St. & Rueger D., 1996; Groeneveld E.H.J. & Burger E.H., 2000).

Untersuchungen am BMP-2 (Homodimer 32kd, aktive Form 114 Aminosäuren) haben gezeigt, dass es neben seiner Funktion während der Embryogenese bei der

Differenzierung von Osteoblasten und damit bei Heilungen von Knochenbrüchen eine bedeutende Rolle spielt (Riley E. et al., 1996; Ducy P. & Karsenty G., 2000). Es hat einen chemotaktischen Einfluss auf reife Osteoblasten (Sampath K. et al., 1992; Groeneveld E.H.J. & Burger E.H., 2000). Ein Synergismus zwischen bFGF und BMP-2 wurde bereits beschrieben (Groeneveld E.H.J. & Burger E.H., 2000).

BMP-7 (Homodimer 36 kd) gehört zu den meist untersuchten BMPs. Seine Wirkung ist während der Embryogenese und bei Heilungsprozessen unumstritten. Neben dem Knochen und dem Knorpel ist es im adulten Organismus neben Nervenzellen und Sehnen auch in der Niere vertreten; hier ist es wichtig für die Regeneration nach einem ischämischen Infarkt (Aspenberg P. & Forslund C., 2000; Gould SE. et al., 2002). Der Einfluss von BMP-7 auf die Sehnenheilung wurde mit unterschiedlichen Ergebnissen erforscht. Aspenberg et al. (2000) beobachteten eine Knochenbildung in Achillessehnen. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass BMP-7 eine stärkere osteoinduktive Wirkung auf Gewebe als mechanische Stimuli hat (Forslund C. & Aspenberg P. 1998; Aspenberg P. & Forslund C. 2000).

4.4.3. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

Das bFGF (Abb. 13) (basic fibroblast growth factor) gehört der Gruppe der FGFs (fibroblast growth factor) an, die aus 23 Mitgliedern besteht. Gemeinsam ist ihnen ein 120 aa Kern mit sechs identischen Aminosäuren. Ihre Signaltransduktion erfolgt über vier Tyrosin-Kinase-Rezeptoren.

bFGF besteht aus einem 146 Aminosäuren langem Polypeptid (18 kd) und ist in vielen Zellen und Bindegeweben vorhanden. Beteiligt ist es an vielen Funktionen im Organismus. Zusammen mit den BMPs gehört es mit zu jenen Faktoren, welche die Entwicklung der meisten Organe und des Skeletts lenken (Broadley K.N. et al., 1989; Martin G.R., 1998). Neben der Embryogenese ist die Beteiligung von bFGF bei der Heilung von Wunden und in der Angiogenese schon lange bekannt. Neuere Erkenntnisse haben dessen mitogene Wirkung auf Chondrozyten und den Einfluss auf Umdifferenzierungen in der Matrix gezeigt (Wang J-S. & Aspenberg P., 1993; Shida J. et al., 2001).

Die Wirkung des bFGF auf die Kollagen-Typ-II-Expression wird in der Literatur beschrieben, wobei durch die unterschiedlichen Methoden abweichende Ergebnisse beschrieben wurden. *In vitro* Untersuchungen ergaben eine hemmende Wirkung auf die Kollagen-Typ-II-Expression sowie auf die Enddifferenzierung der Chondrozyten (Desai S., 2001; Shida J. et al., 2001). *In vivo* Untersuchungen hingegen zeigten eine stimulierende Wirkung auf die Kollagen-Typ-II-Expression (Shida J. et al., 1996; Hanada K. et al., 1997; Nakajima F. et al., 2001; Shida J. et al., 2001). bFGF kann indirekt auf die Knochenheilung wirken, indem es mesenchymale Zellen stimuliert, welche später in Chondrozyten umgewandelt werden können (Wang J-S. & Aspenberg P., 1993; Mundy G., 1996). Chan et al. (1997) zeigten *in vitro* eine fördernde Wirkung von bFGF auf die Heilung von Sehnen (Chan B. et al., 1997).

4.4.4. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die Gruppe der VEGFs (Abb. 14) sind Endothelzellen- spezifische Mitogene und Auslöser der Gefäßneubildung sowie Mediatoren der Gefäßpermeabilität. Sie werden als glykosylierte Proteindimere in einer Größe von 46-48 kd sezerniert. Es sind fünf verschiedene Isoformen mit 121, 145, 165, 189 und 206 aa bekannt. Sie sind essentiell in der Angiogenese, bei der weiblichen Reproduktion und während der enchondralen Ossifikation. Letztere erfolgt über die Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten. VEGF ist zum Überleben von Endothelzellen *in vitro* sowie *in vivo* notwendig. Es besitzt auch eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten. Ihre Signaltransduktion erfolgt über zwei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2) (Ferrara N. & Gerber H-P., 2001; Petersen W. et al., 2002).

Normale Sehnen, besonders in Regionen des Faserknorpels, haben nur eine geringe Anzahl von Gefäßen. Dies macht sie möglicherweise zur Prädilektionsstelle für degenerative Veränderungen und Rupturen. Untersuchungen über die VEGF-Expression in gesunden und gerissenen Sehnen haben gezeigt, das VEGF in gesunden Sehnen nur in sehr geringem Maße vorhanden ist, während der Heilungsphase jedoch verstärkt exprimiert wird (Pufe T. et al., 2001). Eine Erklärung hierfür könnten Zytokine und Wachstumsfaktoren sein, welche durch Trauma und Entzündung die Expression des VEGF hervorrufen. VEGF gilt auch als Marker für Entzündungen, da hier bei

gesteigerter Stoffwechselaktivität Gefäße benötigt werden, um fördernde Substanzen und Zellen herbeizuführen sowie Abbauprodukte abzutransportieren.

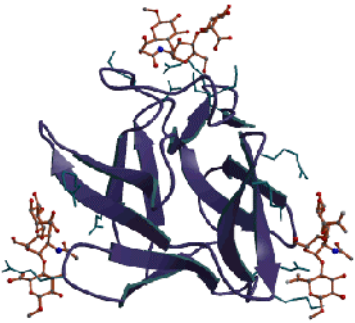


Abb. 13 Dreidimensionale Strukturform des bFGF. Übernommen aus <http://www.biochem.wustl.edu>

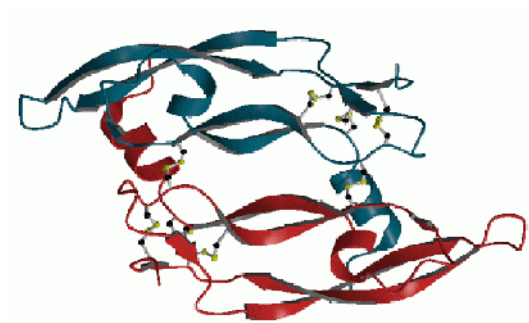


Abb. 14 Dreidimensionale Strukturform des VEGF. Übernommen aus <http://www.mdc-berlin.de>

4.5. Reaktion auf Trauma und Entzündung des Sehngewebes

4.5.1. Entzündungsreaktion nach Läsion der SSS

Unter Entzündung versteht man den Abwehrmechanismus des Organismus gegen einen mechanischen, chemischen oder physikalischen Schadstoff. Diese Noxe kann endogen (Urämie) oder exogen (Trauma) zugeführt werden. Dem Körper stehen zur Abwehr ein humorales und ein zelluläres System zur Verfügung.

Neben systemischen Symptomen wie z.B. Fieber, findet eine humorale Veränderung im Organismus statt. Leukozyten und Makrophagen werden an den Entzündungsort gelockt. Zellen vor Ort, oder auch neu eintretende Zellen sezernieren Mediatoren, sogenannte Zytokine, welche in den Vorgang mit eingreifen. Unter anderem sind Interleukine (IL), welche durch Leukozyten gebildet werden, bei der Aktivierung von Entzündungsprozessen wichtig. Hierzu gehört auch das IL-1, welches unter anderem von Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten gebildet wird, und eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese und auf den Entzündungsverlauf hat. Auf die Expression von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, besonders dem Kollagen Typ II, hat IL-1 eine hemmende Wirkung. Es kann durch IL-1 Einfluss sogar zur Gelenkdestruktion kommen (Bühling K.J., 2000; Saadeddin S.M.et al., 2002).

Neben den Schädigungen des Gelenkknorpels ist auch eine Schädigung des Faserknorpels möglich. In der Literatur wird auch ein Zusammenhang zwischen BMPs und IL-1 β beschrieben. Untersuchungen zeigten, dass in Fibroblasten, welche mit IL-1 β inkubiert wurden, eine Hochregulation der BMP-2 mRNA nachzuweisen war. Zusätzlich scheint das BMP-7 an Nierenzellen eine hemmende Wirkung auf die IL-1 β Expression zu haben (Fowler MJ Jr. et al., 1998; Gould SE Day M et al., 2002).

Die Expression von IL-1 (Untergruppen IL-1 α und IL-1 β) stimuliert Zellen zur weiteren Zytokinsekretion (Abb. 12). Chemotaktisch ist es verantwortlich für die Migration von Entzündungszellen sowie Monozyten an den Ort des Geschehens. Da IL-1 eine bedeutende Rolle im Entzündungsprozess spielt (Abb. 12), kann man dieses auch als Entzündungsmarker verwenden (Lotz M., 2001; Saadeddin S.M. et al., 2002).

Die zelluläre Antwort auf ein Trauma vermitteln meist Leukozyten und Makrophagen. Diese können über ihre Oberflächenrezeptoren nachgewiesen werden. Bei den Lymphozyten sind sie über clusters of differentiation (CD) klassifiziert. CD3 ist ein Rezeptor auf den T-Lymphozyten und kann somit als Marker für eine spezifische Immunantwort verwendet werden (Cambier J.C., 1992; Noll S. & Schaub-Kuhnen S., 2000).

Über die Erfassung der Aktivität der Makrophagen, welche zu den Hilfszellen gehören, kann man genauere Einblicke in die Geschehnisse gewinnen. Makrophagen wandern ins Gewebe ein, um dort Bakterien, Zellreste, Antigene und Immunkomplexe durch Phagozytose zu entfernen (Böcker W. et al., 2001). RAM11 (Anti-Rabbit-Makrophage) ist ein Oberflächenrezeptor, über den man Makrophagen im Gewebe nachweisen kann.

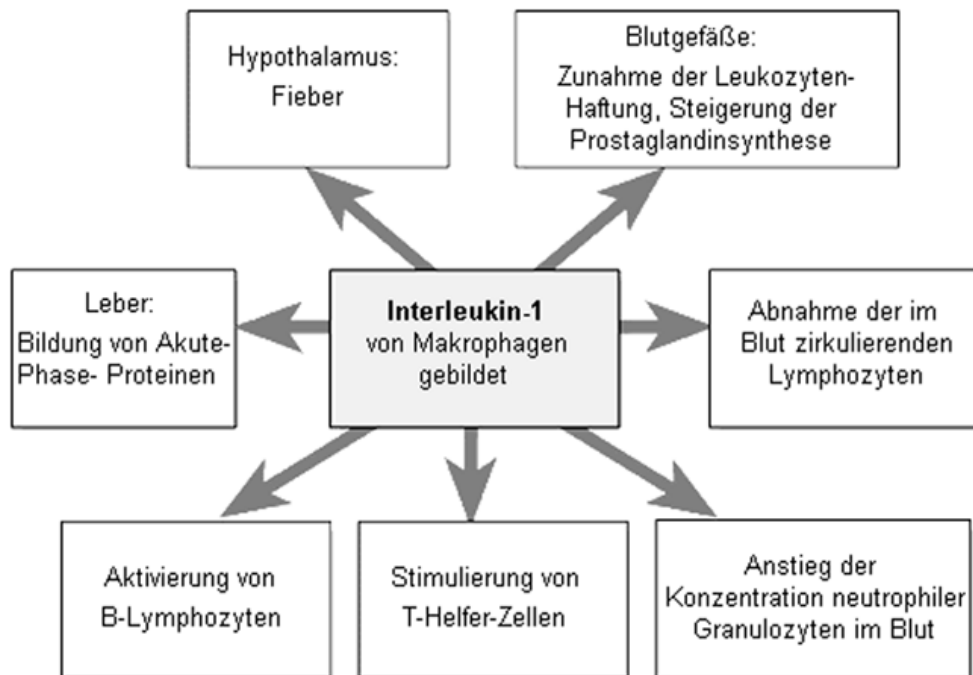


Abb. 15 Übersicht über Funktionen des IL-1. Dargestellt sind die vielseitigen Wirkungen des IL-1. Abgeändert übernommen aus (Roche, 1999).

4.5.2. Apoptosevorgang bei Gewebsumbildungen

Im Zuge des normalen Zellzyklus und bei Gewebsneubildungen gehen Zellen unter und müssen ersetzt werden. Dieser Vorgang wird Apoptose genannt und muss von der Nekrose unterschieden werden. Nekrose entsteht im Zuge eines Gewebstraumas, bei dem der Zelltod von außen hervorgerufen wird. Bei der Apoptose hingegen begibt sich die Zelle selbständig in den Untergang.

Die Apoptose ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem eine hohe Anzahl von proteolytischen Enzymen mit beteiligt sind. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die Caspasen, welche in einer Kette von Reaktionsschritten die Zelle proteolytisch spalten. Es entstehen pyknotische Zellen, charakterisiert durch Schrumpfung des Zellkerns unter Verdichtung und Zusammensintern des Chromatins zu einer homogenen, stark färbbaren, unregelmäßig konturierten Masse.

Bei der Spaltung der DNA entstehen in hohem Maße freie 3'-OH Enden. Da dieser Schritt nicht reversibel ist, gilt der Nachweis der freien Enden als eine Möglichkeit, apoptotische Zellen nachzuweisen (Hengartner M.O., 2000).

Dies geschieht über enzymatische Inkorporation von markierten Nukleotiden an die freien 3' OH Enden mittels der Desoxynucleotidyl Transferase (TdT). Über einen

Zweitantikörper, welcher die inkorporierten Nukleotide erkennt, (Anti- BrdU), kann man diejenigen Zellen sichtbar machen in denen eine erhöhte DNS Fragmentierung vorhanden ist. In apoptotischen Zellen steigt die Anzahl der freien 3'-OH Enden über die Nachweisgrenze. Damit können Zellen, welche sich in Apoptose befinden sichtbar gemacht werden.

So kann man unterscheiden, ob es sich bei Umdifferenzierungen im Gewebe um Neubildungen nach Zelltod handelt oder ob eine Metaplasie stattfindet (Hengartner M.O., 2000).

5. Materialien

5.1. Geräte

Autoklav	Certoclav Sterilizer GmbH Tischcertoklav Axiolab
Brutschrank	Memmert GmbH Modell 400
Eismaschine	Scotsman FRIMON AF 80
Gel Kammer	Bio-Rad Mini-Sub-Cell GT Gerhardt Thermoshake TH05/THL5
Histokinette	Shanon Citodel 1000
Kühlplatte	Leica EG 1130
PCR (Polymerase-Chain-Reaktion)Machine	Master Cycler Gradient, Eppendorf
Microtom	Microm Typ HM 355
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte	Leica EG 1120
Spektralphotometer	Smart Spec™ 3000 Bio-RaD
Thermostat plus	Eppendorf
Wasser-Filtrieranlage	TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 6UV/VF
Zentrifuge	Eppendorf 5415D

5.2. Chemikalien

2-Propanol	Merck I967540046
Agarose	BIO-RAD High Strength Analytical Agarose Control Nr. 161680A
Borsäure	Sigma Lot# 39H0134
Bromphenol Blau	Merck 1.11746
Chloroform	Merck K29322345
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck K28272080
DNA Marker	Carl Roth GmbH pUC19/Msp I Art. Nr. T149.1
Essigsäure	Merck Z594862103

Ethanol	Apotheke KIM
Ethidiumbromid (Ethbr.)	Carl Roth GmbH Art. Nr. 7870.1 10mg/ml
Natrium Chlorid (NaCl)	Merck K28431204045
Ethylendiamidtertraessigsäure (EDTA)	Merck S05581046
Glycerol	Merck K28649392106
Kaliumchlorid (KCl)	Merck F518033032
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ P)	Merck F900877045
Methanol	Merck K29889143
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck K91420645106
Osteodec	Manfred Fremdling-Krankenhaus und Laborbedarf. Fürth/Landshut
Paraformaldehyd	Merck K28306405040
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Merck K28265482042
Trizol	Invitrogen / Life technologies Lot# 1106266
Tween 20	Merck S28933048
Wasserstoffperoxid	Merck ZU31011709
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

5.3. Enzyme

Albumin Fraktion V	Merck K28335418044
Hyaluronidase	Sigma Lot# 30K7049
Trypsin	Sigma Lot# 39H74555

5.4. Färbungen

Eosin	Chroma GmbH & Co.
Hämatoxylin nach Gill	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Lichtgrün	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Safraninlösung	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Anilin-Orange-G Lösung	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Azocarmin	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Anilinalkohol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

5.5. Antikörper

bFGF IgG1κ	Oncogene, Research Produkt Lot# D13756-1 monoklonal mouse anti-human 0,1 µg/mL clone 3H3
BMP 2 IgG2B	R&D Systems Lot# CGC02 monoklonal mouse anti-human 500µg/mL clone 65529.111
BMP 7 IgG1	R&D Systems Lot# DBL02 monoklonal mouse anti-human 500µg/mL clone 80610
CD3	Dako Diagnostika GmbH Lot# 028 monoklonal mouse anti-human T-Cell 385µg/ mL clone PC3/188A
Collagen Typ I Ig2ακ	Oncogene, Research Produkts Lot# D12319-1 monoklonal mouse anti-human/rabbit Isotype 100µg/mL clone I-8H5
Collagen Typ II IgG1κ	Oncogene, Research Produkts Lot# D09565-1 monoklonal mouse anti-human/rabbit/mouse 1µg/mL clone II-4C11
Fluoreszenz Antikörper IgG (H+L)	MoBiTec, Lot# F-2761 Fluorescein goat anti-mouse 2000 µg/mL
IgG Serum	Calbiochem, Mouse IgG, Serum Lot# B42236 10000 µg/mL
RAM 11 (Makrophagen)IgG1κ	Dako, Macrophage Lot# 061 monoklonal mouse anti-Rabbit 60µg/mL clone RAM11
VEGF ₁₆₅ IgG1	Oncogene, Research Produkts Lot# D13224-1 monoklonal mouse anti-human 200µg/mL Clone JH121
VEGF ₁₂₁ IgG1	Kamya Biomedical Company monoklonal mouse anti-human/rabbit/rat 200µl/ml Clone JH121

5.6. Test Kits

Antifade Kit	Antifadakit, MoBiTec (P-7481)
Apoptose Detection Kit	R&D Systems apoTacs TM Lot # TA300
Omniscript RT Kit	Quiagen Cat#205111
Hot Start Master Mix	Quiagen Cat# 203443

5.7. Verbrauchsmaterialien

Objektträger	Superfrost Plus, beschichtet, Menzel
Paraffin	Paraplast Plus, Merck
Stickstoff	Linde
Quarzsand	Merck TA1077836148

5.8. Computersoftware

Adobe Photo Shop 4.0	Adobe Systems, Inc.
Diagramme	SigmaPlot 2000 for Windows Version 6.00
Literaturverwaltung	EndNote 4.0 ISI Research Soft USA
Mikroskopsteuerung	Axiovert Vision 3.0 Carl Zeiss Vision GmbH
Quantifizierungsprogramm für Gele	Quantity One [®] Quantitation Software V 4 BioRad
Zellzählung	Optimas 5.0 Optimas Corporation

6. Methoden

6.1. Entnahme der Präparate

6.1.1. Supraspinatussehne

Die Untersuchungen am Kaninchenmodell wurden an acht weißen New Zealand Kaninchen unter Ketamin/Xylazin-Narkose durchgeführt. Nach sterilem Abwaschen und Abdecken erfolgte in Seitenlagerung das Anlegen eines kleinen gradlinig verlaufenden Hautschnittes vom Akromion zum lateralen Humeruskopf ziehend. Die Subkutanschichten wurden in Schnittlängsrichtung durchtrennt. Es folgte ein stumpfes Spalten des M. deltoideus parallel zum Faserverlauf, um das Darstellen der Insertion der Sehne des M. supraspinatus am Tuberculum majus humeri zu ermöglichen. Die Supraspinatussehne (SSS) wurde unmittelbar am knöchernen Ansatz scharf abgetrennt und durch ihre Spontanretraktion auf komplette Durchtrennung überprüft. Der Durchtrennungsort wurde an dieser Stelle gewählt, weil dies mit 68% die häufigste Rupturlokalisation in der humanen Schulter ist (Rickert M. et al., 1998).

