



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Abteilung und Poliklinik für Sportorthopädie des Klinikum rechts der Isar

Univ.-Prof. Dr. Andreas Imhoff

**Biologische Augmentation der Sehnenheilung mittels Wachstumsfaktoren
nach induzierter Supraspinatussehnenruptur am Rattenmodell**

Thomas Ulrich Reichel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Andreas Imhoff
2. Univ.-Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 29.10.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Grundlagen	5
2.1 Funktionelle Anatomie der Schulter	5
2.2 Funktion und Pathophysiologie der Rotatorenmanschette beim Menschen	7
2.2.1 Faktoren der primären Sehnendegeneration	8
2.2.2 Mechanische Faktoren (Impingement)	9
2.2.3 Neuromuskuläre Faktoren bei der Impingemententstehung	11
2.4. Therapie der Rotatorenmanschettenruptur	12
2.4 Grundlagen der Sehnenheilung	15
2.5 Applikationsmöglichkeiten von Wachstumsfaktoren	17
2.6 Eigenschaften von Phospholipidgelen	22
2.7 Spezifische Wachstumsfaktoren der Sehnenheilung	22
2.8 Vergleich von Anatomie und Pathophysiologie der Rotatorenmanschette Ratte – Mensch	25
3. Material und Methoden.....	30
3.1 Versuchstiere und Versuchsablauf.....	30
3.2 Wachstumsfaktorenapplikation durch Biogele	31
3.3 Operatives Procedere	32
3.4 Datengewinnung	34
3.4.1 Histologie	34
3.4.2 Biomechanik	35
3.4.3 Serologie	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Rückblick Phase I und II	37
4.2 Phase III	37
4.2.1 Makroskopisch	37
4.2.2 Histologisch	38
4.2.3 Biomechanisch	41
4.3 Evaluation der Biogele.....	46
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	46
5. Diskussion	47
5.1 Interpretation der Ergebnisse	47
5.2 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	50
5.3 Limitation	56
5.4 Ausblick	57
6. Zusammenfassung.....	59
7. Literaturverzeichnis	60

8. Anhang	67
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	67
8.2 Tabellenverzeichnis	68
9.Danksagung	68

1. EINLEITUNG

Schulterschmerzen sind neben Beschwerden der Wirbelsäule und des Kniegelenks einer der häufigsten Gründe für eine Vorstellung beim Arzt. Es wird davon ausgegangen, dass sich ungefähr jeder zehnte Patient in orthopädischen Praxen mit Schulterbeschwerden vorstellt. Urwin et al. berichten von einer 16%igen Prävalenz bei Schulterschmerzen, die bis zum Alter von 75 Jahren auf über 22% ansteigt (Urwin, et al., 1998, pp. 649,651). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass ca. 5-10% der Schulterschmerzen durch schulterferne Ursachen ausgelöst werden. Vor allem die Halswirbelsäule ist häufig für ähnliche Beschwerden verantwortlich (Wirth & Jäger, 1986, p. 766).

Die Hauptursache von Schulterbeschwerden bei Patienten oberhalb des 40. Lebensjahres sind degenerative Veränderungen der Rotatorenmanschette. Diese umfassen Tendopathien, Verkalkungen und Rupturen einzelner oder mehrerer Muskeln- oder Sehnenanteile.

Die exakte Prävalenz von Rotatorenmanschettendefekten ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abschließend untersucht. Yamamoto et al. (2009) geben für Komplettrupturen der Rotatorenmanschette eine Prävalenz von 20,7% in der Bevölkerung an. Diese steigt altersabhängig von 0% bei den 20jährigen bis auf 50% bei den 80jährigen an. Weitere Faktoren in der Studie, die mit einer Erhöhung der Prävalenz von Rotatorenmanschettenschäden einhergehen waren schwere, körperliche Arbeit, zurückliegende Unfälle und Verletzungen an der Schulter, das männliche Geschlecht und die Händigkeit der Person (Yamamoto, et al., 2009, p. 117). Andere Autoren zeigen ähnliche Ergebnisse für Komplettrupturen der Rotatorenmanschette. Bei asymptomatischen Patienten fanden z.B. Shibany et al. eine 6%ige Prävalenz (Schibany, et al., 2004, p. 265), Tempelhof et al. eine von durchschnittlich 23% (in vier Altersgruppen von 13% bis 51% ansteigend) (Tempelhof, Rupp, & Seil, 1999, pp. 296,297) und Sher et al. sogar eine von 34% über alle Altersgruppen gemittelt (Sher, Uribe, Posada, Murphy, & Zlatkin, 1995, p. 11). Zuletzt untersuchten auch Moosmayer et al. die Prävalenz dieser Pathologie und fanden bei 7.6% der 420 klinisch asymptomatischen Patienten Risse der Rotatorenmanschette (Moosmayer, Smith, Tariq, & Larmo, 2009, p. 197). Die Arbeitsgruppe erhob ihre Ergebnisse durch die Verwendung von sowohl MRT und Ultraschall zur Diagnostik der Läsionen. Auffällig war in ihrem Kollektiv ein hoher Anteil an Studienteilnehmern zwischen 50 und 80 Jahren, was in vielen Studien nicht der Fall war. Neben diesen radiologischen Studien untersuchte Reilly et al. in einer Metaanalyse die Prävalenz für Komplettrupturen und Partialrupturen in asymptomatischen sowie symptomatischen Patienten in Ultraschall-, MRT- sowie Kadaverstudien. Abhängig von der Untersuchungsmethode treten in 11,8% (Kadaver), 10,3% (MRT) bis 21,7% (Ultraschall) der Fälle Komplettrupturen auf (Reilly, Macleod, Macfarlane, Windley, & Emery, 2006, p. 119). Zusammengefasst zeigt die Literatur für Komplettrupturen der Rotatorenmanschette bei asymptomatischen Patienten eine Prävalenz von 6%-35%. Betrachtet man dabei die einzelnen

Altersgruppen, so ist ein linearer Anstieg der Prävalenz von 0% mit 20 Jahren bis zum Alter von 80 Jahren erkennbar.

In der klinischen Routine machen Läsionen des M. supraspinatus (SSP) den größten Teil an pathologischen Veränderungen der Rotatorenmanschette aus. In der Studie von Moosmayer et al. fanden diese in 78% der Fälle singuläre Defekte des SSP (Moosmayer, et al., 2009, p. 198). Unklar ist jedoch, durch welche Faktoren eine asymptomatische Ruptur symptomatisch wird. Ebenso wird diskutiert, wie die Rupturen ohne adäquates Trauma entstehen. Aktuelle Hypothesen vermuten degenerative (intrinsische) Veränderungen der Sehne im Alter, mechanische Abnutzungen und Schäden durch z. B. Impingement (= Zusammenstoß, womit der Kontakt der Sehne mit knöchernen Strukturen im Subacromialraum bezeichnet wird) sowie neuromuskuläre Störungen.

Ist eine Ruptur symptomatisch und schränkt sie den Patient in seiner Lebensqualität stark ein, ist nach erfolgloser konservativer Therapie die operative Versorgung indiziert. Allerdings fanden verschiedene Autoren wiederkehrende Rupturen nach erfolgreichem intraoperativem Verschluss des Defektes bei 20% bis über 50% der Patienten (Gazielly, Gleyze, Montagnon, Bruyere, & Prallet, 1995, p. 17; Harryman, et al., 1991, p. 984). Diese hohe Rezidivrate wird auf die mangelnde biologische und mechanische Qualität und die Durchblutung der Sehne zurückgeführt, sodass eine stabile Einheilung nicht gewährleistet werden kann. Die Gründe und mögliche Verbesserung für diesen insuffizienten Einheilungsprozess sind noch nicht ausreichend untersucht.

In der vorliegenden wissenschaftlichen Literatur bzgl. der Sehnenheilung erscheinen Wachstumsfaktoren als ein möglicher Ansatzpunkt. Ein entscheidender Punkt ist dabei die Applikationsform, die bei einfacher Anwendung eine ausreichende Menge der Wachstumsfaktoren während des Heilungsvorgangs abgeben sollte. Ein sogenanntes „Biogel“ erscheint uns hierfür gut geeignet zu sein, da es neben der problemlosen Einbringung die enthaltenen (variablen) Wirkstoffe langsam und kontrolliert abgibt, sowie eine ausgezeichnete Biokompatibilität besitzt.

2. GRUNDLAGEN

2.1 FUNKTIONELLE ANATOMIE DER SCHULTER

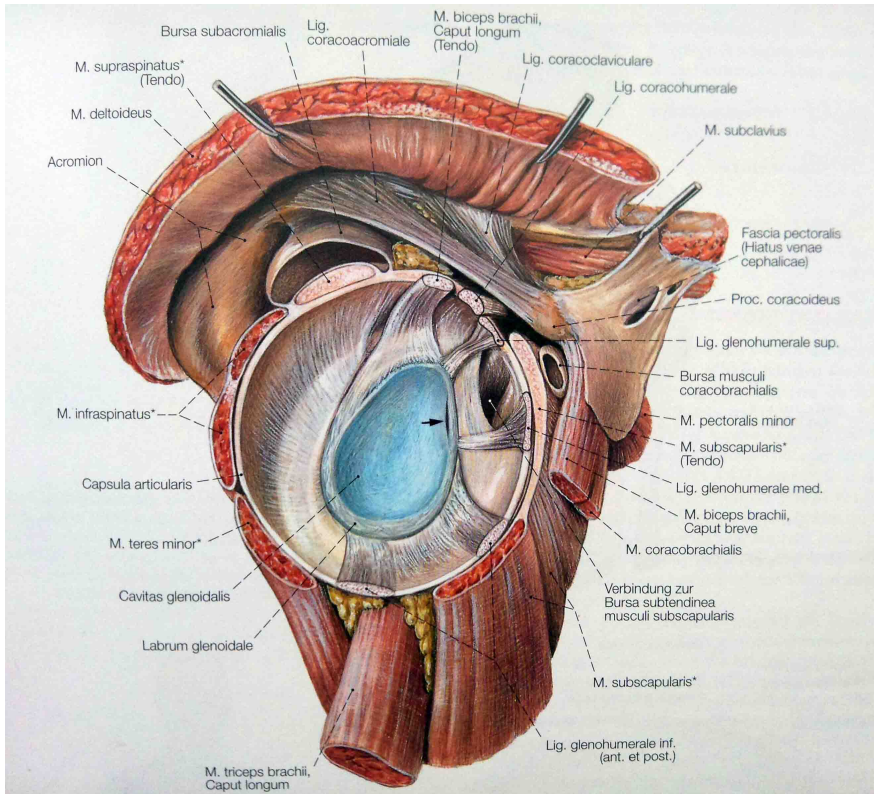


Abb. 1 Schulteranatomie nach Humeruskopfenukleation

(Abb. 5.4-13, S.287 aus Benninghoff, Drenckhahn Anatomie, Band 1, 17. Auflage 2008 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München)

Das Schultergelenk (Art. glenohumerale) ist eines der beweglichsten Gelenke des menschlichen Körpers. Es ist eine Diarthrose (Art. synovialis) mit Beweglichkeit in drei Freiheitsgraden. Die relativ flache Gelenkpfanne bedeckt dabei nur ca. ein Drittel des Humeruskopfes, der Kapsel- und Bandapparat ist relativ weit, so dass, mehr als bei anderen Gelenken, die muskuläre Führung entscheidend ist. Der Bewegungsumfang des Armes wird in Kombination mit den Gelenken des Schultergürtels, dem Akromioklavikulargelenk (Art. acromioclaviculare), dem Sternoklavikulargelenk (Art. sternoclaviculare) und der skapulothorakalen Gleitschicht enorm vergrößert, bei Bewegungen wie Abduktion und Anteversion sogar verdoppelt.

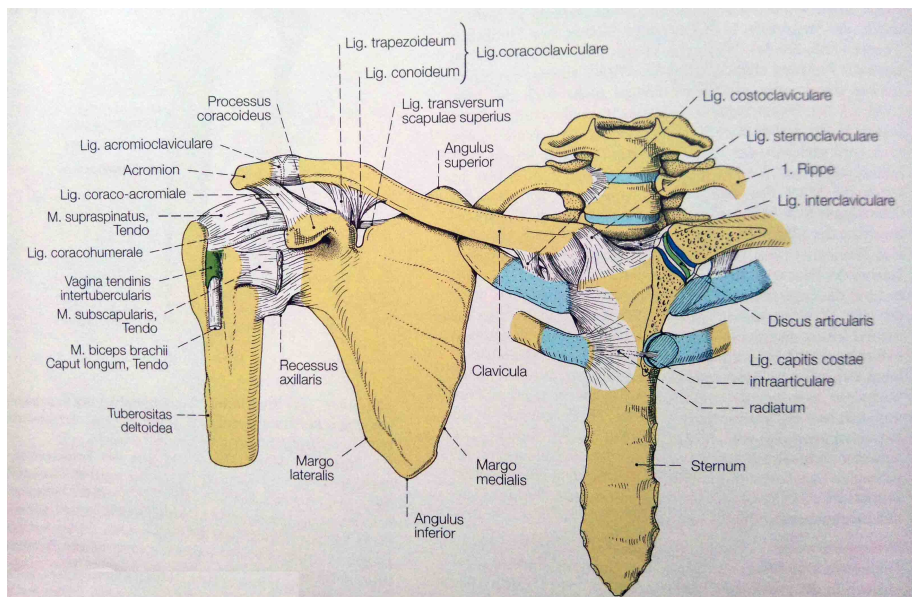


Abb.2 Knöcherne und ligamentäre Anatomie des Schultergürtels

(Abb. 5.4-8, S.284 aus Benninghoff, Drenckhahn Anatomie, Band 1, 17. Auflage 2008 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München)

Die Kapsel entspringt an der Gelenkklippe (Labrum glenoidale) der Pfanne (Glenoid) und setzt am anatomischen Hals (Collum anatomicum) des Humerus an. Als Verstärkung verlaufen das Lig. coracohumerale und die Ligg. glenohumeralia in der anterioren Kapsel. Die Sehnen der Rotatorenmanschette strahlen ebenso in die Kapsel ein und verhindern als „Kapselspanner“ ein Einklemmen der Gelenkkapsel. Eine Besonderheit ist der intraartikuläre Verlauf der langen Bizepssehne. Diese verläuft in der Gelenkhöhle zwischen den Sehnen des M. supraspinatus und M. subscapularis, der als Rotatorenintervall bezeichnet wird.

Das Schulterdach (Fornix) wird aus Akromion, Coracoid und dem Lig. coracoacromiale gebildet. Es wirkt als Gegenlager, an dem sich der Humeruskopf bei bestimmten Bewegungen abstützen kann. Daher wird es auch funktionell als Gelenk gesehen (Subakromialgelenk). Die Bursa subacromialis und der Fettkörper darunter (Corpus adiposum subacromialis) sind morphologische Zeichen dieser Funktion. Der sehr beschränkte Platz in diesem „Nebengelenk“ führt aber dazu, dass bei Ausdehnung bzw. Anschwellung der Bursae, Sehnen oder Muskeln durch z.B. entzündliche Vorgänge diese schnell „eingeklemmt“ werden.

Jede Bewegung des Humerus wird unter Mitbewegung der Scapula durchgeführt, diese bewegt sich dabei auch schon bevor das Bewegungsmaximum des Humerus im Schultergelenk erreicht wird. Dabei wird auch von einem „skapulothorakalem Rhythmus“ sowie „skapulothorakalem Rhythmus“ gesprochen, der das Verhältnis von Scapula zur Humerusbewegung auf dem Thorax beschreibt.

Die Scapula wird über das Akromio- und das Sternoklavikulargelenk mit dem Rumpf verbunden. Beide Gelenke besitzen eine flache Form, erhalten aber durch die Interposition eines Diskus drei Grade der Bewegungsfreiheit. Die beiden Gelenke beteiligen sich bei fast allen Bewegungen im Schultergürtel, wobei das Akromioklavikulargelenk besonders bei der endgradigen Elevation beansprucht wird.

2.2 FUNKTION UND PATHOPHYSIOLOGIE DER ROTATORENMANSCHETTE BEIM MENSCHEN

Die Rotatorenmanschette setzt sich zusammen aus den Muskeln:

M.supraspinatus, M.infraspinatus, M.teres minor und M.subscapularis.

Die Hauptaufgabe dieser vier Muskeln liegt in der Zentrierung des Humeruskopfes in der Gelenkpfanne, da keine ausreichende knöcherne Führung besteht.

Die Tendopathie der Supraspinatussehne ist am weitesten verbreitet. Sie kommt bei Männern häufiger als bei Frauen vor. Auch ist die rechte Schulter häufiger betroffen (Wirth & Jäger, 1986, p. 768).

Als Ursache der Tendopathien der Rotatorenmanschette werden zunehmend degenerative Veränderungen diskutiert. Auch spielt bei der Genese dieser Tendopathien die besondere biomechanische Situation des Schultergelenkes wahrscheinlich eine wichtige Rolle.

Gesichert ist, dass sich in der Phylogenese eine Situation entwickelt hat, in deren Rahmen die Supraspinatussehne und auch die Infraspinatus- und Bizepssehne zum einen erhöhten mechanischen Stress, aber auch einer ungünstigen Durchblutungssituation ausgesetzt sind. Ungünstig erscheint dabei, dass die letztgenannten Sehnen zum Teil um den Humeruskopf herumgeführt und umgelenkt werden. Dieser mechanische Stress beschleunigt oder ruft degenerative Veränderungen im Sinne von Auffaserungen der Sehne hervor. Das repetitive Durchführen der schädigenden Bewegungen verstärkt den Befund.

Die Ursache der degenerativen, atraumatischen Rotatorenmanschettenschädigungen sehen Hedtmann et al. 2009 in einer Kombination von intrinsischen Sehnen-Kapselveränderungen und mechanischen Konflikten vor allem der Supraspinatussehne im Gleitkanal unter dem osteofibrösen Schulterdach (Hedtmann, 2009, p. 88).

2.2.1 FAKTOREN DER PRIMÄREN SEHNENDEGENERATION

Hypovaskuläre Situation.

Im Rahmen der Theorie der primären Sehnen Degeneration (intrinsischen Tendopathie) wird die ungünstige Versorgungslage als wesentlicher Faktor gesehen. In der Rotatorenmanschette, insbesondere in der Supraspinatussehne nimmt man an, dass ca. 1 cm vom Ansatz der Sehne eine sogenannte „kritische Zone nach Codman“ existiert. In diesem Bereich ist die Vaskularisierung der Sehne problematisch. Die kapillären Endstrecken von Blutgefäßen aus dem Knochen und von Blutgefäßen aus der Muskulatur treffen hier aufeinander. Die Folge dieser anatomischen Situation ist eine Hypovaskularität und damit kritische Versorgungslage der Sehne (Hedtmann, 2009, p. 88). Diese Annahme wurde zunächst von Biberthaler et al. gestärkt, die am Rand von Defekten der Supraspinatussehne eine verminderte Mikrozirkulation nachweisen konnte, gemessen an Anzahl und Dicke der Kapillaren (Biberthaler, et al., 2003, p. 477). Im Jahr 2008 untersuchten Rudzki et al. die Supraspinatussehne erneut auf eine hypovaskuläre Zone. Mittels spezieller Ultraschalltechnologie konnten sie erstmals beim Menschen in vivo zeigen, dass in dem Gelenk zugewandten Teil der Sehne eine Zone existiert, die weniger stark durchblutet ist. Zusätzlich zeigte sich eine weitere Abnahme der Durchblutung dieser Zone im Alter, wobei Gruppen über sowie unter 40 Jahren verglichen wurden (Rudzki, et al., 2008, p. 97).

Auch andere Autoren wie Uthoff et al. sehen eine primäre Degeneration der Sehne als vorrangig. Sie halten Ernährungs- und Altersvorgänge als maßgeblich für die Schädigung der Sehne in der sogenannten „kritischen Zone“ (Uthoff & Sano, 1997, p. 38)

Strukturelle biologische Sehnenveränderungen.

Wiederum andere Autoren sehen zum Teil funktionsbedingte primäre strukturelle Veränderungen der Sehnen der Rotatorenmanschette als primären Ausgangspunkt der Tendopathien. Tillmann et al. 1991 vertreten die Auffassung, dass die Supraspinatussehne im Kontaktbereich mit der knorpeligen Humeruskopfoberfläche einen Funktionswechsel erfahre. In dieser anatomischen Region wird die Sehne zunehmend auf Druck und Scherung beansprucht. Die Supraspinatussehne stellt daher in diesem Bereich keine klassische „Zugsehne“ sondern eine „Gleitsehne“ dar. Daraus folgt laut Tillmann et al., dass sich die Sehne in dieser Region anpasst und faserknorpelig erscheint (Tillmann, Schünke, & Rödecker, 1991, p. 83).

Bestätigt werden diese Vorstellungen von Riley et al., die 1994 ein Glykosaminoglykan/Proteoglykan-Muster der Supraspinatussehne feststellten, das eher dem einer faserknorpeligen Sehne entspricht (Riley, et al., 1994a, p. 375). Weitere Untersuchungen von Tillmann und Koch 1995 zeigten, dass die

Supraspinatussehne (und auch die proximale Bizepssehne) faserknorpelige Bestandteile aufweisen, die laut den Autoren ausdrücklich nicht pathologisch sind, sondern die strukturelle Anpassung einer funktionell adaptierten Gleitsehne darstellen. (Tillmann & Koch, 1995, p. 45). Fukuda et al. machten 1994 zusätzlich die Entdeckung, dass die Supraspinatussehne bursa- und gelenkseitig unterschiedliche mechanische Qualitäten besitzt. So ist die Reißfestigkeit der bursaseitigen Anteile fast doppelt so hoch, wie die der gelenkseitigen. Daraus resultierende intratendinöse Spannungen könnten alleine schon Defekte provozieren (Fukuda, Hamada, Nakajima, & Tomonaga, 1994, p. 65).

2.2.2 MECHANISCHE FAKTOREN (IMPINGEMENT)

Eine Gruppe weiterer Autoren, darunter auch der Namensgeber des Impingementsyndroms Charles Neer stellen die mechanische Komponente an die Spitze ihrer Überlegungen. Entsprechend den Vorstellungen dieser Autoren besteht eine Dysbalance zwischen der Größe der Rotatorenmanschette und dem zur Verfügung stehenden subakromialen Raum.

Einerseits kann es dabei durch chronische Druckübertragung zur Ausbildung von osteophytären Ausziehungen an der vorderen Akromionkante kommen, die den Gleitraum für die Sehnen einengen und ein Impingementsyndrom hervorrufen.

Zum anderen haben Bigliani et al. 1986 spezifische Akromiontypen festgestellt, von denen die nach distal abgeknickten oder extendierten Typen II und III ein Impingement begünstigen sollen. Ursprünglich wurde vermutet, dass diese versch. Akromionformen angeboren seien. Die Bedeutung dieser Akromionformen für ein Impingementsyndrom wird zum Teil von anderen Autoren kontrovers diskutiert (Chang, Moses, Babb, & Schweitzer, 2006, p. 503; Nyffeler, Werner, Sukthankar, Schmid, & Gerber, 2006, p. 804)).

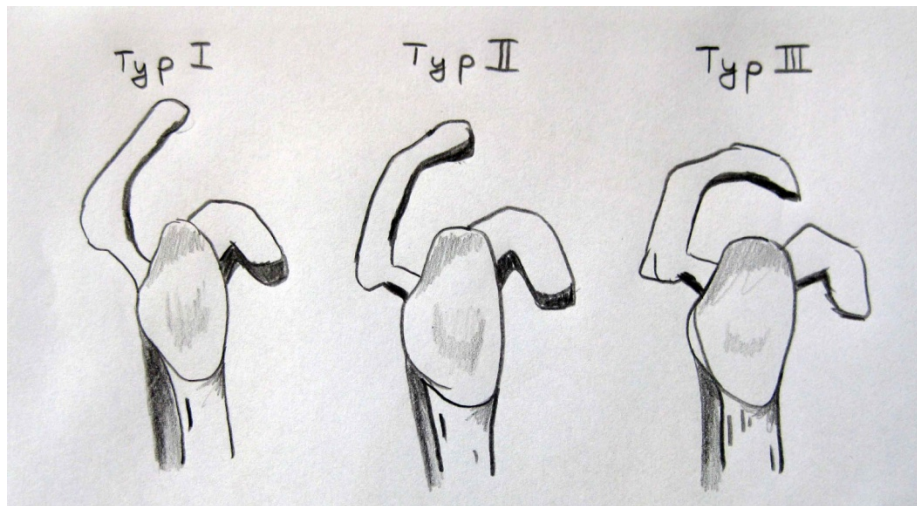


Abb. 3 Akromionformen nach Bigliani

Es existiert die These, dass es sich bei diesen Akromiontypen um erworbene Formveränderungen handelt. Diese treten als Folge von subakromialen Erkrankungen auf, die zu einer kontaktinduzierten, chondroiden Metaplasie des Lig. coracoacromiale und in Folge zu einer enchondralen Ossifikation des Ursprunges am Akromion führen (Gohlke & Hedtmann, 2002, p. 258).

