

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie

Abteilung für Sportorthopädie

Klinikum rechts der Isar

(Leitung: Prof. Dr. A. Imhoff)

**Histologische und immunhistochemische Analyse  
des Heilungsverhaltens von Achillessehnen  
nach Behandlung mit bFGF-exprimierenden Stammzellen  
im in-vivo Rattenmodell**

**Luzie Lenz**

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

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. S. Vogt
2. Prof. Dr. A. Imhoff
3. Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 08.12.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.07.2017 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Bedeutung von Sehnenverletzungen.....	5
1.2 Derzeitige Therapiekonzepte.....	6
1.3 Grundlagen der Sehnenanatomie und - funktion.....	7
1.4 Sehnenheilung.....	11
1.5 Stand der Forschung.....	14
1.6 Zielsetzung.....	16
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Studiendesign.....	17
2.2 Stammzellen.....	17
2.3 Tiere.....	19
2.3.1 Tieroperation.....	19
2.3.2 Tierhaltung und Rehabilitation.....	20
2.3.3 Euthanasie und Sehnenentnahme.....	21
2.4 Biomechanische Untersuchung.....	21
2.5 Histologische und Immunhistochemische Arbeitsschritte.....	22
2.5.1 Anfertigung der Gefrierschnitte.....	22
2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	22
2.5.3 Immunhistochemische Markierung.....	23
2.5.4 Zonale Einteilung und mikroskopische Auswertung.....	25
2.6 Statistische Analyse.....	26
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
3.1 Biomechanische Ergebnisse.....	28
3.2 Histologische und immunhistochemische Ergebnisse.....	28
3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	28
3.2.2 Kollagene.....	34
3.2.2.1 Kollagen I.....	34
3.2.2.2 Kollagen III.....	37
3.2.2.3 Pro-Kollagen I.....	40
3.2.3 Glykoproteine, Proteoglykane und Intermediärfilament.....	44
3.2.3.1 Laminin.....	44
3.2.3.2 Fibronectin.....	46
3.2.3.3 Versican.....	48
3.2.3.4 Vimentin.....	51

3.2.4 Statistische Analyse.....	54
3.2.4.1 HE-Färbung.....	54
3.2.4.2 Pro-Kollagen Typ I.....	59
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	61
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1 Wertigkeit der Methode.....	63
4.1.1 Studiendesign.....	63
4.1.2 Stammzellverfahren und Tieroperation.....	64
4.1.3 Vorbereitung der Proben und immunhistochemische Färbung.....	65
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	67
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>88</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AC	Chondroitinase AC
bFGF	basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
BMP	bone morphogenetic proteins (knochenmorphogenetische Proteine)
C	Celsius
ca.	circa
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
Coll	Kollagen
df	Freiheitsgrade
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank der University of Iowa (USA)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein (verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor (Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor)
g	Gramm
HC	Hyaluronidase
HE	Hämatoxilin-Eosin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LV	lentiviral
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MSC	Mesenchymal stem cell (Mesenchymale Stammzelle)
M.	Musculus
PBS	phosphat-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	platelet derived growth factor (von Blutplättchen produzierter Wachstumsfaktor)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
s.	siehe
TU	Technische Universität
U	Units
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche
x	mal

# 1. Einleitung

## *1.1 Bedeutung von Sehnenverletzungen*

Die Achillessehne, das Untersuchungsobjekt des im Folgenden dargestellten Projekts, ist nach der einzig verwundbaren Körperstelle eines des berühmtesten Helden der griechischen Mythologie benannt, Achilleus (deutsch: Achill, latinisiert: Achilles), welcher von seiner Mutter Thetis in den Unterweltsfluss Styx getaucht wurde, was ihn vor allen Verletzungen feite. Nur seine Ferse, an der ihn Thetis festhielt und die deshalb nicht mit dem Wunderwasser in Berührung kam, blieb verwundbar und kostete ihn schließlich im Krieg um Troja sein Leben.

Eine gewisse Analogie zwischen dieser tragischen Geschichte und Sehnen und ihren Verletzungen ist durchaus gegeben: Sehnen sind zwar nicht die einzigen verwundbaren Stellen des menschlichen Körpers, dennoch sind sie getrost als „Schwachstelle“ zu bezeichnen: Zum einen zählen Verletzungen der Sehnen zu den häufigsten Verletzungen überhaupt, so wurden im Jahr 2013 insgesamt 28.398 Patienten stationär mit Krankheiten der Synovialis und der Sehnen behandelt, das bedeutet eine Fallzahl von 33 auf 100.000 Einwohner (GBE 2015). Durch tiefgreifende Veränderungen wie der zunehmenden Prävalenz von Übergewicht und Adipositas in der Gesellschaft und der fortschreitenden Entwicklung des Breitensports mit vielen neuen, riskanteren Sportarten (ISBACH 2007) nimmt die Inzidenz von Sehnenverletzungen immer weiter zu. Diverse Studien kommen zu dem Schluss, dass gerade die Inzidenz der Achillessehnenruptur rapide zunimmt (THERMANN 1999; FEIBEL & BERNACKI 2003). Auch wenn keine genauen epidemiologischen Daten vorliegen (LILL et al. 1996), kann mit circa 15.000 - 20.000 Achillessehnenrupturen allein in Deutschland pro Jahr gerechnet werden (MAJEWSKI et al. 2000). Damit rupturiert die dickste und stärkste Sehne des menschlichen Körpers am häufigsten (FEIBEL & BERNACKI 2003; MILLER et al. 2005) mit 35% aller Sehnenrisse (BESKIN et al. 1987; JOZSA et al. 1989; THOMPSON et al. 1994; MAFFULLI et al. 1999), gefolgt von Quadrizeps-, Supraspinatus-, Patellar- und langer Bizepssehne. Da sich die Blutversorgung der Sehnen bereits ab dem 25. Lebensjahr verschlechtert und somit zur Degeneration beiträgt (LAGERGREN & LINDHOLM 1959), sodass schon geringe Über-, Fehl- oder Dauerbelastungen zu Rupturen führen können, können bereits junge Patienten davon betroffen sein (SHARMA & MAFFULLI 2005). So werden schon in der Altersgruppe der 15- bis unter 45-jährigen 29 von 100.000 jährlich stationär wegen Krankheiten der Synovia und der Sehnen behandelt (GBE 2015). Weitere Ursachen für Sehnenrupturen sind wiederholte Mikrotraumata durch Sport (FOX et al. 1975), hypoxische und mucoide Degeneration

(KANNUS et al. 1991) oder Kortikosteroidtherapie (MAHLER et al. 1992). Sehnen stellen also das schwächste Glied der funktionellen Einheit des Bewegungsapparats bestehend aus Knochen, Sehne und Muskel dar.

Zum anderen haben Sehnen eine bemerkenswert niedrige Heilungspotenz, was vor allem auf die schlechte Gefäßversorgung und die verlangsamte bis stagnierende Zellteilung zurückzuführen ist. Intratendinöse Verletzungen zeigen schlechtere Ergebnisse als knöcherner Sehnenausrisse (VOGT et al. 2007) und das entstehende Regeneratgewebe ist im Vergleich zum gesunden Sehnengewebe morphologisch unterschiedlich, biomechanisch minderwertig und entspricht in den Kollagenanteilen nicht der Zusammensetzung des Ursprungsgewebes (MÖLLER et al. 2000). Nicht selten folgen Rerupturen oder chronische Schmerzen aufgrund von Sehneninsuffizienzen, die für die Patienten äußerst belastend sein können. Desweiteren dauert die Rehabilitation sehr lange (KNOBLOCH et al. 2007; MAJEWSKI et al. 2008), was neben der psychischen Belastung für den Patienten auch eine lange Arbeitsunfähigkeit bedeutet. Das wiederum zieht enorme volkswirtschaftliche Kosten nach sich (CHIODO & WILSON 2006; HUFNER et al. 2006). Mit einer bleibenden eingeschränkten Lebensqualität muss in vielen Fällen gerechnet werden und auch die sportliche Leistungsfähigkeit bzw. das vor der Ruptur erreichte Aktivitätsniveau wird oft nicht mehr in vollem Ausmaß wieder hergestellt (THOMPSON et al. 1994; HUFNER et al. 2006; KINNER et al. 2009; KOSAKA & YAMAMOTO 2011).

Sehnenverletzungen sind also häufige, meist langwierig verlaufende Verletzungen, die zu erheblichen, oftmals langandauernden oder immer wiederkehrenden Einschränkungen führen und die aufgrund der Tatsache, dass besonders viele Menschen im „produktiven Alter“ zwischen 30 und 50 Jahren betroffen sind, und der mit ihnen verbundenen langen Arbeitsunfähigkeit durchaus gesellschaftliche Bedeutung haben.