Um den Verlauf einer Spontanruptur zu simulieren, wurde die Sehne nicht refixiert. Die Supraspinatussehnen wurde einschließlich ihres muskulären Anteils sowie des proximalen Humerusanteils 1, 2, 4, und 16 Wochen nach Einschläferung der Tiere mit einer Überdosierung Ketanest entnommen. Die Eröffnung der Schulter bei der Entnahme erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie der operative Eingriff. Nach Eröffnung erfolgte das subperiostale Darstellen des proximalen Humerus und das Anlegen einer queren Osteotomie mit der oszillierenden Säge. Nach Identifikation der Langen Bicepssehne wurde diese tenotomiert. Die übrigen Anteile der Rotatorenmanschette wurden identifiziert und unter Schonung der knöchernen Ansatzregion des M. supraspinatus vom Knochen abgelöst. Das Schultergelenk wurde dann von kaudal her eröffnet und der Kapselapparat am Glenoid abgetrennt. Nun konnte das Präparat mit dem Tuberculum majus entnommen werden. Abschließend wurden die Präparate parallel des Faserverlaufs der Supraspinatussehne halbiert. Die jeweiligen Hälften wurden einmal in 1% Paraformaldehyd für histologische Untersuchungen und in flüssigem Stickstoff für die PCR tiefgefroren und bei -80°C

gelagert. Für die Kontrollen wurden die Schultern von acht gleichaltrigen gesunden weißen New Zealand Kaninchen entnommen und nach gleichem Prinzip wie die postoperativen Schultern weiterbehandelt.

Antrag: Reg.Nr. 02-28/99 „Analyse und Einheilungsprozesse kortikal reinsertierter und klebstoffadaptierter Sehnen und Ligamente.“

Antragsteller: Prof. Dr. R.Venbrocks

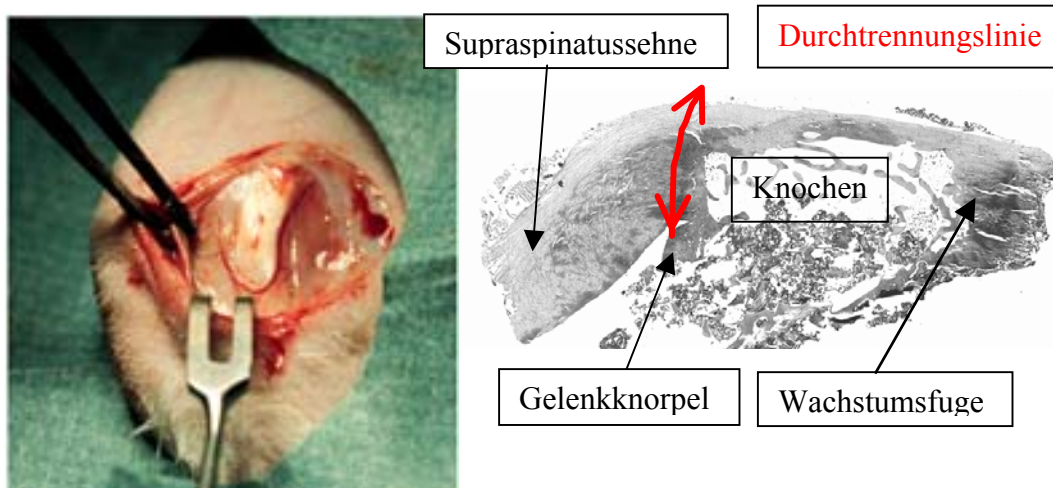


Abb. 16 Blick auf das eröffnete Schultergelenk und Darstellung des Durchtrennungsortes in der Insertion der SSS

6.1.2. Bursa subacromialis

Die untersuchten Bursae subacromiales stammten von 20 Patienten mit einem chronischen Subakromialsyndrom unterschiedlicher Ätiologie. Die Patienten waren zwischen 42 und 70 Jahre alt. Gemeinsam waren ihnen bewegungsabhängige Schulterschmerzen und Bewegungs einschränkungen. Nach entsprechender Diagnostik und Ausschöpfen konservativer Behandlungsmaßnahmen wurde ein operatives Vorgehen indiziert.

Die Bursen wurden im Rahmen einer Arthroskopie mit anschließender Bursoskopie des betroffenen Schultergelenks entnommen. Dabei wurde auch der intraartikuläre Befund erhoben. Dieser umfasste die Beurteilung der gelenknahen Rotatorenmanschette, der Bicepssehne, der Gelenkknorpelverhältnisse, des glenoidalen Kapselansatzes bzw. der Verstärkungsbänder sowie der Synovialis. Anschließend erfolgte eine Uminstrumentierung, um einen Zugang zum

Subakromialraum zu gewährleisten (Bursoskopie). Hierbei wurde der Zustand der Bursa subakromialis als auch der bursseitigen Rotatorenmanschette dokumentiert. Die partielle Resektion der Bursa erfolgte mittels elektrisch getriebener Rotationsfräsen bzw. Faszangen.

6.2. Herstellung von Puffern und Lösungen

Es wurden folgende Lösungspuffer hergestellt: (Angaben für einen Liter)

PBS (Phosphatgepufferte Saline) Puffer für alle Methoden außer dem Apoptose-Test:

PBS (pH 5,0): 6,66 μmol Na_2HPO_4 (1,186g) + 14,46 μmol KH_2PO_4 (0,2g) + 2,67 μmol KCl (0,2g) + 136,9 μmol

PBS⁻ Apoptose-Test : 25 mmol NaH_2PO_4 (3,9g) + 75 mmol Na_2HPO_4 (13,34g) + 1,45 mol NaCl (84,73g) + a.d.

TBE: 0,1 mol Tris (12,4g) + 1,8 μmol EDTA (0,74g) + 0,09 mol H_3BO_3 (5,6g) + a.d.

Elektrophorese Puffer: 300ml TBE + 15 μl EthBr.

6.3. Histologie

6.3.1. Herstellung von Gewebsschnitten

Zur Einbettung in Paraffin (Paraplast) wurden die kompletten Supraspinatussehnenpräparate in 1% Paraformaldehyd fixiert (6h) und mit Osteodec[®] entkalkt (24h). Die Präparate wurden nach einem kurzem Spülvorgang mit a.d., mittels einer Histokinette, in einer Serie von Waschschritten (aufsteigende Ethanolreihe (70% 2x, 96% 3x, 100% 2x) Ethanol- Xylol Gemisch (2/3-1/3 // 1/3-2/3) , reines Xylol) für je 1-2h behandelt. Es folgten zwei abwechselnde Tauchbäder in geschmolzenem Paraffin für 2 bzw. 3 Stunden und eine Lagerung im Brutschrank (60°C) für 30 Minuten. Abschließend wurden die Gewebestücke in Kunststoffbehälter eingegossen und bei -20°C gelagert. Die Schnitte von 5 μm wurden auf die beschichteten Objektträger bei 60° C eingeschmolzen.

6.3.2. Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Nach Entparaffinierung der Schnitte (zur Färbung [1x 20 min, 1x 10min], zur Immunhistochemie [3x 1h], zum Apoptosetest [2x 5 min]) wurden die Schnitte in einer Serie von Waschschritten, beginnend mit einer absteigenden Ethanolreihe und gefolgt von destilliertem Wasser (Färbung und Immunhistochemie) sowie PBS⁻ (Apoptosetest [2x 5 min]) in ein anorganisches Milieu gebracht.

6.3.3. Färbung

Zur histologischen Betrachtung wurden die Schnitte mit der Safranin O-, Azan- und Hämatoxylin- Eosin (H&E)-Färbung behandelt (Hageman & Rosemund., 1989). Nach der Entparaffinierung und Überführung in anorganischem Milieu wurden die Schnitte zuerst mit Hämatoxylin nach Gill, bzw. Safranin O Lösung gefärbt (10 min). Nach der Waschung mit a.d., (bei Hämatoxylin 30°C), wurden die Schnitte im zweitem Schritt mit Eosin (10 min) bzw. Lichtgrün (8 min) gefärbt und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe in ein organisches Milieu geführt. Nach abschließender Waschung mit Xylol (2x) wurden die Schnitte mit Canada Balsam eingedeckt.

Die Hämatoxylin Lösung wurde mit 2g Hämatoxylin (in 20ml 100% Ethanol gelöst), 0,4 g Na-Jodat, 100g Kali Alaun, 100g Chloralhydrat, 2g Zitronensäure in zwei Liter a.d. gelöst und für 14 Tage bei Raumtemperatur zur Reifung aufbewahrt.

Für die Herstellung von Eosin- und Safranin O-Lösung wurde 10g Eosin bzw. Safranin O (in 300 ml 95% Ethanol gelöst) in einem Liter a.d. verdünnt.

Zur Herstellung von einer Lichtgrün Lösung wurden 2g Lichtgrün zusammen mit 2ml Essigsäure (1%) in einem Liter a.d. gelöst.

Zur Bindegewebsdarstellung wurde die Azan Färbung nach Heidenhain verwendet (Hageman & Rosemund, 1989). Dafür wurden die Schnitte nach Entparaffinierung und Überführung in anorganisches Milieu im ersten Schritt 15 min in Azocarmin bei 56°C Anfangstemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte in Anilin-Ethanol geschwenkt bis sich die Kerne gut vom Hintergrund differenzieren ließen. Diese Differenzierung wurde mit essigsauerm Ethanol unterbrochen. Nach Spülung in a.d. wurde das Bindegewebe in 5% Phosphorwolframsäure für 20 min gebeizt und

anschließend wieder mit a.d. gespült. Es folgte eine 15 min Inkubation mit Anilin-Orange G Lösung mit abschließender Spülung mit a.d. Vor der Eindeckung mit Canada-Balsam wurden die Schnitte zuerst in 96% Ethanol und anschließend in Xylol gewaschen.

Zur Herstellung von essigsauerm Alkohol (1%) wurde Essigsäure in 96% Ethanol verdünnt. Die restlichen Färbemittel wurden von der Firma „Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig“ gebrauchsfertig geliefert.

6.3.4. Immunhistochemie

Zur Darstellung der untersuchten Wachstumsfaktoren, Kollagen bzw. der spezifischen Zellen in Gewebsschnitten wurde die Immunfluoreszenzmethode verwendet, bei der das an den Sekundärantikörper gekoppelte Fluorescein zum Nachweis dient (Noll S. & Schaub-Kuhnen S., 2000).

Bevor man die Gewebsschnitte mit dem Erstantikörper inkubieren konnte, mussten diese enzymatisch demaskiert werden, um spezifische Epitope im Gewebe erkennbar zu machen. Hierzu mussten für die verschiedenen Antikörper unterschiedliche Methoden angewendet werden, zum einen die Inkubation mit Hyaluronidase (1µg/ml PBS) und 0,25% Trypsin (2,5 mg/ml TBS) je 30 min bei 37° C für BMP-2,-4,-7; Kollagen I, II, X ; bFGF; und RAM11; zum anderen eine Hitzedemaskierung mit 1,0mmol, für VEGF und CD 3 5,0mmol, Tris- HCl (pH 10, 30min, 99°C). Anschließend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Erstantikörper (Verdünnung 1:20-1:100) beschichtet und bei einer Inkubationszeit über Nacht (5°C) für VEGF, und CD 3 bzw. 30 min bei Raumtemperatur für BMP -2,-4,-7; Kollagen I, II, X; bFGF; und RAM 11 beschichtet.

Nach einem anschließenden Waschvorgang wurden die Gewebsschnitte mit dem Zweitantikörper, dem Fluoreszenzantikörper in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min inkubiert. Die Eindeckung mit dem Antifadekit erfolgte nach einem letzten Waschvorgang in a.d. in trockenem Zustand.

6.4. Auswertung der histologischen Schnitte

Zur Auswertung der histologischen Schnitte wurde der Sehnenansatz der Supraspintaussehne zusätzlich zu den vier klassischen Zonen, wie sie in der Literatur beschrieben werden, in acht weitere Regionen (a-h) eingeteilt (Abb. 17) (Woo SL. et al., 1987; Thomopoulos S. et al., 2002).

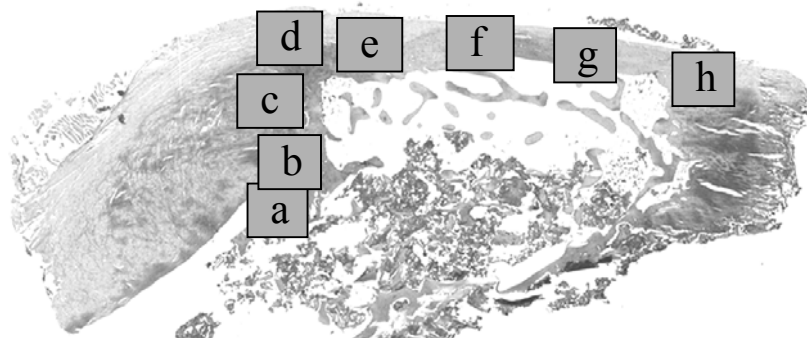
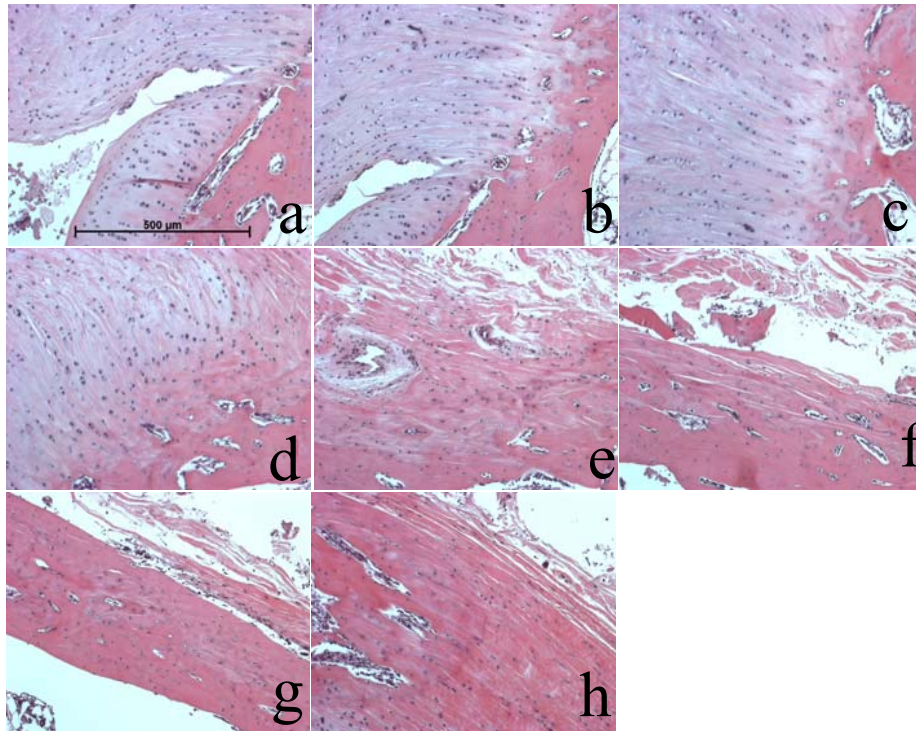


Abb. 17 Regionendarstellung a-h in H&E Färbung.

- a: Gelenkknorpel- subchondraler Knochen kaudal (Chondrozyten, Osteozyten)
- b: Übergang Gelenkknorpel- Sehnenansatz (Chondrozyten, Fibrozyten, Osteozyten)
- c: Sehnenansatz (Chondrozyten, Fibrozyten)
- d: Übergang Sehnenansatz zu Sehne (d-h: Fibrozyten, Fibroblasten, Osteozyten, Chondrozyten)
- e: Übergang von Sehne zum kranialen Humeruskopf
- f: Fortsetzung von e weiter peripher
- g: Fortsetzung von f weiter peripher
- h: Beim jungen Tier auf Höhe der Wachstumsfuge

6.5. Apoptose-Test

Zum Nachweis der apoptotischen Zellen wurde der "Apoptosis Detection Kit" (R&D-Systems) benutzt, der auf dem Prinzip des TUNEL-Assays beruht.

Es wurde das vom Hersteller beigefügt Protokoll verwendet, mit Ausnahme der Gegenfärbung, welche mit 1,5% Eosin (in 70% Ethanol verdünnt) erfolgte.

6.5.1. Auswertung des Apoptose-Tests

Die Zählung der apoptotischen Zellen erfolgte mit Hilfe der histologischen Regioneneinteilung a-h. Dabei wurde zuerst die Gesamtzellzahl der bestimmten Regionen mit einer Größe von 1mm² ermittelt. Dies erfolgte durch die Auszählung der Zellkerne der H&E gefärbten Schnitte der entsprechenden Regionen mittels Programm „Optimas 5.0[®]“.

Auf gleiche Weise erfolgte die Zählung der positiven Zellen, welche aber nur mit 1,5% Eosin gegengefärbt waren. Es wurden jeweils jedes Präparat und jede Region viermal gezählt und der Mittelwert ermittelt.

Bei der zusätzlichen Auswertung des Knochens wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren.

6.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

6.6.1. RNA Extraktion

Für die RNA Isolierung wurden die tiefgefrorenen Gewebstücke (Sehnenansatz|Bursa) unter Verwendung von Quarzsand in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Zur Lyse der Zellen wurde Trizol zu dem Quarz-Gewebe Gemisch hinzugeführt (1 ml Trizol/ mg Ausgangsgewebe). Nach Zentrifugation (12000rpm/10min) und Aliquotieren (1 ml Trizol/ Aliquot) wurde Chloroform zur Ausfällung zugesetzt (2ml/ ml Trizol). Nach leichtem Schütteln und 3 min Ruhen bei RT wurde, nach erneuter Zentrifugation (12000rpm/15min) und Entnahme der wässrigen Phase, 500µl 2-Propanol/ml Trizol zugefügt. Es folgte ein erneutes Ruhen

(10min) und Zentrifugieren (12000rpm/10min). Das erhaltene RNA-Pellet wurde in Ethanol (70%) gewaschen und für die reverse Transkription in 25µl RNase freies Wasser gelöst.

6.6.2. Reverse Transkription

Um aus der erhaltenen RNA cDNA zu synthetisieren, wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Anschließend an eine Denaturierung (6min | 65°C) erfolgte eine Inkubation von 25µl RNA Probe zusammen mit 4µl RT Buffer (Omniscript™), 4µl dNTP Mix (1mM/dNTP), 4µl Oligo dT, 2µl RNase Inhibitor, 2µl reverse Transkriptase (4 Units) und 1µl H₂O. (37°C | 60min)

Der RNase Inhibitor wurde in einer Stocklösung in folgender Zusammensetzung hergestellt: 2,5µl RNase Out (Omniscript™) + 1µl RT Buffer (Omniscript™) + 6,5µl RNase freies H₂O.

6.6.3. PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Amplifikation der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA Fragmente, erfolgte nach folgendem Protokoll:

Ansatz: 12,5µl Master Mix (Omniscript™ ; 1,25U HotStarTaq DNA Polymerase, 1x PCR Puffer (Omniscript™ enthält 1,5mM MgCl₂, 200µM je dNTP), 9,5µl H₂O und je 1µl (20pmol/µl) Primer upstream und downstream, 1µl cDNA Template.

Das Standardprotokoll umfasste 30 Zyklen:

Annealing:	30sec	94°C
Extension:	45sec	60-70°C (Gradient 5°C)
Denaturierung :	45sec	72°C

Es wurden folgende Primer benutzt:

- Upstream Primer GAPDH: 5'-CAT CAC TGC CAC CCA GAA GA-3'
- Downstream Primer GAPDH: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'
- Upstream Primer Coll I α 2 rabbit: 5'-CCC AAG GAC TAT GAA GTC GA-3'
- Downstream Primer Coll I α 2 rabbit: 5'-ACA TCA TTG GAG CCC TGC AG-3'
- Upstream Primer Coll II α 1 rabbit: 5'-GGG CCA GGA TGT CCG GAA AAC A-3'
- Downstream Primer Coll II α 1 rabbit: 5'-CCA GGG GGG CCC GGA TTT CCA-3'
- Upstream Primer Coll X mouse: 5'-GCC GCT TGT CAG TGC TAA CC-3'
- Downstream Primer Coll X mouse/human: 5' GAG CCA CTA GGA ATC CTG AG-3'
- Upstream Primer TGF β 1 rabbit: 5'-AGA GAA GAA CTG CTG TGT GC-3'
- Downstream Primer TGF β 1 rabbit: 5'-GTA GTA ACA CGA TGG GCA GT-3'
- Upstream Primer BMP7 rabbit: 5'-GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC-3'
- Downstream Primer BMP7 rabbit: 5'-AGT AGT AGG CGG CGT AGC CTT-3'
- Upstream Primer BMP7 human 5'-CCA TCT CCG TCC TCT ACT- 3'
- Downstream Primer BMP7 human 5'- TTT TCC TTT CGC ACA GAC ACC-3'
- Upstream Primer bFGF2 human/bovine/rabbit: 5'-TAC AAC TTC AAG CAG AAG AG-3'
- Downstream Primer bFGF2 human/bovine/rabbit: 5'-CAG CTC TTA GCA GAC ATT GG-3'
- Upstream Primer VEGF rat/human/mouse/horse: 5'-AAG TGG TCC CAG GCT GCA-3'
- Downstream Primer VEGF universal: 5'-ATC TCT CCT ATG TGC TGG CC-3'
- Upstream Primer IL-1 rabbit: 5'-ATC GCT TTG GGA TTC TCT CC-3'
- Downstream Primer IL-1 rabbit: 5'-GGA GAA CAC CAC TTG TTG GT-3'

Da ein Teil der Sequenzen beim Kaninchen nicht publiziert ist, wurden diese durch Sequenzierung verifiziert (Fichter M. und Wenz I. et al., unveröffentlicht).