Neer modifizierte 1990 seine Theorie. Zu seiner These des „outlet-impingements“ hat er das „non-outlet-impingement“ hinzugefügt, bei dem eine Imbalanz zwischen den subakromialen Strukturen, die zu groß sein können, und dem zur Verfügung stehenden Raum von ihm angenommen wird .

Stadium	Gewebliche Veränderung	Alter
I	Ödem, Einblutung	< 25
II	Fibrose	< 40
III	Sehnenläsion bis 1cm Größe und knöcherne Veränderungen	> 40
IV	Sehnenläsionen >1cm Größe und knöcherne Veränderungen	meist > 50
V	Rotatorendefektarthropathie	> 60

Tab. 1 Impingementstadien nach Neer (1972), modifiziert nach Jobe (1983)

Auch hier existieren jedoch Gegenthesen, basierend auf Untersuchungen über den Zusammenhang von Rotatorenmanschettenläsionen und dem subakromialen Raum. Daraus schließen Hedtmann und Fett 2002: „Wir selbst fanden keine überzeugende Belege, dass primäre Form und Volumen des

subakromialen Raums einen signifikanten Risikofaktor für die Entstehung von Rotatorenmanschettendefekten darstellen.“ (Gohlke & Hedtmann, 2002, p. 258).

2.2.3 NEUROMUSKULÄRE FAKTOREN BEI DER IMPINGEMENTENTSTEHUNG

Auch neuromuskuläre Störungen im Zusammenspiel von Deltoideus und Rotatorenmanschettenmuskulatur werden bisweilen postuliert (Hedtmann, 2009, p. 90)

Diese Vorstellungen wurden insbesondere von Nirschl et al. 1989 entwickelt. Die Arbeitsgruppe vertritt die Auffassung, dass eine funktionelle Überlastung zu einer Dysbalance der Muskulatur führen kann, mit resultierender Überlastung der Sehnen. Der Verschleiß der Sehnen bewirkt in der Folge eine mechanische Insuffizienz und schließlich den Kontakt der Sehnen mit dem Schulterdach (Nirschl, 1989, p. 443).

Ursache der Muskelimbalance könnten von Irlenbusch U. und Pieper K.S. 1992 festgestellte Veränderungen an den Muskelfasern von Delta- und Supraspinatusmuskeln sowie deren Verhältnis zueinander sein. Nirschl postuliert, dass dadurch angiofibroplastische Veränderungen im Sehngewebe hervorgerufen werden, die mit Schwächung der Sehnen und folgendem Impingement einhergehen (Irlenbusch & Pieper, 1992, p. 531).

Auch können Instabilitäten und Hypermobilitäten als Traumafolge oder im Rahmen eines ständigen, repetitierenden Trainings mit folgender Dezentrierung im Schultergelenk ein Impingementsyndrom hervorrufen. Bei dieser Form wäre eine als Folge oben genannter Ursachen aufgetretene muskuläre oder sehnenbedingte Dysbalance die Ursache, weshalb eine Einordnung an dieser Stelle erfolgte. Auch z.B. genetisch bedingte Muskel- und Sehnenveränderungen wären dazu zu zählen.

Schlussfolgernd liegt eine nicht unbeträchtliche Anzahl an extrinsischen und intrinsischen Faktoren vor, die ein subakromiales Impingement und eine konsekutive Schädigung der Rotatorenmanschette begünstigen können. Aufgrund der Komplexität ist eine Wertung der einzelnen Faktoren schwierig. Daher sollten allen Einzelfaktoren in der klinischen Bewertung Beachtung geschenkt werden. Auch wird unter anderem postuliert, dass die funktionelle Dezentrierung durch mechanische, gewebliche oder neurophysiologische Insuffizienz der Rotatorenmanschette dem makrostrukturellen Schaden vorangeht (Hedtmann, 2009, p. 90).

2.4. THERAPIE DER ROTATORENMANSCHETTENRUPTUR

Die Therapie der Rotatorenmanschettenruptur ist vom Beschwerdebild, den Anforderungen des Patienten und dessen individuellen Faktoren wie Alter, medizinische Vorgeschichte, Vorerkrankungen etc. abhängig.

Grundsätzlich gilt es die konservative Therapie von der operativen Therapie zu unterscheiden.

Die konservative Therapie wird oft bei wenig symptomatischen Patienten mit mäßigem Beschwerdebild oder Patienten, die eine Operation ablehnen bzw. diese nicht durchführbar ist, angewandt. Ziel der konservativen Therapie sollte eine Verbesserung der Schulterfunktion und eine oft damit verbundene Verbesserung des Schmerz- und Beschwerdebildes des Patienten sein.

Die konservative Therapie besteht aus der medikamentösen und krankengymnastisch-physikalischen Therapie. Im Rahmen der medikamentösen Therapie wird meist die Gabe von nichtsteroidalen antiinflammatorischen Substanzen (NSAR) verordnet. Sie dienen der Behandlung der Entzündung und Irritation des Gewebes sowie des Schmerzes. Die systemische Gabe ist dabei der topischen Gabe vorzuziehen, da hierbei meist höhere Gewebsspiegel erreicht werden. NSARs haben sich als effektiv erwiesen, jedoch fanden Cohen et al. sowie Ferry et al. in aktuellen Studien auch schwerwiegende Nachteile: Das Sehngewebe der mit NSARs behandelten Ratten wies in ihren Experimenten eine verminderte Reißfestigkeit, Kollagenorientierung sowie einen geringeren Kollagengehalt auf. (Cohen, Kawamura, Ehteshami, & Rodeo, 2006, p. 367; Ferry, Dahners, Afshari, & Weinhold, 2007, p. 1329)

Eine weitere Möglichkeit ist die subakromiale Steroidinjektion. Andres et al. zeigen in ihrem Review, dass es zwar Hinweise auf einen schwachen, positiven Effekt einer Steroidinjektion bei Tendinosen der Rotatorenmanschette gibt, die Literatur aber noch nicht ausreicht um eine Therapieempfehlung daraus abzuleiten. Weiterhin werden die Sicherheit sowie die Auswirkungen auf das Muskel- und Sehngewebe kontrovers diskutiert (Andres & Murrell, 2008, p. 1543). Bei Rupturen der RM gibt es laut Koester et al. 2007 bislang keinen dokumentierten, positiven Effekt auf das Langzeitergebnis, nur eine temporäre Wirkung für ca. 6 Wochen (Koester, Dunn, Kuhn, & Spindler, 2007, p. 9).

Adjuvant werden meist Maßnahmen der Physikalischen Therapie (Ultraschall, extrakorporale Stoßwellentherapie, Elektrotherapie, Eisanwendungen) sowie entzündungsmodulierende Substanzen (Selen, Vitamin E, Enzyme) eingesetzt.

Die Physiotherapie nimmt weiterhin eine wichtige Stellung in der konservativen Therapie ein. Je nach Funktionsanspruch des Patienten kann selbst bei größeren Defekten von mehreren Sehnen oft ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. (Zingg, et al., 2007, p. 1933) Auch Ainsworth et al. erkennen in ihrem aktuellen Review den Nutzen der Physiotherapie an, jedoch mit einer Einschränkung, da bisher keine kontrollierten, randomisierten Studien diesen Nutzen belegen (Ainsworth & Lewis, 2007, p. 209).

Die Erfolge der konservativen Therapie sind von vielen Kriterien abhängig. Maman et al. untersuchten 54 Patienten, die mit Physiotherapie, selektiven Steroidinjektionen und Ruhigstellung behandelt wurden. Sie stellten bei vollständigen Rupturen in über 50% der Fälle eine Progression der Läsionsgröße fest, bei Teilrissen nur in 8%. Gerade bei Patienten unter 60 Jahren war der Defekt in 83% der Fälle gleich geblieben oder kleiner geworden; Teilrisse führten zu keiner Atrophie des M.supraspinatus, wohingegen Komplettrisse in 24% der Fälle zur Atrophie des Muskels führten (Maman, et al., 2009, p. 1901). Zingg et al. untersuchte die Progression der Defektgröße einer Ruptur an 19 konservativ behandelten Patienten über 4 Jahre. Die Ergebnisse zeigten eine ausreichende Erhaltung oder Verbesserung der Schulterfunktion über den Beobachtungszeitraum. Bei einem gewissen Prozentsatz der Patienten wurde aber aus einem operativ versorgbarem Defekt ein ihrer Meinung nach nicht mehr versorgbarer Defekt (Zingg, et al., 2007, p. 1933).

Hierin liegt auch die Gefahr einer konservativen Therapie. Trotz klinischer Besserung kann sich der strukturelle Schaden fortsetzen. Ein Fortschreiten der Atrophie, Retraktion und fettigen Infiltration des Muskels, sowie eine Verminderung des akromiohumeralen Abstandes unter konservativer Therapie wurden festgestellt. (Maman, et al., 2009, p. 1901; Zingg, et al., 2007, p. 1933) Diese Faktoren mindern den Erfolg einer späteren Rekonstruktion oder machen sie möglicherweise sogar unmöglich.

Die Erfolgchancen einer konservativen Therapie sind in der Literatur damit sehr heterogen, mit Zahlen zwischen 35%-90%. Diese starken Unterschiede sind zum einen in Verwendung verschiedener Bewertungssysteme zu finden (objektiver Constant-Score, eher subjektive DASH-Scores), zum anderen in der Heterogenität der Gruppen, da die Erfolge von vielen Variablen wie z.B. Alter, Rupturgröße und Beobachtungszeitraum beeinflusst werden.

Als Indikationen für eine Rotatorenmanschettenrekonstruktion werden symptomatische, therapieresistente Partialrupturen, Komplettrupturen beim körperlich aktiven Patienten, sowie traumatische Rupturen genannt. Auch Schmerzen bei Patienten mit (Teil-) Rupturen, die konservativ nicht beeinflussbar waren, können eine Indikationsstellung zur OP bedingen. Untersucht sind jedoch nur einzelne Faktoren, die das Operationsergebnis positiv oder negativ beeinflussen (z.B. Alter, Geschlecht, Kraft, Bewegungsausmaß, Rupturgröße), doch auch hier sind die Ergebnisse widersprüchlich. Sogar das Alter des Patienten ist nicht zwingend mit einem schlechteren Operationsergebnis verbunden, wie Oh et al. feststellten (Oh, Wolf, Hall, Levy, & Marx, 2007, p. 54).

Folgende Faktoren gelten als Pfeiler der Indikationsstellung für eine operative RM-Rekonstruktion:

1. Schmerz- und Beschwerdebild des Patienten
2. Anforderungen an Kraft und Beweglichkeit (Aktivität)
3. nicht ausreichende Besserung unter konservativer Behandlung nach 6-12 Wochen
4. Zustimmung des Patienten zu einer Operation und der verbundenen Nachbehandlung
5. Größe der Rissbildung; Muskelqualität und Sehnenbeteiligung, degen. Veränderungen
6. Zeitdauer der Beschwerden

Die operative Versorgung kann in drei Techniken erfolgen: Als offene Operation, in der sog. „Mini-open“ Technik und vollständig arthroskopisch. Dabei wurde die offene Rekonstruktion aufgrund der Ablösung des M.deltoideus größtenteils verlassen.

Die Diskussion über die optimale Rekonstruktionsmethode hält jedoch immer noch an: So liegt Literatur vor, die eine komplett arthroskopische Versorgung als Gold Standard ansieht (Ozbaydar, Chung, Diller, & Warner, 2007, p. 832). Dagegen gibt es Publikationen die den „Mini-open“-Repair als Gold-Standard bezeichnen (Schofer, et al., 2009, p. 325).

Morse et al. führten 2008 eine Meta-Analyse zwischen arthroskopischen und „mini-open“ Techniken durch. Ihre Analyse zeigte zwischen beiden Techniken keinen signifikanten Unterschied im postoperativen Ergebnis (Morse, et al., 2008, p. 1825). Diese Ergebnisse werden auch von einem aktuelleren Review von Lindley et al. gestützt, die ebenfalls keinen Unterschied zwischen offenen und arthroskopischen Techniken finden konnten (Lindley & Jones, 2010, p. 598). Sogar die Entwicklung der „double row fixation“, d.h. die Refixation des Supraspinatus in zweireihiger Naht bringt in einem Review von Papalia et al. noch keinen klaren Vorteil in der Literatur im Vergleich zur einreihigen Fixation („single row“). (Papalia, et al., 2011, p. 346)

Die Operationstechnik scheint also nicht der limitierende Faktor für ein gutes Operationsergebnis zu sein. Intraoperativ ist die Fähigkeit des Operateurs und die korrekte anatomische Fixierung der Sehnenstümpfe eine grundlegende Voraussetzung. Die Tatsache, dass trotz Berücksichtigung dieser Faktoren hohe Rerupturraten auftreten, lässt vermuten, dass biologische Ursachen für diese gestörte Sehnenheilung verantwortlich sind.

2.4 GRUNDLAGEN DER SEHNENHEILUNG

Die Sehne besitzt die Aufgabe der Verbindung und Kraftübertragung von Muskeln auf das Skelettsystem. Im Bereich des muskulo-tendinösen Übergangs bilden die Kollagenfasern mit den Zwischenräumen der Muskelfasern ein Geflecht.

Am knöchernen Ansatzpunkt der Sehne, dem tendo-ossären Übergang liegen zwei unterschiedliche Formen der Verankerung vor. An Apophysen wie dem Ansatz des M.supraspinatus am Humerus kann man verschiedene Zonen unterscheiden, die einen Übergang aus straffem, parallelfaserigen in zuerst faserknorpeliges, dann mineralisiert faserknorpeliges Gewebe zeigen, welches dann in den Knochen übergeht.

Histologisch ist die Sehne ein zellarmes, faserreiches Bindegewebe. Die spezialisierten Fibrozyten der Sehne erscheinen im Querschnittspräparat dreieckig mit feinen Ausläufern zwischen den einzelnen Kollagenfasern (Flügelzellen). In der Literatur sowie im weiteren Text werden sie auch als Tendoblasten bzw. Tendozyten bezeichnet.

Die humane Sehnenheilung lässt sich in drei Phasen, die entzündliche, die proliferative und die Umstrukturierungsphase aufteilen.

In der entzündlichen Phase gelangen Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophile, Monozyten und Makrophagen direkt posttraumatisch aus umliegendem Gewebe zur Defektstelle, zum Teil angelockt von vasodilatierenden und proinflammatorischen Stoffen. Angiogenetische Faktoren führen innerhalb von Tagen zur Bildung eines feinen Kapillarnetzwerks. Die Rekrutierung von aktiven Tendoblasten sorgt insgesamt für eine Vermehrung der Extrazellulärmatrix (EZM) (Oakes, 2003, pp. 56-70)

Nach ungefähr 24h beginnt die Proliferationsphase, in der die Tendoblasten dominieren. Der Gehalt an Typ I und III Kollagen nimmt weiter zu, während der Anteil an Wasser, DNA und Glykosaminoglykanen annähernd gleich bleibt. In der bis zu 3 Wochen andauernden Proliferationsphase nimmt die Zugbelastbarkeit durch Querbrücken und Narbengewebe zu; in dieser Zeit könnte eine Mobilisation der entsprechenden Struktur schädlich sein (Oakes, 2003, pp. 56-70). Dies wird durch Arbeiten von Gimbel et al. an der Rotatorenmanschette der Ratte unterstützt; sie fanden eine verbesserte Sehnenqualität bei Immobilisierung und Minimierung der Reparaturspannung (Gimbel, Van Kleunen, Lake, Williams, & Soslowsky, 2007, p. 565; Gimbel, Van Kleunen, Williams, Thomopoulos, & Soslowsky, 2007, p. 403). Ein zu später Beginn der Belastung kann jedoch die Heilung negativ beeinflussen, Bring et al. zeigten schon nach 16 Tagen der Immobilisation eine niedrigere Genexpression in Achillessehnen von untersuchten Ratten (Bring, et al., 2009, p. 416). Am Ende dieser physiologischen Heilungsphase ist die Sehne sehr zellreich mit hohen Mengen an EZM.

Es folgt 6-8 Wochen nach Ruptur die Umstrukturierungsphase (Remodelling), in welcher die Zellzahl und Synthese der EZM abnimmt. Besonders Kollagenfasern vom Typ I, die sich entsprechend der Zugrichtung ausrichten, sind für steigende Belastbarkeit und Steifigkeit der Sehne verantwortlich. In dieser Phase kann eine gesteuerte Mobilisierung und Belastung die spätere Sehnenstruktur positiv beeinflussen (Oakes, 2003, pp. 68-70). Das Remodelling wird von manchen Autoren noch in Konsolidierung und Reifung unterteilt, wobei die Reifung dann bis zu zwölf Monate oder sogar mehrere Jahre andauert. Die mechanischen Eigenschaften einer geheilten Sehne nach einem Trauma erreicht jedoch nicht die Stärke und Qualität von intaktem Sehngewebe. Sharma et al. zeigten dies an Schafen, deren zuvor durchtrennte Achillessehne selbst nach 12 Monaten nur 56,7% der Reißfestigkeit einer intakten Sehne besaß (Sharma & Maffulli, 2006, p. 186).

Zusätzlich werden zwei Typen von Heilung unterschieden: Bei der extrinsischen Heilung migrieren Fibroblasten und Entzündungszellen vom umliegenden Gewebe und helfen bei der Reparatur des Gewebes. Die intrinsische Heilung geht von Zellen des Endo- und Epitendineum aus und hilft besonders bei der Strukturierung der Kollagenfasern. Beide Mechanismen greifen ineinander, ihre Beteiligung ist z.B. von der Größe des Schadens und der Lokalisation abhängig. Dabei führt die intrinsische Heilung meist zur komplikationsärmeren Heilung und biomechanisch belastbareren Strukturen. Extrinsische Heilung führt oft zu Vernarbungen und Verklebungen. Sie dominiert in der Heilung der Supraspinatussehnenkompletrupturen, was bei Ratte und Mensch gezeigt werden konnte (Gimbel, et al., 2004, p. 747; Uhthoff & Sarkar, 1991, p. 401). Bei partiellen Rupturen ist auch eine großteils intrinsische Heilung vorstellbar, hier fehlen jedoch noch entsprechende Untersuchungen. Man kann nur Hypothesen dafür anstellen, z.B. eine verbleibende Fehlbelastung der Strukturen oder Vorschäden der Sehne, die eine intrinsische Heilung erschweren. Unklar ist auch, ob die Vernarbungen und Verklebungen eine hilfreiche, stabilitätsfördernde Gewebsneubildung darstellen, oder unerwünschtes Nebenprodukt der Heilung sind.

2.5 APPLIKATIONSMÖGLICHKEITEN VON WACHSTUMSFAKTOREN

Wachstumsfaktoren können in verschiedenen Formen über unterschiedliche Wege appliziert werden. Dabei ist zu unterscheiden ob man einzelne oder mehrere Faktoren appliziert und wie man die Wirksubstanzen effektiv an das Zielgewebe liefert.

Tabelle 2 Methoden der biologischen Augmentation

1) Trägermatrizen
- Synthetische Produkte
- Biologische Produkte
- Allografts
- Xenografts
2) Platelet Rich Plasma
- Versch. Produkte / Zubereitungen
3) Wachstumsfaktoren
- Basic fibroblast growth factor (bFGF)
- Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)
- Transforming growth factor β (TGF β)
- Platelet derived growth factor β (PDGF β)
- Bone morphogenetic proteins (BMP 12,13,14)
- Cartilage oligomatrix Protein (COMP)
- Connective tissue growth factor (CTGF)
- Fibroblast growth factor 2 (FGF-2)
- Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)
- Matrix Metalloproteinasen (MMP's)
- Scleraxis (SCX)
4) Mesenchymale Stammzellen
5) Gentherapie

Einzelfaktoren

Einzelne Wachstumsfaktoren sind kommerziell erhältlich. Aktuell ist nur die lokale, invasive Applikation etabliert, da bei oraler Gabe noch keine lokalisierte Bioverfügbarkeit erreicht werden kann. Diese Tatsache macht wiederholte Injektionen und Applikationen erforderlich, da auch die

Halbwertszeit beschränkt ist. Alternativ ist das Einbringen im Rahmen einer operativen Intervention möglich, wobei die Faktoren in stabiler Bindung an eine biologisch abbaubare Matrix eingebracht werden.

Eine Vielzahl von Einzelfaktoren wie TGF β , VEGF, bFGF, G-CSF und PDGF konnten in publizierten Untersuchungen zu positiven Ergebnissen führen, indem sie Heilungsprozesse beschleunigten und verstärkten (Longo, Lamberti, Maffulli, & Denaro, 2011, pp. 35-36). Für eine gute Wirksamkeit ist es notwendig ausreichend hohe Konzentrationen über einen ausreichend langen Zeitraum zu gewährleisten

Stammzellen

Durch die Verwendung von aus Knochenmark gefilterten Stammzellen erhoffte man sich ebenfalls eine verbesserte Sehnenheilung. Gulotta et al. untersuchten die Supraspinatussehnen an 89 Ratten. Die Ratten erhielten nach Durchtrennung und Rekonstruktion des M.supraspinatus lokal mesenchymale Stammzellen in einem Fibrinträger appliziert. Nach zwei und vier Wochen wurden histologische und biomechanische Tests am Sehngewebe durchgeführt. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zu dem Sehngewebe der Kontrollgruppen in Struktur, Zusammensetzung und Stabilität. Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass es an Signalen fehlt, um bei den Stammzellen eine Differenzierung zu bewirken. Weitere Forschung ist dazu notwendig. Sie wird zeigen, ob mit Hilfe von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren diese zellbasierte Strategie soweit modifiziert werden kann, dass sich positive Ergebnisse einstellen. (Gulotta, et al., 2009, p. 184) In weiteren Untersuchungen konnten Gulotta et al. zeigen, dass genetisch modifizierte, mesenchymale Stammzellen mit Überexpression des Transkriptionsfaktors Scleraxis die Sehnenheilung positiv beeinflussen – bei gleichen Versuchsaufbau wie in der Vorstudie zeigten die so behandelten Sehnen nach zwei sowie vier Wochen eine erhöhte Reißfestigkeit sowie einen erhöhten Anteil an Faserknorpel in der Apophyse. Bei noch unklarem Wirkmechanismus betonen die Autoren die Wichtigkeit der Signalgebung durch Scleraxis, das u.a. die Kollagenproduktion sowie die Differenzierung zu Tendozyten beeinflusst (Gulotta, Kovacevic, Packer, Deng, & Rodeo, 2011, p. 1288).

Platelet Rich Plasma (PRP)

PRP ist ein autologes Konzentrat, reich an Thrombozyten und verschiedenen Wachstumsfaktoren, darunter platelet-derived growth factor (PDGF), Insulin-like growth factor (IGF-1), transforming growth factor (TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) und epidermal growth factor (EGF) (Lyras, et al., 2009, p. 1577). Daneben sind in PRP auch bioaktive Stoffe wie Histamin, Dopamin, Calcium und Adenosin in den „Dense bodies“ der Thrombozyten enthalten, die z.B. in der Gerinnungskaskade eine Bedeutung haben. Der Cocktail an

Wachstumsfaktoren besitzt die theoretische Möglichkeit Reparaturprozesse an verschiedenen Geweben zu beeinflussen. Die stark angiogenetische Wirkung der enthaltenen Faktoren könnte bei schlecht durchbluteten Gewebsformationen wie Bändern und Sehnen sinnvoll eingesetzt werden. Der Pfropf, in dem das PRP appliziert wird, bietet zusätzlich eine Art Gerüst, an das sich wundheilungskompetente Zellen binden können. Es sind kommerzielle Systeme erhältlich, die das Gewinnen des PRP aus venösem Blut ermöglichen. Das PRP kann in verschiedenen Formen weiterverwendet bzw. verarbeitet werden, z.B. als Injektion, Gel oder in Transplantaten.

Schwierigkeiten bereitet die kontrollierte Freigabe der Wachstumsfaktoren über längere Zeit, da die Freigabe der Faktoren aus dem PRP schwer beeinflusst werden kann. Auch die Rolle der einzelnen Faktoren kann kaum abgeschätzt werden und bleibt somit unbekannt.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Kinetik der Zytokinfreisetzung aus dem PRP, den optimalen Applikationszeitpunkt und beeinflussende Faktoren auf das Verhalten des PRP's wie z.B. den Gewebs-pH zu bestimmen (Foster, Puskas, Mandelbaum, Gerhardt, & Rodeo, 2009, p. 2270).

Faktorenkombinationen

Ähnlich wie bei einer Einzelfaktorengabe ist es auch möglich mehrere Faktoren in spezifischer Zusammensetzung zu applizieren und somit die einzelnen Phasen des Heilungsvorgangs positiv zu beeinflussen. Die Tatsache, dass die Bedeutung der Einzelfaktoren bei der Sehnenheilung noch nicht vollständig geklärt ist, erfordert das Austesten verschiedener Konzentrationen und Kombinationen von Wachstumsfaktoren in der Forschung. Das Aufspüren einer potenten Kombination von Wachstumsfaktoren als Ziel der Forschung könnte großen Einfluss auf den Heilungsverlauf z.B. einer Sehnenverletzung haben.