## ***1.2 Derzeitige Therapiekonzepte***

Die Möglichkeiten, Sehnenverletzungen und insbesondere Rupturen zu therapieren, gliedern sich in die zwei großen Bereiche des konservativen und des operativen Vorgehens. Gerade die Achillessehnenruptur kann in vielen Fällen durchaus konservativ behandelt werden, wobei zwischen der immobilisierenden Therapie durch einen Unterschenkelgips und der frühmobilisierenden Therapie, bestehend aus einer funktionellen Schiene, meist in Form eines Stiefels, und frühzeitig beginnender Physiotherapie, unterschieden werden kann. Beide Behandlungsmethoden nutzen die Hämatombildung, die Proliferation von Kollagen und die daraufhin stattfindende Kollagenfibrillenausdifferenzierung. Durch die frühmobilisierende Therapie wird außerdem die parallele Ausrichtung der Fasern angeregt und dadurch Adhäsionen vermindert, außerdem wird die Atrophie der Wadenmuskulatur verringert und das Sprunggelenk bleibt beweglich (SORRENTI 2006). Zu den Vorteilen der frühfunktionellen Therapie gegenüber

der immobilisierenden zählen neben der schnelleren Schmerzfreiheit des Patienten und der objektiv besseren Bewertung (CHIODO & WILSON 2006; KHAN et al. 2004) die signifikant geringere Rerupturrate (HUFNER et al. 2006) und die schnellere Rückkehr zur Sportfähigkeit und eine kürzere Arbeitsunfähigkeitsdauer sowie weniger Komplikationen (KHAN et al. 2005). Gegenüber der operativen Therapiemöglichkeiten sind der Wegfall von Operations- und Anästhesierisiken (MILLER et al. 2005; RENSTRÖM 1997) sowie die geringeren Kosten aufgrund der ambulant möglichen Behandlung als positiv zu werten. Die operative Therapie hat jedoch andere, entscheidende Vorteile und wird auch deutlich häufiger durchgeführt (STEINBRÜCK 2000): Neben der geringen Rerupturrate (CHIODO & WILSON 2006; KHAN et al. 2004) ist die Tatsache zu nennen, dass sie die Sehne kaum bis gar nicht verlängert, so dass die vorher bestandene Leistungsfähigkeit eher wieder erreicht wird (RENSTRÖM 1997). Es gibt verschiedene Operationskonzepte, zum einen die offene Operation (BANKS et al. 2001; KITAOKA 2002) mit diversen Nahttechniken, beispielsweise die direkte Naht nach Krackow, wenn die Sehnenstümpfe direkt zusammengeführt werden können, oder die Klöppeltechnik nach Segesser, falls die Sehne über einen längeren Abschnitt zerrissen ist. Bei großen Defekten kann es nötig sein, dass ein Ersatz den Defekt überbrücken muss. Dazu können verschiedene plastische Verfahren dienen, z.B. ein Sehnentransfer des M. flexor hallucis longus, die Umkehr-Plastik nach Silverskjold oder der Sehnentransfer des M. peroneus brevis (SEEMANN 2009). Neben diesen offenen Verfahren gibt es zum anderen noch die Möglichkeit einer perkutanen Naht, also ein minimal invasives Verfahren, welches laut Steinbrück mit 57,6% inzwischen am häufigsten angewandt wird und bessere qualitative Ergebnisse bringt als die offenen Verfahren (STEINBRÜCK 2000). Dazu genügt ein rupturferner Hautschnitt, das Peritendineum muss nicht eröffnet werden. Je nach Operationsverfahren und Zustand des Patienten sollte frühzeitig mit der geeigneten Nachbehandlung begonnen werden.

### ***1.3 Grundlagen der Sehnenanatomie und - funktion***

Um die Mechanismen der Sehnenheilung zu verstehen, muss man sich zunächst die anatomischen und funktionellen Grundlagen vor Augen führen: Als Sehne bezeichnet man die kraftübertragenden bindegewebigen Elemente zwischen Muskeln, mit denen sie den tendomuskulären Übergang bilden, und Knochen, wo sie über die osteotendinale Verbindung inserieren (SCHIEBLER 1999).

Sie bestehen aus der Interzellulärsubstanz, in die hauptsächlich Kollagene (65-80%) und zwar hauptsächlich Kollagen I, und Elastin (1-2%) eingebettet sind, und Sehnenzellen, genauer den Tenoblasten und Tenozyten, welche aufgrund ihrer länglichen Kerne und den flügelartigen Fortsätzen als Flügelzellen bezeichnet werden (KANNUS 2000; WELSCH 2005). Diese Zellen bilden und sezernieren einen Enzymcocktail zum Auf- und Abbau der Fasern und vor allem das lösliche Prokollagen, aus welchen dann die unlöslichen Kollagenmoleküle entstehen, die dann

wiederum durch Aggregation Mikrofibrillen und schließlich elektronenmikroskopisch sichtbare Kollagenfibrillen bilden. Kollagen I zeichnet sich durch starke Fibrillen aus, Kollagen III bildet hingegen dünne Fibrillen. (HEINZELLER & BÜSING 2001). Die Fibrillen bilden dann die lichtmikroskopisch sichtbaren Kollagenfasern. Diese Kollagenfasern werden mit dem sie umgebenden Endotendineum zum Subfaszikel (15-400  $\mu\text{m}$ ), das von Peritendineum internum durchzogen ist und auch als Primärbündel bezeichnet wird. Die Funktion der kabelartigen Primärbündel besteht darin, dass sie durch ihre parallel, aber flach spiralig verlaufenden und miteinander verwobenen Bauelemente um 2-4 % gestreckt werden kann, wenn der zugehörige Muskel kontrahiert wird. Dadurch wird die Bewegung gedämpft. (GRAUMANN & SASSE 2004). Größere Stränge des Peritendineums (externum) bilden dann aus Primärbündeln Sekundärbündel bzw. Faszikel (150-1000  $\mu\text{m}$ ). Eine Gruppe von Faszikeln ist von Epitendineum umgeben und wird dann als Tertiärfaser bezeichnet (1000-3000  $\mu\text{m}$ ) (RILEY 2004; KANNUS 2000). Einen Überblick über den geschilderten Aufbau gibt Abbildung 1 unten. Den genannten durchziehenden und umgebenden verschiedenen Bindegewebschichten kommt besondere Bedeutung zu: Sie führen Blut- und Lymphgefäße und Nerven (KVIST et al. 1995).

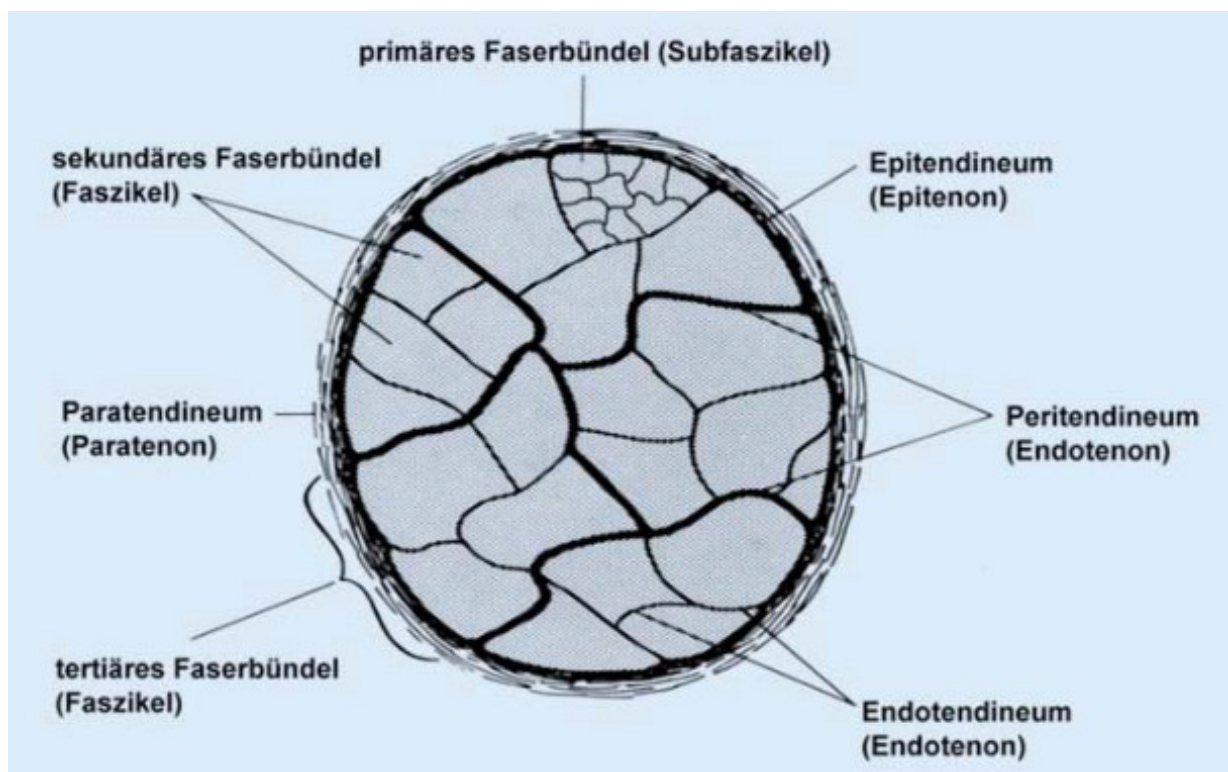


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch eine Sehne (ZSCHÄBITZ 2005).