Die amplifizierten Produkte wurden mit Hilfe von Gelelektrophoresen (3% Agarosegel) aufgetrennt. Zugefügt wurde je 1 μ l Loading Buffer und 5 μ l Marker pUC 19Msp I mit einer Laufzeit von 90 min (90 V/ 400 mA). Das Agarose Gel (3%) wurde wie folgt hergestellt: 75ml TBE- Puffer + 2,25g Agarose + 3,75 μ l EthBr. Das Loading Puffer (10X) enthielt 0,004g Bromphenol-Blau + 0,5g Glycerol + 0,46 1XTBE Puffer + 0,5 μ l EthrBr.

6.6.4. Auswertung der RT-PCR

Die Semiquantifizierung der entstandenen cDNA Menge wurde mit Hilfe des Auswertungsprogrammes „Quantity One[®]“ Version 4 von Bio Rad durchgeführt. Zur Verhältnisdarstellung wurden die erhaltenen Werte in Verhältnis zu den vorgegebenen Werten des Markers und dem GAPDH, als Housekeeping Enzym gesetzt. Somit konnten unterschiedliche Ausgangskonzentrationen der extrahierten RNA (7-99 μ g/ml) korrigiert werden. Die Ausgangskonzentrationen der RNA wurden bei 260nm mit einem Spektralphotometer gemessen.

Da die Auswertung semiquantitativ durchgeführt wurde und die Menge an Tieren keine Statistik zulässt, sind die PCR- Ergebnisse als Tendenzen anzusehen.

7. Ergebnisse

7.1. Histologische Auswertung des Supraspinatus- Sehnenansatzes

Postoperativ veränderte sich die Faseranordnung. Bereits in der ersten postoperativen Woche war eine Desorganisation der gesamten Ansatzregion zu beobachten. Der Übergang zwischen mineralisiertem und demineralisiertem Knorpel wies eine Verbreiterung auf, welche auch über die nächsten Wochen bestehen blieb. Zusätzlich war eine Zunahme der Fasermenge zu beobachten. Der vermehrte Anteil rötlich gefärbter Fasern in der Azanfärbung weist auf einen erhöhten Anteil von Knorpelgrundsubstanz hin (Abb. 19).

Zusätzlich veränderten sich in der ersten postoperativen Woche die Anordnung und Anzahl der Knorpelzellen im Gelenkknorpel (Zone a Abb. 20). Diese Beobachtung war in der zweiten postoperativen Woche nicht mehr gegeben. An der Peripherie der Sehne war in der ersten Woche Granulationsgewebe zu erkennen, welches bis in die vierte postoperative Woche existent blieb (Abb. 21). Neben der Desorganisation des Gewebes zeigte die Sehne im postoperativen Verlauf einen Zellverlust und eine Auflockerung der noch vorhandenen Fasern (Abb. 18).

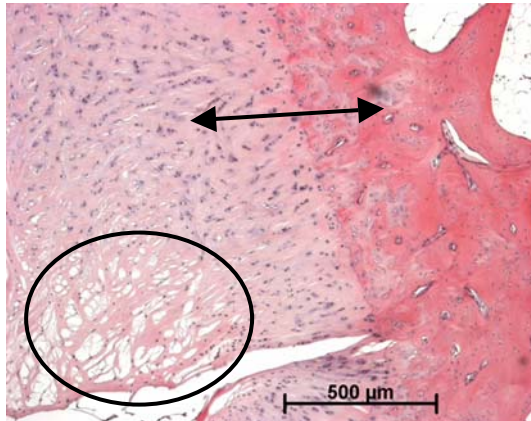


Abb. 18 Sehnenansatz vier Wochen nach Durchtrennung. Deutlich zu sehen ist die Verbreitung der mineralisierten Faserknorpelzone. Zu beobachten ist auch der Zell- und Faserverlust in der Faserknorpelzone
Objektivvergrößerung 5X Färbung H&E

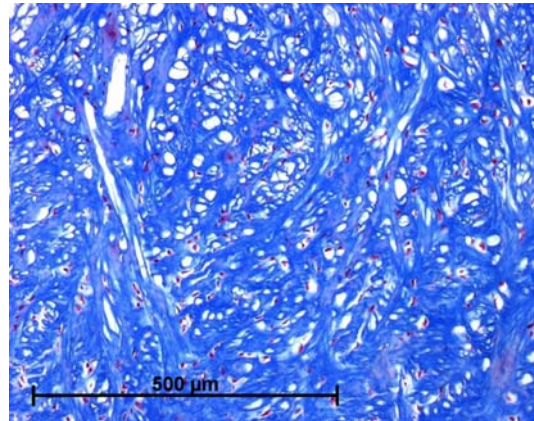


Abb. 19 Übersicht über die Desorganisation im Faserknorpel vier Wochen post-OP.
Objektivvergrößerung 10X Färbung Azan

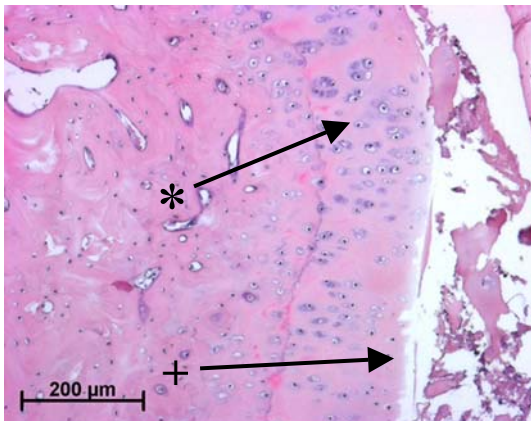


Abb. 20 Veränderte Anordnung der Knorpelzellen im Gelenkknorpel. Ihre Linearität ist nicht mehr vorhanden, stattdessen sind sie vereinzelt im Knorpel eingestreut (*). An der Gelenkoberfläche scheint es auch zu einem Proteoglykanverlust gekommen zu sein (+). Eine Woche postoperativ.
Objektivvergrößerung 10X H&E Färbung

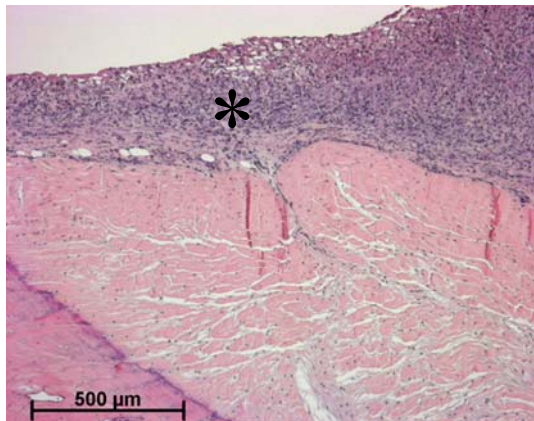


Abb. 21 Granulationsgewebe (*) oberhalb des Sehnenansatzes in der ersten Woche post-OP
Objektivvergrößerung 5X Färbung H&E

7.2. Expression von Extrazellulärer Matrix (EZM) in den Kaninchenschultern

7.2.1. Histologische Auswertung

Da die H&E- und Azanfärbungen wenig bzw. nur andeutungsweise über die Zusammensetzung der EZM aussagen, wurden die Schnitte zusätzlich mit Safranin O gefärbt, um besonders das Vorhandensein von Proteoglykanen im Gewebe zu analysieren, wobei eine intensive Safranin O- Färbung hohe Konzentrationen des

großen Knorpelproteoglykans Aggrekan anzeigt (Junqueira L.C. und Carneiro J., 1996; Hageman & Rosemund, 1989)

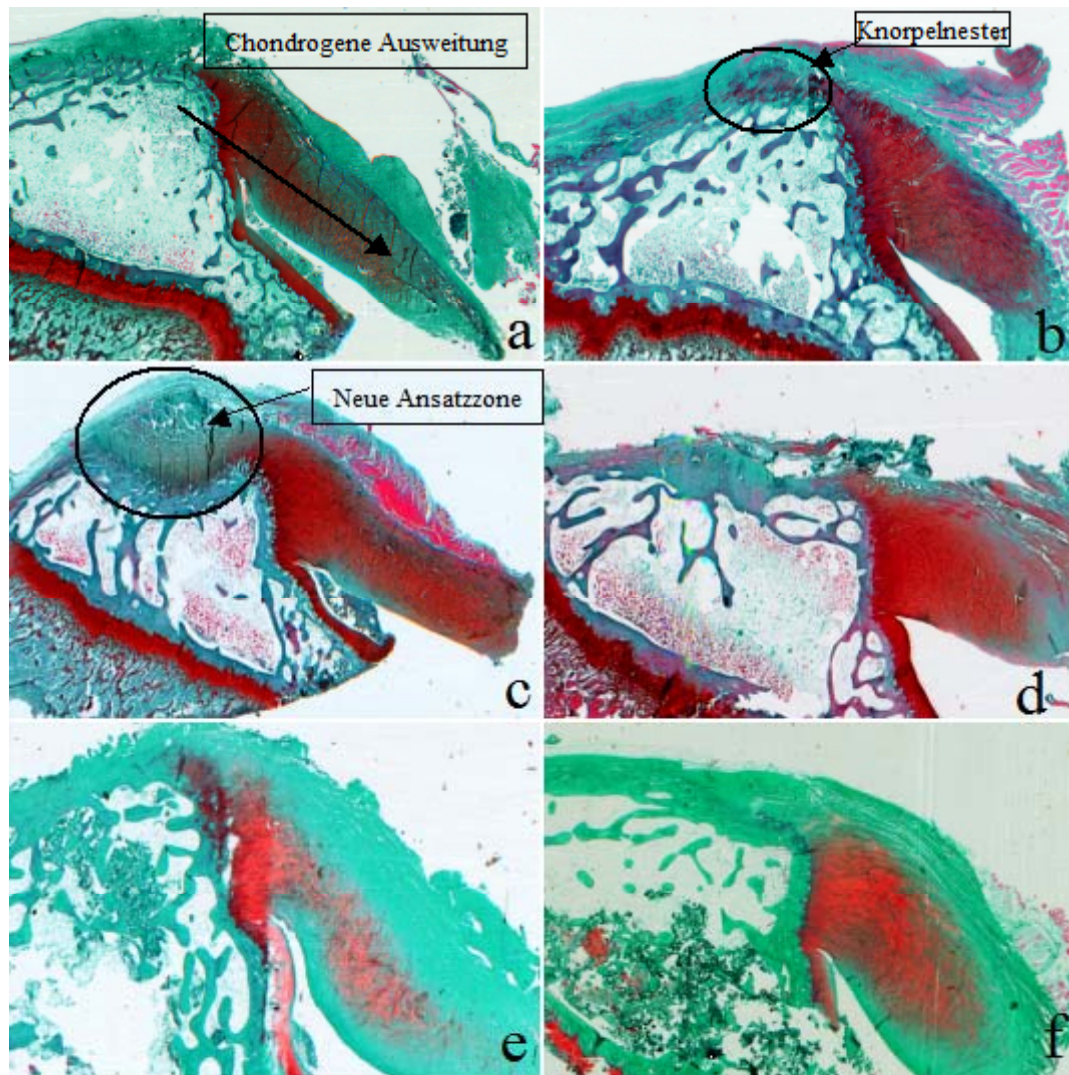


Abb. 22 Kaninchenschulter nach Durchtrennung und ohne Wiederverankerung. 1. Woche post-OP (a). 2. Woche post-OP (b) 4. Woche post-OP (c) 12. Woche post-OP (d) 16. Woche post-OP (e) Zusätzlich Kontrollschulter (f)

Bei den Kontrollpräparaten färbten sich der Gelenkknorpel, die Wachstumsfuge und der Faserknorpel Safranin-O-positiv. Im postoperativen Verlauf breitete sich die Knorpelzone entlang der Sehne nach distal aus. Besonders auffällig war auch die Tatsache, dass die Sehnen trotz fehlender Reinsertion bereits nach einer Woche wieder insertionsnah readaptiert waren. Besonders ausgeprägt war die Beobachtung der Faserknorpelausdehnung in der 4. postoperativen Woche. In der 16. postoperativen Woche schien diese Entwicklung rückläufig zu sein. Zu erkennen ist aber, dass die klar definierte Grenze zwischen Faserknorpel und Sehne nicht mehr vorhanden ist (Abb. 22).

In der zweiten postoperativen Woche waren neue Knorpelnester in Höhe des direkten Sehnenansatzes bursanah zu sehen (Regionen e-f) (Abb. 22). Diese weiteten sich in der vierten Woche aus und hatten eine Struktur, die einem neuen Sehnenansatz entsprach. Diese Beobachtungen waren auch in der H&E- und Azanfärbung zu sehen (Abb. 23+24). Zusätzlich zu den Knorpelfeldern in Region e-f wurden parallel verlaufende Faserzüge in der Sehne beobachtet, welche dem oberflächlichen Sehnenverlauf entsprachen (Abb. 25). In der 16. postoperativen Woche waren Anzeichen der Rückbildung, bzw. Abbau zu beobachten (Abb. 26).

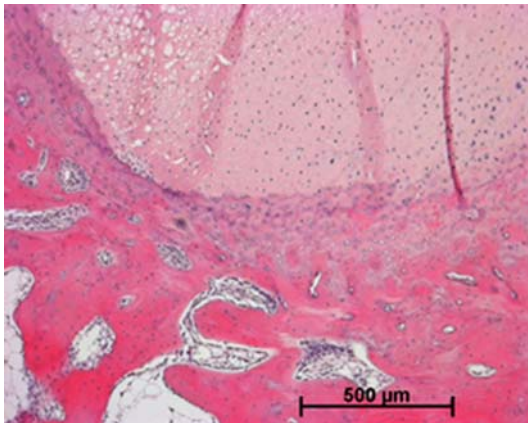


Abb. 23 Neue Ansatzzone in Region e-f .
4. Woche 5X Objektivvergrößerung H&E

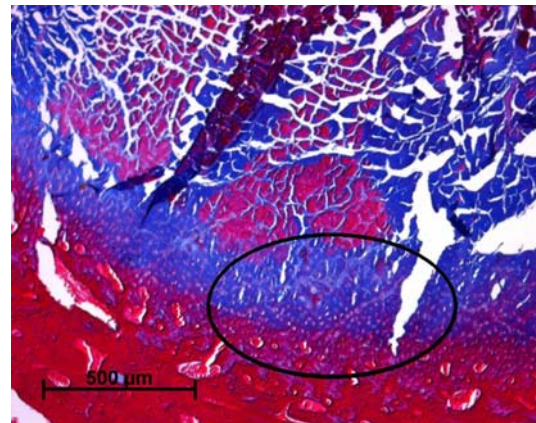


Abb. 24 Azanfärbung 4. Woche post-OP Region
e-f 5X Objektivvergrößerung

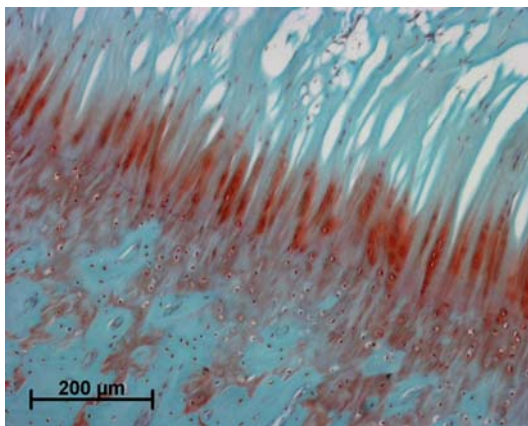


Abb. 25 Neue Ansatzzone vier Wochen post-OP
Safranin-O-Färbung, Objektivvergrößerung 10X

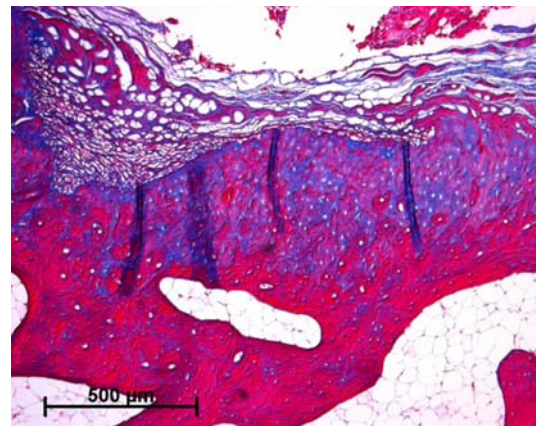


Abb. 26 Rückgang der neuen Ansatzzone 16 Wochen
post-OP Azanfärbung Objektivvergrößerung 5X

7.2.2. Immunhistologische Untersuchungen

Um genauere Angaben über die Expression der EZM zu bekommen, wurde zusätzlich zur Safranin O- Färbung das Vorhandensein bestimmter EZM- Bestandteile mittels der Immunhistochemie nachgewiesen.

An der gesunden Supraspinatussehne der Kaninchenschulter wurden ähnliche Untersuchungen schon von Kumagai et al. (1994) durchgeführt (Kumagai et al., 1994).

Kollagen Typ I ließ sich in den gesunden Kontrollschultern und in den postoperativen Wochen, wie erwartet, im Knochen, in der Sehne und in dem Faserknorpel nachweisen. Kollagen Typ II beschränkte sich auf den Knorpel, die Wachstumsfuge und den Faserknorpel.

Im Heilungsverlauf veränderte sich die Intensität der einzelnen Kollagenexpressionen. Kollagen Typ I wurde in der ersten Woche vermehrt innerhalb der Sehne und im Faserknorpel beobachtet. Im Heilungsverlauf nahm dessen Intensität ab, so dass es in der sechzehnten Woche nur noch in geringem Maße vorhanden war (Abb. 27+28).

Kollagen Typ II wurde in stark vermehrter Form innerhalb der gesamten Sehne gefunden, besonders in der 2. bis 4. postoperativen Woche. In der 16. Woche war ein leichter Rückgang des Kollagen Typ II zu verzeichnen. Zu beobachten war auch, dass es im Vergleich zu den Kontrollpräparaten keine in sich geschlossene Kollagen Typ II Region mehr gab (Abb. 29+30). Sie erstreckte sich über den gesamten sichtbaren Sehnen- und Faserknorpelanteil. Zu erkennen war auch die Desorganisation im Faserknorpel, welche schon in den klassischen Anfärbmethoden zu beobachten war.

In den Regionen e-f zeigte sich auch in den Kontrollpräparaten ein gewisser Anteil an Kollagen Typ II. Im postoperativen Verlauf wurde hier eine Steigerung beobachtet, welche bis in die sechzehnte Woche vorhanden blieb (Abb. 31+32).