Applikationsformen

Injektion

Die wiederholte Injektion eines Wachstumsfaktors stellt die technisch einfachste Lösung der Applikation dar. Nachteilig ist, dass die Injektion das Gewebe wiederholt traumatisiert und die Verteilung der Faktoren im Gewebe nicht gezielt und standardisiert ist. Durch niedrige Stabilität der Faktoren kann nur kurzzeitig eine ausreichend hohe Konzentration gewährleistet werden. Zusätzlich stellt die mehrfache Injektion ein bedeutendes Infektionsrisiko dar.

Trägersysteme

Auf dem Markt ist aktuell eine Vielzahl an Trägersystemen mit wachstumsfördernden Wirkstoffen erhältlich, mit denen versucht wird die Wundheilung positiv zu beeinflussen. Es handelt sich dabei um biologisch oder synthetisch hergestellte Gewebegerüste. Diese Gerüste werden zur verbesserten Heilung von Gewebdefekten verwendet, bei denen Heilungskomplikationen oder –störungen erwartet werden. Ein solcher Problemfall stellt z.B. die Konsolidierung von Rissen der oftmals chronisch degenerativ veränderte Supraspinatussehne dar. Aber auch andere Gewebstypen und –systeme können auf diese Art und Weise versorgt werden.

Die Trägersysteme können organischer oder synthetischer Herkunft sein. Weiterhin wird zwischen biologisch abbaubaren und lediglich biokompatiblen Materialien unterschieden.

Organische Systeme, die in der Forschung oft verwendet werden sind z.B. Submukosa aus Schweinedünndarm (SIS = small intestine submucosa) oder azelluläre Hauttransplantate (z.B. Graftjacket®, Kinetic Concepts Inc., P.O. Box 659508 San Antonio, TX 78265; azellular dermal matrix graft). Die organischen Transplantate werden dabei von Zellen bereinigt, sodass nur ein Bindegewebsgerüst aus Extrazellulärmatrix übrig bleibt. Diese EZM-Matrix kann zur Defektdeckung benutzt werden, sie bietet zum Teil eine gewisse Frühstabilität und ermöglicht es den umliegenden Zellen einzuwachsen. Darüber hinaus können in solche Matrizen z.B. Stammzellen, Fibroblasten oder Wachstumsfaktoren inkorporiert werden, die eine weitere Unterstützung der Heilung versprechen.

Synthetische Systeme werden auf der Basis verschiedener Polymere hergestellt. Diese können natürlichen Ursprungs sein (Fibrin, Kollagen, Gelatine, Chitosan, Alginat, Hyaluronsäure). Auch komplett synthetisch hergestellte Trägersysteme (z.B. Polylactid (PLA), Polyglycolid(PGA) oder poly-lactide-co-glycolide(PLGA)) sind verfügbar. Ziel ist es dabei ein Gerüst (engl. „scaffold“) zu schaffen welches stabil ist, eine poröse Oberfläche zur Zellbesiedlung bietet und potenziell für spezielle biologische Wirkungen förderliche Substanzen bzw. Zellen enthält.

Die Oberflächen und Raumstrukturen der synthetisch hergestellten Trägersysteme können technisch weiter verändert werden, um bessere biologische Eigenschaften zu erhalten. Bindungen von Kollagenen, Gelatine, Galaktose, Peptiden oder Heparin führen zu Interaktionen mit dem Zielgewebe. Wachstumsfaktoren lassen sich in diese Trägersystem binden oder inkorporieren, um in Folge biologisch abbaubar vorzuliegen. Auch können diese in Form von Mikrosphären in das Trägersystem integriert werden. Es ist auch möglich DNA-Sequenzen zu binden und in diesen Systemen anzureichern, die für entsprechende Wachstumsfaktoren kodierend sind. (siehe Gentransfer)

Biogele (Hydrogele)

Biogele sind biologisch abbaubare, heute meist synthetisch hergestellte Materialien. Sie können als Trägersysteme für Substanzen (Medikamente) und Zellen benutzt werden und bieten dabei eine enorme Anwendungsvielfalt.

Die Vorteile liegen in einer gezielten, individuellen Anpassung an verschiedene Problemsituationen oder Defektformen. Die Gele sind stark adhäsiv und können so den besonderen Anforderungen entsprechend aufgetragen werden. Das Gel passt sich dabei dem Oberflächenrelief des Gewebes gut an und gewährleistet so eine große Oberfläche für die gezielte Abgabe von z.B. inkorporierten Wachstumsfaktoren. Diese können sogar im Gel unterschiedlich gebunden werden. Dabei kann das Freigabeprofil modifiziert werden. Eine konstante Freisetzung von z.B. Wachstumsfaktoren ist über mehrere Tage bis Wochen möglich. Die Faktoren, die sonst eine geringe Bioverfügbarkeit besitzen, bleiben im Gel relativ stabil.

Frühere Nachteile waren die schwache Adhäsion des Gels oder mangelnde Stabilität bei Körpertemperatur, die zur raschen Auflösung des Gels führten. Diese Probleme werden durch optimierte Zusammensetzungen der Gele verbessert.

Bei richtiger Anwendung ermöglichen Biogele also die gezielte Abgabe von Wachstumsfaktoren an das gewünschte Gewebe, dabei können lokal ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen über längere Zeit erreicht werden, um den Heilungsprozess positiv anzuregen.

Gentransfer

Der Transfer von Genen zur Anregung der Produktion der entsprechenden Wachstumsfaktoren in den Tendozyten bzw. Zellen des umliegenden Gewebes ist ein eleganter Weg die Sehnenheilung zu unterstützen. Durch Vektoren können die Zellen gezielt mit dem gewünschten Genmaterial „infiziert“ werden. Dabei können durch virale Vektoren, ein Virus ohne die Fähigkeit zur Replikation, oder nicht-virale Vektoren wie z.B. Liposomen eingesetzt werden. Diese Vektoren können entweder in vivo direkt auf das entsprechende Zielgewebe aufgebracht werden. Eine weitere Möglichkeit ist, sie in vitro mit entnommenem Zellmaterial zu kombinieren, welches nach Kultivierung dann wieder in das Ursprungsgewebe eingebracht wird. Der sogenannte direkte Transfer in vivo ist dabei weniger aufwendig und invasiv, aber auch schwerer kalkulierbar, da die umgebenden Zellen sozusagen „ungezielt“ infiziert werden und eine große Masse an Zielgewebe vorhanden ist. Der indirekte Transfer in vitro ist genauer und sicherer, da die Zellen vor der Wiedereinbringung in den Körper getestet und selektiert werden können. Dabei bestehen je nach Anwendungsart (Stammzellen, Ort, Applikationsweg, Langzeitüberleben der Zellen/Vektoren etc.) verschiedene Risiken. Eine erhöhte Rate an Neoplasien, die Fehldifferenzierung des Zielgewebes sowie systemische Nebenwirkungen durch aus Stammzellen freigesetzten Wachstumsfaktoren können aktuell nicht ausgeschlossen werden

(S. Buchmann, Zumstein, & Brucker, 2013, p. 143). Mit den bisher erhältlichen Vektoren ließ sich eine messbar erhöhte Genexpression von 6-8 Wochen erreichen (Maffulli, Moller, & Evans, 2002, p. 316).

2.6 EIGENSCHAFTEN VON PHOSPHOLIPIDGELEN

Biogele stellen eine neuartige, biologisch abbaubare Möglichkeit zur Wirkstoffeinbringung dar. Das in dieser Arbeit verwendete Biogel besteht aus einer hochkonzentrierten natürlichen Phospholipid-Dispersion und wird auch als „Vesicular Phospholipid Gel“ (VPG) bezeichnet. Es besitzt eine zähflüssige Konsistenz und zeigt die Eigenschaften von Vesikeln. Dies hat laut M. Brandl und U. Massing (Torchilin, 2003, pp. 45-69) folgende Auswirkungen:

- es existieren zwei getrennte, flüssige Kompartimente in den Vesikeln selber und dem interstitiellen Raum zwischen den Vesikeln
- VPG's können mit hydrophilen, amphiphilen und lipophilen Medikamenten in verschiedenen Konzentrationen beladen werden
- VPG's speichern verschiedene Wirkstoffe relativ stabil, selbst beim Autoklavieren oder langfristiger Lagerung, da zwischen Vesikelinhalt und flüssiger Phase kein Konzentrationsgradient besteht.
- VPG's zeigen in vitro eine kontrollierte, gleichmäßige Abgabe der gespeicherten Wirkstoffe über Erosion der Vesikel, die je nach Zusammensetzung des Gels variieren kann
- Die Wirkstoffe werden vor frühzeitigem Abbau oder Abtransport geschützt

2.7 SPEZIFISCHE WACHSTUMSFAKTOREN DER SEHNENHEILUNG

Eine Vielzahl von Substanzen und Faktoren sind an der Sehnenheilung beteiligt, darunter auch viele verschiedene Wachstumsfaktoren. In der Literatur wurden einige dieser Faktoren schon eingehend untersucht. Das Ziel besteht darin, die Heilung unter Einsatz von spezifischen Wachstumsfaktoren zu verbessern und über das Niveau einer minderwertigen oder Defektheilung zu heben. Es wird vermutet, dass eine mangelhafte Expression von Genen für Wachstumsfaktoren, eine zu hohe Spannung auf die Strukturen, sowie das Vorhandensein von zu wenigen noch differenzierbaren Zellen am Ort des Defektes dafür verantwortlich sind (Thomopoulos, Williams, & Soslowky, 2003, p. 111). Rodeo et al. nehmen an, dass Entzündungsreaktionen im postnatalen Organismus die Defektheilung im speziellen Sehngewebe auf diese Art verursachen (Rodeo, 2007, p. 191).

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten inzwischen eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die Auswirkungen auf die Sehnenheilung in vitro sowie in vivo hatten (Siehe Tabelle 3, Absatz 5.3).

Die Heilungsprobleme der Rotatorenmanschette brachten uns dazu, zwei Wachstumsfaktoren genauer zu untersuchen: *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF). Beide Faktoren zeigten signifikant positive Ergebnisse bei der Sehnenheilung, sind leicht erhältlich und besitzen eine klinische Zulassung (S. Buchmann, et al., 2013, p. 300).

bFGF

Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF2) ist ein Wachstumsfaktor aus der Familie der fibroblastischen Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Angiogenese, Migration von Zellen, Wundheilung und Embryonalentwicklung spielen. Diese Familie bindet an Heparin-Proteine und beeinflusst so über Zelloberflächenmoleküle die Proliferation und Differenzierung insbesondere von Fibroblasten und Endothelzellen. Es sind vier verschiedene Rezeptoren bekannt (FGFR1-4), die als Rezeptor-Tyrosinkinase Signale weitervermitteln. Dabei wird bFGF nicht sezerniert, sondern an Zelloberflächen oder EZM-Bestandteilen gebunden. Freigesetzt wird bFGF durch seine Heparin-Bindung degradierende Enzyme oder von beschädigten Zellen. Da bFGF keine Signalsequenz besitzt, wird er durch einen Exozytose-Mechanismus unabhängig vom ER-Golgi-Weg freigegeben (Mignatti, Morimoto, & Rifkin, 1992, p. 88).

Wirkung von bFGF auf die Sehnenheilung

Kobayashi et al. 2007 untersuchten den Einfluss von bFGF auf die Heilung des vorderen Kreuzbandes (ACL) bei Kaninchen. Der Einsatz von bFGF führte bei früher Applikation nach dem Eingriff zu einer besseren Defektdeckung durch Granulationsgewebe sowie Bildung eines Kapillarnetzwerkes und später zu einer besseren Kollagenstruktur und Gewebsmasse als in der Kontrollgruppe (D. Kobayashi, Kurosaka, Yoshiya, & Mizuno, 1997, p. 191). Der Effekt auf die Heilung ist laut den Autoren besonders in den ersten Tagen wichtig, um die folgenden Stadien positiv zu beeinflussen. In weiteren Studien untersuchten Kobayashi et al. das Expressionsmuster von bFGF in Supraspinatussehnen von Kaninchen nach Erzeugung eines Defekts. Es zeigte sich, dass bFGF besonders in Fibroblasten und Gefäßendothelzellen exprimiert wird, mit einem Maximum an Tag sieben bis neun (M. Kobayashi, et al., 2006, p. 375). Diese Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren bestätigt, wie z.B. Würgler-Hauri in 2007 (Würgler-Hauri, Dourte, Baradet, Williams, & Soslowsky, 2007, p. 199). Im völligen Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von Chen et al. aus 2008, die Beugesehnen der langen Zehen an Hühnern untersuchten. Es wurde eine niedrige Expression von bFGF an Tag 0 nach der Ruptur beobachtet, die sogar an den Folgetagen noch weiter herunterreguliert wurde (Chen, et al., 2008, p. 1837). Die Ursache für dieses Verhalten wird in der intrasynovialen Lage der Sehnen gesehen, die für die schlechte Heilung verantwortlich gemacht wird. Gerade dieses „Gegenbeispiel“ zeigt die

eventuellen positiven Effekte von bFGF bei insuffizienten Heilungsvorgängen und die Bedeutung der extrinsischen Heilung.

Chan et al. untersuchten die Wirkung von bFGF an Ratten. Sie erzeugten im Mittelteil der Patellasehne 1x4mm große Defekte und injizierten drei Tage später bFGF in verschiedenen Dosierungen. Sie konnten eine Zunahme der Proliferation und Expression von Kollagen Typ III abhängig von der Dosierung nachweisen; eine Zunahme der Sehnenreisfestigkeit wurde zwar beobachtet, war aber nicht signifikant. Die Autoren weisen aber auf eine mangelnde Power durch ihren Versuchsaufbau hin (Chan, et al., 2000, p. 515). Bei diesen Experimenten wurde die Wichtigkeit von bFGF, besonders in der Akutphase der Heilung festgestellt. Auch Fukui et al. beobachteten die schnelle Defektfüllung an den medialen Seitenbändern des Kniegelenks bei Hasen bei Anwendung von bFGF. Neben der Bestätigung der Dosisabhängigkeit fanden sie aber auch negative Auswirkungen auf die Reifung des Sehngewebes nach 3-6 Wochen, besonders in Gruppen mit hoher Dosierung. Sie fanden, dass in allen Interventionsgruppen die Expression von Typ I Kollagen vermindert war und die Orientierung der Kollagenfasern sich schlechter darstellte (Fukui, Katsuragawa, Sakai, Oda, & Nakamura, 1998, p. 410).

G-CSF

Das Peptidhormon G-CSF ist ein Zytokin, das besonders bei Entzündungen im Körper eine wichtige Rolle zur Aktivierung von Granulozyten einnimmt. Es besteht aus 178 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 19,7 kDa. Wichtig für seine Stabilität als Protein und seine Funktion ist eine hohe Glykolysierung von ca. 4% (Hill, Osslund, & Eisenberg, 1993, p. 5167). Neben dem Einfluss auf die Reifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, fördert G-CSF auch die Aktivierung und Migration reifer neutrophiler Granulozyten. In diesen wird auch die Superoxid-Produktion gesteigert. Inzwischen wird G-CSF als „polyfunktionales“ Signalmolekül angesehen, das neben Einfluss auf die Neutrophilenproduktion sowie –funktion auch Effekte auf Stammzellen, T-Zellen, dendritische Zellen und, für die Sehnenheilung bedeutsam, ein Modulator bei Entzündungsreaktionen ist. (Eyles, Roberts, Metcalf, & Wicks, 2006, p. 508; Roberts, 2005, p. 38)

Sasaki et al. untersuchten die Wirkung von G-CSF auf die Heilung an den vorderen Kreuzbändern bei 28 Beagle-Hunden. Nach 2 Wochen zeigte die mit G-CSF behandelte Gruppe eine deutlich bessere Mikrovaskularisierung. Nach 4 Wochen waren die Expression wichtiger mRNA und die Reisfestigkeit signifikant erhöht (Sasaki, et al., 2008, p. 1523).

Marmotti et al. zeigten, dass G-CSF (sowie TGF- β 1) das Auswachsen von Chondrozyten aus Knorpelfragmenten beschleunigt. Dabei selektiert G-CSF laut den Autoren eine dedifferenzierte Population von Chondrozyten, die ähnlich wie die Chondrozyten der Knorpeloberfläche noch eine gute Proliferationskapazität besitzen und eine erhöhte Regenerationsfähigkeit besitzen. Sie betonen die

Bedeutung von G-CSF auch bei anabolen Vorgängen wie Knochenregeneration, Frakturheilung sowie Sehnen-Knochenintegration (Marmotti, et al., 2012, pp. 11-12).

G-CSF ist ähnlich wie bFGF besonders in der Akutphase nach einem Gewebstrauma ein wichtiger Faktor, der die Zellmigration zur defekten Stelle fördert, die Proliferation und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten erhöht und somit die Heilung positiv beeinflusst. Der Einfluss von G-CSF auf Sehnen und Bänder wurde in der Literatur bisher kaum untersucht, die Arbeiten von Sasaki und Marmotti zeigen aber das mögliche Potenzial dieses Faktors.

Wachstumsfaktoren spielen bei der Sehnenheilung eine bedeutende Rolle. Ihre Expression ist unterschiedlich in den verschiedenen, an der Reparatur beteiligten Zellen. Auch ist ihre Expression sehr stark vom Zeitpunkt der Applikation und der Beobachtung abhängig. Das Zuführen von Wachstumsfaktoren kann, bezugnehmend auf die oben aufgeführte Literatur, einzelne Phasen der Heilung positiv beeinflussen und den Heilungsprozess so beschleunigen oder das Heilungsergebnis verbessern. Dosisabhängig können jedoch auch negative Effekte auf den Heilungsvorgang entstehen, die zu einer verminderten histologischen und biomechanischen Qualität des Gewebes führen.

2.8 VERGLEICH VON ANATOMIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER ROTATORENMANSCHETTE RATTE – MENSCH

Um pathologische Veränderungen, den Einfluss verschiedener Faktoren oder therapeutischer Interventionen auf die Schulter zu analysieren, ist es notwendig ein ausreichend vergleichbares Tiermodell zu benutzen. Dieses Tiermodell sollte im muskuloskelettalen Aufbau der Anatomie des Menschen möglichst ähnlich sein. Gleichzeitig sollten die Belastungen auf das Schultergelenk des Versuchstieres vergleichbar sein. Neben diesen Gesichtspunkten sind auch die Kosten, die ethischen Gesichtspunkte sowie der Aufwand in Beschaffung, Betreuung und Umgang zu beachten.

Mit dem Ziel ein geeignetes Tiermodell zu finden, untersuchten im Jahre 1996 Soslowky et al. 33 verschiedene übliche Versuchstiere auf ihre Eignung (Soslowky, Carpenter, DeBano, Banerji, & Moalli, 1996, p. 385). Die vier Primaten, die anatomisch und funktionell dem Menschen am nächsten waren, schieden aus den oben genannten ethischen Gründen sowie den Kosten und dem Aufwand aus.

Die Ratte verblieb als einziges Versuchstier, das die von Soslowky angewandte Checkliste mit 34 Punkten erfüllte. Dabei waren Kosten und Aufwand vertretbar.

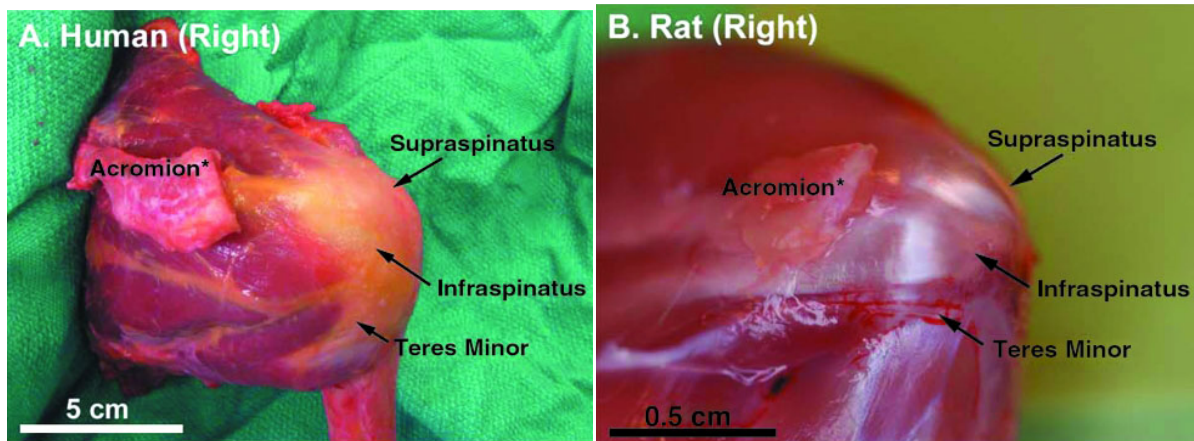
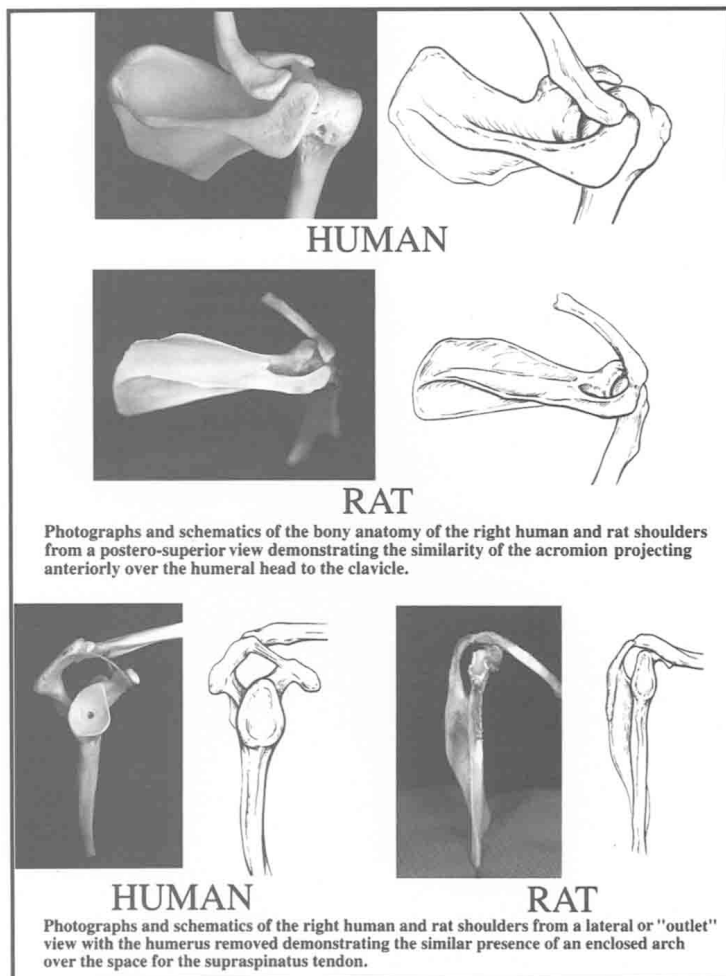


Abb. 4 Vergleichende Anatomie nach Akromionresektion: A) Mensch B) Ratte

(Figure 2, "Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair", Derwin KA, Tissue Eng Part B Rev. 2010 Feb;16(1):21-30.)

Der Schultergürtel der Ratte besteht wie beim Menschen aus Scapula, Clavicula und Humerus. Die Scapula lässt vergleichbare anatomische Strukturen erkennen und ist auf dem Thorax muskulär geführt. Der Margo medialis ist bei der Ratte kürzer und besitzt andere Muskelansätze, was eine Rotation der Scapula nur beschränkt ermöglicht. Beim Menschen brachte die Verlängerung des Margo medialis bis zum Angulus inferior einen besseren Hebelarm für die Muskeln, die das Schulterblatt drehen, was einen Bewegungszugewinn bedeutet. Die gelenkige Verbindung mit dem Sternum über die Clavicula bietet Stabilität, lässt aber Bewegungen des Schultergürtels zu.



Eine Besonderheit der Ratte ist, dass sie im Gegensatz zu den anderen untersuchten Tieren ein Akromion besitzt, das über dem M. Supraspinatus (SSP) positioniert ist. Es bildet sich ein geschlossener coraco-acromialer Bogen aus dem Proc. Coracoideus, der Clavicula, dem Akromion und den verbindenden Bändern. Dieser Aufbau ist mit dem Schulterdach des Menschen vergleichbar und ein Grund für die gute Eignung der Ratte als Modell (Abb. 5).

Abb. 5 Vergleichende knöcherner Anatomie Ratte – Mensch.
 Das Schulterdach der Ratte aus Clavicula und Akromion gleicht funktionell dem Schulterdach des Menschen (Figure 3, "Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease", J Shoulder Elbow Surg. 1996 Sep-Oct;5(5):383-92)

Auch funktionell besteht eine starke Ähnlichkeit. Bei der Lokomotion oder bei Überkopfbewegungen mit den Vorderläufen passiert bei der Ratte der SSP das Akromion wiederholt (siehe Abb.6), was beim Menschen als ein wichtiger Pathomechanismus für die Entstehung von Supraspinatussehnenrupturen angesehen wird (Bigliani, Ticker, Flatow, Soslowsky, & Mow, 1991, p. 835; Gohlke, Barthel, &

Gandorfer, 1993, p. 30; Hijioka, Suzuki, Nakamura, & Hojo, 1993, p. 62; Schneeberger, Nyffeler, & Gerber, 1998, p. 377).