Die im hier vorgestellten Projekt untersuchte Achillessehne inseriert an der hinteren Fläche des Calcaneus distal der Tuberositas calcanei und entsteht durch die Vereinigung der oberflächlichen und der tiefen Sehne des M. triceps surae, welcher sich aus dem M. gastrocnemius und dem M.



soleus zusammensetzt. Diese beiden Muskeln dienen der Plantarflexion des Fußgelenks, durch eine Kontraktion wird auch eine Pronation des Sprunggelenks und eine Flexion des Kniegelenks erreicht.

Gerät die Achillessehne unter Zugspannung, kommt es zu einer primären Streckung und sekundären Elastizität mit einer Verlängerung der Sehne um etwa 1%, da die im Ruhezustand gewellten Kollagenfasern nun gespannt werden. Danach folgt die Verlängerung der einwirkenden Kraft linear. Bei konstant gehaltener Sehnenlänge nimmt die Spannung allerdings deutlich ab (sogenannte Stressrelaxation), was sich dadurch erklärt, dass nach und nach die visköse Substanz, bestehend aus Proteoglykanen und Wasser, zwischen den Fasern von den angespannten Kollagenmolekülen verdrängt wird (SCOTT 2003). Umgekehrt verhält es sich beim Kriechphänomen, auch creeping genannt, wenn die Sehne sich bei konstanter Belastung verlängert (ZSCHÄBITZ 2005). Abbildung 3 (unten) stellt das Verhalten von Sehnen bei Belastung dar und zeigt, dass bereits bei Dehnungen ab ca. 4 % Mikrorupturen auftreten, unterhalb dieser Belastung führen die viskoelastischen Eigenschaften dazu, dass die Fasern in ihre ursprünglich wellenförmige Position zurückkehren. Zwischen 4% und 8% kommt es bereits zu Gewebeschäden mit verminderten Belastbarkeit, ab 8% Dehnung zerreißt die Sehne (MAGNUSSEN et al. 2002; ZSCHÄBITZ 2005).

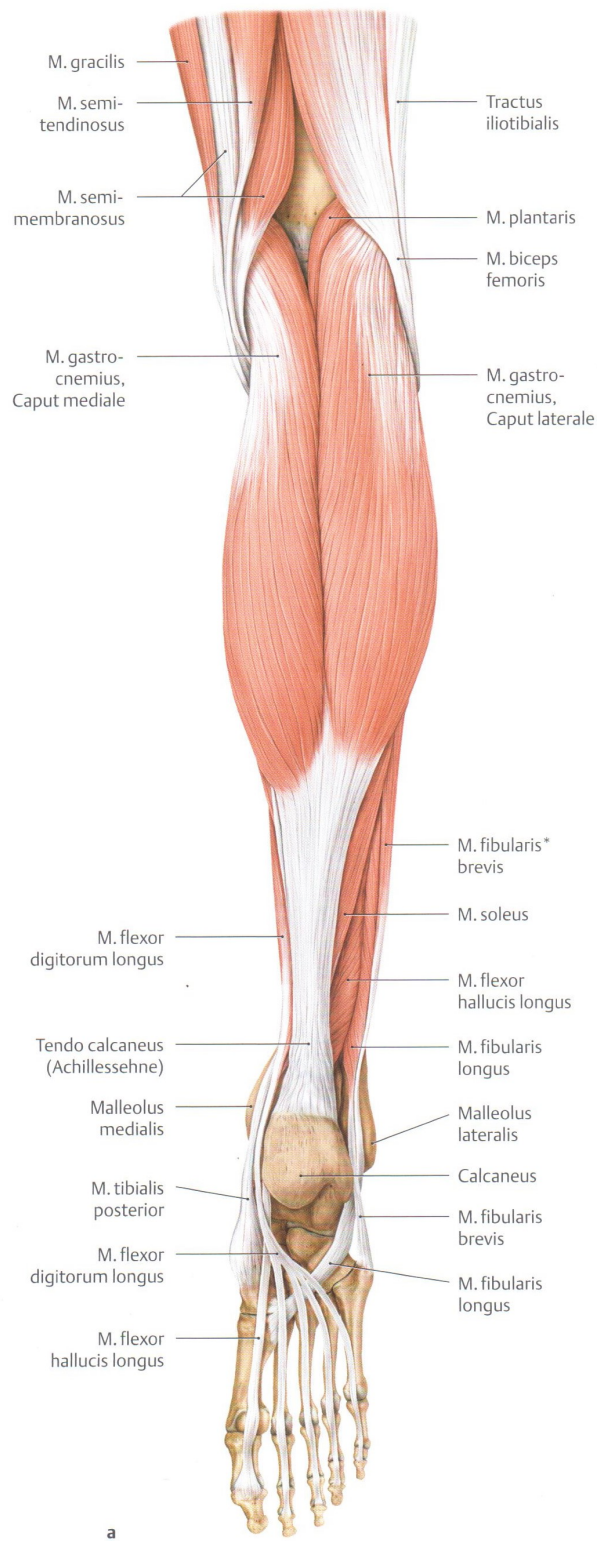


Abbildung 2: Anatomie der Achillessehne (SCHUENKE et al. 2004)

Die Achillessehne wird über drei verschiedene Wege mit Blut versorgt: Zum einen aus dem intrinsischen Gefäßsystem der osteotendinösen und muskulotendinösen Verbindung, zum anderen aus dem extrinsisch-segmentalen Gefäßsystem durch das Paratenon, das die Sehne umgibt (JOZSA & KANNUS 1997). Gespeist werden alle perfundierenden Gefäße hauptsächlich aus Ästen der Arteria fibularis und der Arteria tibialis posterior.

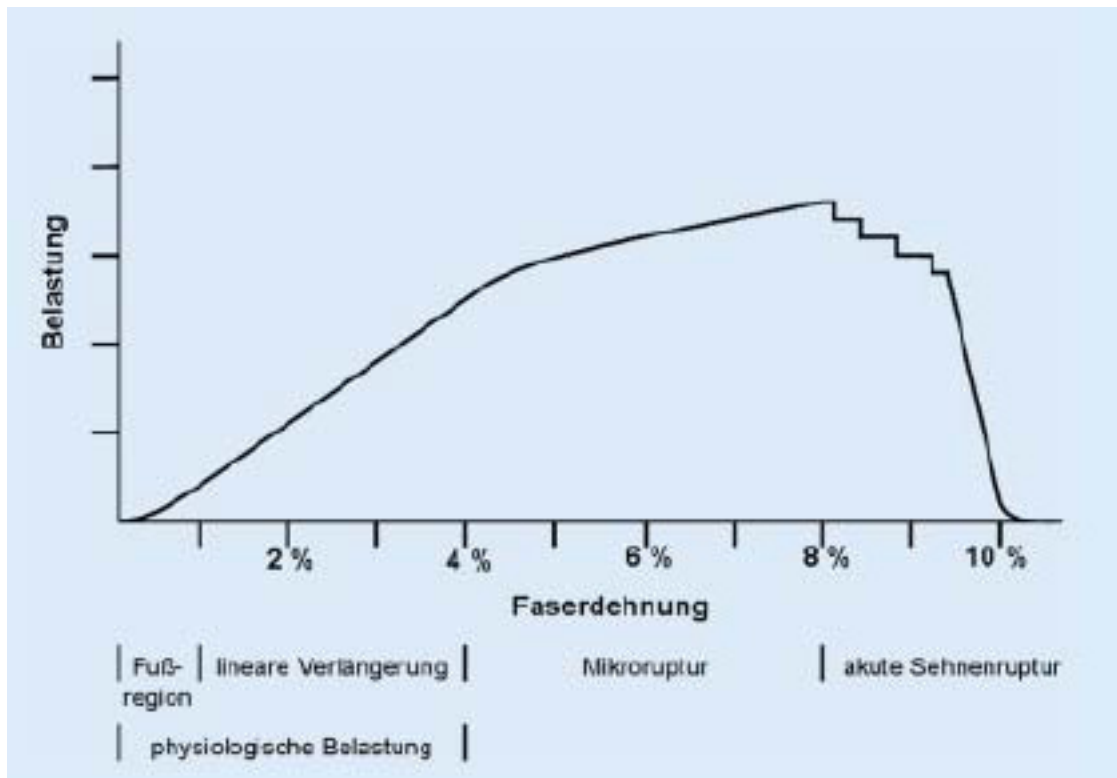


Abbildung 3: Schematisches Verhalten einer Sehne unter Belastung (ZSCHÄBITZ 2005)