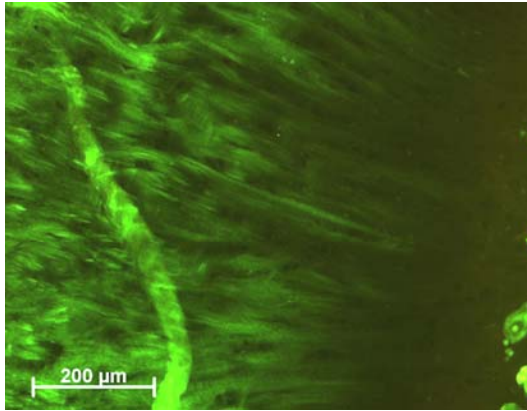


Abb. 27 Kollagen-Typ-I-Expression am gesunden Sehnenansatz. Rechts ist ein Teil des Knochens zu sehen. Objektivvergrößerung 10X

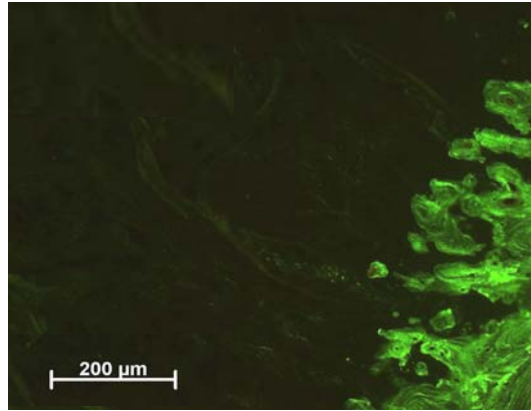


Abb. 28 Kollagen-Typ-I-Expression 16. Woche post-OP. Links ist der Knochen zu sehen. Zu beachten ist der stark verminderte Kollagen-Typ-I-Gehalt. Objektivvergrößerung 10X

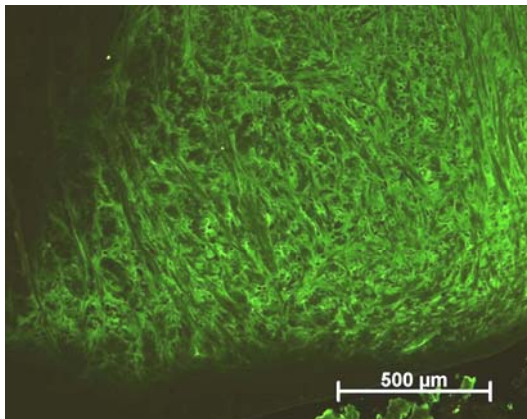


Abb. 29 Kollagen-Typ-II-Expression im gesundem Knorpelfaseransatz. Zu sehen ist der klar definierte Abschluss. Objektivvergrößerung 5X

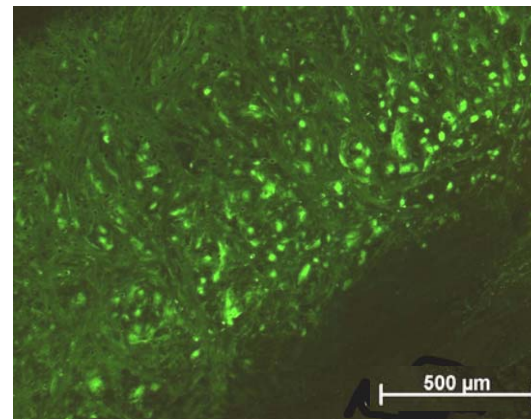


Abb. 30 Kollagen-Typ-II-Expression 16. Woche post-OP. Es ist keine klare Abgrenzung innerhalb der Sehne. Rechts unten ist Bindegewebe. Objektivvergrößerung 5X

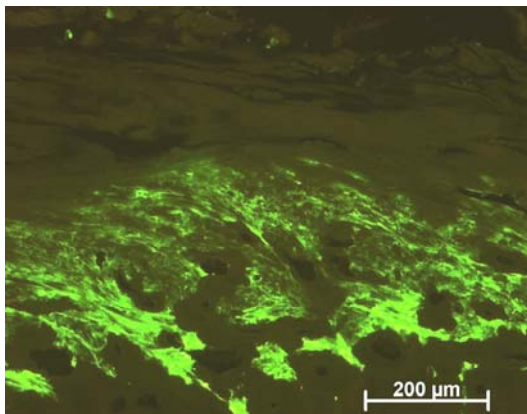


Abb. 31 Kollagen-Typ-II-Expression in der Region e-f (Region, in der später die neue Zone auftritt) in der gesunden Schulter. Objektivvergrößerung 10X

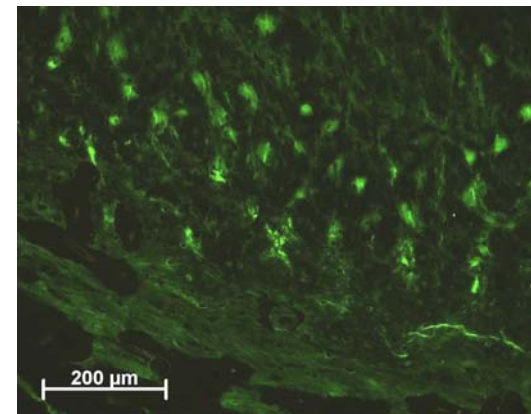
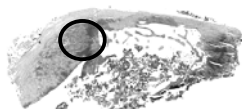
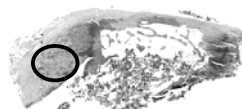


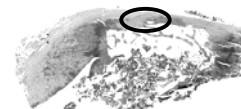
Abb. 32 Kollagen-Typ-II-Expression in der 16. Woche post-OP. Zu sehen sind Chondrozyten und eine Verbreiterung der Zone. Objektivvergrößerung 10X



Schema Abb. 27+28



Schema Abb. 29+30



Schema Abb. 31+32

7.2.3. mRNA Expression

Da die immunhistochemischen Untersuchungen nur Detektierbarkeit bestimmter Proteine im Gewebe nachweisen können, wurden die Supraspinatussehnen auf ihre mRNA-Expression mittels der PCR untersucht (Abb. 33). Dabei wurden als Kontrolle acht gesunde Supraspinatussehnen unterschiedlichen Alters mituntersucht.

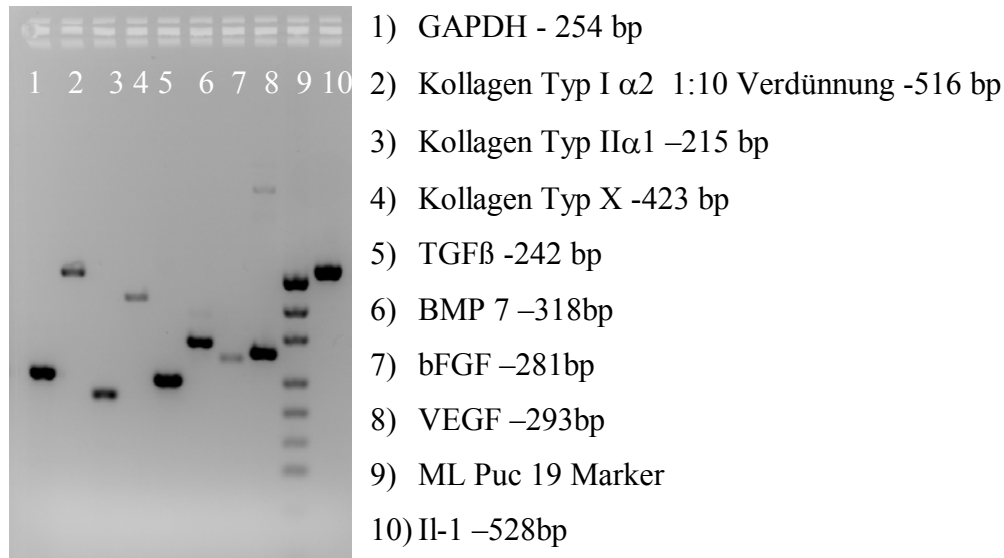


Abb. 33 PCR Analyse einer gesunden Sehne eines 6 Monate alten Tieres.

Bei den untersuchten mRNA-Produkten der Kollagene Typ I, -II und -X zeigten sich folgende Ergebnisse:

Kollagen Typ I α 2, mit der Bande bei 516 bp, zeigte eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression in den ersten beiden Wochen, welche sich ab der vierten postoperativen Woche den Kontrollwerten der gesunden Präparaten näherte (Abb. 34). Besonders ausgeprägt war die mRNA-Expression der zweiten postoperativen Woche, welche fast doppelt so stark wie in den Kontrollpräparaten war.

Bei der Kollagen Typ II α 1 mRNA-Expression, Bande bei 215bp, zeigt sich eine Abhängigkeit im postoperativen Verlauf (Abb. 34). In der zweiten und vierten postoperativen Woche war die mRNA-Expression vergleichbar mit der Expression der Kontrollsehnen. Eine besondere Beobachtung war, dass die Kollagen-Typ-II α 1-Expression in der ersten postoperativen Woche deutlich unter dem Kontrollwert sank,

um dann in der zweiten Woche wieder anzusteigen. In der sechzehnten Woche sanken die Werte wieder unter die Kontrollwerte.

Die Expression von Kollagen Typ X mit einer Bande bei 423 bp zeigte auch eine deutliche Zeitabhängigkeit (Abb. 34). In der ersten postoperativen Woche war die Expression stärker als bei den Kontrollwerten, ab der zweiten Woche sank sie unter die Kontrollwerte. In der sechzehnten Woche war kein Kollagen Typ X mehr nachweisbar.

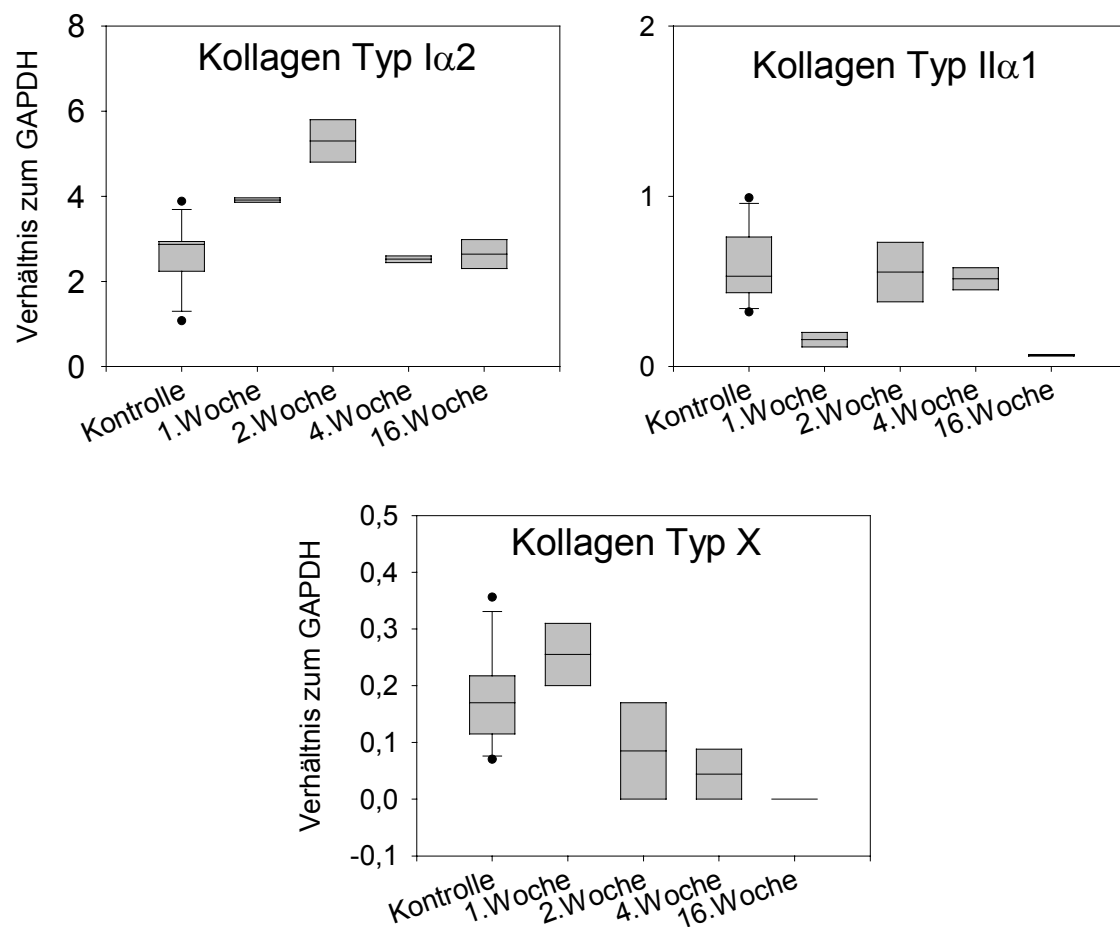


Abb. 34 Übersicht der Kollagenexpression im postoperativen Verlauf. Da die Auswertung semiquantitativ durchgeführt wurde und die Menge an Tieren keine Statistik zulässt, sind diese Ergebnisse als Tendenzen anzusehen. Bei den Kontrolltieren waren es jedoch 10 Tiere, so dass hier die entsprechende Statistik durchführbar war.

7.3. Expression von Wachstumsfaktoren in der Supraspinatussehne des Kaninchens

7.3.1. Immunhistologische Untersuchungen

In den Kontrollpräparaten konnte BMP-7 in der Wachstumsfuge, der Sehne und dem Faserknorpel nachgewiesen werden. Es war auf den Fasern, sowie perizellulär vorhanden (Abb. 37). Besonders auffällig war die Beobachtung, dass das Innere der Fasern BMP-7 positiv war (Abb. 36). Bei den angeschnitten Fasern erschien die Färbung punktiert, da das Innere der Fasern BMP-7 positiv war. Gleiche Beobachtungen wurden bei den humanen Bursae subacromiales gemacht.

Im postoperativen Verlauf veränderte sich die lokale Expression von BMP-7.

Bereits in der ersten Woche war eine verstärkte Anwesenheit zu beobachten. Diese erstreckte sich über den Sehnenansatz entlang des Knochens. Es waren auch fleckenartige positive Felder in den Regionen e-h zu beobachten, die in der zweiten Woche in der Safranin O- Färbung chondrogen charakterisierter Regionen entsprachen. In der zweiten Woche breitete sich die Expression entlang der Ansatzzone aus. Auch eine Region innerhalb der Sehne war positiv (Abb. 39). Dieser „Fleck“ (schwarz umkreist) war in der ersten postoperativen Woche noch nicht zu beobachten, sehr wohl aber in der vierten Woche. Die Ausbreitung entlang der Regionen e-h war durchgängig bis in die 16. Woche in unterschiedlichen Intensitäten vorhanden. Am stärksten war die Expression in der 2. bis 4. Woche, wobei die vierte Woche die zweite noch übertraf. In der 16. Woche war diese Beobachtung weitgehend verschwunden, nur noch in der Region e-f leicht erkennbar. Das periphere Bindegewebe war in dieser Woche auch leicht positiv färbbar (Abb. 39).

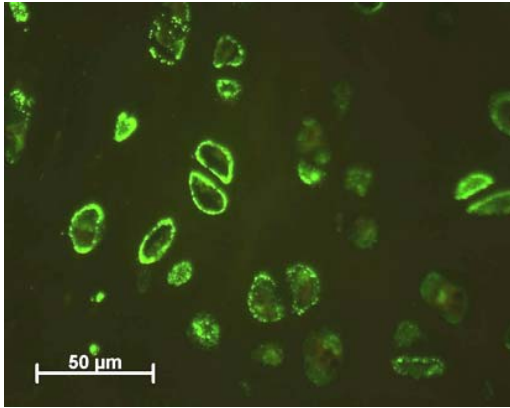


Abb. 35 BMP-7-Expression im Faserknorpel vier Wochen post-OP. Zu erkennen ist die Verteilung entlang der Zellmembranen.
Objektivvergrößerung 40X

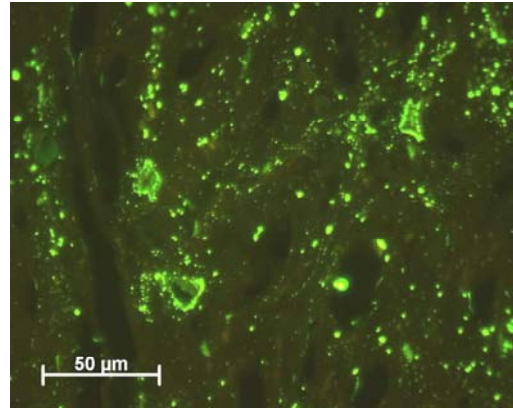


Abb. 36 BMP-7-Expression in der Sehne vier Wochen post-OP. Zu sehen ist die Verteilung entlang der Fasern und an den Zellmembranen.
Objektivvergrößerung 40X

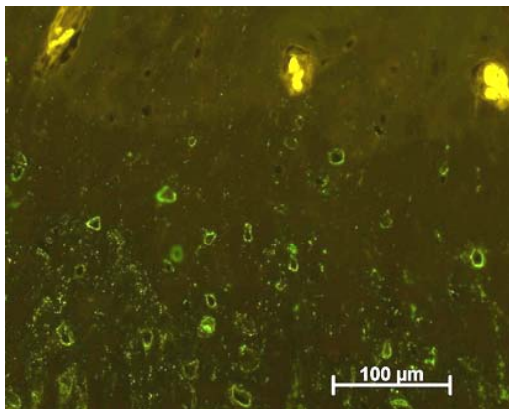


Abb. 37 BMP-7-Expression am gesunden Sehnenansatz. Zu sehen ist dessen extrazelluläre Lokalisation. Objektivvergrößerung 20X

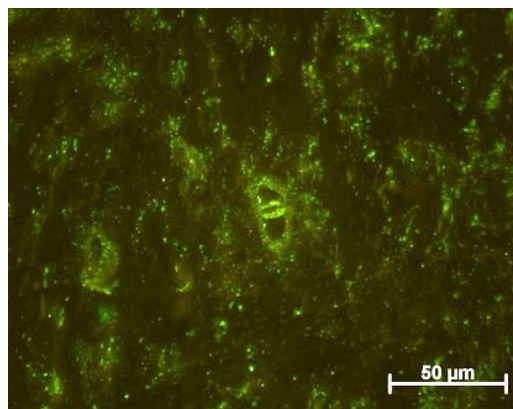


Abb. 38 BMP-7-Expression im gesundem Faserknorpel des Sehnenansatzes beim Kaninchen. Mittig sind hier zwei Knorpelzellen zu erkennen welche, paarig liegen.
Objektivvergrößerung 40X

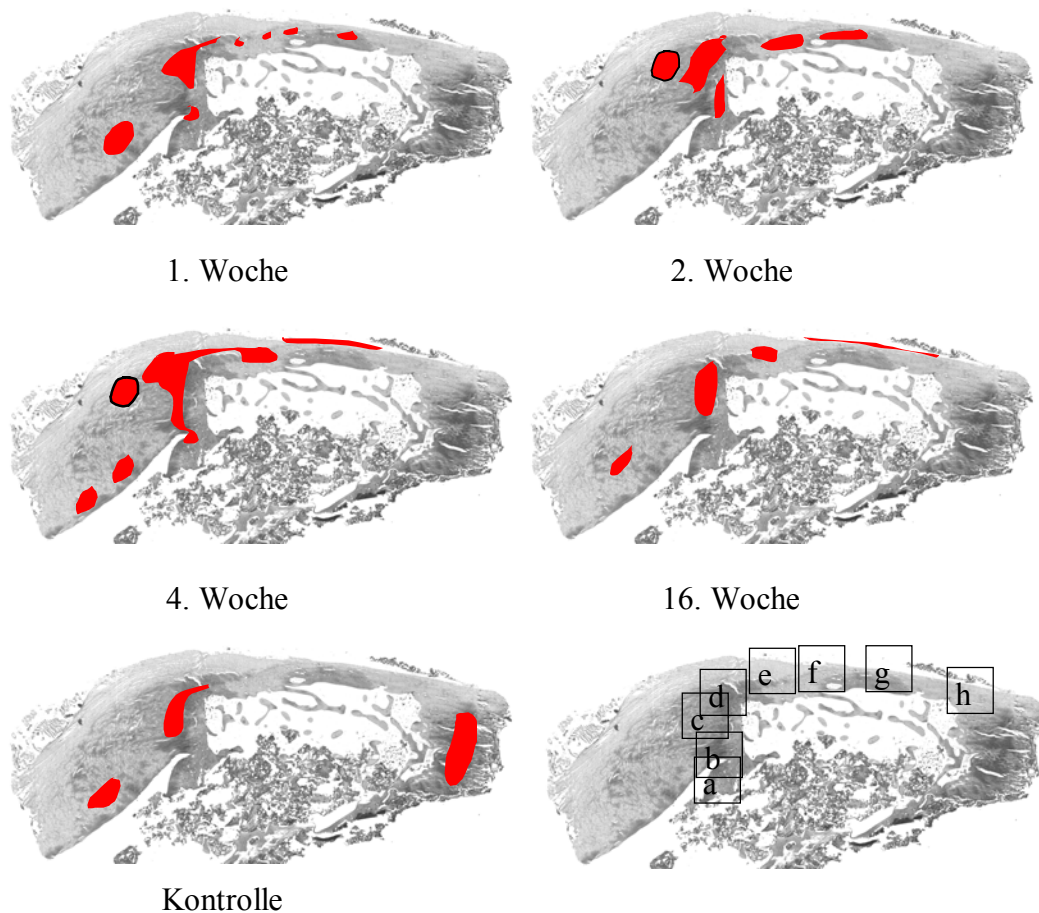


Abb. 39 Schematische Darstellung über die BMP-7-Expression im zeitlichen Verlauf. Es ist eine klare Steigerung der BMP-7-Expression in der 2. und 4. postoperativen Woche zu erkennen. Innerhalb der Sehne wird BMP-7 auch vermehrt nachgewiesen. In der sechzehnten Woche ist die Expression mit den Kontrollen vergleichbar. Der umkreiste Fleck markiert die Stelle, an der das BMP-7 im postoperativen Verlauf verstärkt auftritt. Diese Region ist in der 1. und 16. Woche sowie bei den Kontrollen negativ.

Zusätzlich zum BMP-7 wurden die Supraspinatussehnen auch auf das Vorhandensein von BMP-2 untersucht.

BMP-2 war ubiquitär vorhanden und in seiner Erscheinung dem BMP-7 sehr ähnlich. Besonders stark ausgeprägt war die Expression im Knorpel und dem Knochen, sonst in der Wachstumsfuge, der Sehne, an Gefäßwänden und im Granulationsgewebe. Im postoperativen Verlauf waren auch keine Veränderungen, weder in der Quantität, noch im Verteilungsmuster zu beobachten (Abb. 41+42).