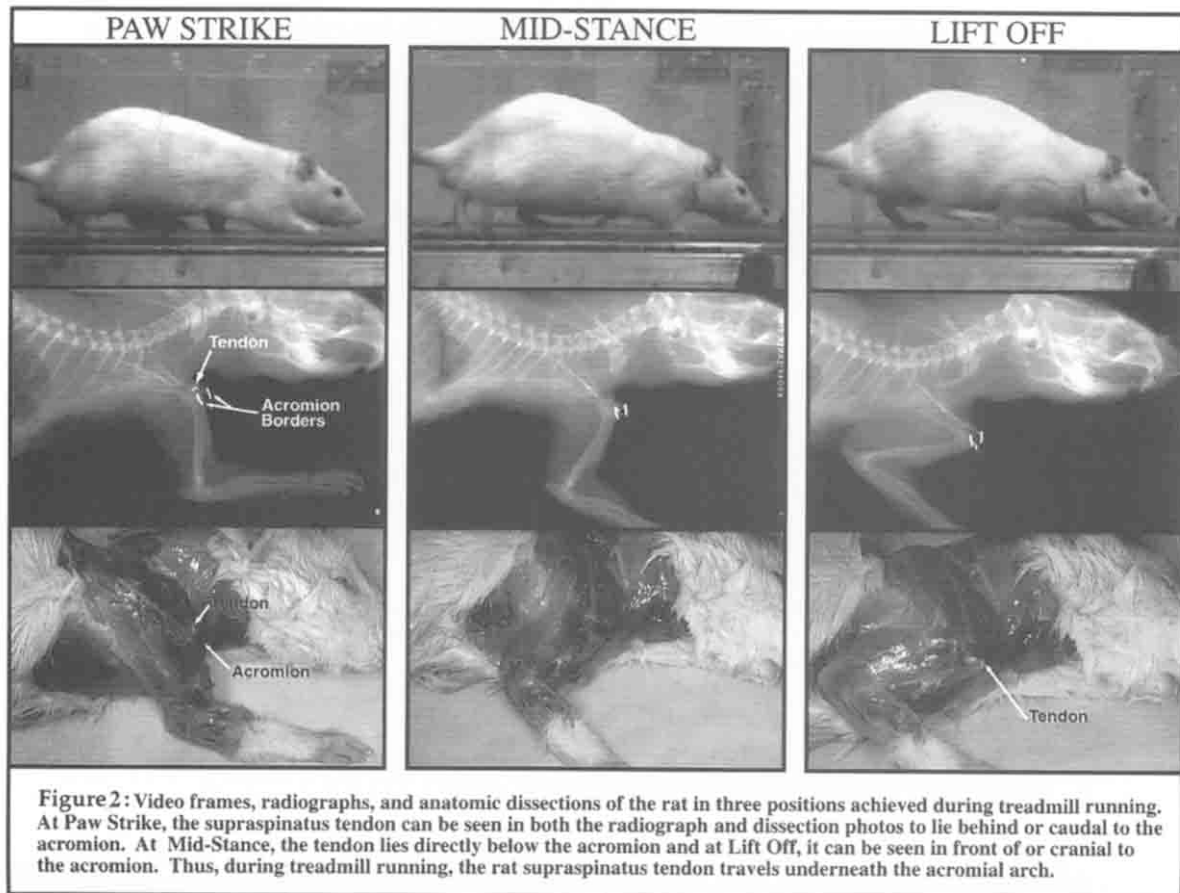


Abb. 6 Benutzung der oberen Extremität der Ratte. Bei der Lokomotion passiert der SSP der Ratte das Akromion – ähnlich wie es beim Menschen bei z.B. Überkopfbewegungen der Fall ist (Figure 2, "Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease", J Shoulder Elbow Surg. 1996 Sep-Oct;5(5):383-92)

Daraufhin wurden entzündliche Reaktion sowie die charakteristischen Heilungsvorgänge nach Sehnenreizungen oder Sehnenrupturen an der Ratte von mehreren Autoren untersucht. Gewebeproben zeigten ähnliche histologische Veränderungen wie man sie bei chronischen Sehnenreizungen beim Menschen finden kann. Es fand sich eine Zunahme der Zellzahl und –proliferation, ein Orientierungsverlust der Kollagenstruktur, Zunahme der Vaskularität und eine Heilungsantwort der Fibroblasten (Galatz, et al., 2006, p. 544; Soslowky, et al., 1996, p. 385). Im Gegensatz zum Menschen bewegt sich die Ratte auf allen vier Extremitäten fort, weshalb die Schulter unter ständiger Gewichtsbelastung steht. Neben dem Einsatz zur Fortbewegung ist aber die vordere Extremität der Ratte flexibel genug ausgebildet, um Greifbewegungen, sogar Überkopfbewegungen auszuführen.

Weiterhin ist es schwer, die vorderen Extremitäten der Ratte nach durchgeführten Operationen bzw. Manipulationen ausreichend bzw. vollständig zu immobilisieren. Die Heilung ist zudem geprägt durch überschießendes Narbengewebe, welches den Defekt ausfüllt, was beim Menschen nicht derartig beobachtet wird.

Modell der chronischen Supraspinatussehnenruptur

Rupturen der Supraspinatussehne entstehen beim Menschen selten akut traumatisch, meist sind chronisch degenerative Veränderungen an der Sehne über einen langen Zeitraum verantwortlich. Oft werden schon bestehende Defekte oder Pathologien durch Bagateltraumen aktiviert. Die Sehne des älteren Patienten ist also wahrscheinlich in einem anderen Zustand, als die Sehne eines Versuchstieres. Um ähnliche Bedingungen zu schaffen, untersuchten wir den Zustand der Supraspinatussehnen nach induzierter Ruptur an der Ratte. Das Ziel war, den Zeitpunkt zu finden, an dem die Sehne dem Bild des älteren Patienten mit degenerativen Veränderungen am ehesten entspricht. Wir fanden heraus, dass nach 3 Wochen die Sehne am ehesten dem histologischen Bild der chronischen Supraspinatussehnen degeneration entspricht, gemessen an Grad der Sehnenveränderungen und Atrophie des Muskels. Wird unter diesen Bedingungen die Sehnenheilung untersucht, ergibt sich ein Zugewinn an Übertragbarkeit auf den Menschen (S. Buchmann, et al., 2011, p. 432).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSABLAUF

Es wurden insgesamt 45 männliche CD® (Sprague-Dawley) Ratten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Ratten werden in einem Alter von 14 Wochen mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 500g von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) geliefert. Die Haltung sowie Versuchsdurchführung erfolgte im Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) der Technischen Universität München. Die Leitung des Tierversuchsvorhabens erfolgte durch Dr. vet. Gabriele Wexel sowie stellvertretend Dr. med. Stefan Buchmann.

Die Versuchstiere wurden zu Beginn tierärztlich untersucht und gewogen. Die Haltung erfolgte in einem dafür vorgesehenem Raum mit begrenztem Personenzutritt, einer konstanten Temperatur von ca. 23°C sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden mit Dämmerungsphase.

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Ratten zu viert in Standardkäfigen aus Makrolon Typ III (H: 20cm, B:22cm, T: 37cm) mit Holzgranulateinstreu sowie Stroh gehalten. Zur Ernährung wurden Rattenpellets der Fa. Altromin sowie Wasser ad libitum verwendet.

Die Identifizierbarkeit der Ratten war durch internationale Ohrlochung, farbiger Schwanzmarkierung sowie Kennzeichnung mit Käfigkarten nach Vorschrift des Tierschutzgesetzes stets gegeben. Auf den Käfigkarten wurde ebenfalls die Gruppenzugehörigkeit, Medikation, Fütterung sowie der Zeitpunkt einer Intervention notiert.

In einer ersten Operation wurde bei allen Ratten die Supraspinatussehne der linken Schulter insertionsnah am Humerus abgesetzt, analog zu der Operationstechnik der Vorversuche (S. Buchmann, et al., 2011, p. 430).

Drei Wochen später wurden die Supraspinatussehnen in der zweiten Operation refixiert. Dabei wurde die Sehne an Insertionsstelle und Verlauf mit dem jeweiligen Biogel versorgt.

In der postoperativen Phase wurden die Ratten mit Metamizol (Novaminsulfon, Fa. Ratiopharm) per os und Buprenorphin (Temgesic®, Fa. Reckitt Benckiser Healthcare (London)) versorgt. Sie erhielten direkt nach der Operation sowie bis drei Tage später zweimal täglich 0,05 mg/ kg Buprenorphin i.m. und zweimal täglich Metamizol (1-2 Tropfen) oral (p.os.).

Auf die Anwendung von nichtsteroidalen Antiphlogistika wurde verzichtet, da Studien deren negative Auswirkungen auf die Sehnenheilung und –reorganisation nachgewiesen haben (siehe Absatz 2.4).

Die Behandlung mit einem Morphinderivat erforderte eine engmaschige Gewichtskontrolle, um etwaige Gewichtsverluste als Nebenwirkung festzustellen. Die Ratten wurden hierfür anfangs jeden 3. Tag, nach neun Tagen einmal wöchentlich gewogen.

Weitere sechs Wochen später erfolgte die Euthanasie der Ratten mittels intrakardialer Injektion von Pentobarbital (120mg/kg Körpergewicht) nach intramuskulärer Narkotisierung mit MMF (~0,45ml), dabei Entnahme der beiden Schultern für histologische und biomechanische Auswertung.

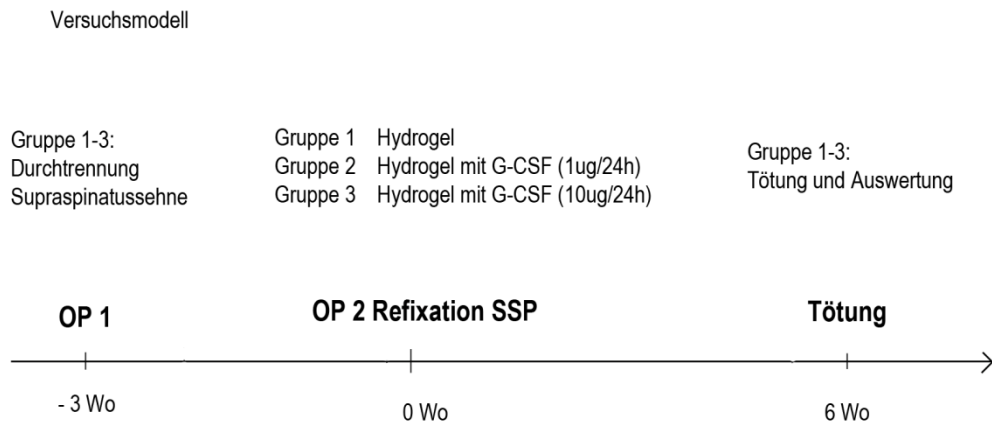


Abb.7 Versuchsaufbau und Zeitplan

3.2 WACHSTUMSFAKTORENAPPLIKATION DURCH BIOGELE

Die Herstellung des G-CSF-haltigen Biogels erfolgte in der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abteilung Pharmazie/Zentrum für Pharmaforschung im Rahmen der Dissertation von Weiwei Tian unter Leitung von Prof. Dr. Gerhard Winter.

Als Endprodukt wurden zwei Gelpreparationen mit einer G-CSF-Freisetzung von 10µg/24h (G-CSF High) sowie 1µg/24h (G-CSF Low) geliefert, die in Konsistenz, Adhäsion sowie der geprüften Freigabekinetik des Wachstumsfaktors für den Versuch geeignet erschienen. Der Herstellungsprozess sowie die verschiedenen Freigabepprofile des Biogels wurden von Tian et al. ausführlich beschrieben (Tian, Schulze, Brandl, & Winter, 2010, p. 323).



Abb.8 Testreihe der verschiedenen Biogele

Intraoperativ erfolgt standardisiert die Gabe von 2x0,1 ml des jeweiligen Biogels mittels einer Einmalspritze. Dabei wird das Gel mit einer sterilen Kanüle (Sterican®, 20G, Fa. Braun) in den Subakromialraum sowie an die operativ versorgte Ansatzstelle des M. supraspinatus appliziert. Der operative Verschluss des M. deltoideus sichert den Verbleib des Gels an der applizierten Stelle.

3.3 OPERATIVES PROCEDERE

Die Narkose erfolgt durch eine Kombination aus Medetomidin (0,15 mg/kg, Dormitor®, Fa. Pfizer), Midazolam (2 mg/kg, Dormicum®, Fa. Ratiopharm) und Fentanyl (0,005 mg/kg, Fentanyl®, Fa. Deltaselect). Die Injektion erfolgt intramuskulär (i.m.) mittels einer Mischspritze. Diese Narkose bietet den Vorteil der Spontanatmung der Tiere, einer ausreichend starken analgetischen Wirkung und die Möglichkeit über Nachdosierung die Narkose zu verlängern, oder sie komplett zu antagonisieren. Diese Antagonisierung der Narkose wird mit Atipamezol (0,75 mg/kg, Antisedan®, Fa. Pfizer), Flumazenil (0,2 mg/kg, Fa. Inresa) und Naloxon (0,12 mg/kg, Fa. Deltaselect) mittels subkutaner (s.c.) Injektion einer Mischspritze durchgeführt. Um Auskühlung zu verhindern werden die Tiere während der Operation auf einer Wärmeplatte (36°C, Fa. Horn) gelagert, die Augen werden dabei mit Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen®-Augensalbe, Fa. Bayer) sowie einem Mullverband um den Kopf geschützt. Die Temperatur wird rektal mit einem Fieberthermometer überwacht. Ebenso werden die Tiere mit Pulsoximetrie (Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz, Fa. Ohmeda) überwacht. Sie erhalten je

nach Bedarf 100%igen Sauerstoff zur Atemluft hinzu. Die Operationen erfolgen in Linksseitenlagerung. Nach Narkotisierung wird die rechte Schulter-Arm-Region sowie der rechte Brust- sowie Unterarmbereich elektrisch rasiert (Rasierapparat, Fa. Aesculap) und desinfiziert (Cutasept®, Fa. Bode). Die sterile Abdeckung erfolgt mit einem Lochtuch, mit dem die Schulter-Arm-Region ausgespart wird.

In der ersten Operation (OP1) erfolgt die Durchtrennung der Supraspinatussehne. Die Hautinzision erfolgt mit einem Skalpell (Nr. 15) 1,5-2cm über der kranialen Scapula. Der M.deltoideus wird knapp unter dem Akromion stumpf auseinander gedrängt, danach folgt die Darstellung des M.supraspinatus, der Sehne sowie des Humeruskopfes. Die Sehne wird nach Darstellung mit einem feinen Skalpell (Scalpel No.11, Feather®) ansatznah abgetrennt und mit einem nichtresorbierbaren, monofilen Faden (Prolene 5-0, Fa. Ethicon) angeschlungen. Dabei wird ein Knoten und ca. 5mm Faden belassen, um ein späteres Wiederauffinden zu ermöglichen. Abschließend wird mit resorbierbaren Faden (Vicryl 4-0, Fa. Ethicon) der M.deltoideus mit einer Einzelkopfnah und die Haut mit einer Subkutannaht verschlossen. Zusätzlich wird ein wasserdampfpermeabler Sprühverband (Opsite®, Fa. Smith&Nephew) aufgetragen.



Abb.9 Mit Prolene 5-0 angeschlungene Supraspinatussehne, Blick auf den eröffneten Subakromialraum

In der zweiten Operation (OP2) wird die Supraspinatussehne rekonstruiert, sowie das Biogel appliziert. Es wird der Zugang aus der ersten Operation verwendet, der Deltamuskel für eine verbesserte Übersicht jedoch T-förmig gespalten. Die Supraspinatussehne wird am Humeruskopf mit einer transossären Naht (Prolene 5-0, Fa. Ethicon) fixiert. Der Ansatzbereich der Sehne wird dabei mit dem jeweiligen Biogel (siehe 3.2) versorgt. Die Applikation des Gels erfolgt über eine vorbereitete Einmalspritze. Der Verschluss der Operationswunde erfolgt wie bei der Voroperation (OP1).



Abb.10 Gel im Subakromialraum, M. deltoideus T-förmig eröffnet mit vorgelegten Fäden.

3.4 DATENGEWINNUNG

3.4.1 HISTOLOGIE

Post mortem erfolgt die Entnahme des Humeruskopfes einschließlich Humerusschaft und des M. supraspinatus. Danach wird die Sehne insertionsnah am Humerus abgesetzt und der Muskelbauch aus der Fossa supraspinata abpräpariert.

Die gewonnenen Präparate werden in nummerierten Einzelgefäßen in 4%iger Formalinlösung zur histologischen Aufbereitung geschickt. Die paraffinierten Präparate werden in 5µm dicke Scheiben geschnitten. Die Einfärbung erfolgt mittels Hämatoxylin/Eosin-, PAS-Färbung sowie Immunhistochemie. Die qualitative histologische Untersuchung zur Ermittlung des MOVIN-Scores

erfolgt verblindet durch den Pathologen. Dabei werden mittels digitaler Mikroskopie (Leica Microsystems, Jena, Germany) und digitaler Fotografie (Digital Kamera System, Nikon Inc, Duesseldorf, Germany) standardisierte Bilder aufgenommen und analysiert.

3.4.2 BIOMECHANIK

Der Humerus wird zusammen mit dem M.supraspinatus vom Schulterblatt abgesetzt. Die Supraspinatussehne wird von überschüssigem Muskelgewebe gesäubert. Die Humerusdiaphyse wird knapp oberhalb der distalen Epiphyse abgetrennt und von Gewebsresten befreit. Im angewendeten Versuchsaufbau wird der Humerusschaft samt M.supraspinatus ohne Einbettung verwendet. Die Sehne wird dabei durch eine Schlitzplatte aus Aluminium geführt, an die sich der Humerus mit der Epiphyse abstützt und selbstständig ausrichtet. Hierbei wird die Sehne in einem Winkel parallel zur Humerusschaftachse ausgerissen. Die Fixierung der Sehne erfolgt wie oben beschrieben in einer „CryoClamp“, die aus zwei profilierten Metallplatten mit Reservoir für Flüssigstickstoff besteht. Diese wird in der Testmaschine an der Einspannvorrichtung fixiert.

Die Sehne wird mit einer Vorkraft von 0,1 N eingespannt. Zuerst wird sie dynamisch in Zyklen präkonditioniert, mit einer Geschwindigkeit von 0,2mm/min wird sie von 0,1N bis 0,5N belastet.

Nach einer 5 sec. Ruhepause wird die Sehne dann bis zum Versagen getestet.

In Vorversuchen wurden dabei die Kraftkurven evaluiert, und so die richtige Menge an Stickstoff ermittelt, bei der die Sehnen weder im ganzen Verlauf gefroren sind, noch aus der Fixierung rutschen.

Zur Testung wird eine elektrisch gesteuerte, universelle Prüfmaschine, Modell Nr. 1120 der Firma Zwick/Roell (**Zwick GmbH & Co. KG**, August-Nagel-Str. 11, D-89079 Ulm) verwendet. Dabei wird die Software testXpert® eingesetzt um die entstandenen Kraftkurven zu vermessen sowie zu speichern.

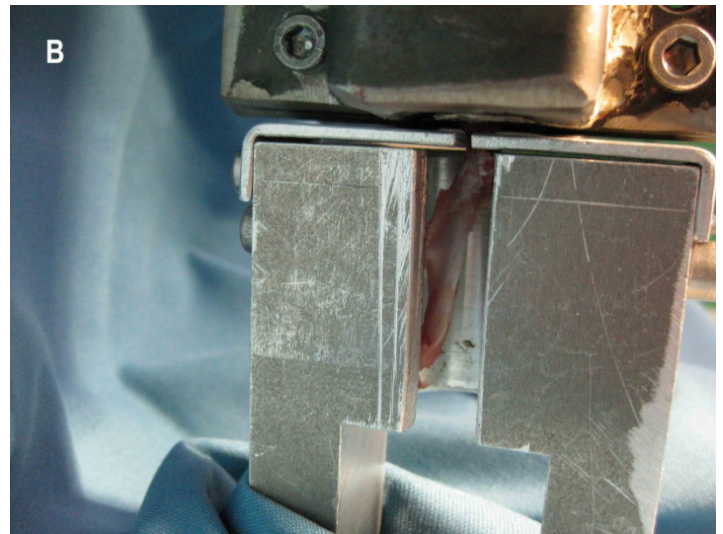
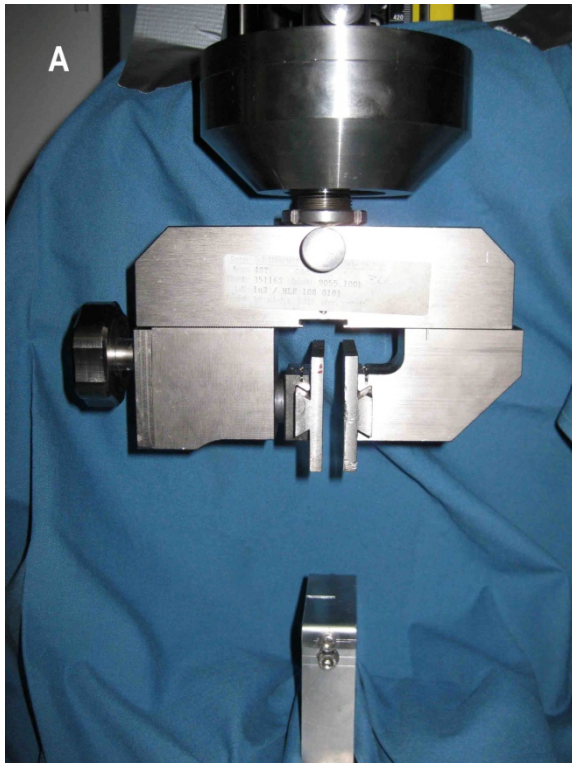


Abb.11 Biomechanischer Testaufbau: A) Kugelgelagerte Einspannvorrichtung zur Kraftmessung
 B) Rattenhumerus im Testaufbau: Die Supraspinatussehne ist durch die Schlitzplatte geführt und oberhalb in der CryoClamp eingespannt

3.4.3 SEROLOGIE

Für die Bestimmung der systemischen Freigabekinetik werden bei der Gruppe mit der höchsten G-CSF-Konzentration und in der Kontrollgruppe postoperativ Blutentnahmen vorgenommen. An den Tagen 2,5 und 8 werden unter inhalativer Kurznarkose mittels Isofluran jeweils 2µl Blut aus der Vena subclavia der Gegenseite entnommen. Zur Bestimmung des Plasma G-CSF-Spiegels wird das ELISA-Kit „Quantikine Human G-CSF Kit“ von R&D Systems verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1 RÜCKBLICK PHASE I UND II

In Phase I wurden die Auswirkungen sowie die Heilungsantwort der Supraspinatussehne nach standardisierter Durchtrennung im Rattenmodell untersucht. Es wurden operativ Defekte in der Supraspinatussehne von 45 Sprague-Dawley Ratten gesetzt. Nach 3, 6 und 9 Wochen wurden die Ratten euthanasiert und die Sehnen histologisch untersucht. In der Kohorte, die nach 3 Wochen untersucht wurde, zeigte sich die größte Anzahl an persistierenden Defekten (80%), eine geringgradige Atrophie sowie häufig eine Infiltration mit Entzündungszellen (S. Buchmann, et al., 2011, p. 431).

Der Zeitpunkt von 3 Wochen nach Defektbeibringung wurde als Modell ausgewählt, weil er der chronischen Supraspinatussehnenruptur beim Menschen am ehesten entspricht.

In der Phase II wurden Osmosepumpen (Fa. Alzet Modell 2004) angewandt, um die Wachstumsfaktoren bFGF sowie G-CSF einzeln und in Kombination über einen dünnen Silikonschlauch direkt in den Subakromialraum zu leiten. Die Wachstumsfaktoren wurden so über ca. 14 Tage stetig abgegeben. Es zeigte sich sowohl in der G-CSF als auch in der bFGF-Gruppe ein niedrigerer (besserer) MOVIN-Score, sowie ein höheres Verhältnis von Kollagen I zu III in der bFGF- sowie bFGF + G-CSF-Gruppe. Beide Wachstumsfaktoren führten zu einem besseren Sehnen-Remodelling, was zu weiteren Versuchen motivierte.

Die Osmosepumpe ist für den Einsatz am Menschen jedoch nur eingeschränkt geeignet, da neben der Implantation des Reservoirs mit Folgeoperation eine hohe Dislokationsrate von 33% im Tierversuch beobachtet wurde (S. Buchmann, et al., 2013, p. 304). Ziel der nächsten Phase des Tierversuchs war es, einen neuen, geeigneten Applikationsweg zu finden, der in Funktion und Ergebnis die Osmosepumpe übertrifft.

In der Phase III erfolgte nun die Anwendung der Biogele mit Wachstumsfaktoren wie oben beschrieben.