## 1.4 Sehnenheilung

Sehnen verfügen nun also dank dem oben geschilderten Aufbau aus dicht und parallel zur Zugspannung angeordneten Fasern und dem hohen Kollagenanteil (70% des Trockengewichts, davon 95% Kollagen Typ I; BAILEY et al. 1973; O'BRIEN 1992) über die höchste Zugfestigkeit von allen Weichteilgeweben des menschlichen Körpers, um ihrer Funktion als Bindeglied zwischen dem dynamischen (Muskeln) und dem statischen Teil (Knochen) des Bewegungsapparats und den damit einhergehenden biomechanischen Erfordernissen gerecht zu werden (MÖLLER et al. 2000). Es ist demnach von besonderer Bedeutung, dass sich diese Struktur auch nach Verletzungen im Laufe der Sehnenheilung wieder aufbaut. Diese wurde früher mit zwei unterschiedlichen Konzepten erklärt: Beim sogenannten intrinsischen Mechanismus wird davon ausgegangen, dass die Sehne und ihre Sehnenscheide obliterieren und die Defektheilung zwischen den Sehnenstümpfen mit den gleichen Phasen wie bei der Wundheilung (exsudativ und formativ) stattfindet (MASON & ALLEN 1941). Dem gegenüber stand das Konzept der

extrinsischen Heilung, welches besagt, dass die an der Heilung beteiligten Zellen zunächst aus der Peripherie einwandern (POTENZA 1962 In: MÖLLER et al. 2000). Inzwischen wird jedoch angenommen, dass während des Heilungsverlaufes durchaus Mechanismen beider Konzepte ablaufen (GELBERMANN et al. 1988). Die Sehnenheilung verläuft demnach in den drei Phasen der Inflammation, der Proliferation und des *Remodellings* (BRAUN 1999; ZHANG et al. 2003; KASHIWAGI et al. 2004; SHARMA & MAFFULLI 2005), siehe hierzu Abbildung 4.

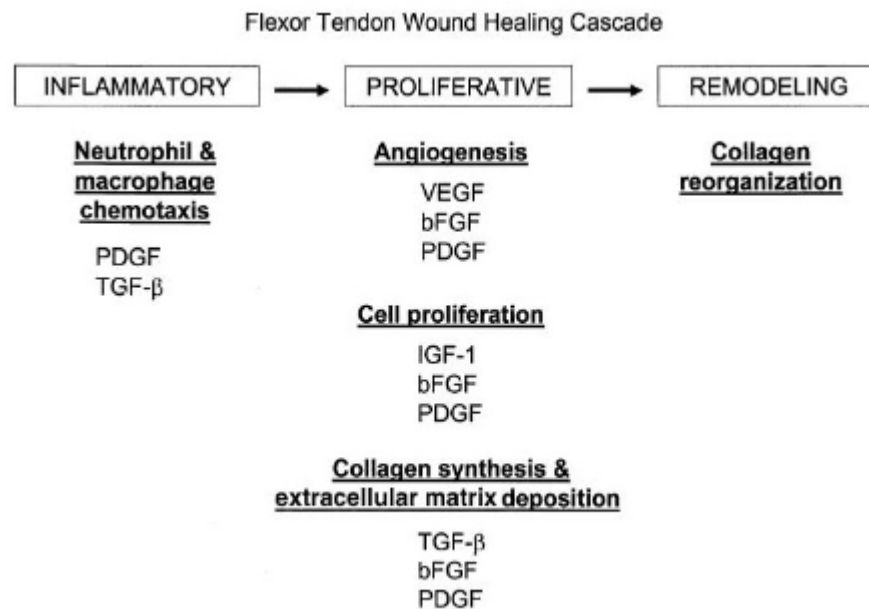


Abbildung 4: Wundheilungskaskade (HSU 2004)

Die erste Phase, die Entzündung, beginnt in den ersten Stunden nach Verletzung und dauert beim Menschen 3-5 Tage. Es entsteht zunächst ein instabiles Hämatom, bestehend aus Erythrozyten, Leukozyten, Zelltrümmern und Fibrin. Während der ersten 24 Stunden, in denen Makrophagen und Monozyten das Bild dominieren und vor allem die Phagozytose des nekrotischen Materials und Freisetzung chemotaktischer und vasoaktiver Substanzen erfolgt, wodurch Gefäßpermeabilität, die Angiogenese, das Einwandern von Fibroblasten aus dem Paratenon, die Tendozytenproliferation und die Rekrutierung von weiteren inflammatorischen Zellenerhöht werden, wird Granulationsgewebe gebildet. (SEEMANN 2009) Anschließend wandern Tendozyten ein und die Kollagen-III-Synthese kann beginnen. Die einwandernden Zellen und die einwachsenden Kapillaren stammen hauptsächlich aus dem peritendinösen Gewebe (Faszien, Sehnenhülle, Periost, Subkutangewebe), weswegen man diese Antwort als extrinsisch bezeichnet (MÖLLER et al. 2000). Sie überwiegt zunächst die intrinsische Antwort aus Epitenon und Endotenon, welche jedoch zu weniger Komplikationen und einer besseren Festigkeit der Sehne führt. Denn der Gleitmechanismus der Sehne bleibt erhalten und es kommt zu weniger Verwachsungen mit den umliegenden Strukturen (SHARMA & MAFFULLI 2005). Thrombozyten, Leukozyten und Makrophagen schütten verschiedenste Wachstumsfaktoren aus: PDGF (platelet-derived growth

factor), TGF- $\alpha$  und  $-\beta$  (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulin-like growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor). Auf deren Bedeutung wird im nächsten Abschnitt, 1.3 Stand der Forschung, näher eingegangen.

Die 2. Phase, die Proliferation, beginnt ungefähr 5 Tage nach der Verletzung. Dann

„beginnen die immigrierten Fibroblasten mit der Kollagenneosynthese. Zunächst weist die Verlaufsrichtung dieser neugebildeten Kollagenfasern keine einheitliche Orientierung auf, dennoch tragen sie wesentlich zur biomechanischen Festigkeit der zu überbrückenden Defektzone bei. Insgesamt sind Fibroblasten die nun dominierenden Zellen innerhalb der Läsion und der Kollagenanteil nimmt bis in die 5. Woche hinein kontinuierlich zu. In 4. Woche kommt es zusätzlich zu einer deutlich gesteigerten Proliferation von Fibroblasten intrinsischer Herkunft, im Wesentlichen aus dem Endotenon. Diese Zellen übernehmen um den 40. Tag herum die weitaus aktivste Rolle im Sehnenheilungsprozess, indem sie zur selben Zeit Kollagen aktiv resorbieren und synthetisieren. Es kommt zu einer Gewebereifung in deren Zuge eine zunehmende Ausrichtung der Kollagenfasern entlang der funktionellen Belastungsachse der Sehne stattfindet.“

(MÖLLER et al. 2000, 183)

Diese Phase dauert insgesamt ungefähr 8 Wochen, dann nimmt die Zellzahl und Kollagen- und Glukosaminoglykansynthese ab.

Die 3. Phase, das *Remodelling*, beginnt. Sie kann als Reifungs- und Festigungsphase (SEEMANN 2009) verstanden werden, die für die letztendliche biomechanische Stabilität sorgt (MÖLLER et al. 2000). Dazu ordnen sich die Kollagenfasern weiter in Zugrichtung der Sehne und eine Quervernetzung der Fibrillen erhöht die Zugfestigkeit. Außerdem kommt es zu einer Umverteilung des in der proliferativen Phase primär gebildeten Kollagen Typ III zugunsten des stabileren Kollagen Typ I (PARRY et al. 1978).

Dieser intensive Umbauvorgang dauert mehrere Monate, trotzdem führt er nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung von gesundem Sehnenewebe. Neben weiterhin bestehender Hyperzellularität und deutlich verringertem Fibrillendurchmessern (JOZSA et al. 1984) ist auch ein weiterhin erhöhter Kollagen III Anteil festzustellen (WILLIAMS et al. 1984).

Dabei ist festzuhalten, dass die Belastbarkeit einer Sehne im indirekt proportionalen Verhältnis zu ihrer Kollagen-III-Konzentration steht und ein erhöhter Anteil dieses Proteins also auf eine verminderte mechanische Belastungsfähigkeit schließen lässt. All diese Veränderungen, die man histologisch und immunhistochemisch feststellen kann, erklären die bestehendbleibende biomechanische Minderwertigkeit des Regeneratgewebes. Möglichkeiten, die Sehnenheilung zum einen zu beschleunigen, sie zum anderen aber vor allem auch zu einem qualitativ besseren Ergebnis zu führen, sind also sehr sinnvoll und gesucht.