Im Gegensatz zum BMP-2 ergaben die Untersuchungen der bFGF-Expression eine Zeitabhängigkeit. In den Kontrollen war bFGF in den Zellen der Region a und dem Gelenkknorpel nachweisbar. In der ersten und in der vierten Woche waren die Präparate der operierten Tiere negativ (Abb. 40). In der zweiten Woche waren die

Zellen am Sehnenansatz stark positiv. Hier war die topographische Anordnung nicht granulär wie beim BMP-2 und BMP-7. Fasern waren auch negativ. Lediglich die Tenozyten und Chondrozyten im unmittelbaren Sehnenansatz waren intrazellulär positiv (Abb. 44). In der sechzehnten Woche waren wieder positive Zellen in der Ansatzzone zu beobachten, allerdings in geringerer Ausprägung und Quantität (Abb. 43).

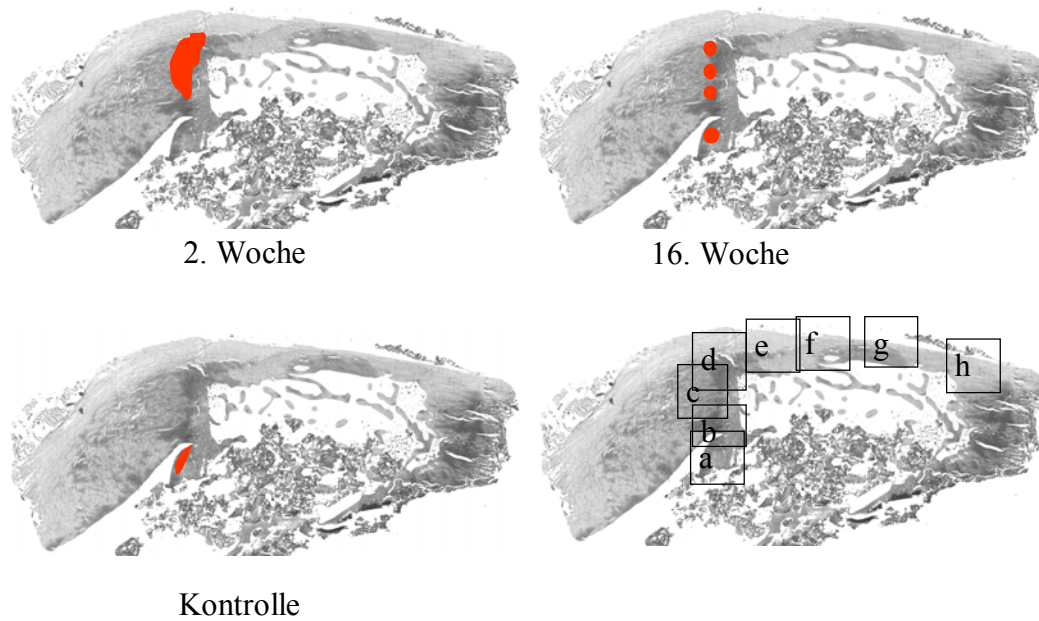


Abb. 40 Schematische Darstellung der bFGF-Expression im postoperativem Verlauf. Zu erkennen ist deutlich die Expression in der 2. postoperativen Woche. In der 16. Woche ist bFGF gering am Sehnenansatz nachweisbar.

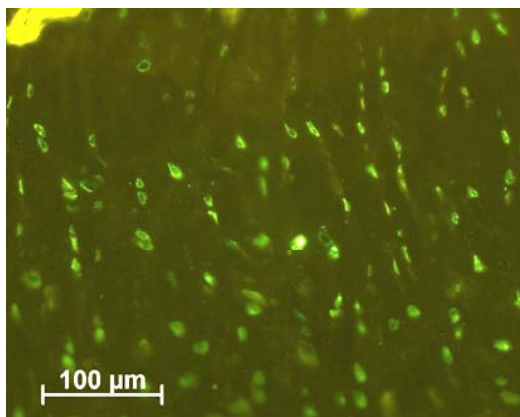


Abb. 41 BMP-2-Expression am gesunden Sehnenansatz. Zu sehen ist die Verteilung entlang der Zellmembran. Links oben ist der Übergang zum Knochen. Objektivvergrößerung 20X

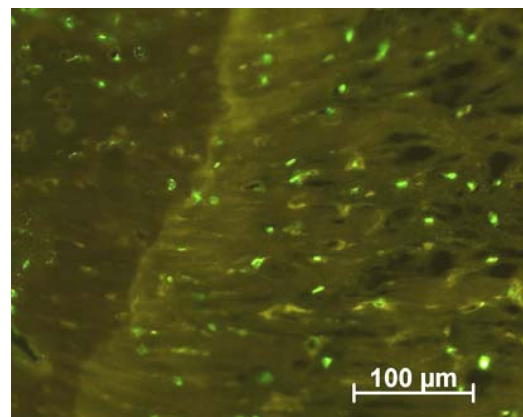


Abb. 42 BMP-2-Expression am Sehnenansatz eine Woche post-OP. Im Vergleich zur Kontrolle ist zu sehen, dass es keine Steigerung im postoperativen Verlauf gab. Objektivvergrößerung 20X

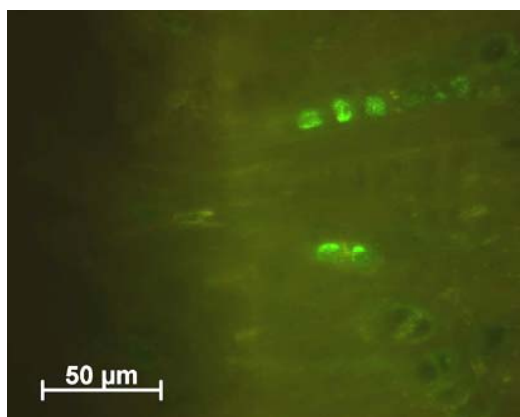


Abb. 43 bFGF-Expression in den Zellen des Sehnenansatzes sechzehn Wochen postoperativ. Objektivvergrößerung 40X

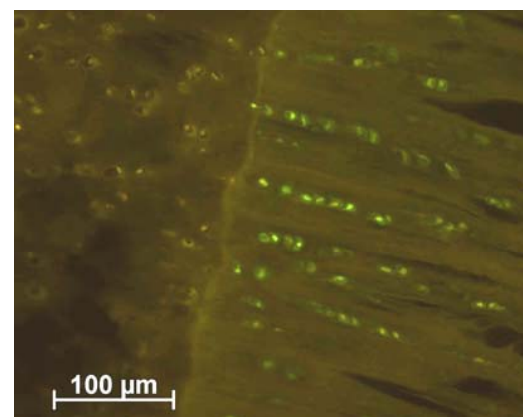


Abb. 44 bFGF-Expression in Sehnenansatz zwei Wochen post-OP. Klar zu erkennen ist die intrazelluläre Lokalisation des bFGF. Objektivvergrößerung 20X

7.3.2. mRNA Expression

Um den Entstehungsort der Wachstumsfaktoren nachweisen zu können, wurden die Sehnen mittels der PCR auf das Vorhandensein spezifischer mRNA geprüft. Besonderes Interesse galt dem BMP-7 und dem bFGF2.

Die BMP-7-Expression in den heilenden Sehnen zeigte eine zeitlich abnehmende Tendenz (Abb. 45). Die Kontrollwerte lagen über den Werten des postoperativen Verlaufes. Der niedrigste Wert war in der sechzehnten Woche zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die lokalen Veränderungen der BMP-7-Expression, welche in der Immunhistochemie zu sehen waren, durch PCR nicht erfasst werden können.

Die bFGF2-Expression zeigt eine klare Zeitabhängigkeit mit Werten welche in der 1. bis 4. postoperativen Woche deutlich höher lagen als die Kontrollwerte (Abb. 46). In der 16. Woche sank der Wert unter die Kontrollwerte.

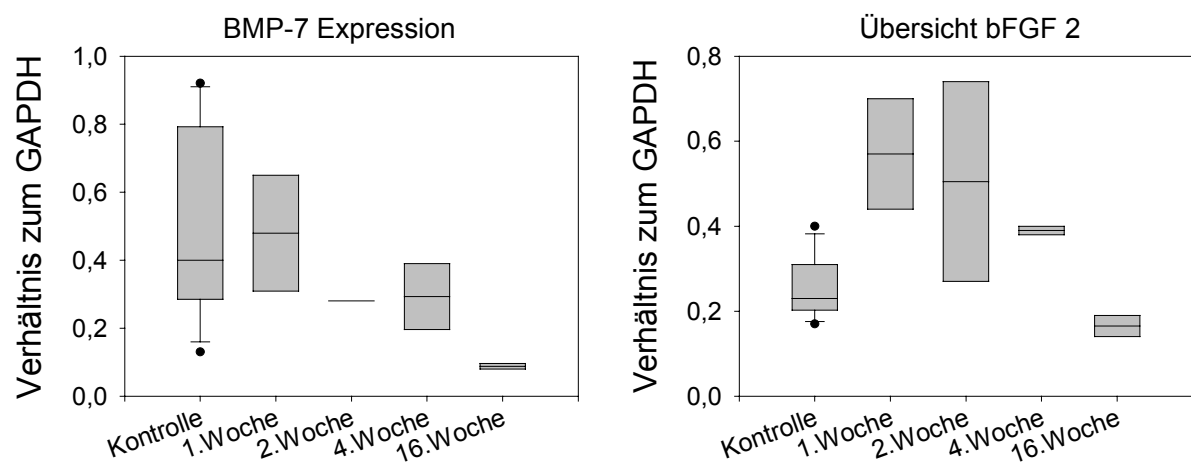


Abb. 45+46 Diagramme über die Verteilung vom BMP-7 und bFGF2 im postoperativen Verlauf. Die Werte des BMP-7 sinken im postoperativen Verlauf unter die Kontrollwerte. Anders ist dies beim bFGF. Hier steigert sich die Expression im postoperativen Verlauf. Besonders stark ist dies in den ersten zwei Wochen zu erkennen.

Die TGF β - und VEGF-Expressionen zeigten keine zeitliche Abhängigkeit (Abb. 47+48).

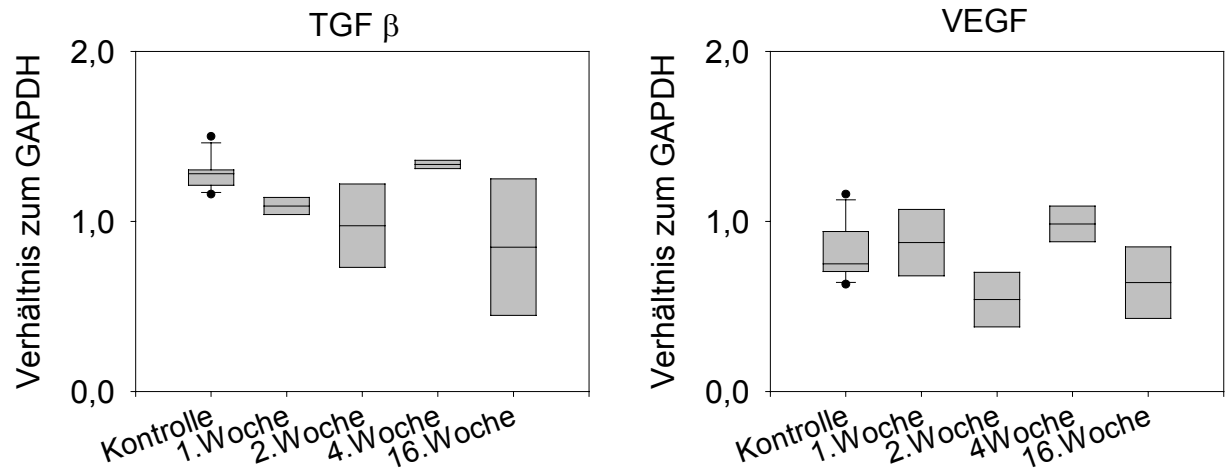


Abb. 47+48 TGF β - und VEGF-Expression in den postoperativen Wochen. Es ist keine zeitliche Abhängigkeit zu beobachten.

7.4. Entzündungsparameter

7.4.1. Immunologische Untersuchungen

Um das Entzündungsverhalten der heilenden Supraspinatussehne erfassen zu können, wurde die Lymphozytenaktivität mittels CD3 Antikörper, einem Marker für T-Lymphozyten, und die Makrophagentätigkeit mit Hilfe von RAM 11 Antikörper untersucht.

Es zeigte sich, dass im Heilungsverlauf keine T-Lymphozyten beteiligt waren. Es waren vereinzelte CD3 positive Zellen im Knochenmark vorhanden, was als Kontrolle des Antikörpers gilt.

Mittels RAM 11-Antikörper konnte ein starkes Vorhandensein von Makrophagen in den postoperativen Gewebsschnitten beobachten werden. In den Kontrollpräparaten waren nur vereinzelte Zellen im Knochenmark, der Wachstumsfuge und gelegentlich in der Sehne zu beobachten. Neben der Anwesenheit von RAM11- positiven Zellen im Knochenmark zeigten die Sehne, das Granulationsgewebe und das umliegende Bindegewebe eine starke Anfärbung. In der ersten postoperativen Woche waren besonders die Sehne und die Regionen d-e betroffen (Abb. 50). Auch in den Regionen f-g waren Makrophagen anwesend. Sie waren vereinzelt, meist aber in Gruppen lokalisierbar. In der zweiten Woche breitete sich die Anfärbung aus. Hauptsächlich

war dies im Sehnenstumpf zu beobachten, aber auch die Regionen d-f waren betroffen. In der vierten Woche waren in der Sehne weniger Makrophagen erkennbar, dafür aber vermehrt in den Regionen e-f, der neu entstandenen Ansatzzone, anwesend. Dies konnte auch in der sechzehnten Woche beobachtet werden, wobei sich in dieser Phase die Makrophagen mehr die Peripherie der Sehne und in den Sehnenstumpf verlagerten. Der Sehnenansatz war weitgehend frei von Makrophagen (Abb. 49+51).

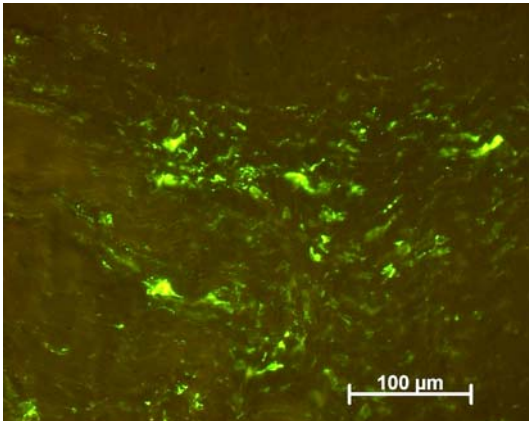


Abb. 49 Makrophagen in der Sehne. 16. Woche post-OP. Objektivvergrößerung 20X

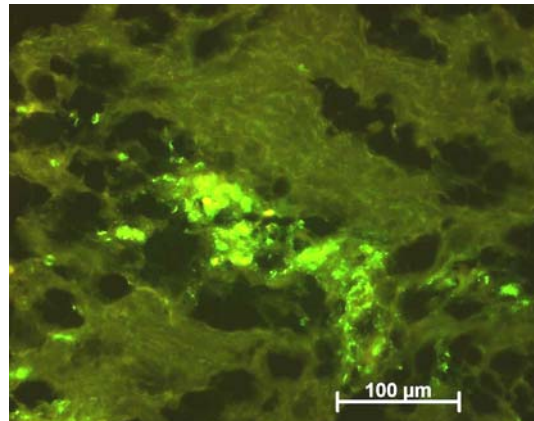
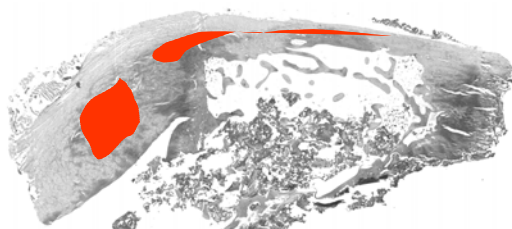
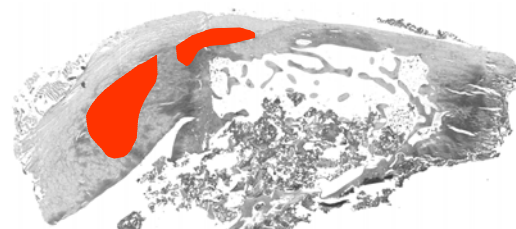


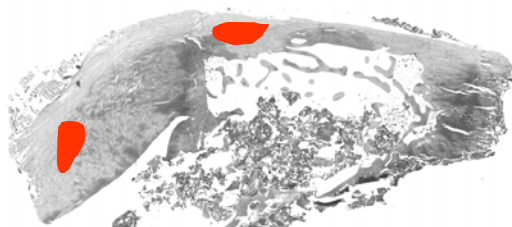
Abb. 50 Makrophagenkonglomerat in der Sehne. 1. Woche post-OP. Objektivvergrößerung 20X



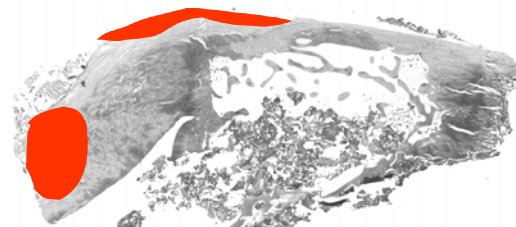
1. Woche



2. Woche



4. Woche



16. Woche

Abb. 51 Schematische Darstellung der Verteilung der Makrophagen in den postoperativen Wochen. Dargestellt ist die hohe Konzentration von Makrophagen speziell in der Sehne in der 1., 2. und 16. Woche.

7.4.2. mRNA Expression

Auf der mRNA- Ebene wurde als Entzündungsmarker die Expression von IL-1 untersucht. Diese zeigte ein umgekehrtes Verhalten im Vergleich zu den restlichen mRNA- Werten. Der niedrigste Wert war in der ersten Woche nachweisbar, gefolgt von den Werten der zweiten Woche. Die Werte der 4. bis 16. Woche waren vergleichbar mit den Kontrollwerten (Abb. 52).

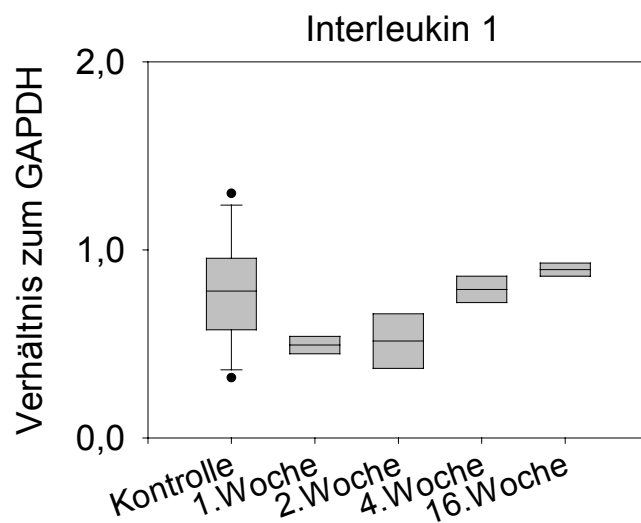


Abb. 52 IL-1 Expression in den postoperativen Wochen.

7.5. Apoptose in der Supraspinatussehne

Da im Verlauf der Heilung eine klare Umstrukturierung und Veränderung der Regionen in der Schulter histologisch zu beobachten war, entstand die Frage, ob dies durch Umdifferenzierung oder Neubildung hervorgerufen wurde. Um klarere Einblicke in diesen Ablauf, speziell der Frage der Neubildung zu gewinnen, wurde ein TUNEL- Assay durchgeführt, um die Apoptose in diesen Regionen beschreiben zu können. In den Kontrollsehnen waren nur sehr vereinzelt und sehr unregelmäßig positive Zellen zu finden, so dass man diese generell als Apoptose-negativ ansehen kann.

In der ersten postoperativen Woche waren die meisten apoptotischen Zellen im Sehnenansatz zu beobachten. Eine klare regionale Verteilung war nicht erkennbar. Im Sehnenstumpf so wie im Knochen waren keine positiven Zellen. In den nächsten Wochen zeigte sich eine regional unterschiedliche Anzahl von apoptotischen Zellen.

In der zweiten Woche war in den Regionen b-d, dem unmittelbaren Sehnenansatz, die höchste Konzentration an positiven Zellen, in den Regionen e-f prozentual weniger Zellen apoptotisch. Die Region (a) war in der zweiten Woche nicht auswertbar.

Das regionale Muster der apoptotischen Zellen veränderte sich auch in der vierten Woche. Die Regionen e-f, in denen die neue direkte Sehnenansatzzone sichtbar war, zeigten häufiger als die anderen Regionen positive Zellen (Abb. 54). Besonders in der neuen Ansatzzone waren häufig diese Zellen in geordneter Weise anzutreffen. Zusätzlich wurde eine hohe Menge an positiven Zellen in der Region (b), dem Übergang zwischen dem Gelenkknorpel und dem Sehnenansatz, beobachtet. Außerhalb der Sehnenansatzregionen a-h war in der vierten Woche eine hohe Anzahl (bis zu 30%) an apoptotischen Zellen im subchondralen Knochen zu erkennen (Abb. 53).