4.2 PHASE III

4.2.1 MAKROSKOPISCH

Bei den operierten Sehnen tritt regelmäßig eine diskrete bis teils starke Hypertrophie an Sehne und Kapsel auf. Hierbei lässt sich jedoch makroskopisch kein Unterschied zwischen Placebo und Behandlungsgruppen erkennen. Nach der biomechanischen Testung kam es bei den gesunden Sehnen der Gegenseite regelmäßig zur intratendinös lokalisierten Ruptur (in 18/18 Fällen). Die Sehnen der

Interventionsgruppen versagten nahezu immer an der Insertionsstelle der Sehne am Humeruskopf (in 15/18 Fällen).

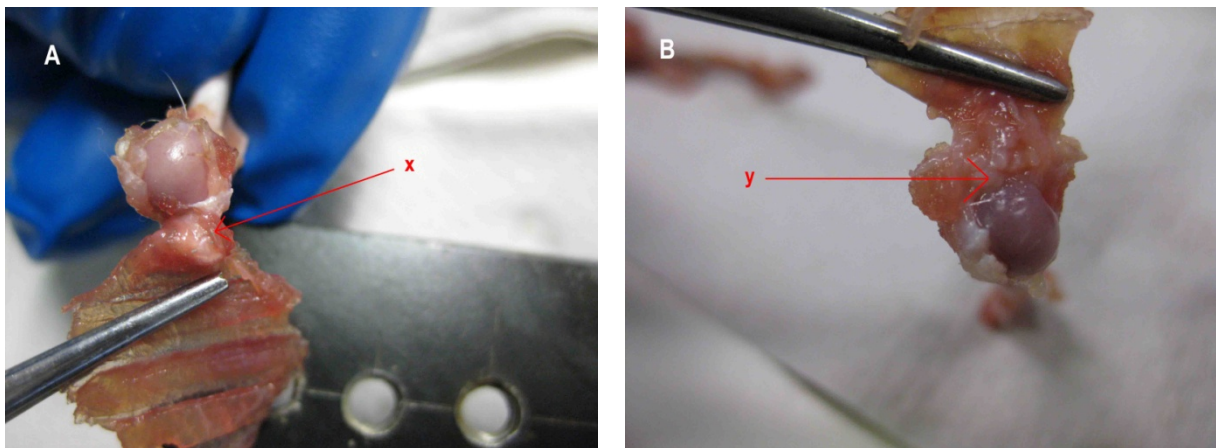


Abb.12 Rupturlokalisation: A) intratendinöse Diskontinuität erkennbar (x) B) Ruptur an Entese mit starker Hypertrophie (y)

4.2.2 HISTOLOGISCH

Zur histologischen Evaluation wird der semiquantitative MOVIN-Score von Longo & Maffulli verwendet, der die histologischen Schnitte nach Faserstruktur und -anordnung, Zellkernabrundung, Zellularitätsvariation, Hypervaskularität und Hyalinisierung beurteilt. Dabei wird den einzelnen Unterkategorien sowie dem Gesamtscore eine Wertung von 0 bis 3 (bzw. 0 bis 12 für den Gesamtscore) zugeordnet (dabei entspricht 0 = normal, 1 = leicht anormal, 2 = anormal, 3 = deutlich anormal). Der MOVIN-Score ist in der Literatur etabliert, um histopathologische Unterschiede z.B. nach Sehnenrupturen zu erkennen (Maffulli, Barrass, & Ewen, 2000, p. 860; Maffulli, Longo, Franceschi, Rabitti, & Denaro, 2008, p. 1606). Die Bewertung wird von zwei unabhängigen Untersuchern (Dr. med Lars Walz und PD Dr. med Achim Battmann) am Pathologischen Institut in Bad Homburg vorgenommen.

In der Immunhistochemie wurde mittels monoklonalen Antikörpern der Gehalt der behandelten Sehnen und der Gegenseite an Kollagen I und Kollagen III untersucht. Dabei wurde jeweils in sechs mikroskopisch vergrößerten Ausschnitten des Sehnenquerschnittes die Färbungsintensität analysiert. Zur Auswertung wurde eine semiquantitative Bewertung von 0 (keine Färbung) bis 3 (intensive Färbung) angewendet.

4.2.2.1 HE - PAS Färbung

HE- und PAS-Färbungen werden standardmäßig vorgenommen. Sie dienen als Grundlage der histologischen Bewertung sowie zur Berechnung des MOVIN-Score.

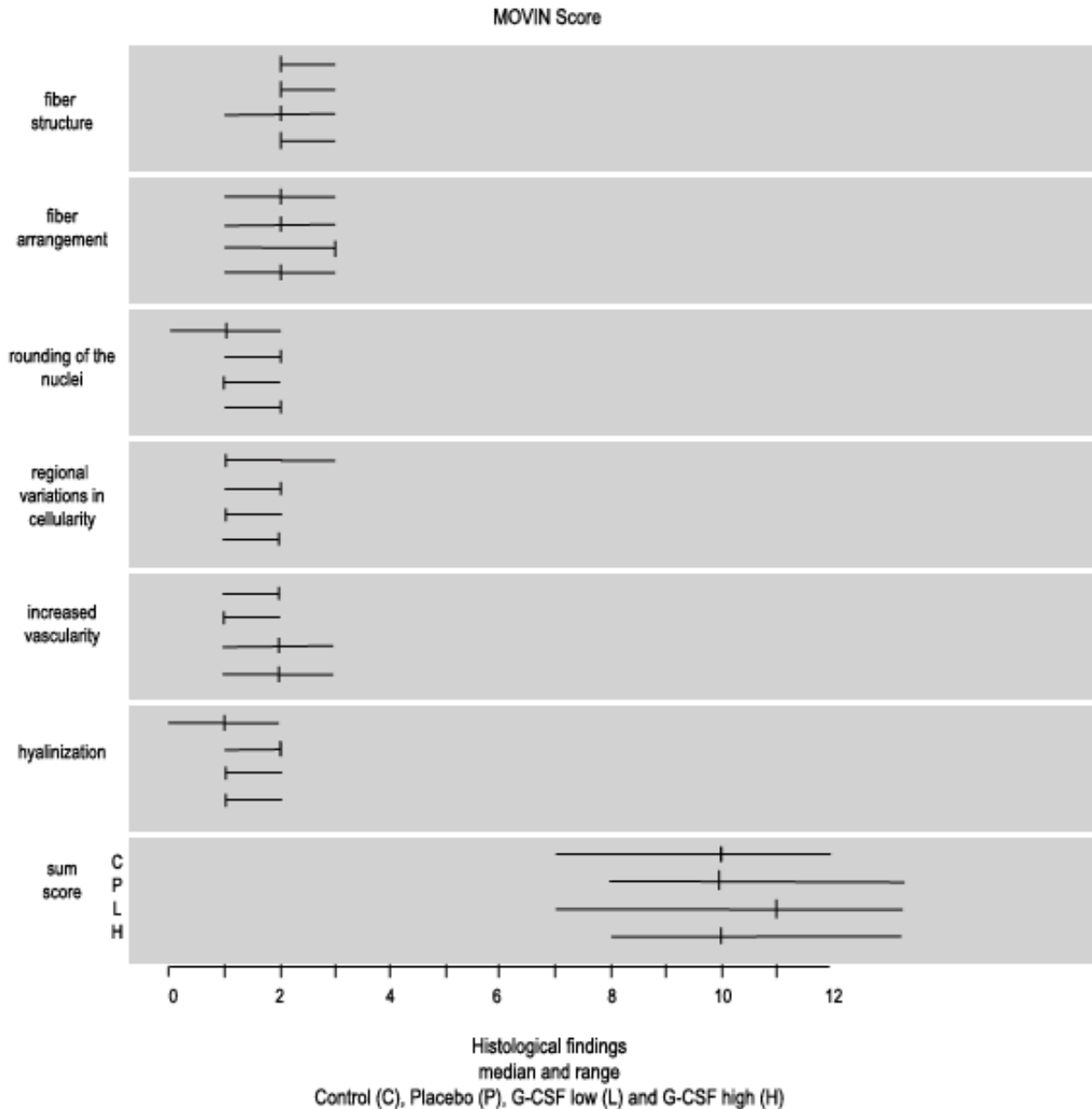


Abb.13 MOVIN-Score: Median und Spannweite von Unterkategorien sowie Gesamtscore

Die Grafik stellt die Mediane und Spannweiten der einzelnen Untergruppen des MOVIN-Score (Faserstruktur, Faseranordnung, Zellkernabrundung, Zellularitätsvariation, Vaskularisierung, Hyalinisierung) sowie des Gesamtscores dar. Die statistische Analyse der Einzelgruppen durch einen

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test zeigte eine signifikante Verminderung der Zellularitätsvariation von G-CSF Low gegenüber Placebo ($p=0,009$) sowie von Placebo gegenüber Kontrolle ($p=0,041$). Auch zeigte die Placebo-Gruppe eine signifikant höhere Hyalinisierung als die Kontrolle ($p=0,021$). Die beiden Interventionsgruppen dagegen unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe.

In Bezug auf die Faserstruktur, Fasernanordnung sowie den Gesamtscore zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

4.2.2.2 Immunhistochemie

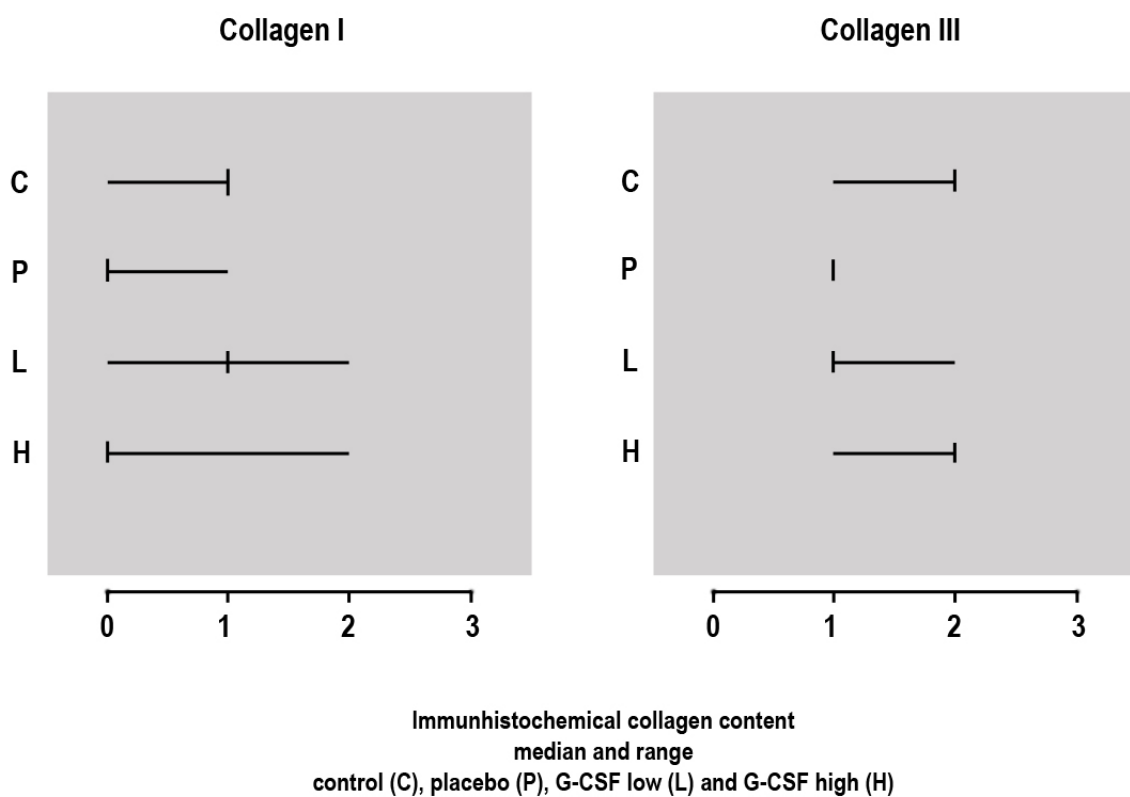


Abb.14 Immunhistochemie: Median und Spannweite des Kollagen I / III – Gehalts

Die Grafik zeigt den mittels Immunhistochemie ermittelten Gehalt an Kollagen I und III der untersuchten Sehnen an. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde zur statistischen Auswertung verwendet. Es zeigte sich ein Trend eines niedrigeren Gehalts an Kollagen I von Placebo gegenüber Kontrolle ($p=0,056$). Die Interventionsgruppen unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe oder Placebo.

Der Gehalt an Kollagen III war signifikant niedriger in der Placebo- ($p=0,003$) sowie G-CSF Low-Gruppe ($p=0,035$) gegenüber der Kontrolle. Die G-CSF High-Gruppe zeigte dagegen einen signifikant höheren Gehalt an Kollagen III im Vergleich zu Placebo ($p=0,004$) sowie einen schwach signifikant höheren Gehalt gegenüber G-CSF Low($p=0,053$).

Es zeigt sich also, dass die Applikation von G-CSF in niedriger Dosierung zu einem ähnlichen Gehalt an Kollagen I wie in der nativen Kontrollgruppe führt und dabei gleichzeitig der Gehalt an Kollagen III niedriger ist.

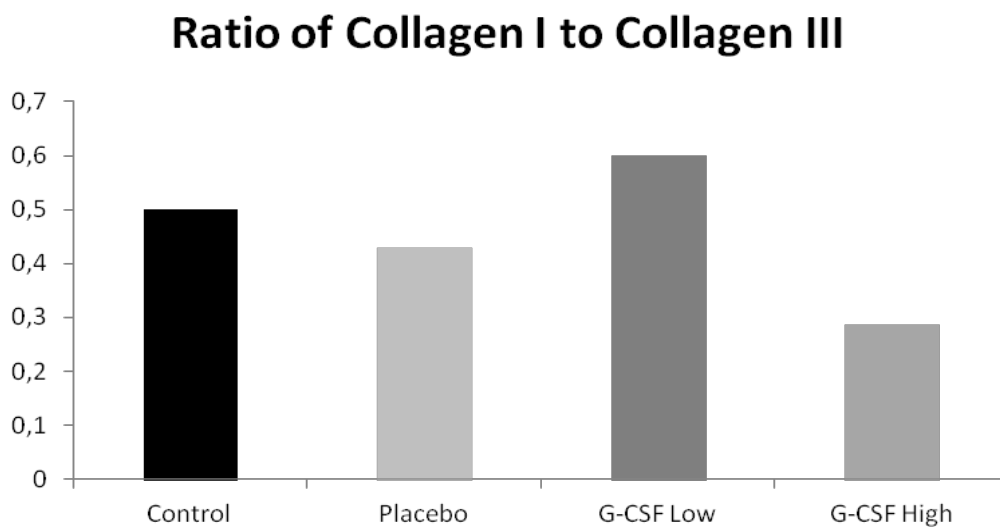


Abb.15 Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III

Das Verhältnis des Gehalts an Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III ist in der niedrigen G-CSF Low Gruppe mit $r = 0,6$ am höchsten, sogar höher als in der gesunden Kontrollgruppe ($r = 0,5$). Die Placebo ($r = 0,42$) und G-CSF High ($r = 0,29$) Gruppe besitzt im Verhältnis deutlich weniger Kollagen Typ I.

4.2.3 BIOMECHANISCH

Mit dem unter 3.4.2 beschriebenen Aufbau wurden die Sehnen auf ihre maximale Reißfestigkeit sowie Steifheit untersucht. Aus den erhobenen Daten wurden in Excel sowie SPSS die Mittelwerte, Standardabweichungen, Varianzen der einzelnen Gruppen (G-CSF High, G-CSF Low, Placebo sowie Kontrolle), sowie innerhalb der Gruppen bei jedem Tier im Vergleich zur gesunden, nichtoperierten Gegenseite berechnet.

Reißfestigkeit (N)

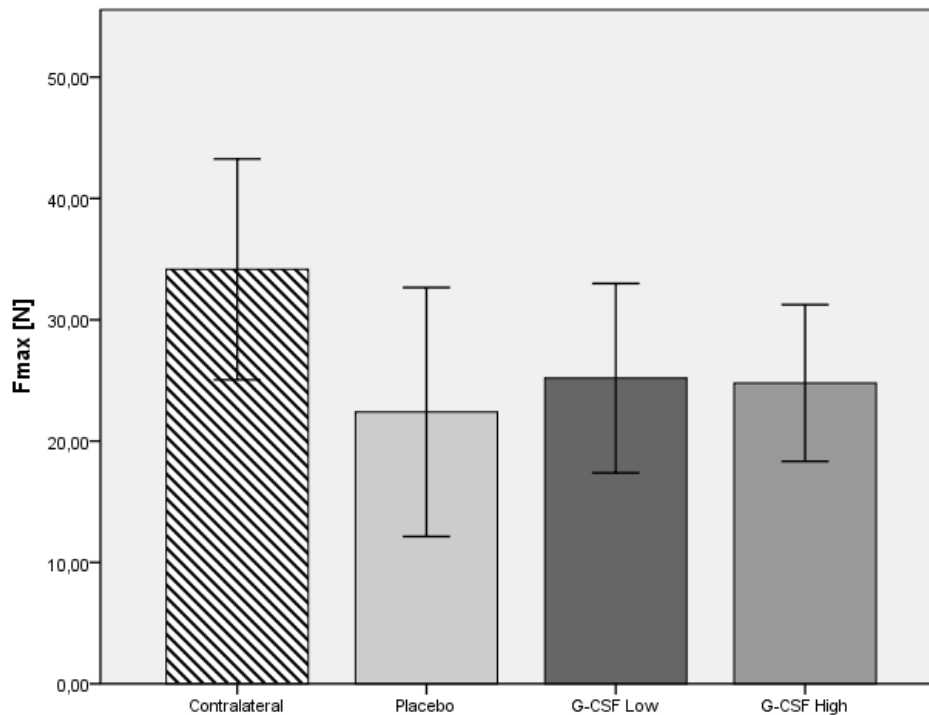


Abb.16 Biomechanisch ermittelte Reißfestigkeit

Es zeigt sich bei den Sehnen, die mit G-CSF behandelt wurden eine leicht erhöhte Reißfestigkeit beim Load-to-Failure Test im Vergleich zu Placebo ($F=26,7\text{N}$ bzw. $F=24,8\text{N}$ gegenüber $F=21,4\text{N}$). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Reißfestigkeit der gesunden Kontrollsehnen ($F=34,15\text{N}$) wurde erwartungsgemäß von keiner Gruppe übertroffen.

Um bei der limitierten Anzahl an Versuchstieren exaktere Ergebnisse zu erzielen, wurden innerhalb der Gruppen die Sehnen jeder Ratte, d.h. die operierte gegenüber der gesunden Kontrollseite des gleichen Tieres, gegenübergestellt. Die Kraftdifferenz zwischen gesunder sowie operierter Seite zwischen den einzelnen Tieren zeigt, dass zwischen den einzelnen Ratten sehr wohl geringe morphologische Unterschiede bestehen, die jedoch symmetrisch gleich ausgeprägt sind.

Differenz der Reißfestigkeit (N)

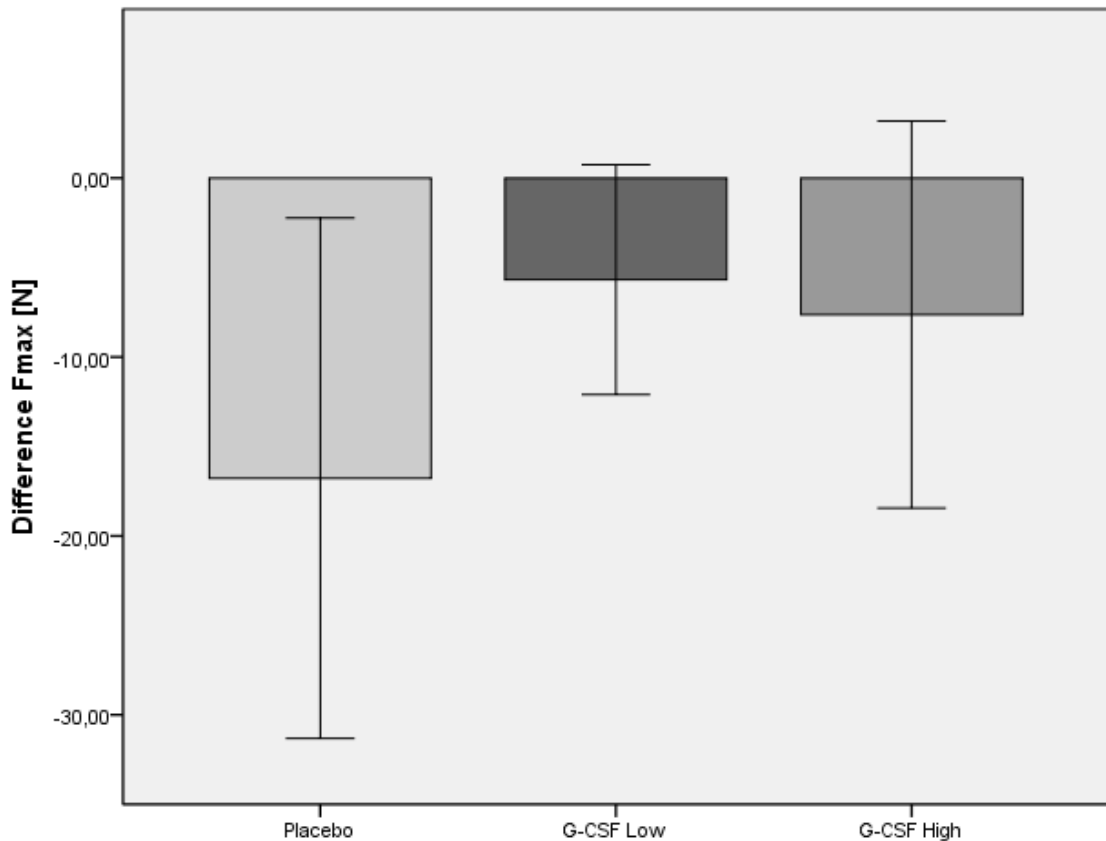


Abb.17 Differenz der Reißfestigkeit im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite

Es zeigt sich, dass G-CSF High ($d=7,63$ N) sowie G-CSF Low ($d= 5,68$ N) deutlich geringere Kraftdefizite zur Gegenseite aufweisen als Placebo ($d= 16,78$ N). Prozentual ausgedrückt behielten die mit G-CSF behandelten Gruppen 80,39% bzw. 81,62 % ihrer Reißfestigkeit gegenüber der Placebo-Gruppe mit 62,71%, die Unterschiede waren jedoch nicht hoch signifikant.

Gruppe	Kraft [N]	Kraftdefizit zur Gegenseite [N]	Diff. Kraft zur Gegenseite in Prozent [%]
Kontrolle	34,15	---	---
Placebo	21,40	-16,78	62,71
G-CSF High	24,78	-7,63	80,39
G-CSF Low	26,70	-5,68	81,62

Tab.3 Kraftwerte sowie Defizite der biomechanisch getesteten Sehnen

Steifheit (N/mm)

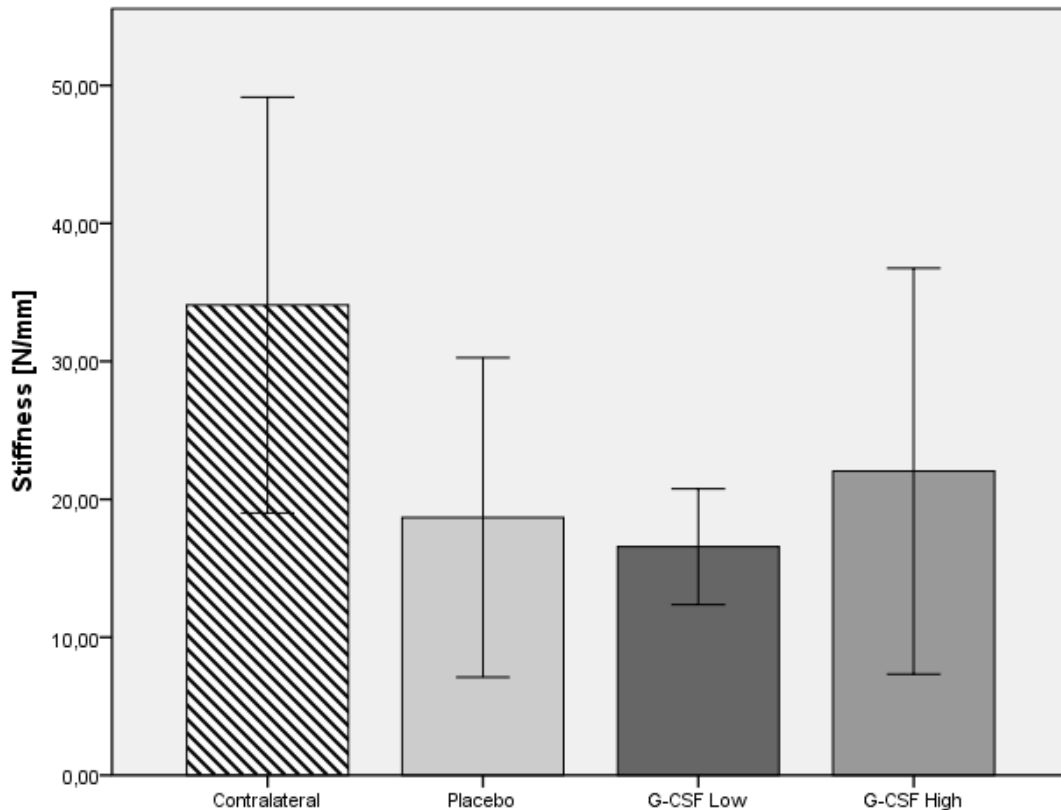


Abb.18 Biomechanisch ermittelte Steifheit

Die Steifheit (= Stiffness) wurde mittels der testXpert®-Software ermittelt, indem die Kraft in Newton durch die Wegdifferenz zwischen Beginn und Ende des Versuches geteilt wurde. Die operierten Sehnen wiesen eine geringere Steifigkeit als die Kontrollsehnen ($S=34,08$ N/mm) auf. Die mit G-CSF Low behandelten Sehnen hatten eine mit $S=16,57$ N/mm geringere Steifigkeit als Placebo mit $S=18,68$ N/mm. Die G-CSF High Gruppe besaß eine größere als Placebo ($S=22,04$ N/mm). Beide Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p=0,69$ bzw. $p=0,60$).