## ***1.5 Stand der Forschung***

Da, wie bereits erläutert, der Heilungsprozess zwar oft zu einem zumindest zufriedenstellenden Ergebnis, jedoch nicht zu einer restitutio ad integrum führt und das Regenerat in jedem Fall morphologisch unterschiedlich und biomechanisch schwächer ist, ist die Forschung, vor allem auf Grundlage des steigenden Verständnisses der Vorgänge und Mechanismen während der Heilung, intensiv mit der Suche nach Verbesserungsmöglichkeiten beschäftigt.

Als vielversprechenden Ansatz hat sich dabei der Einsatz von Stammzellen erwiesen. So zeigte beispielsweise die Untersuchung von JU et al. im Jahre 2008, dass die Knochen-Sehnenheilung sich durch den Zusatz von Stammzellen beschleunigen lässt. CHONG et al. führten in ihrer 2007 erschienenen Arbeit über ein Achillessehnenmodell an Kaninchen aus, dass nach Applikation von Knochenmarksstammzellen ein histologisch und biomechanisches besseres Ergebnis erzielt wurde. Zu der Zeit, in der unser Projekt verwirklicht wurde, veröffentlichten OKAMOTO et al. 2010, dass sowohl mesenchymale Stammzellen als auch, bzw. sogar im Besonderen frische nicht-kultivierte Knochenmarkszellen, die unter anderem aus mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen bestehen, das histologische und biomechanische Ergebnis in frühen Heilungsstadien verbessern.

Neben anderen möglichen Ursachen für diese positiven Effekte wie z.B. der immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Wirkung mesenchymaler Stammzellen ( WANG et al. 2008; LE BLANC et al. 2006) und ihrer Möglichkeit, in viele verschiedene im Heilungsprozess hilfreiche Zelltypen zu differenzieren (CAPLAN 2009), könnten die Auswirkungen auf die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren durch die Stammzellen zurückgeführt werden (MOLLOY et al. 2003; CHAMBERLAIN et al. 2007) .

Desweiteren lieferten die Supplementierung von Vitaminen (OMEROGLU et al. 2009) und die lokale Injektion von Thrombozytenkonzentrat (ASPENBERG et al. 2004) oder Wachstumsfaktoren (ZHANG et al. 2003) sehr interessante Ergebnisse. Insbesondere letztere haben, wie unter 1.2 bereits erwähnt, einen sehr großen Einfluss auf den Heilungsprozess, indem sie zur Stimulation der Zellproliferation, zur Angiogenese und zur Chemotaxis beitragen und die Zelldifferenzierung beeinflussen.

„Darüber hinaus regulieren sie zelluläre Synthese und Sekretionsaktivität von Matrixbestandteilen und beeinflussen auf diese Weise unter anderem den Verlauf und das Ergebnis von Wundheilungsprozessen. Die Vielfältigkeit der beschriebenen zytokinetischen Eigenschaften legt nahe, dass Wachstumsfaktoren auch potentiell in der Lage sind Sehnenheilungsabläufe zu modulieren und deren Resultate entscheidend zu verbessern.“

(MÖLLER et al. 2000, 185)

1995 fanden Duffy et al. heraus, dass gesunde Sehnen im Vergleich zu heilenden Sehnen andere Wachstumsfaktoren verstärkt exprimieren, nämlich basic fibroblast growth factor (bFGF) in der unverletzten und platelet derived growth factor (PDGF) in der heilenden Sehne. Eine erhöhte

Kollagensynthese und eine verstärkte Chemotaxis konnte nach dem Einsatz von PDGF festgestellt werden (GROTENDORST et al. 1985, PIERCE et al. 1995). Bei Zhang et al. konnte 2003 durch Verabreichung von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) die Sehnenfestigkeit verbessert werden. Auch andere Wachstumsfaktoren, wie „bone morphogenetic proteins“ (BMP) (ENZURA et al. 1996) und „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF  $\beta$ ) (IGNOTZ et al. 1986; KASHIWAGI et al. 2004) zeigten positive Einflüsse vor allem auf die Kollagen Typ I Synthese. bFGF scheint jedoch von besonders vorteilhafte Ergebnisse zu erbringen, denn neben einem angiogenetischen Effekt (GABRA et al. 1994) konnte auch eine Proliferation von Fibroblasten (CHAN et al. 1997) festgestellt werden. Ab dem Jahr 2000 wies die Arbeitsgruppe um Chan die erhöhte Kollagenproduktion nach Applikation von bFGF auch in einem Rattenmodell nach. Desweiteren zeigten TANG et al. 2008 an den Beugeseiten der Langfinger von Hühnern eine deutliche Festigkeitssteigerung der Sehne nach bFGF Zusatz im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die fördernde Einflussnahme einer bFGF-Applikation auf die Heilungsprozesse von Sehnen ist also bereits mehrmals belegt worden, es stellt sich aber die Frage, wie genau diese Applikation am wirksamsten vorgenommen werden kann. bFGF ist, wie auch die meisten anderen Wachstumsfaktoren, ein Protein und hat eine geringe biologische Halbwertszeit. Eine einmalige Injektion ist also nur eingeschränkt erfolgsversprechend, eine orale Gabe aufgrund fehlender Bioverfügbarkeit nicht zielführend und eine mehrmalige lokale Applikation kann aufgrund der stattfindenden Heilungsvorgänge und dem Verschluss umliegender Weichteile durchaus schwierig und bezüglich der Infektionsgefahr riskant sein. Auch bleibt offen, inwieweit dadurch wirksame Titer sichergestellt werden können. Als Lösung bietet sich der Transfer von Genen in das Zielgewebe an, wo sie dann kontinuierlich expremiert und der Wachstumsfaktor lokal sezerniert werden kann. Bereits Mitte der 1990er Jahre wurden erste Versuche in diese Richtung unternommen (LOU et al. 1996; ÖZKAN et al. 1997). Dazu ist zunächst der Transfer der Gene in Zellen notwendig, was entweder in vitro oder in vivo erfolgen kann. Bei letzterem werden die Vektoren direkt an den Wirkort appliziert, es ist die einfachere, im Normalfall weniger invasive Methode, die den Vorteil hat, dass man im akuten Verletzungsfall gleich modulativ reagieren kann (MÖLLER et al. 2000). Neben der unspezifischen Transduktion am Zielort ist auch die Notwendigkeit eines transgenetisch hoch effektiven Vektors aufgrund der umgebenden Matrix ein Nachteil gegenüber der in vitro Methode, die außerdem als deutlich sicherer gilt (MAFFULLI et al. 2002) und die sich bei unserem Projekt wegen des ohnehin angestrebten Einsatzes von Stammzellen anbietet. Bei der in vitro Methode werden Zielzellen isoliert, gentechnisch manipuliert und dann nach einer eventuellen Selektion oder Qualitätskontrolle an den Wirkort gebracht. Desweiteren muss sich mit der Form des Transfersystems beschäftigt werden, denn die DNA/ RNA des „therapeutischen Gens“ muss ja in die Zielzelle bzw. deren Nukleus gelangen. Diesen Vorgang nennt man Transduktion. Trägermoleküle für dieses Gen sind so genannte Vektoren, bei denen man zwischen viralen und non-viralen Vektoren unterscheidet

(VOGT et al. 2008; VOGT et al. 2009). Zu Letzteren zählen Plasmide und die Vorteile sind in der geringen Toxizität, der Einfachheit der Durchführung, der beliebigen DNA-Größe und des geringen onkogenen Potentials zu sehen. Die niedrige Transduktionsrate und geringe Stabilität des Transfers sind die entscheidenden Nachteile im Vergleich zu den viralen Vektoren (SCHILLINGER et al. 2008). Daher wurde sich für virale, bzw. im speziellen Fall für lentivirale Vektoren entschieden. Viele Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Methodik der viralen Transduktion (z.B. IKEDA et al. 1998; VOGEL et al. 2004; PLUTA et al. 2005), welche auch bei Stammzellen möglich ist (MC MAHON et al. 2006), was für dieses Projekt von essentieller Bedeutung ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl positive Einflüsse sowohl von Stammzellen, als auch von Wachstumsfaktoren in der Literatur beschrieben wurden. Eine genetische Manipulation der Stammzellen ist möglich, ebenso wie der Transfer von Wachstumsfaktor-Genen. Eine Zusammenführung dieser beiden Ansätze ist also durchführbar und verspricht vielversprechende Ergebnisse, da nicht nur die Vorteile beider Mechanismen genutzt werden können, sondern auch Probleme wie die Frage nach der kontinuierlichen Wachstumsfaktorapplikation dadurch gelöst werden.