In der sechzehnten Woche waren in den Regionen d-e und g-h die meisten apoptotischen Zellen. Insgesamt waren in dieser Woche am wenigsten positive Zellen aufzufinden. Beim Betrachten der Diagramme der 2. bis 16. Woche scheint die prozentual höhere Anzahl der positiven Zellen wie zwei aufeinander folgende Wellen über den Sehnenansatz zu gehen (Abb. 55).

Diese Ergebnisse zeigen, dass am unmittelbaren Sehnenansatz Zellen im Laufe der Regeneration apoptotisch werden. Da der Faserknorpel hingegen keine apoptotischen

Zellen aufweist, kann man davon ausgehen, dass die Ausdehnung der Knorpelplatte eine Metaplasie ohne negative Zelsektion darstellt.

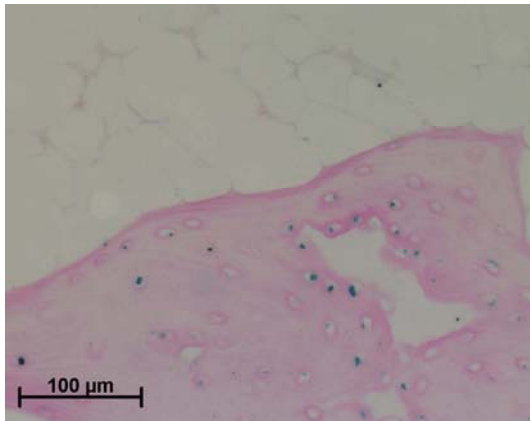


Abb. 53 Apoptose-positive Zellen (blau), ca. 30%, im subchondralem Knochen vier Wochen post-Op
Objektivvergrößerung 20X

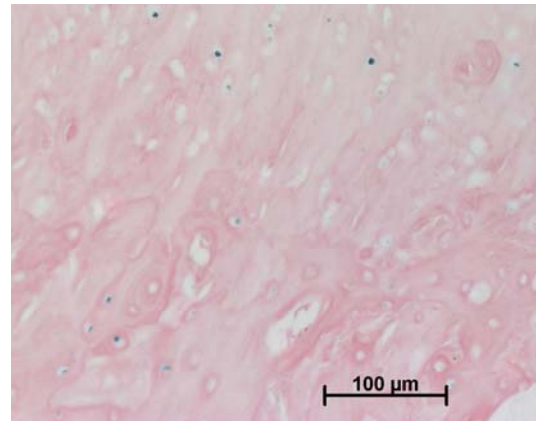


Abb. 54 Apoptotische Zellen in der Region e, ca. 2 % (neuen Ansatzzone).
20X Objektivvergrößerung

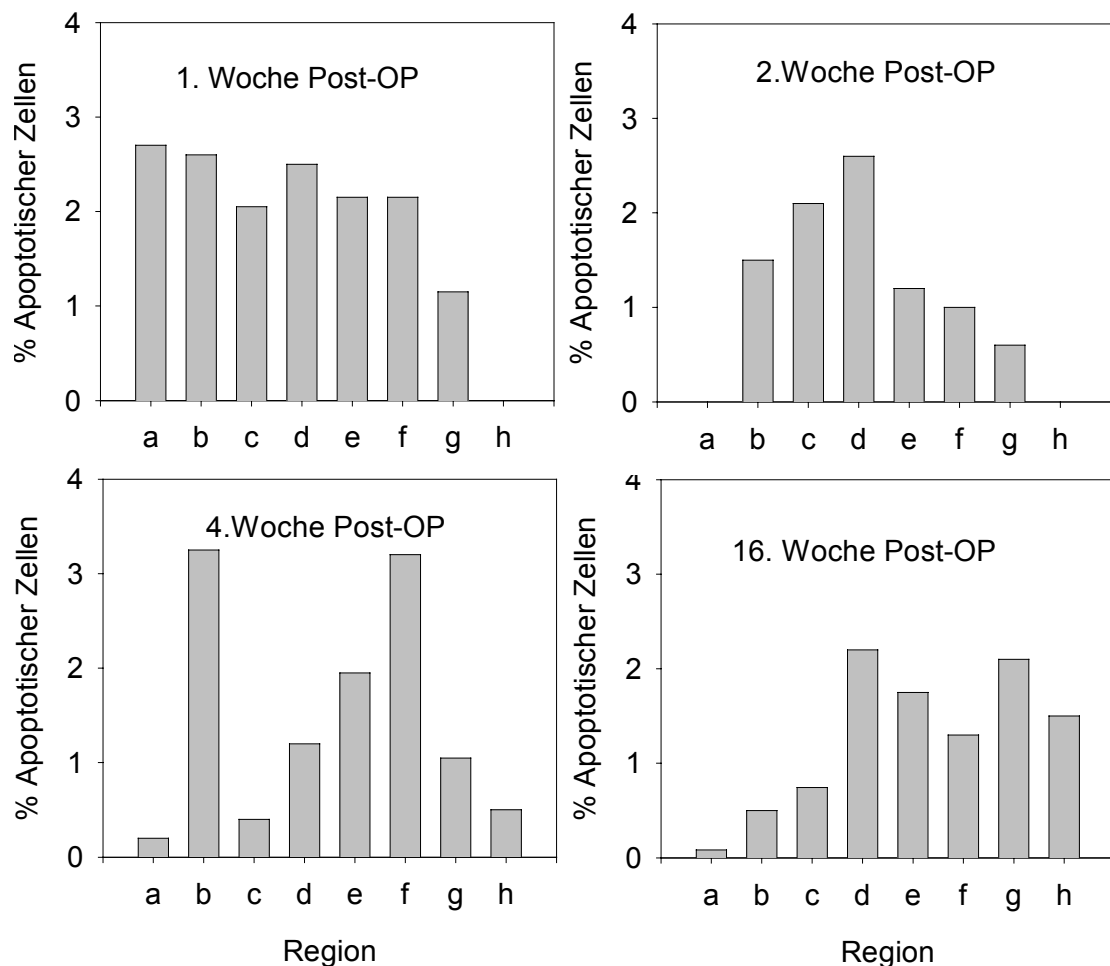


Abb. 55 Prozent apoptotische Zellen im postoperativem Verlauf. Wochenübersicht der Mittelwerte. Zu erkennen sind die zwei wellenartigen Verläufe über den Ansatz.

7.6. Untersuchungen an der humanen Bursa subacromialis

Die untersuchten Bursae subacromiales stammten von 20 Patienten mit einem chronischen Subakromialsyndrom unterschiedlicher Ätiologie. Die Patienten waren zwischen 42 und 70 Jahre alt. Gemeinsam waren ihnen bewegungsabhängige Schulterschmerzen und Bewegungs einschränkungen.

Es wurden auch gesunde Bursen untersucht, welche keine Anzeichen von Entzündung zeigten (Abb. 56). Sie stammten von Patienten, bei denen die Resektion des proximalen Humerus aufgrund eines malignen Tumors im Oberarmschaftbereich erfolgen musste.

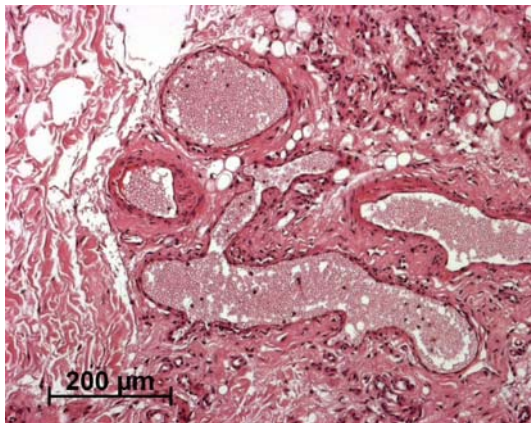


Abb. 56 Drüsengänge mit mukösem Inhalt in einer gesunden Bursa.
H&E-Färbung Objektivvergrößerung 10X

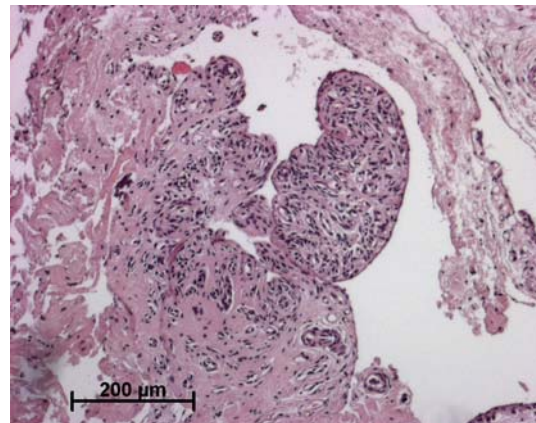


Abb. 57 Entzündete Bursa subacromialis.
H&E-Färbung. Objektivvergrößerung 10X

7.6.1. Immunhistologische Untersuchungen der EZM

Um die EZM -Zusammensetzung der Bursa subacromialis genauer bestimmen zu können wurden die Schnitte auf die Anwesenheit von Kollagen Typ I und Typ II untersucht.

Es war zu beobachten, dass die Bursa vor allem aus Kollagen Typ I besteht, was mit Ausnahme des Schleimsekretes, ubiquitär vorhanden war (Abb. 58+60). Kollagen Typ II war nur vereinzelt aufzufinden. Die Regionen, an denen Kollagen Typ II nachweisbar war, waren Regionen mit Resten der abgerissenen Rotatorenmanschette oder vereinzelt Knorpelbezirke in der Bursa (Abb. 59).

Durch die Kollagen Typ I-Anfärbungen war die dreidimensionale Beschaffenheit der Bursa besser erfassbar. Die Drüsennester sowie auch die Gefäße waren sehr gut darstellbar (Abb. 58+60+61).

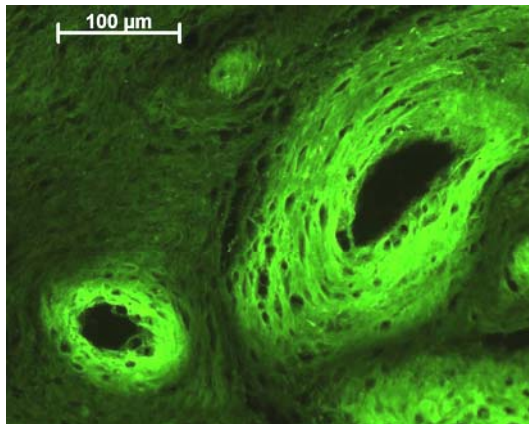


Abb. 58 Kollagen-Typ-I-Expression der Bursa subacromialis. Objektivvergrößerung 20X

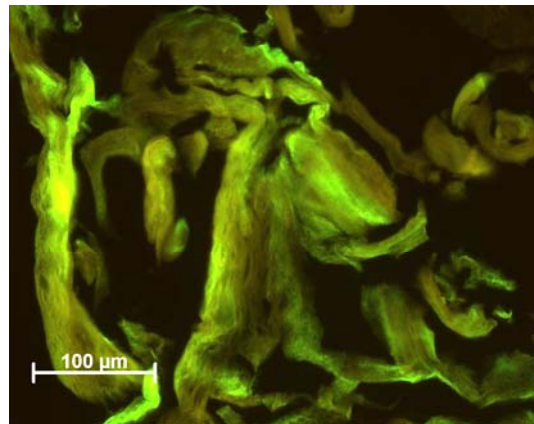


Abb. 59 Kollagen-Typ-II-Expression in einer Bursa mit Faseranteile der RM. Objektivvergrößerung 20X

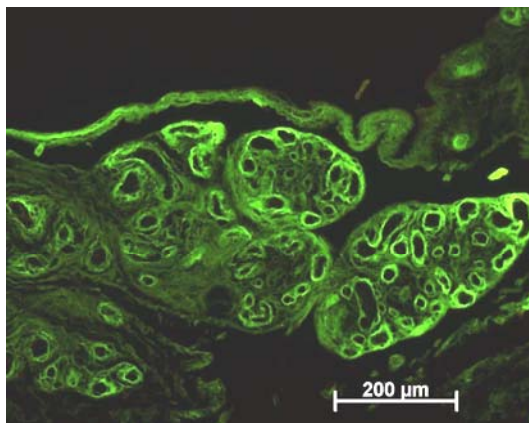


Abb. 60 Kollagen-Typ-I-Färbung der Bursa. Zu erkennen sind Drüsengänge und Gefäße. Objektivvergrößerung 10X

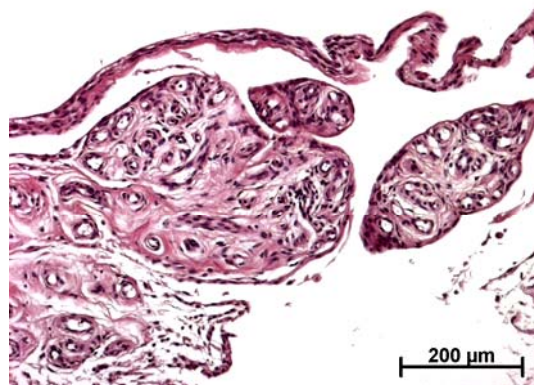


Abb. 61 Bursaübersicht mit Blick auf Drüsengänge und Gefäße. Färbung H&E Objektivvergrößerung 10X

7.6.2. Immunologische Untersuchungen der Wachstumsfaktoren

Zusätzlich zu den Beobachtungen über die EZM wurden die Wachstumsfaktoren in der Bursa subacromialis untersucht. Besonderes Interesse galt dem Vorhandensein von BMP-2 und -7, da diese für die chondrogene Metaplasie innerhalb der SSS mit verantwortlich sein könnten.

Neben BMP-2 und -7 wurden die Bursen auf VEGF und CD3-positive Zellen untersucht, um so den Entzündungshergang näher beschreiben zu können. Es zeigte sich, dass keine Lymphozyten in den entzündeten Bursen nachweisbar waren. Die

VEGF-Expression war innerhalb der Gefäßwände und im Granulationsgewebe erkennbar, besonders wenn sich neue Gefäße hier entwickelten (Abb. 66+67).

Die BMP-2-Expression war nur in drei Bursen zu finden, von denen zwei zu gesunden Kontrollen gehörten. Das BMP-2 war im Bindegewebe, den Sehnenanteilen in der Bursa, im Granulationsgewebe und in den Zellen der Drüsengänge sowie der Gefäße vorhanden. Das Expressionsmuster zeigte das gleiche Schema wie bei der SSS der Kaninchen. Hier war wieder BMP-2 perizellulär nachweisbar. Zusätzlich waren noch Fasern positiv färbbar (Abb. 62+63).

Die BMP-7- und VEGF-Expressionen in den Bursen war unterschiedlich. Sie waren beide in mehr Bursen nachweisbar als das BMP-2 und konnte vermehrt in den makroskopisch sichtbar entzündeten Bursen beobachtet werden, besonders stark bei Patienten mit langjährigen Beschwerden. BMP-7 war vermehrt an den Fasern sichtbar, vereinzelt aber auch in Zellen, insbesondere in Zellen der Drüsengänge und Gefäße. Hier zeigten sie auch das gleiche Muster wie bei den SSS der Kaninchen. Die genauere Betrachtung der Fasern zeigte, dass das BMP-7-Molekül punktuell an der Faseroberfläche und häufig, durch den Anschnitt dieser Fasern beobachtbar, im Inneren der Fasern lokalisiert war (Abb. 64+65). Da die Anzahl der Patientenproben zu gering ist, um statistische Aussagen zu machen, können diese Ergebnisse nur als Tendenzen betrachtet werden, welche weiter in einem größeren Patientengut untersucht werden müssen.

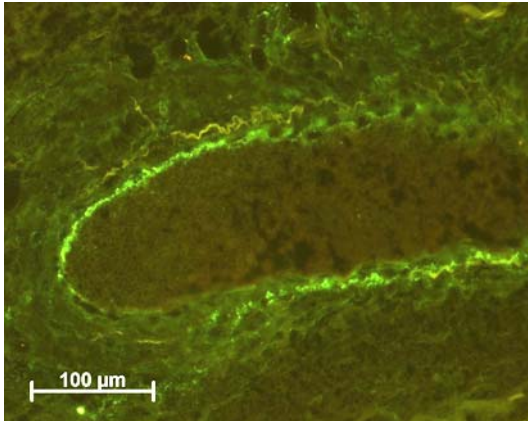


Abb. 62 BMP-2-Expression in der gesunden humanen Bursa. Hier am Rand der Drüsengänge. Erkennbar ist das Drüsensekret. Objektivvergrößerung 20X

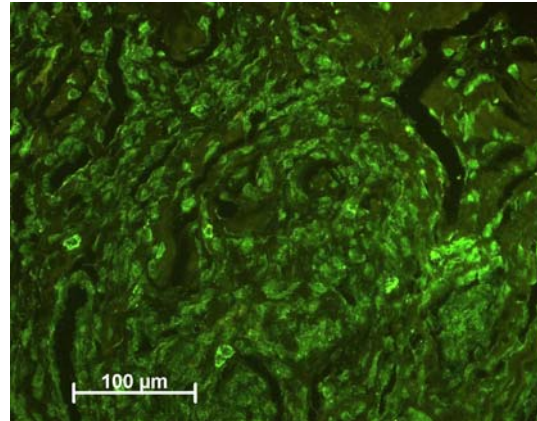


Abb. 63 BMP-2-Expression in der gesunden humanen Bursa. Hier im Bindegewebe zu erkennen. Objektivvergrößerung 20X

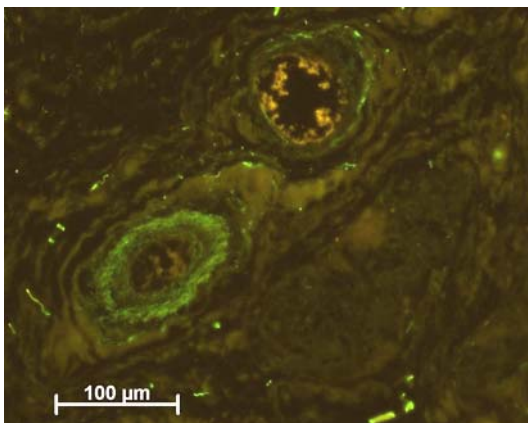


Abb. 64 BMP-7-Expression in den Gefäßen einer entzündlich veränderten Bursa. Objektivvergrößerung 20X

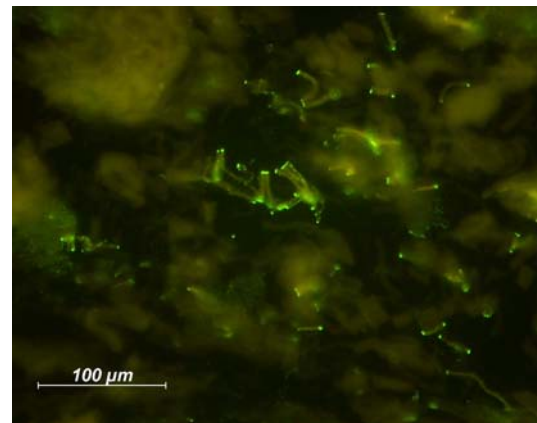


Abb. 65 BMP-7-Expression im BdGW. Zu erkennen die Verteilung des BMP-7 an der Oberfläche bzw. im Inneren der Fasern. Objektivvergrößerung 63X

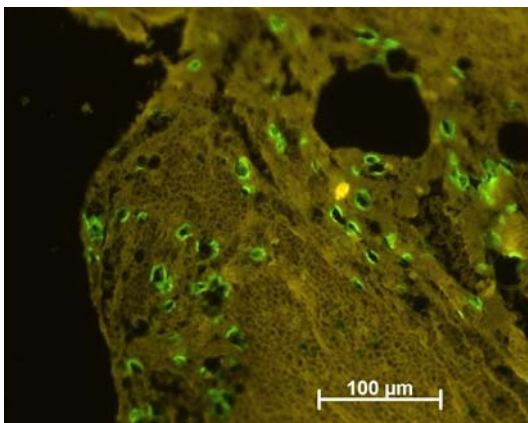


Abb. 66 VEGF-Expression in einer entzündeten Bursa. Zu sehen ist die Gefäßneubildung im Granulationsgewebe. Objektivvergrößerung 20X

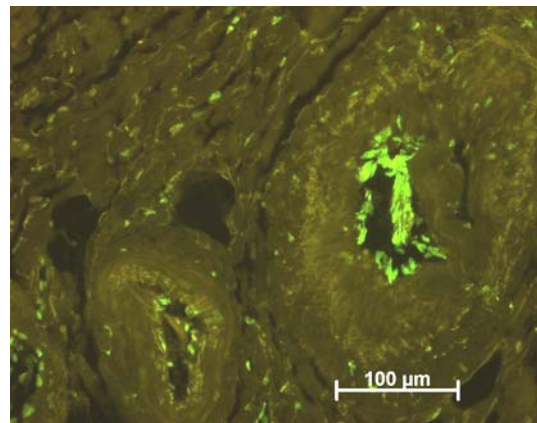


Abb. 67 VEGF-Expression in Gefäßen einer Bursa, besonders in den Zellen der Intima. Es sind auch Zellen im BdGW als VEGF positiv zu erkennen. Objektivvergrößerung 20X

7.6.3. mRNA Expression

Zusätzlich zu den immunhistologischen Untersuchungen wurden exemplarisch drei Bursen auf ihren BMP-7 mRNA-Gehalt untersucht, um so feststellen zu können, ob dieses hier produziert wird. Es wurden eine gesunde, eine leicht entzündete und eine stark entzündete Bursa untersucht. Die Auswertung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei den Kaninchenpräparaten.