Als zweite statistische Auswertung wurde die Differenz der Steifigkeit zur gesunden Gegenseite berechnet, um in den kleinen Versuchsgruppen interindividuelle Unterschiede besser auszugleichen.

Differenz der Steifheit (N/mm)

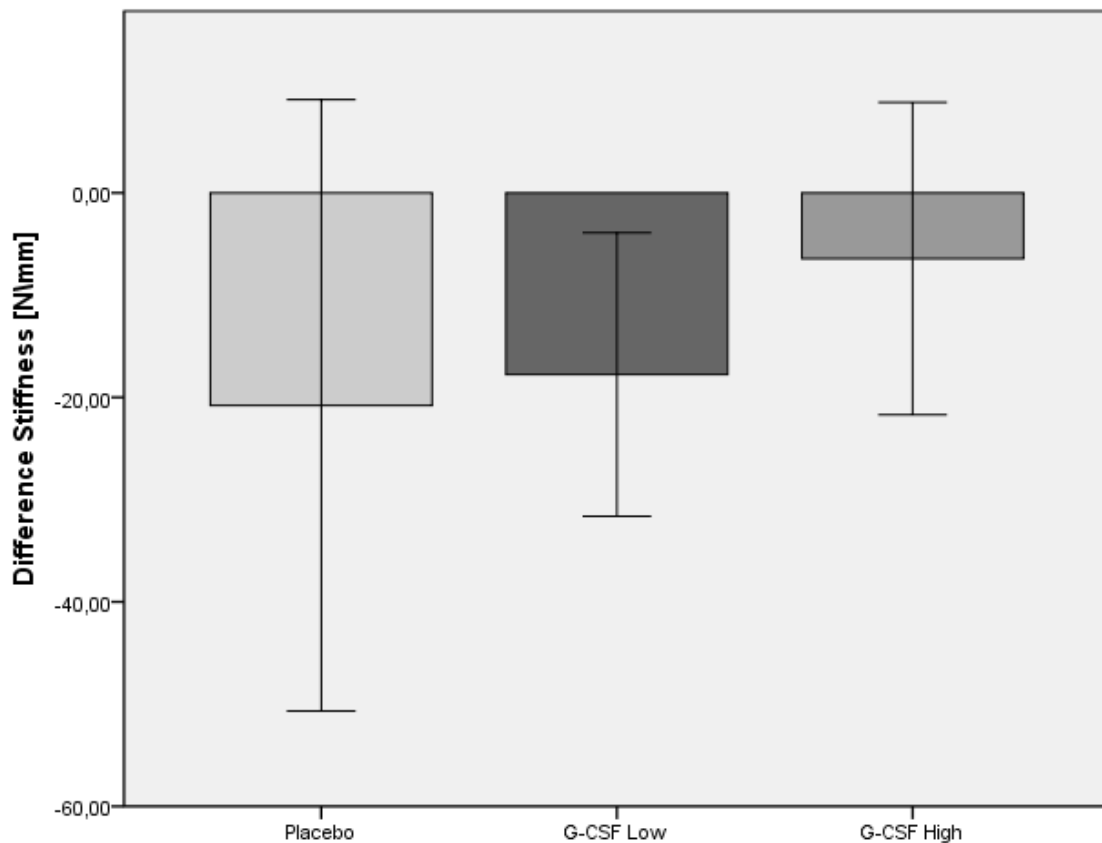


Abb.19 Differenz der Steifheit zur unbehandelten Gegenseite

Während bei der Placebo-Gruppe die Steifheit durchschnittlich um $S=20,78\text{N/mm}$ von operierter zur Gegenseite geringer war, war diese bei der G-CSF Low Gruppe um $S=17,76\text{N/mm}$ und bei der G-CSF High Gruppe nur um $S=6,43\text{N/mm}$ geringer. Es wurde jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Gruppe	Stiffness [N/mm]	Differenz zur Gegenseite [N/mm]	Diff. Stiffness zur Gegenseite in Prozent
Kontrolle	34,08	---	---
Placebo	18,68	20,78	47,34
G-CSF High	22,04	6,43	77,41
G-CSF Low	16,57	17,76	48,27

Tab.4 Steifheit sowie Defizite der biomechanisch getesteten Sehnen

4.3 EVALUATION DER BIOGELE

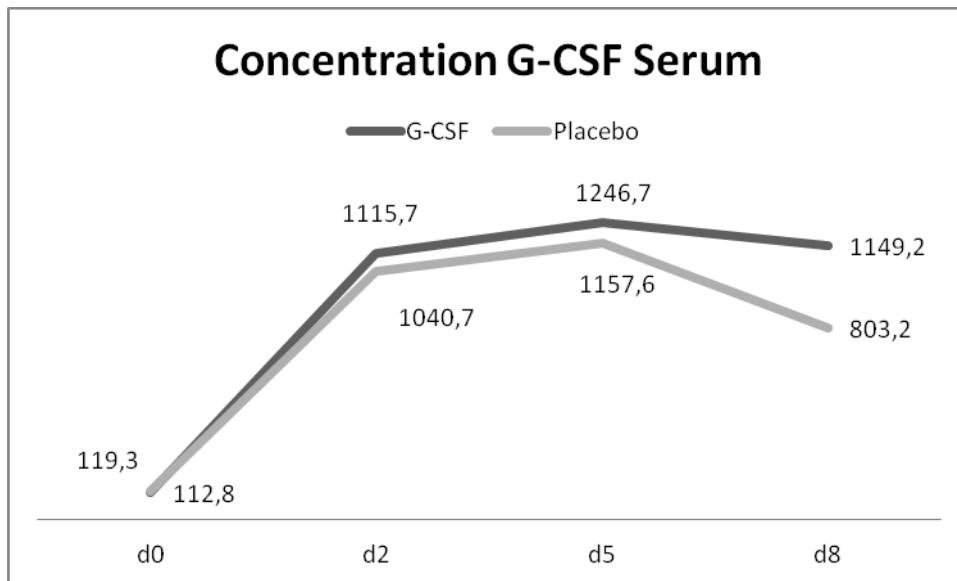


Abb. 20 Serumspiegel von G-CSF

Die Konzentration des Wachstumsfaktors G-CSF im Serum wurde mittels ELISA-Immunoassay - wie im Methoden-Teil beschrieben - ermittelt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des venösen Serumspegels zwischen G-CSF und Placebo.

Der gezeigte Anstieg von beiden Gruppen von Tag 0 bis Tag 5 lässt sich auf die Operation bzw. das zugefügte Trauma zurückführen.

4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Histologisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des MOVIN-Gesamtscore. Die Analyse der Untergruppen ergab für die mit G-CSF behandelten Sehnen eine geringere Zellularitätsvariation als Placebo ($p=0,009$) sowie eine höhere Hyalinisierung von Placebo im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,041$), die bei den Interventionsgruppen nicht beobachtet wurde. Der Kollagengehalt von Placebo war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, in der G-CSF Low Gruppe war hingegen nur der Gehalt an Kollagen III erniedrigt, wodurch sich das Verhältnis von Kollagen I zu III auf $r=0,6$ erhöhte (Kontrolle $r=0,5$, Placebo $r=0,42$). Die G-CSF High Gruppe zeigte einen signifikant erhöhten Kollagen III-Gehalt, was zu einem niedrigerem Verhältnis von Kollagen I zu III führte ($r=0,29$).

Bei der biomechanischen Testung wiesen die mit G-CSF behandelten Sehnen eine höhere (nicht signifikante) Reißfestigkeit als die Placebo-Gruppe auf (25,2N bzw. 24,8N gegenüber 22,4N). Beim

Vergleich mit der gesunden Gegenseite erreichten die Gruppen mit G-CSF 81,7% bzw. 80,4% der Reißfestigkeit, wohingegen die Placebogruppe nur 62,7% erreichte. Die Steifheit der Sehne betrug für G-CSF high 78,3%, für G-CSF low 54,1% und für Placebo 62,7% der Gegenseite.

Es konnten keine negativen Auswirkungen des angewendeten Phospholipidgels auf Histologie oder Biomechanik der Sehnen festgestellt werden.

Serologisch wurden zu jedem Zeitpunkt höhere venöse Plasmaspiegel vom applizierten Wachstumsfaktor G-CSF gefunden. Die Unterschiede waren bis Tag 8 jedoch nicht signifikant.

5. DISKUSSION

5.1 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Applikationsweise der wachstums- oder differenzierungsfördernden Substanzen hat in der Versorgung der Rotatorenmanschettenruptur eine entscheidende Bedeutung, wie vorher dargestellt wurde. Die beiden grundlegenden Anforderungen an das Trägermaterial sind die Bereitstellung der Substanz für einen adäquaten Zeitraum während der Heilungsphase sowie die Biokompatibilität des Trägermaterials, um negative Effekte wie Entzündungsreaktionen vorzubeugen. Weiterhin sollten Anwendung, Haltbarkeit und Verfügbarkeit im klinischen Bereich möglich sein.

Wir wendeten erstmals das von Tian et al. entwickelte Phospholipidgel in vivo im Tierversuch an. Es konnte sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch in der histologischen Untersuchung mittels MOVIN-Score kein signifikanter Unterschied zwischen den Schultern mit und ohne Placebo-Gelapplikation festgestellt werden. Es lässt sich daraus schließen, dass das Gel keine negativen Auswirkungen auf das Sehngewebe ausübte. Diese exzellente Biokompatibilität wird bei anderen Materialien nicht immer beobachtet. Je nach Material können Fremdkörper- oder Immunreaktionen nach Applikation/Implantation von Biomaterialien entstehen. Der Einfluss dieser Reaktion auf die Sehnenheilung wurde bisher noch nicht untersucht, es ist jedoch anzunehmen, dass ein weniger biokompatibles Material negativ auf die lokalen Heilungsvorgänge wirkt.

Die Bereitstellung des G-CSF ließ sich im Tierversuch an Ratten schwer quantifizieren. Es ist davon auszugehen, dass sich die in vivo Freisetzung des Wirkstoffes von der in vitro Freisetzung unterscheidet, da sie hauptsächlich auf Erosion beruht. Die Bewegung, Reibung und Temperatur im operierten Gelenk daher einen Einfluss auf die Freisetzung des Wirkstoffes haben. Der durchgeführte ELISA-Immunoassay ermittelte die Konzentration des Wachstumsfaktors im venösen Blut an den Tagen 0,2,5 und 8 nach Operation. Der auch in der Placebogruppe beobachtete Anstieg ist durch das Operationstrauma sowie die körpereigene Heilungsantwort erklärbar. Im venösen Blut der G-CSF High Gruppen zeigte sich dabei ein höherer Plasmaspiegel zu jedem Zeitpunkt, der jedoch nicht

signifikant erhöht war. Die Differenz zwischen Placebo- und G-CSF wurde zunehmend größer bis zum achten Tag. Somit besteht die Möglichkeit, dass die erhöhten Plasmaspiegel von einer systemischen Aufnahme des Wachstumsfaktors verursacht wurden; dieser Unterschied wäre evtl. mit zunehmender Zeit noch größer geworden, da in den Interventionsgruppen weiterhin G-CSF ins Gelenk abgegeben wurde, in der Placebogruppe nach Abklingen des Operationstrauma jedoch der Plasmaspiegel voraussichtlich absinkt. Eine weitere Blutentnahme zu einem späteren Zeitpunkt war ethisch nicht möglich, da die benötigte Mindestmenge für den ELISA-Immunoassay bei den Versuchstieren zu einem kritischen Blutverlust geführt hätte.

Die bewiesene Biokompatibilität sowie die stabile Freisetzung des Wachstumsfaktors, zusammen mit der einfachen Anwendung und Herstellung machen dieses Phospholipidgel zu einer viel versprechenden Lösung für die Applikation von G-CSF und anderen Substanzen im klinischen Umfeld.

Die Reißfestigkeit einer Sehne ist von ihrem Querschnitt (Quantität) sowie ihrer Zusammensetzung (Qualität) abhängig. Beide Faktoren sollten in einem Gleichgewicht stehen, wobei in der natürlichen Sehnenheilung zuerst eine Phase der Produktion, d.h. des Narbenstadiums mit erhöhter Zellularität, im Vordergrund steht, und in den folgenden Wochen bis Monaten der qualitative Umbau stattfindet.

Bei in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten wir makroskopisch keinen Unterschied zwischen Therapie- sowie Placebogruppe in Bezug auf den Sehnenquerschnitt feststellen. Eine exakte Messung des Querschnitts wäre interessant, da man in Kombination mit der absoluten Reißfestigkeit (F/mm²) eher zwischen einer Neubildung minderwertigen Narbengewebes oder eines qualitativ guten Sehngewebes unterscheiden könnte. Dies erwies sich aber aufgrund der gering ausfallenden Unterschiede und auch bei der kleinen Anatomie der Rattenschulter als unmöglich. Dazu müssten eine genaue Messmethode sowie eine entsprechend hohe Anzahl an zusätzlichen Versuchstieren gewährleistet sein, um auch diese Frage beantworten zu können.

Für die qualitative Bewertung der Sehne wurde besonders Wert auf die histologischen Ergebnisse gelegt. Der angewendete MOVIN-Score ist gut geeignet um die Sehnenqualität abzubilden (siehe 4.2.2). Die G-CSF Low-Gruppe zeigte dabei eine verminderte Zellularitätsvariation als Placebo. Zusätzlich zeigt die Placebo-Gruppe eine erhöhte Hyalinisierung im Vergleich zu den Interventionsgruppen. Longo et al. zeigten 2008 mit histopathologischen Untersuchungen, dass sich rupturierte bzw. degenerativ veränderte Supraspinatussehnen in jedem der einzelnen Items des MOVIN-Scores im Vergleich zu gesunden Sehnen unterscheiden (Longo, et al., 2008). Die mit G-CSF Low behandelten Sehnen zeigen histopathologisch also eine bessere Struktur, die einer gesunden

Sehne ähnlicher ist als die Sehnen der Placebo-Gruppe. Es lässt sich also feststellen, dass G-CSF die Differenzierung des Sehnengewebes beschleunigte oder verbesserte.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Menge sowie das Verhältnis der unterschiedlichen Kollagentypen im Sehnengewebe. Ein hoher Anteil an Kollagen Typ I spricht für eine qualitativ hochwertige Sehne (siehe Absatz 4.2.2).

In beiden Behandlungsgruppen ließ sich ein Trend zu mehr Kollagen I und III zeigen, in der G-CSF low Gruppe war zudem das Verhältnis zugunsten Kollagen I verschoben. Riley et al. zeigten, dass bei Tendinopathien der Rotatorenmanschette der Gesamtgehalt an Kollagenen vermindert ist, sowie bei den Supraspinatussehnen des Patientenkollektivs in 82% der Fälle ein erhöhter Gehalt an Kollagen III zu beobachten war (Riley, et al., 1994b, p. 362). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Samiric et al. beobachtet; in humanen Patellarsehnen mit Zeichen einer Tendinopathie waren Kollagen I und Fibromodulin vermindert, während Kollagen III sowie Vesican erhöht waren. (Samiric, et al., 2009, p. 233). Kollagen III wird besonders in frühen Phasen der Wundheilung im Verhältnis vermehrt produziert, und dann sukzessive durch Kollagen I ersetzt. Das erhöhte Verhältnis von Kollagen III / I kann jedoch noch Monate nach Verletzungen persistieren und/oder ein insuffizientes Remodelling der Sehne darstellen. Das vermehrte Gesamtkollagen beider Interventionsgruppen, sowie besseres Verhältnis von Kollagen I / III in der G-CSF Low Gruppe spricht für eine schnellere bzw. bessere Sehnenheilung unter G-CSF.

Die Reißfestigkeit der Sehne wurde biomechanisch geprüft. Hierbei zeigte sich der Trend zu einer höheren Reißfestigkeit der Sehnen unter G-CSF-Applikation gegenüber Placebo, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Da zwischen den einzelnen Versuchstieren eine gewisse Varianz in Größe und Gewicht bestand, wurde die Reißfestigkeit bei jedem Tier zusätzlich in Bezug zu der gesunden, nichoperierten Schulter gesetzt. Dabei verstärkte sich der Trend zu einer höheren Reißfestigkeit der beiden Interventionsgruppen gegenüber Placebo (mit einem Defizit von 7,63N bzw. 5,68N von G-CSF high bzw. G-CSF low gegenüber einem Defizit von 16,78N zur gesunden Seite in der Placebo-Gruppe). Aufgrund einer großen Varianz wurde jedoch auch hier kein hohes Signifikanzniveau erreicht.

Die Ergebnisse werden zusätzlich entscheidend vom Zeitpunkt der Euthanasie sowie der Dosis des applizierten Wachstumsfaktors beeinflusst. In unserer Vorstudie wurde ein Zeitpunkt von 6 Wochen nach der Operation für die Euthanasie gewählt, da die Sehne im Vergleich zu 3 Wochen postoperativ weniger Entzündungszeichen sowie eine gewisse Heilung (Defektdeckung in 12/15 Fällen) aufweist und somit als guter Vergleichspunkt der Sehnenheilung dient (S. Buchmann, et al., 2011, p. 432). In einer ähnlichen Arbeit am Rattenmodell von Dines et al. zeigte sich der Zeitpunkt von 3 Wochen nach Operation als bester Vergleichspunkt, da schon 6-9 Wochen postoperativ die reguläre Heilungsantwort der unbehandelten Sehne weit fortgeschritten war, was zu geringeren Unterschieden der verschiedenen Gruppen führte. Möglicherweise verringerte also der späte Euthanasie-Zeitpunkt von 6 Wochen post-

OP die Signifikanz der Ergebnisse, da die bei der Ratte bekannte, schnelle Heilungsantwort in diesem Zeitraum schon weit fortgeschritten war.

In den Interventionsgruppen wurden dabei zwei Dosierungen des G-CSF gewählt, ausgerichtet an der Vorstudie (5 µg/24h) eine niedrigere (1µg/24h) sowie eine höhere Dosierung (10µg/24h). Wie beschrieben zeigte sich besonders in der niedrig dosierten Gruppe G-CSF Low ein Vorteil gegenüber Placebo sowie G-CSF High. Eine Hypothese dies zu erklären ist, dass die zu hohe Einwirkung von G-CSF dosisabhängig zu einem negativen Effekt auf die Heilungsantwort führt. Dies wurde auch schon in anderen Studien mit Wachstumsfaktoren beobachtet. Fukui et al. fanden bei der Hochdosis-Gruppe von bFGF eine schlechtere Heilung der medialen Seitenbändern bei Hasen (Fukui, et al., 1998). Eine zu hohe Dosierung einzelner Faktoren der Heilungsantwort scheint also die Differenzierung und Regeneration des Sehnengewebes negativ zu beeinflussen, was zu einer histologisch und biomechanisch minderwertigen Sehne führt. Weitere Untersuchungen zur optimalen Dosis der verschiedenen Faktoren wie G-CSF sind notwendig, um diese effektiv einzusetzen. Da auch verschiedene Zeitpunkte der maximalen Konzentration verschiedener Wachstumsfaktoren während der Sehnenheilung beobachtet wurden (siehe Abs. 2.7), ist neben der Dosis auch die Zeitdauer bzw. der Zeitpunkt der Applikation im Heilungsvorgang von Bedeutung. Hier könnte jedoch die frühere und längere Anwendung von G-CSF bzw. anderen Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren zu einer verbesserten, d.h. schnelleren und/oder histologisch sowie biomechanisch superioren Heilung führen. Es ist noch unklar bei welcher Dosis und Freisetzungskinetik verschiedener Wachstumsfaktoren ein eventuell negativer Effekt auftritt und wann die supraphysiologische Dosierung zur positiven Verstärkung der körpereigenen Heilung führt.

Der Trend in der Verbesserung sowohl der histologischen, immunhistochemischen, als auch der biomechanischen Parameter lässt vermuten, dass G-CSF sowohl die Differenzierung, als auch die quantitative Neubildung von Sehnengewebe fördert. Die Applikation mittels Phospholipidgel ist dabei eine klinisch anwendbare Lösung, die eine exzellente Biokompatibilität besitzt. Es bestehen Hinweise, dass eine zu hohe Konzentration des Wachstumsfaktors jedoch auch negative Effekte auf die Heilung ausübt, weshalb weitere Untersuchungen zur Dosisfindung notwendig sind.

5.2 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT DER LITERATUR

Die biologische Augmentation der Sehnenheilung ist ein schnell wachsendes Forschungsgebiet. Die Anzahl an Veröffentlichungen mit den Schlagwörtern „tissue engineering“, „tendon healing“ und dem Einsatz von verschiedenen Wachstumsfaktoren - besonders in Bezug auf die Rotatorenmanschette - hat in den letzten Jahren rapide zugenommen.

Dabei existieren verschiedene Ansätze diese Augmentation zu erreichen, die teilweise auch kombiniert werden können. Klinisch verwendet werden aktuell hauptsächlich Platelet Rich Plasma, sowie einige der kommerziell erhältlichen Trägermatrizen (engl. „Scaffolds“) (Longo, Lamberti, Petrillo, Maffulli, & Denaro, 2012, pp. 1-2).

In einem aktuellen Review fanden Longo et al. allein 46 Publikationen, die sich mit der Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Sehnenheilung befassen.

Die Ergebnisse waren dabei für alle verschiedenen Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF β , PDGF-B, VEGF, bFGF, IL10, BMP2 etc.) eher positiv. Die Autoren warnen aber vor einem „Publication-Bias“, d.h. der Tatsache, dass oft nur gute Ergebnisse veröffentlicht werden. Auch der begrenzte Beobachtungszeitraum ist entscheidend, da die Sehnenheilung noch Monate bis Jahre andauert, die Studien aber meist nur über wenige Wochen durchgeführt werden. Die Durchführung der Studien an Tiermodellen (dabei meistens Kleintiere, insbesondere Ratten) führt weiterhin zu der Frage wie sich diese Ergebnisse auf den Mensch übertragen lassen, da diese Tiere, wie unter 5.4 dargelegt, teilweise eine andere Heilungsantwort zeigen. Somit ist der endgültige und wahrhaftige Effekt der Wachstumsfaktoren kritisch zu sehen.

Der Wachstumsfaktor G-CSF (siehe Kap 2.7) wurde in Bezug auf die Sehnenheilung bisher nur in einer Studie von Sasaki et al. untersucht (Sasaki, et al., 2008, p. 1523). Die mit dem Wachstumsfaktor versorgten Kreuzbänder zeigten nach 4 Wochen eine höhere Reißfestigkeit, bessere Kollagenorientierung sowie vermehrte Angiogenese als die Kontrollgruppe. Für G-CSF existieren keine Studien in Bezug auf die Rotatorenmanschette bzw. die SSP-Sehne (Stand 30.05.2012). Die klinische Zulassung sowie gute Verfügbarkeit von G-CSF sind ein Vorteil gegenüber vielen anderen, experimentell verwendeten Wachstumsfaktoren. Deshalb waren wir motiviert, die Wirkung von G-CSF auf die Sehnenheilung zu untersuchen.

Zeitgleich bestand die Zielsetzung, ein Applikationssystem zu finden, das in der Praxis anwendbar ist und ein vorteilhaftes pharmakologisches Profil besitzt.