## ***1.6 Zielsetzung***

Nach den dargestellten Auswirkungen auf die Sehnenheilung zum einen durch Stammzellen und zum anderen durch bFGF sollte in diesem Projekt die potentielle Heilungsverbesserung von beidem in Kombination in Form von mesenchymalen Stammzellen, welche bFGF exprimieren, untersucht werden. Desweiteren sollte erarbeitet werden, inwiefern sich bFGF-exprimierende Stammzellen im Vergleich zu Stammzellen, die nicht mit dem bFGF-Gen transduziert wurden, auf die Sehnenheilung auswirken. Bisher gibt es keine Studien zur langzeitigen Applikation von Wachstumsfaktor-exprimierenden Stammzellen in der Sehnenheilung wie es in dem hier vorgestellten Umfang der Fall ist und in der Literatur war, insbesondere zu der Zeit, als dieses Projekt geplant wurde (2007), kein ähnliches Projekt zu finden. Die Ergebnisse unserer Versuche wurden zum einen biomechanisch ermittelt, auf welche hier überblicksartig eingegangen wird, da sie den Inhalt einer eigenen Arbeit von Florian Imhoff darstellen. Zum anderen wurde eine histologische Analyse des Regeneratgewebes vorgenommen und eine immunhistochemische Auswertung bezüglich des Kollagengehaltes bzw. der Kollagenzusammensetzung und weiterer Sehnenbestandteile sowie der Vaskularisierung unternommen. Dieser Teil des Projekts, also die histologische und immunhistochemische Analyse des Heilungsverhaltens von Sehnen nach Behandlung mit wachstumsfaktorexprimierenden Stammzellen, stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar und wird im Folgenden detailliert ausgeführt.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Das mehrdimensionale Studiendesign wird in der folgenden Grafik (Abbildung 5) verdeutlicht. Die insgesamt 84 Ratten wurden randomisiert in drei Versuchsgruppen mit jeweils anderem Behandlungskonzept eingeteilt: 28 Tiere erhielten bei der Operation mesenchymale Stammzellen, die eGFP transduziert bekommen hatten (eGFP-LV-MS). Weiteren 28 Tiere wurden bFGF-exprimierende Stammzellen (bFGF-LV-MS) injiziert. Den anderen 28 Tieren wurde als Kontrollgruppe lediglich eine Pufferlösung (PBS) verabreicht. Pro Gruppe wurden je 14 Tiere nach 14 Tagen und je 14 nach 28 Tagen euthanasiert. Davon wurden immer acht Sehnen biomechanisch und 6 Sehnen histologisch ausgewertet. Die Gruppengrößen waren nach einem Beratungsgespräch mit Diplomstatistiker Tibor Schuster vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München festgelegt worden.

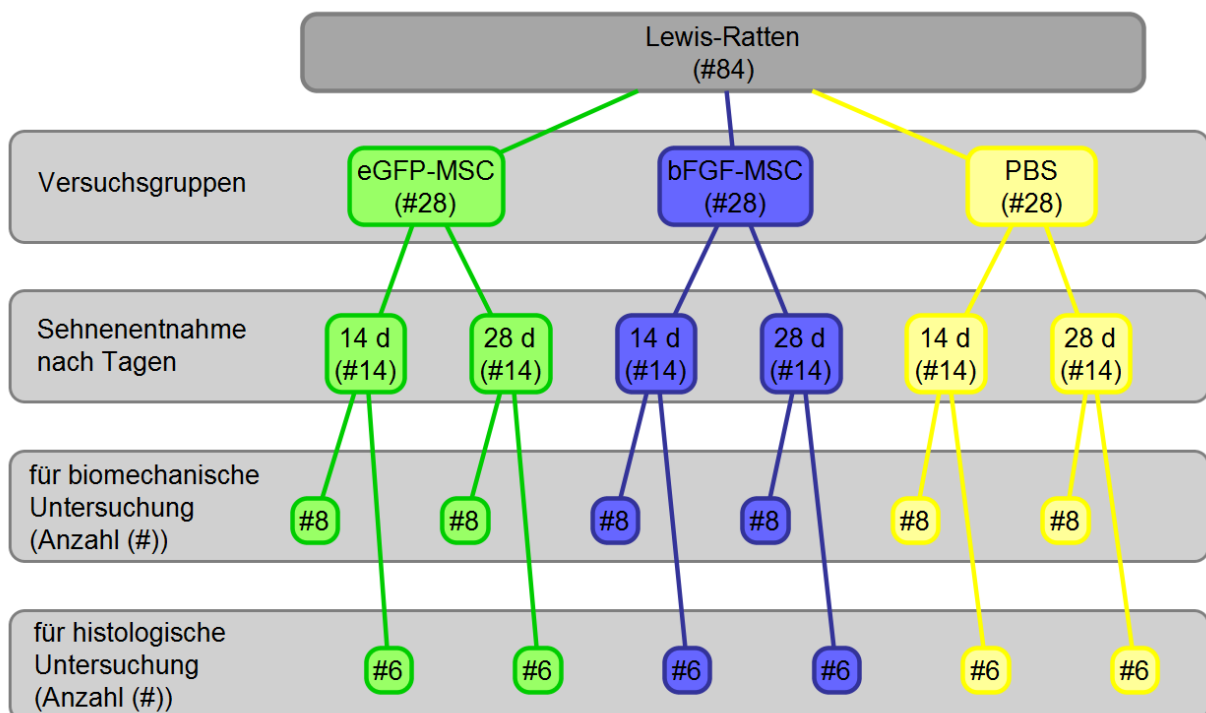


Abbildung 5: Studiendesign

### 2.2 Stammzellen

Die ersten Arbeitsschritte umfassten die Gewinnung, Kultivierung und lentivirale Transduktion von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark männlicher Lewisratten. Die Isolation der Stammzellen erfolgte wie von LENNON et al. 1995 beschrieben aus Femur und Tibia der

Ratten, ihre Kultivierung folgte dem Protokoll von NEUHUBER et al. 2008. Als Vektoren für die Transduktion wurden pseudotypisierte, selbstinaktivierende Lentiviren, die entweder eGFP oder bFGF exprimierten, genutzt, welche durch Kotransfektion dreier Verpackungsplasmide und eines Transferplasmids in 293T- Zellen produziert wurden (WÜBBENHORST et al. 2010). Für die Infektion der mesenchymalen Stammzellen mit den Lentiviren wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit 2,5 ml lentiviralem Überstand und 8  $\mu\text{g/ml}$  Polybren wegen der verhältnismäßig geringen Infizierbarkeit für 24 Stunden inkubiert.

Die Effizienz der Transduktion wurde für eGFP per Durchflusszytometrie (FACS Vantage; Becton Dickinson, Deutschland) bestimmt. Dazu werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einem Argonstrahl ausgesetzt. Dieser wird durch die fließenden Zellen unterbrochen und durch das Ausmaß der Streuung können Angaben zu Zellgröße und Granularität gemacht werden. Darüberhinaus wird die Fluoreszenz von eGFP bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Emission bei 510 nm gemessen (WÜBBENHORST et al. 2010).

Desweiteren konnte die bFGF-Expression durch reverse Transkriptase PCR gezeigt werden. Dazu wurde RNA aus den transduzierten Stammzellen mit Hilfe von Trizol Reagenz (Invitrogen, Deutschland) isoliert. Die RT-PCR wurde mit den Qiagen one step RT-PCR Kit (Qiagen, Deutschland) und den folgenden Primern durchgeführt:

forward 5' ATCACCTCGCTTCCCGCACT 3'

reverse 5' CCTTCTGTCCAGGTCCCGTT 3'

Außerdem wurde die bFGF-Expression per Quantikine ELISA specific for human basic FGF (R&D, Deutschland) quantifiziert.

Darüber hinaus musste die Differenzierungsfähigkeit der mesenchymalen Stammzellen in die drei Hauptrichtungen Osteogenese, Chondrogenese und Adipogenese per Differenzierungsassays ermittelt werden wie von NEUHUBER et al. 2008 beschrieben. Zur Osteogeneseauswertung wurde die Calcium-Konzentration, die durch Zellen nach osteogener Differenzierung bedingt ist, quantifiziert (Calcium CPC Liquidcolor Kit, Stanbio Laboratories, USA). Diese wurde dann mit der Calcium-Produktion uninduzierter Kontrollzellen verglichen. Desweiteren wurde die Mineralisierung, die im Zuge der Osteogenese stattfindet, durch die Alizarin-Färbung nachgewiesen, indem die differenzierten Zellen in eiskaltem Ethanol fixiert, in Wasser gewaschen und mit Alizarinrot S Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) inkubiert wurden (HIRSCH 2011). Die Adipogenese wurde mittels des fettlöslichen, rot färbenden Azofarbstoff Oil-Red-O, welcher in Isopropanol gelöst worden war, visualisiert. Bei der Wellenlänge 490 nm wurde eine semiquantitative mikroskopische Auswertung vorgenommen. Die Chondrogeneseauswertung erfolgte durch Pelletkulturen, die nach chondrogener Differenzierung über Nacht einen Papainverdau unterliefen. Anschließend wurde zur Chondroitin-Quantifizierung Dimethylmethylenblau-Lösung und Chondroitin-6-Sulfat (Sigma-Aldrich, Deutschland) zugegeben, die Absorption bei einer

Wellenlänge von 595 nm gemessen und die Menge des Chondroitins auf DNA-Gehalt normiert, welcher mittels Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Deutschland) bestimmt wurde (TOH et al. 2005; HIRSCH 2011). Die Fluoreszenz wurde mit einem Anregungsfilter von 485 nm und einem Emissionsfilter von 538 nm (Wallac VICTOR2, Perkin Elmer, Deutschland) ermittelt.