Bei diesen drei exemplarischen Bursen zeigte sich eine Abhängigkeit der BMP-7-Expression von dem Entzündungsgrad der Bursa. Drei Bursen können noch keinen tatsächlichen Zusammenhang festlegen, sie zeigen aber eine Tendenz, die weiter untersucht werden sollte (Abb. 68).

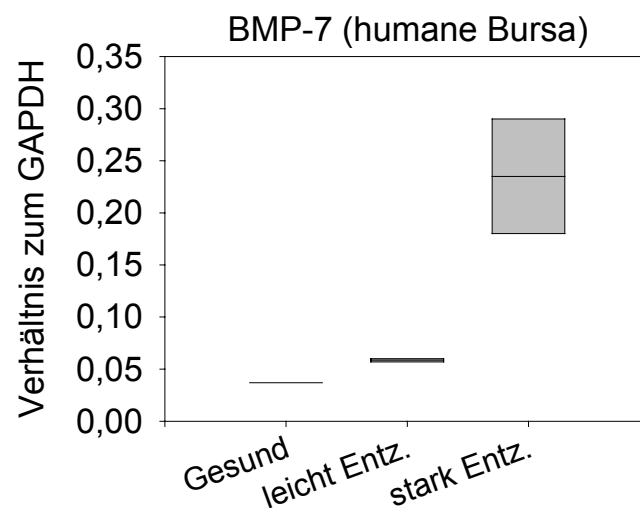


Abb.68 BMP-7-Expression in der Bursa subacromialis.
Zu erkennen ist die starke Expression in stark entzündeten Bursae.

8. Diskussion

Die den häufigen RM- Rupturen und Rerupturen zugrunde liegenden molekularen und mikrostrukturellen Veränderungen konnten bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden. Es wurden unterschiedliche Untersuchungen am Tiermodell (Kumagai J. et al., 1994; Carpenter J.E. et al., 1998; Uthoff HK et al., 2000; Kobayashi K. et al., 2001; Thomopoulos S. et al., 2002) und prospektive sowie retrospektive Untersuchungen an selektionierten Patientenklientelen durchgeführt (Rickert M. et al., 1998; Gerber Ch. et al., 2000; Jost B. et al., 2000; Kahn U. et al., 2000; Murrell G.A.C. & Walton J.R., 2001). Am Tiermodell wurden die Rotatorenmanschetten im postoperativen Verlauf lediglich auf deren EZM-Zusammensetzung untersucht. Betrachtungen über eventuelle Wachstumsfaktoren innerhalb der heilenden Sehne wurden bislang noch nicht durchgeführt. Die Untersuchungen an humanen Präparaten beschränkten sich meist auf die Analyse intraoperativ gewonnener Gewebeproben sowie die Untersuchung klinischer Aspekte zum Vergleich von Operationstechniken und deren Auswirkung auf die SSS oder die betroffenen Muskelgruppen.

Bei all diesen Untersuchungen wurden die degenerativen Veränderungen der RM nahezu ausschließlich auf deren Raumbegrenzung unter dem korakoakromialen Bogen und die unzureichende intrinsische Heilung auf die mangelnde Durchblutung zurückgeführt.

Eine mögliche Beteiligung der Bursa subacromialis an der Entstehung degenerativer Veränderungen bzw. dem Heilungsprozess wurde erst in den letzten Jahren postuliert (Uthoff HK et al., 2000; Tillander B. et al., 2001). Dazu gehörte auch der Nachweis von Wachstumsfaktoren bzw. Entzündungsfaktoren in der Bursa in Beziehung zu RM-Defekten (Sakai H. et al., 2001; Yanagisawa K. et al., 2001).

8.1. Die Expression von EZM in der heilenden Schulter

Die Verteilung der Expression der Kollagentypen I und II in der gesunden Ansatzzone von SSS des Kaninchens ist durch immunhistochemische Untersuchungen von Kumagai et al. (1994) untersucht worden und konnte dementsprechend als bekannt vorausgesetzt werden (Kumagai J. et al., 1994).

Die Expression von Kollagen Typ II während des Heilungsvorganges in der SSS wurde von Uthoff et al (2000) im Kaninchenmodell mit Hilfe der Immunhistochemie in der zweiten postoperativen Woche geprüft und zeigte vergleichbare Ergebnisse innerhalb dieses Zeitraumes. Thomopoulos et al. (2002) untersuchten die Expression von Kollagentypen I, XII und X in heilenden Rotatorenmanschetten der Ratte und konnten eine Zunahme von Kollagen Typ I und XII sowie eine Abnahme des Kollagen Typ X im postoperativen Verlauf beobachten (Uthoff HK et al., 2000; Thomopoulos S. et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren mit denen in der Literatur publizierten Ergebnissen vergleichbar, allerdings mit dem Unterschied, dass Thomopoulos et al. keine Steigerung in den Kollagen-Typ-II-Expressionen erfassen konnten.

8.1.1. Kollagen Typ I

Die Expression von Kollagen Typ I zeigte vergleichbare Ergebnisse in den Untersuchungen durch IHC und PCR. Die Steigerungen der Kollagen-Typ-I-Expression in den ersten Wochen ist ein normales Phänomen im Heilungsprozess und charakterisiert einen Regenerationsvorgang in der SSS (Kumagai J. et al., 1993; Hamada K. et al., 1997; Boykiw R. et al., 1998).

8.1.2. Kollagen Typ X

Kollagen-Typ-X-Expression konnte in dieser Arbeit nur mittels PCR ermittelt werden, da in der IHC keine Signale erfasst werden konnten. In der ersten postoperativen Woche war eine Steigerung der mRNA zu beobachten, welche aber schon in der zweiten Woche unter die Werte der Kontrollpräparate fiel. Der niedrigere Wert an Kollagen Typ X mRNA im

Heilungsverlauf ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Thomopoulos et al., nicht hingegen der Anstieg in der ersten postoperativen Woche. Dieses abweichende Ergebnis kann mit der Ausbildung hypertropher Chondrozyten im Heilungsvorgang des Faserknorpels zusammenhängen. In der sechzehnten Woche war kein Kollagen Typ X mehr in den SSS nachweisbar. Dies deckt sich mit den histologischen Untersuchungen, bei denen in diesem Zeitraum keine Wachstumsfuge mehr vorhanden war und die Heilung abgeschlossen war. Die aufgeführten alleinigen PCR-Ergebnisse sind jedoch nicht ausreichend, um das Verhalten des Kollagen Typ X und dessen Rolle im Heilungsverlauf der SSS zu definieren.

8.1.3. Kollagen Typ II und Beeinflussung durch Wachstumsfaktoren

Die Verteilung der Kollagen-Typ-II-Expression im postoperativen Verlauf zeigte in der ersten Woche einen erheblichen Abfall unter die Werte der Kontrollpräparate. Diese Absenkung wurde auch in den ICH-angefärbten Schnitten beobachtet. Dieses Phänomen war indirekt auch in den Safranin O gefärbten Schnitten zu beobachten, da in der ersten postoperativen Woche noch keine vermehrte Anfärbung der Proteoglykane im Vergleich zu den Kontrollpräparaten zu vermerken war. Möglicherweise ist dies durch den in der ersten postoperativen Woche dominierenden Entzündungshergang zu erklären.

Es ist bekannt, dass Chondrozyten unter dem Einfluss von Entzündungsfaktoren ihre Makromolekülsynthese einstellen. Besonders ist dies durch IL-1 β beeinflusst (Huch K. et al., 1997).

Im Vergleich zur ersten postoperativen Woche war in der zweiten Woche eine stark erhöhte Expression von Kollagen Typ II mRNA, eine stark vermehrte Anfärbung mittels IHC und ein erhöhter Proteoglykangehalt durch verstärkte Anfärbung in der Safranin O-Färbung zu beobachten. Daraus kann man auf ein verstärktes Vorhandensein von Knorpelgewebe schließen, was sich histologisch durch die Ausweitung der Faserknorpelzone bestätigen lässt.

Der erhöhte Gehalt an bFGF im postoperativen Verlauf kann eine fördernde Wirkung auf die chondrogene Metaplasie gehabt haben. Neuere *in vivo*-Untersuchungen zeigten im Gegensatz zu den *in vitro*-Untersuchungen eine mitogene Wirkung des bFGF auf Chondrozyten und fördernde Wirkung auf die Kollagen Typ II-Produktion des

Regenerationsgewebes. (Shida J. et al., 1996; Hanada K. et al., 1997; Nakajima F. et al., 2001; Shida J. et al., 2001). Nakajima et al. beobachteten ein Kollagen Typ II mRNA-Maximum in Knorpelzellen heilender Rattenknochen zwei Wochen nach bFGF Injektion. Dies korreliert mit den Beobachtungen dieser Arbeit in der Immunhistochemie und in den Safranin O Färbungen ab der zweiten postoperativen Woche. Möglicherweise wird die erhöhte Kollagen-Typ-II-Expressionen deshalb maßgeblich durch den erhöhten bFGF Gehalt in der SSS hervorgerufen. Dabei scheint der in der ersten Woche vorherrschende Entzündungsprozess auf jeden Fall keinen negativen Einfluss auf die bFGF-Expression zu haben, da die mRNA-Expression bereits in der ersten Woche stark zunahm.

Die Ausdehnung der Faserknorpelzone, die aufgrund der histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen werden konnte, kann neben dem Einfluss der Wachstumsfaktoren auch biomechanisch induziert sein. Dabei kann vor allem die Druckerhöhung unter dem korakoakromialen Bogen verantwortlich gemacht werden. Bedingt durch die Desinsertion der Supraspinatussehne kommt es zu einer relativen kranialen Instabilität des Humeruskopfes, was die Druckerhöhung des Regenerationsgewebes unter dem knöchernen Schulterdach erhöhen kann. Dass es sich um eine echte Metaplasie handelt, kann vorausgesetzt werden, da sich keine apoptotischen Zellen innerhalb der Sehne durch den TUNEL-Assay nachweisen ließen. Daraus folgert, dass es sich hier nicht um eine Neubildung nach Untergang des Gewebes handelt, sondern um eine Umdifferenzierung innerhalb der Sehne.

Zusätzlich zum bFGF sind die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) -auch Osteoinduktive Proteins (OP) genannt- bekannt für ihre Knorpelinduktion in unterschiedlichen Geweben (Forslund C. & Aspenberg P., 1998; Aspenberg P. & Forslund C., 2000; Ducey P. & Karsenty G., 2000; Groeneveld E.H.J. & Burger E.H., 2000; Sanyal A. et al., 2002). In der Immunhistochemie der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich in den postoperativen Wochen nicht nur ein erhöhtes Vorhandensein von BMP-7, sondern auch ein verändertes regionales Expressionsmuster im Verhältnis zu den Kontrollen und im Zeitverlauf. BMP-7 war in der 2. bis 4. Woche am Sehnenansatz sowie in erhöhtem Maße im Faserknorpel vorhanden.

Der Entzündungshergang innerhalb der Sehne könnte den niedrigen BMP-7 mRNA- Gehalt im postoperativen Verlauf erklären. Die Ergebnisse der PCR zeigen abnehmende Tendenzen in der BMP-7-Expression in den postoperativen Wochen, welche auch deutlich unter den Kontrollwerten waren und blieben. Hieraus ergibt sich eine Diskrepanz zu den immunhistochemischen Ergebnissen. Da die mRNA- Analyse jedoch lediglich eine Aussage über den Entstehungsort von BMP-7 aussagt, kann aus diesem Ergebnis abgeleitet werden, dass das BMP-7 möglicherweise auch extern produziert wird, um in der SSS in das aktive Endprotein umgewandelt zu werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass BMP-7 im Vergleich zu mechanischen Einflüssen einen stimulierenden Einfluss auf chondrogene Veränderungen innerhalb von Sehnen hat (Forsslund C.& Aspenberg P., 1998; Aspenberg P. & Forsslund C., 2000).

Die immunhistochemischen Beobachtungen des regional unterschiedlichen Vorhandenseins von BMP-7 lässt vermuten, dass dem BMP-7 zusätzlich zum bFGF eine Rolle für die chondrogene Metaplasie in der SSS nach einem akuten Trauma zukommt. In der Literatur wird ebenfalls ein Synergismus zwischen bFGF und BMPs beschrieben (Hanada K. et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass die chondrogene Metaplasie in der SSS nach traumatischer Desinsertion möglicherweise mit der Gewebsumwandlung im Rahmen degenerativer Veränderungen der SSS zu vergleichen ist. Aufgrund des zeitlich rückläufigen Verhaltens mit Reduktion von Kollagen Typ II mRNA bei gleichbleibendem Nachweis von Kollagen Typ II in der IHC lässt sich schließen, dass es sich um langfristige Veränderungen in der Sehne handelt.

8.2. Entzündungsreaktion im postoperativem Verlauf

Im postoperativen Verlauf waren keine CD3 Zellen im Sehnenansatz nachweisbar. Es war somit keine lymphozytäre Infiltration nachweisbar. Diese waren aber als positive Kontrolle im Knochenmark erkennbar, womit der prinzipielle Nachweis von CD3 Zellen mit dieser Methode erbracht ist. Die Anwesenheit der Makrophagen mit dem RAM11- Antikörper zeigte, dass das Immunsystem der Tiere auf den Entzündungsreiz der Operation adäquat reagiert hat und die Makrophagen in die Umdifferenzierung und Heilung des Gewebes integriert sind.

Überraschenderweise spielte IL-1 keine große Rolle im Entzündungshergang. Im Vergleich zu den Kontrollpräparaten zeigte sich sogar eine vorübergehende Absenkung der IL-1-mRNA-Expression, wobei die Werte anschließend wieder den Kontrollpräparaten entsprachen. Die Daten zeigen, dass IL-1 in der Ansatzregion der SSS beim Kaninchen möglicherweise eher eine physiologische als eine pathophysiologische Rolle spielt. Die Ergebnisse der PCR schließen jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass ähnlich dem BMP-7 regional unterschiedliche Verteilungsmuster des IL-1 auf Proteinebene zum Tragen kommen können.

Diese Untersuchungen zeigten zusammenfassend, dass es im postoperativem Verlauf zu einer mäßigen Entzündungsreaktion kam, welche nicht lymphozytär getragen wurde.

8.3. Neue Ansatzzone

Ab der zweiten postoperativen Woche waren in den kranialen Regionen des Humeruskopfes, d.h. am periostalen Überzug (e-f) einzelne Zonen zu beobachten, die ebenfalls von ihrer histologischen und immunhistochemischen Charakterisierung her Knorpelgewebe entsprachen. Diese Regionen waren zuerst durch Safranin O Färbung sichtbar. In der vierten postoperativen Woche hatte sich diese ausgeweitet und vermittelten damit den Eindruck einer „sekundären direkten Sehnenansatzzone“. IHC war in der zweiten bis vierten postoperativen Woche BMP-7 in diesen Regionen nachweisbar. In der sechzehnten Woche war eine Rückbildung diese Zonen zu beobachten. Insgesamt steht dieser Befund jedoch nicht in einem unmittelbaren Zusammenhang mit dem Heilungsvorgang innerhalb der fibrikartilaginären Region der SSS. Andererseits muss die Ausbildung dieses „sekundären Sehnenansatzes“ als Reaktion des Organismus auf das artifizielle Trauma gewertet werden. Vermutlich handelt es sich dabei um den Heilungsprozess des kranialen Sehnenabschnitts, der auch an der gesunden SSS des Kaninchens direkt in das Periost des Humeruskopfs einstrahlt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch die Heilung des direkten Sehnenansatzes über knorpelig präformierte Regionen verläuft.

Dieses beobachtete Phänomen sollte in weitergehenden Arbeiten genauer untersucht werden.

8.4. Bursa subacromialis

Die SSS ist keine losgelöste anatomische Struktur. Sie steht in unmittelbarem Kontakt zu der Bursa subacromialis, einem Schleimbeutel, dessen Funktion und Wichtigkeit schon früh beschrieben wurde (Rowe C.R., 1988; Birnbaum K. & Lierse W., 1992; Rahme H. et al., 1993). Da diese häufig im Zusammenhang mit RM-Defekten entzündlich verändert ist, liegt die Vermutung nahe, dass sie bei der Heilung sowie bei der Pathogenese von RM-Defekten eine Rolle spielt. Dies wurde auch schon in der Literatur vermutet (Uthoff HK et al., 2000; Tillander B. et al., 2001). Der entzündlich veränderten Bursa subacromialis kommt eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Schulterschmerzen zu (Rowe C.R., 1988; Kumagai J. et al., 1993; Gerber Ch. et al., 2001; Sakai H. et al., 2001; Yanagisawa et al., 2001).

Die Tatsache, dass Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren von der Bursa subacromialis abstammen können und nicht von der degenerierten Sehne selbst, wurde schon in der Literatur beschrieben (Uthoff HK et al., 2000; Sakai H. et al., 2001). Bekannt ist jedoch noch nicht, ob die Bursa subacromialis aktiv oder passiv Faktoren sezerniert, welche für die Pathogenese bzw. einem Heilungsvorgang der RM-Defekte von Bedeutung sein könnten. Bekannt ist nur, dass chemisch hervorgerufene Entzündungen der Bursa (Carrageenan) eine chondrogene Metaplasie in der SSS hervorrufen können (Tillander B. et al., 2001). Sakai et al. (2001) beschrieb auch erhöhte Mengen an Zytokinen und Wachstumsfaktoren, mitunter bFGF, in humanen Bursen, welche für ihre entzündlichen Veränderungen verantwortlich sein können, aber auch die Pathogenese von RM-Rupturen beeinflussen können (Sakai H. et al., 2001).

Da sich in den SSS der Kaninchen zeigte, dass BMP-7 eine Rolle bei der chondrogenen Metaplasie der Sehne zu spielen scheint, ergab sich daraus, die entzündeten Bursen auf die Expression von BMP-7 zu untersuchen. Eine Untersuchung der Bursa subacromialis war jedoch in den Tierversuchen nicht möglich, da sich die Bursa auch nach dem iatrogenen Trauma nicht als eigenständige Struktur makroskopisch oder mikroskopisch identifizieren ließ und somit keine Analyse möglich war.

Aus diesem Grund wurden Bursapräparate aus humanem Gewebe bei vorliegender degenerativer Läsion der Rotatorenmanschette zur Analyse herangezogen. Hier waren tatsächlich Zellen der Drüsengänge und das Gewebe immunhistochemisch für BMP-7 anfärbbar. Exemplarisch wurden entzündlich veränderte humane Bursen mit Hilfe der PCR auf ihren BMP-7 mRNA- Gehalt untersucht. Da sich eine erhöhte Expression im Vergleich zu gesunden Bursen zeigte, lässt sich aus den Beobachtungen der Immunhistochemie und der PCR vermuten, dass die Bursa möglicherweise in die Pathogenese der chondrogenen Metaplasie der Rotatorenmanschette beteiligt ist. Eine durch Gewebedetritus verursachte Entzündung der Bursa ist zwar denkbar, lässt sich jedoch aus unseren Beobachtungen nicht bestätigen, da in den Bursen keine CD3 positiven Zellen auffindbar waren und somit keine lymphozytäre Infiltration vorlagen.

9. Schlussfolgerung

Die zellulären und molekularbiologischen Untersuchungen über die Reaktion der Supraspinatussehne nach einer ansatznahen Desinsertion haben gezeigt, dass es im Heilungsverlauf zu einer chondrogenen Ausweitung des Sehnenansatzes kommt. Derartige Veränderungen wurden schon in der SSS beobachtet, aber degenerativen Veränderungen und Impingementsyndromen der Schulter zugeschrieben (Rowe C.R., 1988; Schneeberger AG. et al., 1998).

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass diese pathologischen Veränderungen auch nach einem akuten Trauma an gesunden Schultern auftreten, was den Rückschluss zulässt, dass gleichartige Mechanismen zum Tragen kommen. Ausgelöst wird die chondrogene Metaplasie möglicherweise durch das lokale Auftreten von BMP-7 und bFGF, wobei aufgrund der Ergebnisse der PCR speziell beim BMP-7 davon auszugehen ist, dass die SSS nicht der Produktionsort ist. In Frage kommt als Produktionsstätte beispielsweise die Bursa subacromialis, da in den humanen Präparaten BMP-7 sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse beinhalten neue Erkenntnisse, die das Verhalten der SSS nach einem Trauma charakterisieren und möglicherweise bei der Therapie von Schulterläsionen mit in Betracht gezogen werden sollten. Unterschiedliche operative Methoden verbessern die Refixation der rupturierten Sehnenanteile am Humeruskopf, verhindern aber nicht die metaplastischen Gewebeumwandlung. In wie weit die chondrogene Metaplasie das Schlüsselereignis für die Auslösung der Degeneration verantwortlich ist und auch das entstandene Regenerationsgewebe charakterisiert, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Eine spezielle Rolle scheint auch die Bursa subacromialis zu spielen. Durch ihre entzündlichen Veränderungen und ihre Lage im subacromialen Raum kommt ihr nicht nur für die Schmerzentstehung, sondern möglicherweise auch für die Induktion von Veränderungen der Rotatorenmanschette eine bedeutsame Rolle zu (Rahme H. et al., 1993; Schneeberger AG. et al., 1998; Sakai H. et al., 2001). Dies begründet sich in den vorliegenden Untersuchungen, die zeigen, dass in der humanen Bursa BMP-7 produziert

wird, was die Chondrogenese in der Rotatorenmanschette stimulieren kann (Huch K. et al., 1997).