Das Modell der Rattenschulter als Annäherung an die beim Menschen auftretende Rotatorenmanschettenruptur wurde in der Literatur schon vielfach verwendet. Wie unter Absatz 2.8. in dieser Arbeit beschrieben, war Soslowky einer der ersten, der die Eignung der Ratte als Versuchstier für Rotatorenmanschettenrupturen untersuchte. Die weitere Modifikation des Modells, um dem Modell einer chronischen Degeneration näher zu kommen, wurde in den Vorphasen dieses Projekts durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass 3 Wochen nach Setzen eines Defektes, bzw. Traumas, der beste Zeitpunkt für einen Vergleich zwischen den Sehnen der Ratte und des Menschen ist. Die Sehne der Ratte zeigt zu diesem Zeitpunkt eine ähnliche Degeneration, Muskelatrophie sowie Entzündungsreaktion. Ein gewisser Unterschied besteht zum einen in der Schnelligkeit, mit der sich

diese Parameter bei der Ratte ändern – nach ca. 9 Wochen war eine fast vollständige Defektheilung zu sehen – sowie die fettige Infiltration des Muskels. Diese fettige Infiltration ließ sich nur selten bei Ratten nachweisen, ist beim Mensch jedoch regelmäßig zu sehen. Da auch bei Schafen und Hasen veränderte Ausmaße dieser fettigen Infiltration histologisch nachzuweisen sind, ist anzunehmen, dass es sich um einen Spezies-abhängigen Prozess handelt. (S. Buchmann, et al., 2011, p. 433)

Zweifellos kommt der biomechanisch ermittelten Reißfestigkeit der geheilten Sehne eine wichtige Bedeutung zu, da sie die Qualität des regenerierten Gewebes widerspiegelt. Besonders bei der chronisch degenerierten Supraspinatussehne des Menschen ist das Ziel der operativen Versorgung die Wiederherstellung eines mechanisch belastbaren, qualitativ hochwertigen Sehnengewebes. Eine vollständig ausgeheilte Sehne zeigt signifikant bessere Ergebnisse in Bezug auf die Funktion und Kraft, wohingegen die klinische (Schmerz-) Symptomatik oft nicht mit der erreichten Heilung korreliert (Boileau, et al., 2005, p. 1234).

Welche Ergebnisse bietet die Literatur zur Wachstumsfaktorenapplikation auf Sehnengewebe?

Hou et al. 2009 fanden in ihrer Studie eine Verbesserung aller biomechanischen Parameter (außer der Querschnittsfläche) bei rupturierten Achillessehnen von Hühnern unter TGFβ Applikation. Dabei applizierten die Autoren mesenchymale Stammzellen in einen gestanzten Defekt, die vorher mit den entsprechenden, für die Wachstumsfaktoren codierenden Genen transfiziert wurden. Der Wachstumsfaktor VEGF besaß im Gegensatz dazu eine negative Wirkung auf all diese Parameter (Hou, et al., 2009, p. 329).

Dines et al. 2007 untersuchten auch die Rotatorenmanschette am Rattenmodell und sind dabei bezüglich der Stichprobenanzahl sowie der Durchführung am ehesten mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Sie zeigten, dass die Supraspinatussehnen von Ratten unter Applikation von GDF-5 mittels einem GDF-5/Gelatine überzogenen Nahtmaterial (ein Wachstumsfaktor aus der TGFβ Familie) nach 3 Wochen eine höhere Reißfestigkeit sowie histologisch bessere Eigenschaften besaßen. Nach 6 Wochen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zu den ohne Wachstumsfaktoren reparierten Sehnen. Eine weitere Limitation dieser Studie war, dass die Rupturen sofort nach Erzeugung operativ versorgt wurden, also weniger dem Bild der chronischen Supraspinatussehnenruptur entsprechen (Dines, et al., 2007, pp. 217-219).

Der nach 6 Wochen nicht mehr signifikant vorhandene Unterschied zwischen Behandlungs- und Placebogruppen dieser Studie von Dines et al. könnte damit begründet werden, dass die Wachstumsfaktoren nur die initiale (Inflammations- bzw. Proliferationsphase) Sehnenheilung

beschleunigten. Dieser Vorsprung geht eventuell in der folgenden Phase des „Remodellings“ wieder verloren. Nach 6 Wochen war auch die unbehandelte Sehne ausreichend geheilt, weshalb der Autor die Testung nach drei Wochen als adäquaten Zeitpunkt empfiehlt.

Da wir auch mit Sprague-Dawley Ratten arbeiteten, könnte die Euthanasie nach sechs Wochen eventuell ein zu langer Abstand von der Rekonstruktion der Sehne gewesen sein, der dazu führte, dass sich keine hohen Signifikanzniveaus mehr zwischen Behandlungs- und Placebogruppe ergaben.

In ähnlichen Arbeiten an Ratten konnten Murray et al. für CDMP-2 (cartilage-derived morphogenetic protein 2, TGF β Familie) sowie Ide et al. für FGF-2 (fibroblast growth factor 2) ebenso eine beschleunigte Heilung feststellen (Ide, et al., 2009, pp. 612-614; Murray, et al., 2007, p. 252).

Im Gegensatz zu diesen positiven Ergebnissen ließ sich nur eine Studie an Rotatorenmanschetten bei Ratten finden, die unter Wachstumsfaktorenapplikation keine positiven Resultate erzielte. Kim et al. testeten alle TGF β Isoformen in ihrer Wirkung auf die Heilung künstlich gesetzter Supraspinatussehnenrupturen, stellten jedoch keinen signifikanten Unterschied in Reißfestigkeit und Volumen fest (Kim, et al., 2011, p. 96).

Es zeigt sich somit, dass am Rattenmodell, unter ähnlichen Bedingungen, die Wachstumsfaktoren der TGF β Familie und FGF-2 in verschiedenen Studien positive Ergebnisse zeigen. Keiner der Autoren konnte bis jetzt aber eine Dosis-Empfehlung, meist nicht einmal eine klare Dosis-Abhängigkeit aufzeigen.

Die erzielten Resultate erweitern diese getesteten Faktoren um GCS-F. Die nur teilweise signifikanten Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen ein Potenzial von GCS-F in der Sehnenheilung erkennen, das weiter untersucht werden sollte.

Was sind die Ergebnisse anderer Methoden der biologischen Augmentation?

Blutplättchenkonzentrate

Autologe Blutprodukte werden in der Form von Blutplättchenkonzentrate (z.B. Platelet Rich Plasma) klinisch schon häufig in der Behandlung von akuten Verletzungen sowie chronischen Überbelastungen von Bändern, Sehnen und Knorpel angewendet (Bava & Barber, 2011, p. 95; Taylor, Petrera, Hendry, & Theodoropoulos, 2011, p. 345). Die klinische Sicherheit der Anwendung (bei Rotatorenmanschettendefekten) wurde beim Menschen in einer Pilotstudie bewiesen (Randelli, Arrigoni, Cabitza, Volpi, & Maffulli, 2008, p. 525). In der Literatur finden sich in Tierversuchen positive Ergebnisse, jedoch liegen wenige klinische Studien am Menschen vor (Foster, et al., 2009, p. 2270; Lee, et al., 2011, p. 635). Castricini et al. konnten jedoch in einer randomisierten, kontrollierten Studie keinen Effekt von PRP auf die Sehnenheilung nachweisen; es wurden kleine bis mittlere Rotatorenmanschettenrupturen mit einer arthroskopischen „Double-Row-Repair“ versorgt, wobei die

mit PRP behandelten Gruppen keinen Unterschied im Constant-Score oder MRT zeigten (Castricini, et al., 2011, p. 264). In der Studie von Rodeo et al. konnte keine verbesserte Sehnenheilung unter Applikation einer PRP-Matrix an dem Sehnen-Knochen-Übergang der Rotatorenmanschette beobachtet werden. In der statistischen Regressionsanalyse wurden sogar negative Effekte erzielt (Rodeo, et al., 2012, p. 7). Insgesamt weisen die Autoren jedoch auf die unterschiedlichen am Markt erhältlichen PRP-Produkte hin und gestehen ein, dass evtl. eine andere Zubereitung eine bessere Wirksamkeit besitzt. Diese teils erheblichen Unterschiede wurden von Mazzocca et al. in einer aktuellen Studie aufgezeigt. Die Thrombozyten, Leukozyten sowie der Anteil an Wachstumsfaktoren variierte je nach Separationsverfahren (Mazzocca, et al., 2012, p. 314).

Trägermatrizen/Scaffolds

Unterschiedliche Trägersysteme sind Gegenstand einer Vielzahl aktueller Forschungsprojekte. Eine MEDLINE Recherche (Zeitpunkt 25.03.2012) mit den Begriffen „tissue engineering“ + „rotator cuff“ zeigte in Bezug auf die Rotatorenmanschette 49 Ergebnisse. Derwin et al. (2009) verwenden eine gewebte poly-L-lactid-Struktur an Kaninchen, Ide et al. (2009) ein azelluläres, humanes Hauttransplantat an Ratten, Moffat et al. (2009) ein auf Nanofasern basierendes Gerüst, Chen et al. sowie Zalavras et al. (2006) untersuchten biologische Gerüste aus Dünndarmmukosa von Schweinen (small intestine submucosa = SIS) zur Verbesserung der Sehnenheilung (Derwin, Baker, Iannotti, & McCarron, 2009, p. 1160; Ide, et al., 2009, p. 614; Moffat, et al., 2009, p. 116; Zalavras, et al., 2006, p. 214). Die Diversität in den Techniken, Materialien und Ergebnissen zeigt, dass noch Untersuchungen nötig sind, bis zur möglichen Etablierung einer Routineanwendung.

Zudem finden sich auch Studien, die im Tierversuch erzielte, signifikant positive Ergebnisse beim Menschen nicht bestätigen konnten, so z.B. Sclamberg et al., die eine retrospektive Untersuchung an 11 Patienten durchführten. Die Patienten mit massiven Rotatorenmanschettenrupturen wurden operativ mit SIS versorgt, dabei fand man in 10 von 11 Fällen nach 6 Monaten eine erneute Ruptur; die Schulter scores der Patienten zeigten prä- und postoperativ keinen Unterschied. Die Gruppe fand somit keinen Vorteil bei Anwendung der „Xenografts“. Zu bemängeln an dieser Studie sind allerdings das Fehlen einer Kontrollgruppe sowie die geringe Anzahl an Patienten. (Sclamberg, Tibone, Itamura, & Kasraeian, 2004, p. 538)

Zusammenfassend fehlt trotz klinisch schon erhältlicher und angewendeter Produkte die Evidenz für eine Anwendungsempfehlung. Es ist nicht geklärt, inwieweit die benutzten Scaffolds als Fremdmaterial eine Entzündungsreaktion auslösen (Longo, et al., 2012, p. 5). Die Anwendung von primärstabilen Trägersystemen zusammen mit anderen Methoden der biologischen Augmentation besitzt viel Potential für eine zukünftige klinische Anwendung.

MSC (Mesenchymal Stem Cells)

Die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen wird schon seit langer Zeit mit großem Erfolg zur Behandlung von hämatopoetischen Erkrankungen durchgeführt. Auch bei der Regeneration von Sehnen und Bändern werden Stammzellen zurzeit experimentell eingesetzt. Dabei werden die verschiedensten Fähigkeiten der Stammzellen genutzt: Chemotaktische Migration in entzündete Gewebe, Differenzierung in gewebsspezifische Zellen als Ersatz für geschädigte Zellen, Immunmodulation mittels Zytokinen sowie Zellkontakte, die zu Entzündungshemmung sowie zum Aufbau eines anabolen Milieus führen (Schmitt, 2012, p. 3).

Die Arbeiten von Chong et al., Gulotta et al. sowie Awad et al. untersuchten die Wirkung von mesenchymalen Stammzellen auf die Sehnenheilung, indem sie diese mittels einem Fibrin- bzw. Kollagengel applizierten. Dabei zeigten Chong et al. keine veränderten Eigenschaften der behandelten Sehnen. Gulotta et al. erzielten erst in einer zweiten Untersuchung, bei dem die Stammzellen mit dem Transkriptionsfaktor MT1-MMP sowie Scleraxis behandelt wurden, positive Auswirkungen auf die Sehnenheilung. Awad et al. beobachteten an den Achillessehnen von Hasen nach 12 Wochen eine erhöhte Reißfestigkeit nach Behandlung mit einem Kollagengel, welches MSC's enthält. Jedoch fand man bei über einem Viertel (28%) der Behandlungsgruppe intratendinöse Ossifikationen (Awad, et al., 2003, p. 427; Chong, et al., 2007, p. 78; Gulotta, et al., 2010, p. 1434; Gulotta, et al., 2011, p. 1286).

Die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen zur Sehnenheilung zeigt also durchaus vielversprechende Möglichkeiten. Es fehlt jedoch noch das Wissen über die nötigen Anreize zur korrekten Differenzierung der Zellen, sowie die Menge und Form der Applikation. Laut Schmitt et al. werden noch mind. 5 bis 10 Jahre bis zur klinischen Anwendung vergehen. (Schmitt, 2012, p. 7)

Gentherapeutische Ansätze

Ein weiterer Ansatz die Heilungsantwort zu verbessern ist die Verwendung von Genmaterial (DANN/RNA), um die Expression von gewünschten Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren zu erhöhen. Dabei wurden die meisten der in Tab. 4 aufgeführten Wachstumsfaktoren ausgetestet. Die Einbringung der Gene erfolgt durch non-virale oder virale Vektoren. Dabei können „nackte“ DNA oder schon vorbehandelte Zellen injiziert werden.

Die Injektion reiner DNA zeigte nur einen sehr schwachen sowie transienten Effekt, wohingegen durch Applikation von vorbehandelten Zellen, insbesondere MSC's, in der Literatur vielfach positive Ergebnisse auf die Sehnenheilung berichtet wurden. Diese „genverstärkten“ Stammzellen können in Zukunft eine elegante und wirkungsvolle Methode der Augmentation werden, setzen aber das Wissen über die Wirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren voraus. (Longo, et al., 2011, pp. 11-16; Nixon, Watts, & Schnabel, 2012, p. 284) Zudem gibt es auch Gefahren der Gentherapie, die von geringen, lokalen Gewebsreaktion bis hin zu systemischen Immunreaktionen oder Fehlinsertionen der Vektoren

führen kann. Als Folge können auch gesunde Zellen beschädigt oder infiziert werden, was im Ernstfall verschiedene Krankheiten, Krebs oder Infertilität verursachen kann. Mitteilungen der Mayoklinik (Mayo Clinic staff, „Gene therapy: Risks“, <http://www.mayoclinic.com/health/gene-therapy/MY00105/DSECTION=risks>, Stand 08.10.2013, 18.30 Uhr) weisen ebenfalls eindrücklich auf diese Risiken der Gentherapie hin.

Betrachtet man abschließend die verschiedenen Methoden die Sehnenheilung mit biologischen Techniken zu beeinflussen, so zeigt sich, dass noch keine davon mit definitiver Empfehlung klinisch angewendet wird. Bei den aktuell schon angewandten Produkten (PRP, Scaffolds) mangelt es immer noch an Evidenz. Die präklinischen Methoden (Wachstumsfaktoren, MSC's, Gentherapie) benötigen noch weitere Untersuchungen sowie evtl. Modifikationen, bis ein klinischer Einsatz möglich werden könnte. Eine Kombination von mehreren Methoden zugleich erscheint vielversprechend. Wachstumsfaktoren werden dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit eine große Bedeutung als Differenzierungsfaktoren, sowie als stimulierende Faktoren für die Sehnenheilung besitzen, sobald genug Kenntnis über Dosierung, Zeitpunkt der Applikation und Auswahl der Faktoren besteht.

5.3 LIMITATION

Trotz großer anatomischer Ähnlichkeit kann man die Ergebnisse, die aus dem Rattenmodell gewonnen wurden, nicht direkt auf den Menschen übertragen.

Durch das zweizeitige Vorgehen, dessen Zeitabstand in der ersten Phase untersucht wurde, konnte das gewöhnliche Rattenmodell an das chronisch-degenerative Bild der menschlichen Supraspinatussehnenruptur angenähert werden. Wie beim Menschen ließen sich bei den Versuchstieren Retraktion, Atrophie, Narbenbildung und Degeneration nachweisen.

Ein großer Unterschied zum Menschen ist die Heilungsantwort der Ratte bzw. anderen Kleintieren bei Verletzungen. So lässt sich bei Ratten keine fettige Infiltration der Muskulatur nach Ruptur nachweisen (S. Buchmann, et al., 2011, p. 432). Auch ist im Gegensatz zum Heilungsverhalten beim Menschen oft eine sehr schnelle und vollständige Defektdeckung zu beobachten. Für diese Dimension der Heilung wären Großtiere, wie z.B. die Infraspinatussehne des Schafs geeigneter, bei denen sich z.B. öfter eine fettige Infiltration des Muskels beobachten ließ und klinisch etablierte Refixationstechniken aufgrund der Größenverhältnisse vergleichbar angewendet werden können (Coleman, et al., 2003, p. 2397).

Ein weiterer Nachteil des Tierversuchs ist die beschränkte Möglichkeit der Immobilisation sowie der adäquaten Nachbehandlung. In unserem Versuchsaufbau durften sich die Tiere postoperativ frei im

Käfig bewegen. Dabei war nach anfänglicher Schonung der operierten Extremität ab Tag 5-7 ein unauffälliger Einsatz der operierten, oberen Extremität zu beobachten. Es ist unklar, ob die normale Käfigtätigkeit der Tiere das Ergebnis positiv oder negativ beeinflusst. Bei Menschen zeigen verschiedene Nachbehandlungsschemata Einfluss auf das Heilungsergebnis, besonders die Belastung sowie Bewegung einer chirurgisch refixierten Struktur ist eine feine Balance zwischen zu viel und zu wenig, wie auch Killian et al. in einer aktuellen Studie zeigten (Killian, Cavinatto, Galatz, & Thomopoulos, 2012, p. 233). Es bleibt noch unklar, welche Nachbehandlung die beste ist, bis genug Evidenz über die korrekte Rehabilitation gewonnen ist.

Zuletzt erschwert die Größe der Rattenschulter sowohl das chirurgische als auch später das histologische / biomechanische Vorgehen. Die Defektheilung ohne Nahtversagen in 44/45 Tieren lässt jedoch vermuten, dass beide Faktoren gut beherrscht wurden. Ebenso war die Applikation des Biogels (2x0,1ml pro Schulter) wegen anatomischer Unterschiede nicht 100% standardisierbar. Die geringen Abweichungen in der applizierten Menge sollten jedoch keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Die von der Ethikkommission genehmigte Tieranzahl zwang uns dazu, den Wachstumsfaktor bFGF nicht weiter zu untersuchen, sowie verminderte sie die Gruppengröße in der Biomechanik sowie Histologie.

Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen fiel kleiner aus, als in der vorangegangenen Poweranalyse erwartet, was zusammen mit den erwarteten Varianzen die statistische Signifikanz stark beeinflusste. Deshalb kann über einige Zielparameter keine Aussage im hochsignifikanten Bereich getroffen werden.

5.4 AUSBLICK

Die biologische Augmentation der chronischen Supraspinatussehnenruptur bleibt ein interessantes Gebiet, auf dem noch viele unbekannte Faktoren erforscht werden müssen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Phospholipidgele bieten ein hohes Potential für die klinische Anwendung, bedingt durch die einfache Herstellung, Anwendung sowie Variabilität bei exzellenter Biokompatibilität.

Erkenntnisse aus dieser Arbeit animieren zu weiteren Experimenten. Es ist vorstellbar, neben verschiedenen Einzelfaktoren eine Abfolge von Wachstumsfaktoren im Gel herzustellen, die sich noch besser den physiologischen Verhältnissen anpasst, diese jedoch beschleunigt bzw. verstärkt.

Auch die Möglichkeit Differenzierungsfaktoren oder Vektoren für den Gentransfer in das Gel einzubetten besteht, zwei andere Methoden der Augmentation, die aktuell viel untersucht und diskutiert werden.

Beim momentanen Stand der Technik erscheint allerdings die gentechnologische Therapie mit höherem Risiko behaftet als der Einsatz von Mediatoren auf zellulärer Ebene, die in einem gewissen Zeitraum abgebaut werden.

Die Einbringung von mesenchymalen Stammzellen in das Gel war nicht erfolgreich, da die Stammzellen den Zentrifugationsprozess in Vorversuchen nicht überlebten. Daher wurden aktuell nur Biogele mit Proteinen hergestellt (Tian, et al., 2010, p. 325).

Die verschiedenen wachstumsfördernden Vorgehensweisen lassen sich zudem mit einem primärstabilen Trägersystem kombinieren (welches natürlich, synthetisch, organisch oder anorganisch sein kann), um die Heilung des Sehngewebes dadurch weiter zu verbessern, sowie eine frühere Belastbarkeit zu erreichen. Diese Techniken werden in der Forschung als „tissue engineering“ zusammengefasst, d.h. die Kombination oder Einzelanwendung von Scaffolds (Trägersystemen), Zellen sowie Stimulationsverfahren. (Longo, et al., 2011, p. 17)

Neben diesen biochemischen Faktoren müssen auch die mechanischen Faktoren der Sehnenheilung weiter systematisch untersucht werden. Das Nachbehandlungsschema einer chirurgisch versorgten Sehnenruptur beruht in vielen Fällen noch zu sehr auf Erfahrung und nicht auf empirisch gewonnenen Erkenntnissen. Diesen Mangel an Evidenz zeigten auch van der Meijden et al. in ihrer Arbeit, die aktuelle Rehabilitationskonzepte untersuchten und dabei keine wissenschaftlich ausreichenden Empfehlungen geben konnten. Sie fordern eine wissenschaftlichere Untersuchung der Belastungsfähigkeit der Rekonstruktion im postoperativen Verlauf um den optimalen Zeitpunkt des Belastungsaufbaus terminieren zu können (van der Meijden, et al., 2012, p. 211). Dieser Forderung ist einerseits zuzustimmen. Auf der anderen Seite liegen bei der Rekonstruktion der Rotatorenmanschette jedoch häufig stark differierende, individuelle Befunde vor, die eine Fokussierung auf „punktgenaue“ Daten erschweren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Großteil aller Schulterschmerzen wird durch das Bild der chronisch degenerierten und/oder rupturierten Rotatorenmanschette verursacht, die im klinischen Verlauf sehr schlechte Regenerationsfähigkeit und auch nach operativer Rekonstruktion noch eine hohe Rerupturrate aufweist.

Gegenstand aktueller Forschungsprojekte ist die Optimierung dieser Heilungsantwort, indem man sie auf verschiedene Weise mechanisch oder biologisch augmentiert. In einigen vorausgegangenen Studien wurde eine positive Reaktion von G-CSF auf Bänder- und Sehnenrekonstruktionen nachgewiesen, so dass es Ziel dieser Arbeit war den Einfluss einer kontinuierlichen G-CSF-Freisetzung auf die chronische Supraspinatussehnenruptur zu untersuchen. Zudem sollte die Anwendbarkeit, Biokompatibilität sowie Pharmakokinetik des verwendeten Phospholipidgels erstmalig in vivo untersucht werden. Um der Situation beim Menschen möglichst nahe zu kommen, wurde das in Vorversuchen etablierte chronische Rupturmodell an der Ratte verwendet. Hierbei wird in einem Ersteingriff eine Ruptur gesetzt und nach dem Eintreten von Muskelatrophie und Sehnendegeneration die Sehne nach 3 Wochen rekonstruiert. Bei der chirurgischen Rekonstruktion der chronischen Ruptur des M. supraspinatus wurde dann ein G-CSF freisetzendes Phospholipidgel in zwei unterschiedlichen G-CSF Dosierungen oder ein Placebo auf die Nahtzone appliziert.

Nach dem chirurgischen Vorgehen wurden die Ratten nach weiteren sechs Wochen euthanasiert, um die Sehnen der behandelten und nicht behandelten Schultern biomechanisch, makroskopisch, histologisch sowie immunhistochemisch auszuwerten.

In einzelnen Unterkategorien wie dem Kollagengehalt sowie der Zellularitätsvariation ließ sich ein signifikanter Vorteil der mit G-CSF behandelten Ratten feststellen. Wegen der beschränkten Anzahl der Versuchstiere wurden leider hohe Signifikanzniveaus nicht erreicht. Im Gesamtergebnis lässt sich jedoch ein positiver Trend zu einer höheren Reißfestigkeit sowie zu verbesserten histologischen Sehneneigenschaften feststellen. Dabei wurde kein negativer Effekt des Placebogels auf das Sehnengewebe beobachtet, was für die Eignung zur klinischen Anwendung spricht.