## **2.3 Tiere**

Alle Versuche wurden an männlichen Lewisratten der Inzuchtlinie LEW/Crl durchgeführt. Diese eignen sich vor allem hinsichtlich Stammzellgewinnung, Klonen und Haltung, da sie kaum aggressives Verhalten zeigen. Das Modell ist in der Literatur vielfach beschrieben (z.B. bei OKAMOTO et al. 2010) und weist hervorragende Bedingungen bezüglich Standardisierungsmöglichkeiten auf. Die Regeneration verläuft sehr schnell und das Infektionsrisiko ist minimal. Die Ratten waren von Charles River Laboratories (Sulzfeld) gezüchtet worden, zum Operationszeitpunkt 14 Wochen alt und wogen im Durchschnitt 412 g bei 20 g Standardabweichung.

### **2.3.1 Tieroperation**

Zur perioperativen Analgesie wurde den Ratten zunächst Metamizol per os verabreicht. Die eigentliche Narkose, unter der der Eingriff durchgeführt wurde, bestand aus Medetomidin, Fentanyl und Midazolam. Diese Medikamente wurden intramuskulär in einer Mischspritze verabreicht und ermöglichten eine Spontanatmung der Ratten sowie eine sichergestellte Analgesie. Die narkotisierten Tiere wurden zunächst gewogen und dann auf eine Wärmematte gelegt, um Auskühlung zu verhindern. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen, Sauerstoffsättigung und Pulsfrequenz durch ein Pulsoxymeter überprüft und bei Bedarf 100% Sauerstoff zur Atemluft zugeführt. Die Augen wurden mit Salbe (BEPANTHEN Augen- u. Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) vor Austrocknung geschützt.

Die Ratten wurden auf den Bauch gelegt und das zu operierende linke, zuvor vollständig rasierte Bein wurde mit sterilem Aseptikum abgesprüht. Nach dem Einwirken wurde ein steriles Lochtuch über das Bein gelegt und nochmals gesprüht. Insgesamt fand der Eingriff unter semisterilen Bedingungen, die sich für Rattenoperationen bewährt haben, statt.

Als erster Schritt erfolgte eine Hautinzision direkt über der Achillessehne von ca. 15 mm Länge. Daraufhin wurde die Sehne bis zum Ansatz am Calcaneus freipräpariert. Nun wurde ein Punch (Fa. Arthrex), ein Instrument, das bei der Arthroskopie beim Menschen, und vor allem bei der Meniskuschirurgie, zum Einsatz kommt, angelegt und nach distal vorgeschoben, sodass der Substanzdefekt bei allen Tieren an der gleichen Stelle erfolgen konnte. Vor dem Durchtrennen der Sehne wurde nun sowohl oberhalb als auch unterhalb des Punches per Insulinspritze jeweils circa fünfmal eingestochen und eine Lösung injiziert, die entweder eine Zellsuspension aus ca.

100.000 trypsinierten Stammzellen, die wiederum entweder eGFP oder bFGF transduziert bekommen hatten, und Phosphatpuffer (PBS) oder, für die Kontrollgruppe, reines PBS enthielt (siehe Abbildung 6). Diese Kontrolllösung wurde eingesetzt, um für die Kontrolltiere gleiche Bedingungen mit dem gleichen Grad an Trauma, somit eben auch Injektionstraumen, herzustellen. Die Auswahl, welche Tiere welche Lösung injiziert bekommen sollten, fiel randomisiert und war den Operateuren nicht bekannt. An jedem Operationstermin wurden Tiere jeder Gruppe operiert bzw. kamen alle drei verschiedenen Lösungen zum Einsatz. Nach der Injektion wurde dann durch den Punch ein 2,4 mm Stück aus der Achillessehne herausgeschnitten (siehe Abbildung 6) und der Defekt wurde im Gegensatz zu vielen anderen Projekten (z.B. ZHANG et al. 2003) nicht überbrückt bzw. durch Naht geschlossen, sondern die Sehnenstümpfe wurden in situ belassen (siehe Abbildung 6). Es erfolgte lediglich eine Intrakutannaht mit resorbierbarem Faden (Vicryl, Stärke 4/0). In Bezug auf das Unterlassen der Defektüberbrückung und das Nähen lediglich der Haut verfahren OKAMOTO et al. 2010 ähnlich.

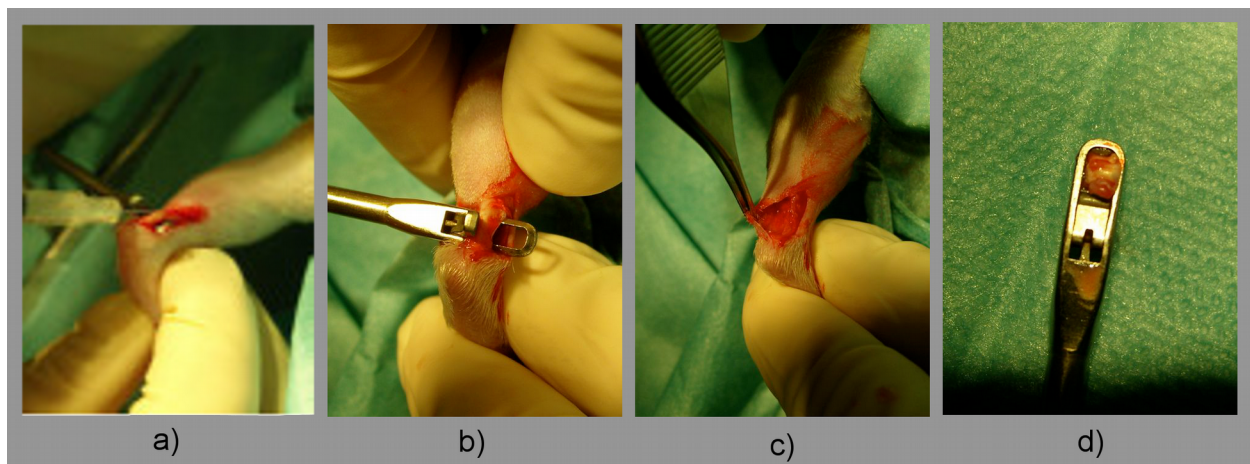


Abbildung 6: Operationsablauf: a) Injektion; b) Verursachen des Defektes; c) Durchtrennte Achillessehne; d) Substanzeffekt im Punch

Abschließend wurde die Narkose durch subkutane Verabreichung von Naloxon, Flumazenil und Atipamezol antagonisiert, im Folgenden wurden die Ratten mit oral gegebenem Metamizol alle 4 Stunden und Buprenorphin (subkutan zugeführt) alle 12 Stunden analgisiert.

### 2.3.2 Tierhaltung und Rehabilitation

Die Ratten wurden in Vierer-Käfigen bei Raumtemperatur gehalten ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), in welche sie auch direkt nach der Operation zurückgebracht wurden. Dort konnten sie sich frei bewegen und hatten beliebigen Zugang zu Wasser und Nahrung. Licht wurde in einem 12 Stunden Rhythmus an- und ausgeschaltet.

Zunächst zeigten die operierten Tiere während der ersten 3 Tage postoperativ einen hinkenden Gang, indem sie ihr linkes Bein nachzogen. Spätestens nach 5 Tagen normalisierte sich das Gangbild wieder und das linke Bein wurde mehr und mehr vollständig belastet. Nach einer Woche war kein Unterschied im Bewegungsablauf mehr festzustellen.