Legt man diese Erkenntnisse zugrunde, wäre es sinnvoll, die Bursa frühzeitig operativ zu entfernen, um diesen pathogenetischen Prozess zu unterbinden, und damit eine Metaplasie des Gewebes zu vermeiden.

Eine andere Möglichkeit bestünde darin, lokale massive entzündungshemmende Therapie, z.B. mit Corticosteroiden, im Subakromialraum durchzuführen. Dabei wäre aber nur eine vorübergehende und kontrollbedürftige Unterdrückung der entzündlichen Veränderungen möglich (Blair B. et al., 1996).

10. Literaturverzeichnis

- Aigner T. G. K., Fairbank JC., von der Mark K., and Urban JP. (1998). "Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs." *Calcif Tissue Int* **63**(3): 263-8.
- Akeson W. B. W., Chu C., and Giurea A. (2001). "Normal cartilage repair-differences in mesenchymal tissue repair." *Clin Orth* 391: 124-141.
- Aspenberg P. and Forslund C. (2000). "Bone morphogenetic proteins and tendon repair." *Scan J Med Sci Sports* **10**: 372-375.
- Benjamin M. and Ralphs J.R. R. (1998). "Fibrocartilage in Tendon and Ligament-andaption to compressive load." *J Anat* **194**: 481-494.
- Benya P.D., Padilla S.R., and Nimni M.E. (1978). "Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture." *Cell*. 15:1313-21.
- Birnbaum K. and Lierse W. (1992). "Anatomy and function of the bursa subacromialis." *Acta Anat* **145**: 354-363.
- Blair B. R. A., Cuomo F., Jarolem K., and Zuckerman J. (1996). "Efficacy of injections of corticosteroids for subacromial impingement syndrom." *J Bone Joint Surg [Am]* **78**(11): 1685-89.
- Böcker W., Denk H. und Heitz Ph.V. (2001). Entzündung. Pathologie. Urban & Fischer. München- Jena 2. Aufl. S.69-99.
- Boykiw R. S. P., Reno C., Marchuk L., Frank C., and Hart D. (1998). "Altered Levels of Extracellular Matrix Molecule mRNA in healing rabbit ligaments." *Matrix Biology* **17**: 371-378.
- Broadley K.N., Aquino A.M., Woodward S.C., Buckley-Sturrock A., Sato Z., Rifkin D.B., and Davidson J.M. (1989). "Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound healing." *Laboratory Investigation* **61**(5): 571-575.
- Bühling K.J. (2000). Entzündung. Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. München/Jena, Urban & Fischer. 2.Aufl. S.57-78.

- Cambier J.C. (1992). "Signal transduction by T- and B- Cell antigen receptors: converging structures and concepts." *Curr. Opin. Immunol.* 4:257-264.
- Carpenter J.E. T. S., Flanagan C.L., DeBano C.M., and Soslowsky L.J. (1998). "Rotator cuff defect healing: A biomechanical and histologic analysis in an animal model." *J Shoulder Elbow Surg* 7(6): 599-605.
- Chan B., Chan K.M., Maffulli N., Webb S., and Lee K. (1997). "Effect of basic fibroblast growth factor: an in vitro study of tendon healing." *Clin Orth* 342: 239-247.
- Clark J., and Stechschulte jr. D.J. (1998). "The interface between bone and tendon at an insertion site: a study of the quadriceps tendon insertion." *J Anat* 192: 605-616.
- Cook St., and Rueger D. (1996). "Osteogenetic Protein-1: Biology and Application." *Clin Orth* 324: 29-38.
- Desai S. (2001). "Prevention of IGF-1 and TGF β stimulated typ II collagen and decorin expression by bFGF and identification of IGF-1 mRNA transcripts in articular chondrocytes." *Matrix Biology* 20: 233-242.
- Doege K.J., and Fessler J.H. (1986). "Folding of carboxyl domain and assembly of procollagen." *J Biol Chem* 261: 8924-8935.
- Ducy P., and Karsenty G. (2000). "The family of bone morphogenetic proteins." *Kidney International* 57: 2207-2214.
- Duncan St., and Watt A.J. (2001). "BMPs on the road to hepatogenesis." *Genes Dev* 15: 1879-1884.
- Ferrara N., and Gerber H-P. (2001). "The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis." *Acta Haematologica* 106: 148-156.
- Fessler J.H., Duncan K.J., and Fessler L.I. (1985). "Biosynthesis of collagen." *Journal of Cellular Biochemistry* 28: 31-37.
- Forslund C., and Aspenberg. P. (1998). "OP-1 has more effect than mechanical signals in the control of tissue differentiation in healing rat tendon." *Acta Orthop Scand* 69(6): 622-6.
- Fowler MJ Jr, Neff MS, Borghaei RC, Pease EA, Mochan E, and Thront RD (1998). "Induction of bone morphogenetic protein-2 by interleukin-1 in human fibroblast." *Biochem Biophys Res Comm* 248(3): 450-3.

-
- Fuhrmann R., Mollenhauer. J., Kircher S, Wiederanders B, and Venbrocks R, (2002). "Alteration in collagen pattern impairs tissue properties after osseous reinsertion of the supraspinatus tendon." *Trans Orth Res Soc* **27**: 285.
 - Fuhrmann R. Mollenhauer. J., Leutloff A, Wiederanders B, and Venbrocks R, (2002). "Insertion of the supraspinatus tendon: microstructural and molecular architecture representing a dual-function structure to compensate tension and pressure." *Trans Orth Res Soc* **27**: 608.
 - Gerber Ch., Fuchs B., and Holder J. (2000). "The results of Repair of massive tears of the rotator cuff." *J Bone Joint Surg [Am]* **82-A(4)**: 505-515.
 - Girkkontaite I., Frischholz S., Lammi P., Wagner K., Swoboda B., Aigner T., and von der Mark K. (1996). "Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies." *Matrix Biology* **15(4)**: 231-8.
 - Gould SE, Day M, Jones SS, and Dorai H (2002). "BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells." *Kidney International* **61(1)**: 51-60.
 - Groeneveld E.H.J., and Burger E.H. (2000). "Bone Morphogenetic protein in human bone regeneration-Review." *European Journal of Endocrinology* **142**: 9-21.
 - Hageman R. (1989). *Histotechnik- Ergänzungsheft zu Hagemann und Rosemund*, S.Hirzel Verlag Stuttgart.
 - Hamada K., Okawara Y., Fryer JN., Tomonaga A., and Fukuda H. (1994). "Localization of mRNA of procollagen alpha 1 type I in torn supraspinatus tendon. In situ hybridization using digoxigenin labeled oligonucleotide probe." *Clin Orthop* **304**: 18-21.
 - Hamada K., Tomonaga A., Gotoh M., Yamakawa H., and Fukuda H. (1997). "Intrinsic healing capacity and tearing process of torn supraspinatus tendon: in situ hybridization study of alpha 1 (I) procollagen mRNA." *J Orth Res* **15(1)**: 24-32.
 - Hanada K., Dennis JE., and Caplan AI. (1997). "Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *J Bone Miner Res* **12(10)**: 1606-14.

-
- Hefti F., and Stoll T.M. (1995). "Heilung von Ligamenten und Sehnen." *Orthopäde* **24**: 237-245.
 - Hengartner M.O. (2000). "The biochemistry of Apoptosis- Review." *Nature* **407**(12): 770-5.
 - Hofman H., Fietzek P.P., and Kuhn K. (1978). "The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: A three-dimensional evaluation of the amino acid sequence." *J Mol Bio* **125**: 137-165.
 - Huch K., Wilbrink B., Flechtenmacher J., Koepp H., Aydelotte M., Sampath K., Kuettner K., Mollenhauer J., and Thonar E.J.M. (1997). "Effects of recombinant human osteogenetic protein 1 on the production of proteoglycan, prostaglandine E2, and interleukin-1 receptorantagonist by human articular chondrocytes cultured in the presence of interleukin-1 β ." *Arthritis & Rheumatism* **40**(12): 2157-61.
 - Jost B., Pforrman Ch., and Gerber Ch. (2000). "Clinical outcome after structural failure of rotator cuff repairs." *J Bone Joint Surg [Am]* **3**: 302-314.
 - Junqueira L.C., und Carneiro J. (1996 a). Bindegewebe. Histologie. Berlin Heidelberg New York, Springer. 4.Aufl. S.140-170
 - Junqueira L.C., und Carneiro J. (1996 b). Knorpel. Histologie. Berlin Heidelberg New York, Springer. 4.Aufl. S.180-88
 - Kahn U., Kakar S., Akali A., Bentley G., and McGrouther D.A. (2000). "Modulation of the formation of adhesions during the healing of injured tendons." *J Bone Joint Surg [Br]* **82-B**: 1054-8.
 - Kannus P. (2000). "Structure of the tendon connective tissue." *Scan J Med Sci Sports* **10**: 312-320.
 - Kobayashi K., Hamada K., Gotoh M., Handa A., Yamakawa H., and Fukuda H. (2001). "Healing of full-thickness tears of avian supracoracoid tendons: in situ hybridization of α 1(I) and α 1(III) procollagen mRNA." *J Orth Res* **19**: 862-868.
 - Kühn K. (1986). "The collagen family-variations in the molecular and supramolecular structure." *Rheumatology* **10**: 29-69.
 - Kuivaniemi H., Tromp G., Chu M.L., and Prockop D.J. (1988). "Structure of a full-length cDNA clone for the pro α 2(I) chain of human type I procollagen. Comparison with the chicken gene confirms unusual patterns of gene conservation." *Journal of Biochemistry* **252**: 633-640.

-
- Kumagai J. S. K., and Uthoff H.K. (1993). "Repair process of surgically produced rotator cuff tear-- a histological and immunohistochemical study using monoclonal antibodies against collagen typ I and III." *Trans Orth Res Soc*: 315.
 - Kumagai J., Sarkar K., Uthoff H.K., Okawara Y., and Ooshima A. (1994). "Immunohistological distribution of type I, II, and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon." *Journal of Anatomy* **185**: 279- 284.
 - Lippert H. (1996). Arm. Lehrbuch Anatomie. München- Wien- Baltimore Urban & Schwarzenberg. 4. Aufl. S. 637-685.
 - Löffler G., und Petrides P. (1997). Binde und Stützgewebe. Biochemie und Pathobiochemie. Berlin Heidelberg New York, Springer. 5. Aufl. S. 733-760.
 - Lotz M. (2001). "Cytokines in cartilage injury and repair-Review." *Clin Orth* **392 Supp**: 108-115.
 - Martin G.R. (1998). "The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs." *Genes Dev* **12**: 1571-86.
 - Maureen C. Ryan, and Sandell L.J. (1990). "Differential Expression of a Cysteine-rich Domain in the Amino-terminal Propeptide of Typ II (Cartilage) Procollagen by alternative Splicing of mRNA." *The Journal of Biological Chemistry* **265**(18): 10334-10339.
 - Mundy G. (1996). "Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors." *Clin Orth* **324**: 24-27.
 - Murrell G.A.C., and Walton. J. R. (2001). "Diagnosis of rotator cuff tear." *Lancet* **357**(March (10)): 769-770.
 - Nakajima F. O. A., Goto K., Morizy H., Ninomiya Y., Einhorn T., and Yamazaki M. (2001). "Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor." *J Orth Res* **19**: 935-944.
 - Nakayama T., Cui Y., and Christian J.L. (2000). "Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development." *CMLS* **57**: 943-956.
 - Noll S., und Schaub-Kuhnen S. (2000). Praxis der Immunhistochemie. München-Jena. Urban & Fisher.
 - Oguma H., Murakami G., Takahashi-Iwanaga H., and Aoki M., Ishii S.. (2001). "Early anchoring collagen fibers at the bone-tendon interface are conducted by

woven bone formation: a light microscope observation using canine model.” *Journal of Orthopaedic Research* **19**: 873-880.

- Petersen W., Pufe Th., Kurz B., Mentlein R., and Tillmann B. (2002). “Angiogenesis in fetal tendon development: spatial and temporal expression in the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor.” *Anat Embryol* **205**: 263-270.
- Pufe T., Petersen W., Tillmann B., and Mentlein R. (2001). “The angiogenetic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal an ruptured tendons.” *Virchows Arch* **439**(579-585).
- Putz R. und Pabst R. (1993). *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen*, Urban & Schwarz. Band 1. 20. Aufl. S.160-250.
- Rahme H., Nordgren H., Hamberg H., and Westerberg C-E. (1993). “The subacromial bursa and the impingement syndrome.” *Acta Orthop Scand* **64**(4): 485-488.
- Reddi A.H., Gay R., Gay S., and Miller E.J. (1977). "Transition in collagen types during matrix- induced cartilage, bone and bone marrow formation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5589-5592.
- Rickert M., Georgousis H., und Witzel U. (1998). “Die native Reißfestigkeit der Sehne des M. supraspinatus beim Menschen. Eine biomechanische Untersuchung.” *Unfallchirurg* **101**: 265-270.
- Riley E., Lane J., Urist M., Lyons K., and Liebermann J. (1996). “Bone Morphogenetic Protein-2: Biology and Application.” *Clin Orth* **324**: 39-46.
- Rokito A., Cuomo F., Gallagher M., and Zuckermann J. (1999). “Long-term functional outcome of repair of large and massive chronic tears of the rotator cuff.” *J Bone Joint Surg [Am]* **81-A**(7): 991-997.
- Rowe C.R. (1988). Tendinitis, Bursitis, Impingement, "Snapping" Scapula, and calcific tendinitis. *The shoulder*. New York, Chirchill Livingstone: 105-29.
- Ruoslathi E. (1988). "Structure and biology of proteoglycans." *Review Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**:229-255.
- Sakai H. Fujita. K., Sakai Y., and Mizuno K. (2001). “Immunolocalization of cytokines and growth factors in subacromial bursa of rotator cuff tear patients.” *J Med Sci* **47**: 25-34.

- Sampath K., Maliakal J., Hauschka P., Jones W., Sasak H., Tucker R., White K., Coughlin J., Tucker M., Pang R., Corbet C., Özkaynak E., Oppermann H., and Rueger D. (1992). "Recombinant Human Osteogenetic Protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in Vivo with specific Activity Comparable with natural bovine osteogenetic Protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in Vitro." *J Biol Chem* **267**(28): 20352-62.
- Sanyal A., Oursler M.J., Clemens V.R., Fukumoto T., Fitzsimmons J.S., and O'Driscoll S.W. (2002). "Temporal expression patterns of BMP receptor and collagen II (B) during periosteal chondrogenesis." *J Orth Res* **20**: 58-65.
- Schneeberger A.G., Nyfeller R.W., and Gerber C. (1998). "Structural changes of the rotator cuff caused by experimental subacromial impingement in the rat." *J Shoulder Elbow Surg* **7**(4): 375-80.
- Shida J., Jingushi S., Izumi T., Ikenoue T., and Iwamoto Y. (2001). "Basic fibroblast growth factor regulates expression of growth factors in rat epiphyseal chondrocytes." *J Orth Res* **19**: 259-264.
- Shida J., Jingushi S., Izumi T., Iwaki A., and Sugioka Y. (1996). "Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo." *J Orth Res* **14**(2): 265-72.
- Thomopoulos S., Hattersley G., Rosen V., Mertens M., Galtz L., Williams G.R., and Soslowsky L.J. (2002). "The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study." *J Orth Res* **20**: 454-463.
- Tillander B., Franzen L.E., Nilsson E., and Norlin R. (2001). "Carrageenan-induced subacromial bursitis caused changes in the rat's rotator cuff." *J Orth Res* **19**(3):441-7.
- Uthoff H.K., Seki M., Backman D.S., Trudel G., Himori K., and Sano H. (2002). "Tensile strength of the supraspinatus after reimplantation into a bony trough: an experimental study in rabbits." *J Shoulder Elbow Surg* **11**(5): 504-9.
- Uthoff H.K., Sano H., Trudel G., and Ishii H. (2000). "Early reactions after reimplantation of the tendon of supraspinatus into bone." *J Bone Joint Surg [Br]* **7**: 1072-76.

-
- v.d.Mark K. (1981). "Localization of collagen types in tissues." *Int Rev Conn Tissue Res* **9**: 265-324.
 - v.d.Mark K. (1999). "Structure, Biosynthesis, and Gene Regulation of Collagen in Cartilage and Bone. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism." Academic Press: 3-29.
 - Wang J-S., and Aspenberg. P. (1993). "Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats." *Acta Orthop Scand* **64**(5): 557-561.
 - Weisser J., Riemer S., Schmidt M., Suva L., Poschl E., Bräuer R., and von der Mark K. (2002). "Four distinct chondrocyte population in the fetal bovine growth plate: Highest Expression Levels of PTH/PTHrP Receptor, Indian Hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40)." *Exp Cell Res* **279**(1): 1-13.
 - Woo SL., Maynard J., and Butler J. (1987). Ligament, tendon, and joint capsule insertions to bone. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. S. Woo, Savannah GA, Academy of Orthopaedic Surgeons: 129-66.
 - Wozney J. and Rosen V. (1998). "Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair." *Clin Orth* **346**: 26-37.
 - Yamanaka K. and Matsumoto T. (1994). "The joint side tear of the rotator cuff. A followup study by arthrography." *Clin Orth*(304): 68-73.
 - Yanagisawa K., Hamada K., Gotoh M., Tokunaga T., Oshika Y., Tomisawa M., Hwan Lee Y., Handa A., Kijima H., Yamazaki H. Nakamura M., Ueyama Y., Tmaoki N., and Fukuda H. (2001). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the subacromial bursa is increased in patients with impingement syndrome." *J Orth Res* **19**: 448-455.

11. Anhang

11.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials unterstützt haben:

Dr.med. R. Fuhrmann

G.Grunert

C.Müller

Ch.Mollenhauer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 12.09.2005

11.2. Lebenslauf**Lotz, Anne Stephanie**

14.03.1978 Freising (D)

Grundschule

03/84- 12/88 Goethe Schule in Buenos Aires (Arg)

03/89- 01/90 Deutsche Schule in Guadalajara (Mex)

Mittelstufe und Oberstufe

02/90- 06/92 American School in Guadalajara (Mex)

08/92- 06/97 Lise Meitner Gymnasium Grenzach-Wyhlen (D)

06/97 Allgemeine Hochschulreife

Universität

10/97- 09/98 Studium Biologie II an der Universität Basel (CH)

09/98 Abschluss des ersten Vordiploms in Bio II

10/98- Medizinstudium an der Friedrich Schiller
Universität Jena (D)

09/2000 Physikum

09/2001 Erstes Staatsexamen

09/2004 Zweites Staatsexamen

9.11.2005 Abschluss des Medizinstudiums mit dem dritten
Staatsexamen

11.3. Danksagung

In erster Linie möchte ich Prof. Dr. J. Mollenhauer und Dr. R. Fuhrmann für die theoretische und praktische Unterstützung danken. Hervorheben möchte ich auch das tolle Laborteam, ohne das diese Dissertation nie möglich gewesen wäre: Dr. Silke Erdmann (+Lena) für das Begleiten im Labor, Christine Mollenhauer und Dr. Marion Fichter für die Unterstützung bei der PCR, Cordula Müller und Gabriele Grunert für die Hilfe in der Histologie, Jana Schömburg für die Hilfe in allen anfallenden Labortätigkeiten und Matthias Dambacher bzw. Andrea Galonska im Sekretariat.

Danken möchte ich auch allen, die außerhalb des Labors mit an dieser Arbeit beteiligt waren, Prof. R.Venbrocks, Dr. A.Leutloff und Dr. S.Kircher, dem Förderverein des Klinikums für die Bereitstellung des Loder Stipendiums, welches die Aussetzung aus dem Studium ermöglicht hat und Dr. Hoyer vom Institut für Medizinische Statistik für die Unterstützung in Fragen der Statistik.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer gefördert und mir das Studium ermöglicht haben. Speziell Danken möchte ich auch Alex, der in allen Höhen und Tiefen hinter mir stand.

Herr, ich will dir danken unter den Völkern, ich will dir lobsingeln unter den Leuten. Denn deine Güte reicht, so weit der Himmel ist, und deine Wahrheit, so weit die Wolken gehen. (Psalm 57, 10+11)