Das Versuchsvorgehen hat sich als gut durchführbar erwiesen. Für die sichere Bestätigung der positiven Wirkungen von G-CSF und vor einer klinischen Anwendung sind weitere Studien notwendig. Bei diesen sollte die Versuchstierzahl höher sein, zudem könnten Modifikationen des Tiermodells (z.B. Großtier), das in der Heilungsantwort und der Rekonstruktionstechnik dem Menschen mehr gleicht, sinnvoll sein, damit verlässlichere Aussagen getroffen werden können. Die Erforschung weiterer, verschiedener Wachstums- sowie Differenzierungsfaktoren ist notwendig um sowohl wichtige Erkenntnisse über die Gewebsheilung, deren mögliche Verbesserung sowie der Versorgung von problematischen Bänder- und Sehnendefekten beim Menschen zu ermöglichen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ainsworth, R., & Lewis, J. S. (2007). Exercise therapy for the conservative management of full thickness tears of the rotator cuff: a systematic review. *Br J Sports Med, 41*, 200-210.
- Andres, B. M., & Murrell, G. A. (2008). Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res, 466*, 1539-1554.
- Awad, H. A., Boivin, G. P., Dressler, M. R., Smith, F. N., Young, R. G., & Butler, D. L. (2003). Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res, 21*, 420-431.
- Bava, E. D., & Barber, F. A. (2011). Platelet-rich plasma products in sports medicine. *Phys Sportsmed, 39*, 94-99.
- Biberthaler, P., Wiedemann, E., Nerlich, A., Kettler, M., Mussack, T., Deckelmann, S., & Mutschler, W. (2003). Microcirculation associated with degenerative rotator cuff lesions. In vivo assessment with orthogonal polarization spectral imaging during arthroscopy of the shoulder. *J Bone Joint Surg Am, 85-A*, 475-480.
- Bigliani, L. U., Ticker, J. B., Flatow, E. L., Soslowsky, L. J., & Mow, V. C. (1991). The relationship of acromial architecture to rotator cuff disease. *Clin Sports Med, 10*, 823-838.
- Boileau, P., Brassart, N., Watkinson, D. J., Carles, M., Hatzidakis, A. M., & Krishnan, S. G. (2005). Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am, 87*, 1229-1240.
- Bring, D., Reno, C., Renstrom, P., Salo, P., Hart, D., & Ackermann, P. (2009). Prolonged immobilization compromises up-regulation of repair genes after tendon rupture in a rat model. *Scand J Med Sci Sports*.
- Buchmann, S., Sandmann, G. H., Walz, L., Hoppe, H., Beitzel, K., Wexel, G., Tian, W., Winter, G., & Imhoff, A. B. (2013). Refixation of the supraspinatus tendon in a rat model--influence of continuous growth factor application on tendon structure. *J Orthop Res, 31*, 300-305.
- Buchmann, S., Walz, L., Sandmann, G. H., Hoppe, H., Beitzel, K., Wexel, G., Battmann, A., Vogt, S., Hinterwimmer, S., & Imhoff, A. B. (2011). Rotator cuff changes in a full thickness tear rat model: verification of the optimal time interval until reconstruction for comparison to the healing process of chronic lesions in humans. *Arch Orthop Trauma Surg, 131*, 429-435.
- Buchmann, S., Zumstein, M. A., & Brucker, P. U. (2013). Evidenzbasierte Evaluation intraoperativer biologischer Augmentation und deren Komplikationspotenzial. *Arthroskopie, 26*, 139-144.
- Castricini, R., Longo, U. G., De Benedetto, M., Panfoli, N., Pirani, P., Zini, R., Maffulli, N., & Denaro, V. (2011). Platelet-rich plasma augmentation for arthroscopic rotator cuff repair: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med, 39*, 258-265.
- Chan, B. P., Fu, S., Qin, L., Lee, K., Rolf, C. G., & Chan, K. (2000). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand, 71*, 513-518.
- Chang, E. Y., Moses, D. A., Babb, J. S., & Schweitzer, M. E. (2006). Shoulder impingement: objective 3D shape analysis of acromial morphologic features. *Radiology, 239*, 497-505.
- Chen, C. H., Cao, Y., Wu, Y. F., Bais, A. J., Gao, J. S., & Tang, J. B. (2008). Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *J Hand Surg Am, 33*, 1834-1842.

- Chong, A. K., Ang, A. D., Goh, J. C., Hui, J. H., Lim, A. Y., Lee, E. H., & Lim, B. H. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am*, *89*, 74-81.
- Cohen, D. B., Kawamura, S., Ehteshami, J. R., & Rodeo, S. A. (2006). Indomethacin and celecoxib impair rotator cuff tendon-to-bone healing. *Am J Sports Med*, *34*, 362-369.
- Coleman, S. H., Fealy, S., Ehteshami, J. R., MacGillivray, J. D., Altchek, D. W., Warren, R. F., & Turner, A. S. (2003). Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *J Bone Joint Surg Am*, *85-A*, 2391-2402.
- Derwin, K., Baker, A. R., Iannotti, J., & McCarron, J. A. (2009). Pre-clinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair. *Tissue Eng Part B Rev*.
- Dines, J. S., Weber, L., Razzano, P., Prajapati, R., Timmer, M., Bowman, S., Bonasser, L., Dines, D. M., & Grande, D. P. (2007). The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg*, *16*, S215-221.
- Eyles, J. L., Roberts, A. W., Metcalf, D., & Wicks, I. P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*, *2*, 500-510.
- Ferry, S. T., Dahners, L. E., Afshari, H. M., & Weinhold, P. S. (2007). The effects of common anti-inflammatory drugs on the healing rat patellar tendon. *Am J Sports Med*, *35*, 1326-1333.
- Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B., & Rodeo, S. A. (2009). Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, *37*, 2259-2272.
- Fukuda, H., Hamada, K., Nakajima, T., & Tomonaga, A. (1994). Pathology and pathogenesis of the intratendinous tearing of the rotator cuff viewed from en bloc histologic sections. *Clin Orthop Relat Res*, 60-67.
- Fukui, N., Katsuragawa, Y., Sakai, H., Oda, H., & Nakamura, K. (1998). Effect of local application of basic fibroblast growth factor on ligament healing in rabbits. *Rev Rhum Engl Ed*, *65*, 406-414.
- Galatz, L. M., Sandell, L. J., Rothermich, S. Y., Das, R., Mastny, A., Havlioglu, N., Silva, M. J., & Thomopoulos, S. (2006). Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res*, *24*, 541-550.
- Gazielly, D. F., Gleyze, P., Montagnon, C., Bruyere, G., & Prallet, B. (1995). [Functional and anatomical results after surgical treatment of ruptures of the rotator cuff. 2: postoperative functional and anatomical evaluation of ruptures of the rotator cuff]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, *81*, 17-26.
- Gimbel, J. A., Van Kleunen, J. P., Lake, S. P., Williams, G. R., & Soslowsky, L. J. (2007). The role of repair tension on tendon to bone healing in an animal model of chronic rotator cuff tears. *J Biomech*, *40*, 561-568.
- Gimbel, J. A., Van Kleunen, J. P., Mehta, S., Perry, S. M., Williams, G. R., & Soslowsky, L. J. (2004). Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. *J Biomech*, *37*, 739-749.
- Gimbel, J. A., Van Kleunen, J. P., Williams, G. R., Thomopoulos, S., & Soslowsky, L. J. (2007). Long durations of immobilization in the rat result in enhanced mechanical properties of the healing supraspinatus tendon insertion site. *J Biomech Eng*, *129*, 400-404.
- Gohlke, F., Barthel, T., & Gandorfer, A. (1993). The influence of variations of the coracoacromial arch on the development of rotator cuff tears. *Arch Orthop Trauma Surg*, *113*, 28-32.
- Gohlke, F., & Hedtmann, A. (2002). Orthopädie und Orthopädische Chirurgie: Schulter. In *Schulter* (2 ed., pp. 674). Würzburg und Hamburg: Thieme, Stuttgart.

- Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Ehteshami, J. R., Dagher, E., Packer, J. D., & Rodeo, S. A. (2009). Application of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rotator Cuff Repair Model. *Am J Sports Med*.
- Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Montgomery, S., Ehteshami, J. R., Packer, J. D., & Rodeo, S. A. (2010). Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site. *Am J Sports Med*, 38, 1429-1437.
- Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Packer, J. D., Deng, X. H., & Rodeo, S. A. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med*, 39, 1282-1289.
- Harryman, D. T., 2nd, Mack, L. A., Wang, K. Y., Jackins, S. E., Richardson, M. L., & Matsen, F. A., 3rd. (1991). Repairs of the rotator cuff. Correlation of functional results with integrity of the cuff. *J Bone Joint Surg Am*, 73, 982-989.
- Hedtmann, A. (2009). Weichteilerkrankungen der Schulter – Subakromialsyndrome *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 4, 85-106.
- Hijioka, A., Suzuki, K., Nakamura, T., & Hojo, T. (1993). Degenerative change and rotator cuff tears. An anatomical study in 160 shoulders of 80 cadavers. *Arch Orthop Trauma Surg*, 112, 61-64.
- Hill, C. P., Osslund, T. D., & Eisenberg, D. (1993). The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5167-5171.
- Hou, Y., Mao, Z., Wei, X., Lin, L., Chen, L., Wang, H., Fu, X., Zhang, J., & Yu, C. (2009). Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol*, 28, 324-335.
- Ide, J., Kikukawa, K., Hirose, J., Iyama, K., Sakamoto, H., & Mizuta, H. (2009). The effects of fibroblast growth factor-2 on rotator cuff reconstruction with acellular dermal matrix grafts. *Arthroscopy*, 25, 608-616.
- Irlenbusch, U., & Pieper, K. (1992). Muskelbiopsische Untersuchungen am Schultergelenk - ein Beitrag zur Pathogenese der sogenannten Periarthritis humeroscapularis. *Orthopädische Praxis*, 28, 529-532.
- Killian, M. L., Cavinatto, L., Galatz, L. M., & Thomopoulos, S. (2012). The role of mechanobiology in tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg*, 21, 228-237.
- Kim, H. M., Galatz, L. M., Das, R., Havlioglu, N., Rothermich, S. Y., & Thomopoulos, S. (2011). The role of transforming growth factor beta isoforms in tendon-to-bone healing. *Connect Tissue Res*, 52, 87-98.
- Kobayashi, D., Kurosaka, M., Yoshiya, S., & Mizuno, K. (1997). Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 5, 189-194.
- Kobayashi, M., Itoi, E., Minagawa, H., Miyakoshi, N., Takahashi, S., Tuoheti, Y., Okada, K., & Shimada, Y. (2006). Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits. *J Shoulder Elbow Surg*, 15, 371-377.
- Koester, M. C., Dunn, W. R., Kuhn, J. E., & Spindler, K. P. (2007). The efficacy of subacromial corticosteroid injection in the treatment of rotator cuff disease: A systematic review. *J Am Acad Orthop Surg*, 15, 3-11.
- Lee, K. S., Wilson, J. J., Rabago, D. P., Baer, G. S., Jacobson, J. A., & Borrero, C. G. (2011). Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? *AJR Am J Roentgenol*, 196, 628-636.
- Lindley, K., & Jones, G. L. (2010). Outcomes of arthroscopic versus open rotator cuff repair: a systematic review of the literature. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 39, 592-600.

- Longo, U. G., Franceschi, F., Ruzzini, L., Rabitti, C., Morini, S., Maffulli, N., & Denaro, V. (2008). Histopathology of the supraspinatus tendon in rotator cuff tears. *Am J Sports Med*, *36*, 533-538.
- Longo, U. G., Lamberti, A., Maffulli, N., & Denaro, V. (2011). Tissue engineered biological augmentation for tendon healing: a systematic review. *Br Med Bull*, *98*, 31-59.
- Longo, U. G., Lamberti, A., Petrillo, S., Maffulli, N., & Denaro, V. (2012). Scaffolds in tendon tissue engineering. *Stem Cells Int*, *2012*, 517165.
- Lyras, D. N., Kazakos, K., Verettas, D., Botaitis, S., Agrogiannis, G., Kokka, A., Pitiakoudis, M., & Kotzakarlis, A. (2009). The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg*.
- Maffulli, N., Barrass, V., & Ewen, S. W. (2000). Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. *Am J Sports Med*, *28*, 857-863.
- Maffulli, N., Longo, U. G., Franceschi, F., Rabitti, C., & Denaro, V. (2008). Movin and Bonar scores assess the same characteristics of tendon histology. *Clin Orthop Relat Res*, *466*, 1605-1611.
- Maffulli, N., Moller, H. D., & Evans, C. H. (2002). Tendon healing: can it be optimised? *Br J Sports Med*, *36*, 315-316.
- Maman, E., Harris, C., White, L., Tomlinson, G., Shashank, M., & Boynton, E. (2009). Outcome of nonoperative treatment of symptomatic rotator cuff tears monitored by magnetic resonance imaging. *J Bone Joint Surg Am*, *91*, 1898-1906.
- Marmotti, A., Bonasia, D. E., Bruzzone, M., Rossi, R., Castoldi, F., Collo, G., Realmuto, C., Tarella, C., & Peretti, G. M. (2012). Human cartilage fragments in a composite scaffold for single-stage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF-beta1 and G-CSF. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.
- Mazzocca, A. D., McCarthy, M. B., Chowaniec, D. M., Cote, M. P., Romeo, A. A., Bradley, J. P., Arciero, R. A., & Beitzel, K. (2012). Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*, *94*, 308-316.
- Mignatti, P., Morimoto, T., & Rifkin, D. B. (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol*, *151*, 81-93.
- Moffat, K. L., Kwei, A. S., Spalazzi, J. P., Doty, S. B., Levine, W. N., & Lu, H. H. (2009). Novel nanofiber-based scaffold for rotator cuff repair and augmentation. *Tissue Eng Part A*, *15*, 115-126.
- Moosmayer, S., Smith, H. J., Tariq, R., & Larmo, A. (2009). Prevalence and characteristics of asymptomatic tears of the rotator cuff: an ultrasonographic and clinical study. *J Bone Joint Surg Br*, *91*, 196-200.
- Morse, K., Davis, A. D., Afra, R., Kaye, E. K., Schepsis, A., & Voloshin, I. (2008). Arthroscopic versus mini-open rotator cuff repair: a comprehensive review and meta-analysis. *Am J Sports Med*, *36*, 1824-1828.
- Murray, D. H., Kubiak, E. N., Jazrawi, L. M., Araghi, A., Kummer, F., Loebenberg, M. I., & Zuckerman, J. D. (2007). The effect of cartilage-derived morphogenetic protein 2 on initial healing of a rotator cuff defect in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg*, *16*, 251-254.
- Nirschl, R. P. (1989). Rotator cuff tendinitis: basic concepts of pathoetiology. *Instr Course Lect*, *38*, 439-445.
- Nixon, A. J., Watts, A. E., & Schnabel, L. V. (2012). Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J Shoulder Elbow Surg*, *21*, 278-294.

- Nyffeler, R. W., Werner, C. M., Sukthankar, A., Schmid, M. R., & Gerber, C. (2006). Association of a large lateral extension of the acromion with rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am*, *88*, 800-805.
- Oakes, B. W. (2003). *Tissue Healing and Repair: Tendons and Ligaments*. In: Frontera WR (ed) *Rehabilitation of Sports Injuries: Scientific Basis* (10 ed.): Blackwell Science.
- Oh, L. S., Wolf, B. R., Hall, M. P., Levy, B. A., & Marx, R. G. (2007). Indications for rotator cuff repair: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res*, *455*, 52-63.
- Ozbaydar, M., Chung, S., Diller, D., & Warner, J. J. (2007). [Arthroscopic reconstruction of the rotator cuff. The current gold standard?]. *Orthopade*, *36*, 825-833.
- Papalia, R., Franceschi, F., Del Buono, A., Zampogna, B., Maffulli, N., & Denaro, V. (2011). Double row repair: is it worth the hassle? *Sports Med Arthrosc*, *19*, 342-347.
- Randelli, P. S., Arrigoni, P., Cabitza, P., Volpi, P., & Maffulli, N. (2008). Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil*, *30*, 1584-1589.
- Reilly, P., Macleod, I., Macfarlane, R., Windley, J., & Emery, R. J. (2006). Dead men and radiologists don't lie: a review of cadaveric and radiological studies of rotator cuff tear prevalence. *Ann R Coll Surg Engl*, *88*, 116-121.
- Riley, G. P., Harrall, R. L., Constant, C. R., Chard, M. D., Cawston, T. E., & Hazleman, B. L. (1994a). Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*, *53*, 367-376.
- Riley, G. P., Harrall, R. L., Constant, C. R., Chard, M. D., Cawston, T. E., & Hazleman, B. L. (1994b). Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*, *53*, 359-366.
- Roberts, A. W. (2005). G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, *23*, 33-41.
- Rodeo, S. A. (2007). Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. *J Shoulder Elbow Surg*, *16*, S191-197.
- Rodeo, S. A., Delos, D., Williams, R. J., Adler, R. S., Pearle, A., & Warren, R. F. (2012). The Effect of Platelet-Rich Fibrin Matrix on Rotator Cuff Tendon Healing: A Prospective, Randomized Clinical Study. *Am J Sports Med*.
- Rudzki, J. R., Adler, R. S., Warren, R. F., Kadrmaz, W. R., Verma, N., Pearle, A. D., Lyman, S., & Fealy, S. (2008). Contrast-enhanced ultrasound characterization of the vascularity of the rotator cuff tendon: age- and activity-related changes in the intact asymptomatic rotator cuff. *J Shoulder Elbow Surg*, *17*, 96S-100S.
- Samiric, T., Parkinson, J., Ilic, M. Z., Cook, J., Feller, J. A., & Handley, C. J. (2009). Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. *Matrix Biol*, *28*, 230-236.
- Sasaki, K., Kuroda, R., Ishida, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Mifune, Y., Kinoshita, K., Tei, K., Akisue, T., Tabata, Y., & Kurosaka, M. (2008). Enhancement of tendon-bone osteointegration of anterior cruciate ligament graft using granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Sports Med*, *36*, 1519-1527.
- Schibany, N., Zehetgruber, H., Kainberger, F., Wurnig, C., Ba-Ssalamah, A., Herneth, A. M., Lang, T., Gruber, D., & Breitenseher, M. J. (2004). Rotator cuff tears in asymptomatic individuals: a clinical and ultrasonographic screening study. *Eur J Radiol*, *51*, 263-268.
- Schmitt, A. (2012). Application of Stem Cells in Orthopedics. *Stem Cells International*, 2012.
- Schneeberger, A. G., Nyffeler, R. W., & Gerber, C. (1998). Structural changes of the rotator cuff caused by experimental subacromial impingement in the rat. *J Shoulder Elbow Surg*, *7*, 375-380.

- Schofer, M. D., Quante, M., Peterlein, C. D., Timmesfeld, N., Phan, K., & Fuchs-Winkelmann, S. (2009). [Operative and follow-up treatment of rotator cuff tears--the current situation]. *Z Orthop Unfall*, *147*, 321-326.
- Sciamberg, S. G., Tibone, J. E., Itamura, J. M., & Kasraeian, S. (2004). Six-month magnetic resonance imaging follow-up of large and massive rotator cuff repairs reinforced with porcine small intestinal submucosa. *J Shoulder Elbow Surg*, *13*, 538-541.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2006). Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, *6*, 181-190.
- Sher, J. S., Uribe, J. W., Posada, A., Murphy, B. J., & Zlatkin, M. B. (1995). Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am*, *77*, 10-15.
- Soslowky, L. J., Carpenter, J. E., DeBano, C. M., Banerji, I., & Moalli, M. R. (1996). Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg*, *5*, 383-392.
- Taylor, D. W., Petrera, M., Hendry, M., & Theodoropoulos, J. S. (2011). A systematic review of the use of platelet-rich plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligament injuries. *Clin J Sport Med*, *21*, 344-352.
- Tempelhof, S., Rupp, S., & Seil, R. (1999). Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders. *J Shoulder Elbow Surg*, *8*, 296-299.
- Thomopoulos, S., Williams, G. R., & Soslowky, L. J. (2003). Tendon to bone healing: differences in biomechanical, structural, and compositional properties due to a range of activity levels. *J Biomech Eng*, *125*, 106-113.
- Tian, W., Schulze, S., Brandl, M., & Winter, G. (2010). Vesicular phospholipid gel-based depot formulations for pharmaceutical proteins: development and in vitro evaluation. *J Control Release*, *142*, 319-325.
- Tillmann, B., & Koch, S. (1995). [Functional adaptation processes of gliding tendons]. *Sportverletz Sportschaden*, *9*, 44-50.
- Tillmann, B., Schünke, M., & Rödecker, K. (1991). Struktur der Supraspinatusansatzsehne. *Anat Anz.*, 83-84.
- Torchilin, V. P. (2003). *Liposomes: A Practical Approach* (2 ed.): Oxford University Press, USA.
- Uthoff, H. K., & Sano, H. (1997). Pathology of failure of the rotator cuff tendon. *Orthop Clin North Am*, *28*, 31-41.
- Uthoff, H. K., & Sarkar, K. (1991). Surgical repair of rotator cuff ruptures. The importance of the subacromial bursa. *J Bone Joint Surg Br*, *73*, 399-401.
- Urwin, M., Symmons, D., Allison, T., Brammah, T., Busby, H., Roxby, M., Simmons, A., & Williams, G. (1998). Estimating the burden of musculoskeletal disorders in the community: the comparative prevalence of symptoms at different anatomical sites, and the relation to social deprivation. *Ann Rheum Dis*, *57*, 649-655.
- van der Meijden, O. A., Westgard, P., Chandler, Z., Gaskill, T. R., Kokmeyer, D., & Millett, P. J. (2012). Rehabilitation after arthroscopic rotator cuff repair: current concepts review and evidence-based guidelines. *Int J Sports Phys Ther*, *7*, 197-218.
- Wirth, C., & Jäger, M. (1986). *Praxis der Orthopädie* (1. Auflage ed.). Stuttgart: Thieme.
- Wurgler-Hauri, C. C., Dourte, L. M., Baradet, T. C., Williams, G. R., & Soslowky, L. J. (2007). Temporal expression of 8 growth factors in tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model. *J Shoulder Elbow Surg*, *16*, S198-203.
- Yamamoto, A., Takagishi, K., Osawa, T., Yanagawa, T., Nakajima, D., Shitara, H., & Kobayashi, T. (2009). Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg*.

- Zalavras, C. G., Gardocki, R., Huang, E., Stevanovic, M., Hedman, T., & Tibone, J. (2006). Reconstruction of large rotator cuff tendon defects with porcine small intestinal submucosa in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg*, *15*, 224-231.
- Zingg, P. O., Jost, B., Sukthankar, A., Buhler, M., Pfirrmann, C. W., & Gerber, C. (2007). Clinical and structural outcomes of nonoperative management of massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am*, *89*, 1928-1934.

8. ANHANG

8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1, S. 5	Schulteranatomie nach Humeruskopfenukleation	Abb. 5.4-13, S.287 aus Benninghoff, Drenckhahn Anatomie, Band 1, 17. Auflage 2008 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München
Abb.2, S.6	Knöchernen und ligamentäre Anatomie des Schultergürtels	Abb. 5.4-8, S.284 aus Benninghoff, Drenckhahn Anatomie, Band 1, 17. Auflage 2008 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München
Abb.3, S.10	Akromionformen nach Bigliani	
Abb.4, S.26	Vergleichende Anatomie nach Akromionresektion	Figure 2, "Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair", Derwin KA, Tissue Eng Part B Rev. 2010 Feb;16(1):21-30.
Abb.5, S.27	Vergleichende knöchernen Anatomie Ratte – Mensch	Figure 3, "Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease", J Shoulder Elbow Surg. 1996 Sep-Oct;5(5):383- 92
Abb.6, S.28	Benutzung der oberen Extremität der Ratte	Figure 2, "Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease", J Shoulder Elbow Surg. 1996 Sep-Oct;5(5):383- 92
Abb.7, S.31	Versuchaufbau und Zeitplan	
Abb.8, S.32	Testreihe der verschiedenen Biogele	
Abb.9, S.33	Mit Prolene 5-0 angeschlungene Supraspinatussehne, Blick auf den eröffneten Subakromialraum	
Abb.10, S.34	Gel im Subakromialraum, M. deltoideus T-förmig eröffnet mit vorgelegten Fäden	
Abb.11, S.36	Biomechanischer Testaufbau	
Abb.12, S.38	Rupturlokalisierung	
Abb.13, S.39	MOVIN-Score: Median und Spannweite von Unterkategorien sowie Gesamtscore	
Abb.14, S.40	Immunhistochemie: Median und Spannweite des Kollagen I / III – Gehalts	
Abb.15, S.41	Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III	
Abb.16, S.42	Biomechanisch ermittelte Reißfestigkeit	
Abb.17, S.43	Differenz der Reißfestigkeit im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite	
Abb.18, S.44	Biomechanisch ermittelte Steifheit	
Abb.19, S.45	Differenz der Steifheit zur unbehandelten Gegenseite	
Abb.20, S.46	Serumspiegel von G-CSF	

8.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1, S.10	Impingementstadien nach Neer (1972), modifiziert nach Jobe (1983)
Tab.2, S.17	Methoden der biologischen Augmentation
Tab.3, S.43	Kraftwerte sowie Defizite der biomechanisch getesteten Sehnen
Tab.4, S.45	Steifheit sowie Defizite der biomechanisch getesteten Sehnen

9.DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Andreas Imhoff für die Übernahme der Funktion des Doktorvaters sowie für die Vergabe des Themas.

Frau Gabriele Wexel, die als Tierärztin das Arbeiten im Forschungszentrum unterstützte und mich den Umgang mit den Versuchstieren lehrte.

Dem Team des Labors Biomechanik der TU München für die Nutzungsmöglichkeiten der Prüfstände, die Mitentwicklung des Aufbaus sowie Hilfe bei der Durchführung der biomechanischen Testung.

Den Mitarbeitern der Pharmakologie LMU für die Produktion und Entwicklung des benutzten Biogels.

PD Dr. med. Achim Battmann und PD Dr. med. Walz für die histopathologische Auswertung der Präparate.

Henriette Hoppe, die mir als erfahrene Doktorandin viele hilfreiche Tipps gab.

Der Deutsche Arthrose-Hilfe e.V. für die Mitfinanzierung des Projektes.

Großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Stefan Buchmann, der mir während der Doktorarbeit jederzeit kompetent Hilfe leistete, mir beim wissenschaftlichen Arbeiten und Schreiben stets mit Rat und Tat zur Seite stand und auch privat immer ein guter Gesprächspartner war.