### **2.3.3 Euthanasie und Sehnenentnahme**

Entweder 14 oder 28 Tage nach der Operation wurden die Ratten euthanasiert. Dies geschah durch eine intravenöse Gabe von Pentobarbital. Die anschließende Präparation wurde je nach Zugehörigkeit zur Histologie- oder Biomechanikgruppe unterschiedlich ausgeführt: Bei den Ratten, die für die Biomechanik bestimmt waren, wurde nach Exploration der Achillessehne der Musculus triceps surae bis zum Knie freipräpariert und dort durchtrennt. Der Ansatz am Kalkaneus wurde nicht abgetrennt, sondern belassen. Stattdessen wurden die knöchernen Strukturen am Oberen Sprunggelenk mit Hilfe einer Rippenschere durchtrennt und somit der gesamte Fuß, die ganze Achillessehne und der anschließende Muskel in Zellophanfolie gebettet bei  $-18^{\circ}$  schockgefroren. Bei den für die Histologie bestimmten Tieren wurde der Muskel weniger weit nach proximal präpariert und die Sehne vorsichtig vom knöchernen Ansatz am Kalkaneus abgelöst. Knochen würde beim Anfertigen der Schnitte zu Zerreißen führen und könnte beim Cryomicrotom Defekte verursachen. Das so erhaltene Sehnenregenerat mit den initialen Sehnenstümpfen und einem kurzen Bereich Muskel wurde in 70%iges Methanol gelegt und bei  $+ 8^{\circ}$  C gelagert. Zuvor wurde ein circa einen Quadratmillimeter großes Stück von dem Regenerat für die PCR-Analyse abgetrennt und ebenfalls schockgefroren. Alle Vorgänge wurden fotografisch dokumentiert und die Sehne vor dem Ablösen bzw. Abtrennen des Fußes makroskopisch bezüglich ligamentärer Heilung, Kontinuität, Vaskularisationen und gegebenenfalls Neubildungen beurteilt.

## ***2.4 Biomechanische Untersuchung***

Die Arbeit unserer Forschungsgruppe beruhte auf 2 Schwerpunkten, einer davon war die biomechanische Untersuchung des Regeneratgewebes. Die Testung wurde von Florian Imhoff durchgeführt und ist Hauptinhalt seiner Dissertation, weswegen an dieser Stelle auf eine genaue Erläuterung des Vorgehens verzichtet wird. Um das Gesamtergebnis beurteilen zu können, ist es jedoch wichtig zu wissen, dass wir die Regenerate auf die für ihre Funktion exemplarischen Parameter Steifigkeit und maximale Versagenslast untersucht haben sowie der Ort der Zerreißen dokumentiert wurde.

## ***2.5 Histologische und Immunhistochemische Arbeitsschritte***

### **2.5.1 Anfertigung der Gefrierschnitte**

Vor der Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Sehnen zunächst für circa eine Woche in 5% EDTA gelegt, welches täglich gewechselt wurde. Ungefähr 24 Stunden vor dem Schneiden wurden sie dann in 5% Succrose-PBS-Lösung gebettet, was ein gleichmäßiges Einfrieren begünstigt. Direkt vor dem Schneidevorgang wurde die Sehne auf einen Objekthalter gelegt und mit einem Gefriermedium, das einen Gefrierschutz darstellt und die Frostschäden verringert (Einbettmedium für Gefrierschnitte, NEG 50, Firma Thermo), fixiert. Anschließend wurde bei  $-23 \pm 1^\circ\text{C}$  mit dem Cryomicrotom Microm HM 500 OMV die Sehne in Längsrichtung geschnitten, zunächst mit  $30 \mu\text{m}$  bis ca. zur Mitte der Sehnendicke getrimmt und dann  $12 \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, die dann auf Objektträger (Menzel Superfrost Plus) aufgezogen wurden. Auf einem Objektträger befanden sich immer zwei Schnitte, was beim Färbeprozess eine direkte Negativkontrolle zum besseren Vergleich neben einer Färbung ermöglichte.

### **2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, im Folgenden HE-Färbung abgekürzt, ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden, mit der die Strukturen feingeweblicher Schnitte angefärbt und unterschieden werden können. Besonders vor immunhistochemischen Färbungen, die besondere Aspekte betrachten, ist die HE-Färbung eine sehr geeignete Übersichtsfärbung, die in unzähligen Bereichen Anwendung findet und in sehr vielen Publikationen nachzulesen ist (z.B. TISCHER et al. 2007).

Hämatoxylin, der natürliche Farbstoff aus dem Blauholzbaum, muss zu Hämalan aufgearbeitet werden, welches basisch ist. Dieses färbt dann alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, also vor allem die Ribosomen im rauen endoplasmatischen Retikulum und die Zellkerne aufgrund der DNA.

Eosin hingegen wird synthetisch hergestellt und ist ein saurer Farbstoff, der alle basischen bzw. acidophilen Strukturen, insbesondere die Zellplasmae, rot anfärbt.

Zunächst durchliefen die Objektträger mit den Schnitten eine aufsteigende Alkoholreihe: Sie blieben für jeweils 5 Minuten in 70% Ethanol, 90% Ethanol, 96% Ethanol und schließlich 100% Ethanol, danach für zweimal 5 Minuten in Xylol. Anschließend verweilten sie wieder je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe mit den gleichen Verdünnungen wie oben beschrieben. Schließlich wurden sie 5 Minuten in destilliertem Wasser rehydratisiert und dann in filtriertem Hämalan (Mayer's, Merck Deutschland) gefärbt. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung erscheinen die Zellkerne nach der Hämalan-Färbung braun bis rötlich. Durch das anschließende Bläuen, was durch Erhöhen des pH-Wertes erreicht wird, schlägt der Farbton in Blau um. Dieser Vorgang fand unter fließendem Leitungswasser statt und dauerte 15 Minuten.

Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurde mit 0,1 % Eosinlösung (Merck Deutschland), welche durch Verdünnung einer 1 %igen Stammlösung, Filtrieren und Zugabe eines Tropfens Ethansäure entstand, gefärbt und wieder kurz mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, indem sie jeweils 5 Minuten in 70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol, 96% Ethanol und zweimal 5 Minuten in 100% reinem Ethanol verweilten. Im Anschluss wurden sie für je zweimal 5 Minuten in Xylol gelegt. Der letzte Schritt war das Fixieren durch das Eindeckmedium DPX (Sigma-Aldrich, Deutschland), worüber ein Deckplättchen geschoben wurde, und das Entfernen der Luftbläschen, welche die Auswertung behindert hätten. Nun mussten die gefärbten Proben ca. 5 Tage trocknen bzw. das DPX härten.

### 2.5.3 Immunhistochemische Markierung

Nach der Erstellung dieser Übersichtsfärbung wurde die Schnitte zum immunhistochemischen Nachweis einzelner Sehnenregeneratsbestandteile mit monoklonalen, aus der Maus gewonnenen Antikörpern gegen Kollagen I, Kollagen III, Pro-Kollagen I, Fibronectin, Versican, Vimentin und (zum Erfassen der Vaskularisierung) Laminin inkubiert (siehe Tabelle 1). Bei jeder Färbung wurden die Kontrollen mit PBS statt Primärantikörper inkubiert, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers ausschließen zu können. Es wurde darauf geachtet, bei jeder Färbung mindestens 2 Kontrollen herzustellen, um Probleme bei dieser speziellen Färbung zu detektieren, und letztendlich von jeder Sehne mindestens einmal auch eine Kontrolle angefertigt zu haben, um auszuschließen, dass es bei einem bestimmten Individuum zu unspezifischen Reaktionen kommt.

Antigen	Antikörper (Klon-Bezeichnung)	Dilution	Enzymatische Vorbehandlung	Quelle	Referenz
Kollagen I	ColIII	1:2000	HC (1,5 U/ml)	Sigma	Mayne 1988
Kollagen III	FH7A	1:4000	HC (1,5 U/ml)	Sigma	Olsen& Ninumiya 1993
Pro-Kollagen I	M-38	1:5	keine	DHSB	McDonald et al. 1986
Fibronectin	HFN7,1	1:5	keine	DHSB	Schoen et al. 1982
Laminin	2,00E+008	1:5	keine	DHSB	Engvall et al. 1986
Versican	12C5	1:5	AC (0,25 U/ml)	DHSB	Asher et al. 1991
Vimentin	Amf-17b	1:5	keine	DHSB	Isaacs et al. 1989
Kontrolle	keine	keine	keine		

*Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper: alle monoklonal und aus der Maus gewonnen.*

Vor Beginn der immunhistochemischen Markierung wurden die Objektträger zunächst noch einmal genau beschriftet und die Schnitte mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vector Laboratories, USA) umkreist, so dass sich die später aufzutragenden Lösungen auf der Probe

blieben. Anschließend wurden die noch gefrorenen Schnitte in mit Tween versetztem PBS (Zusammenstellung siehe Tabelle 2, unten) rehydriert. Dann wurden sie für 30 Minuten in eine Lösung aus 150 ml Methanol (100%) und 1,5 ml Wasserstoffperoxid (30%) gelegt, um die endogene Peroxidase zu inhibieren. Dieser Schritt diente lediglich der doppelten Absicherung, denn auch die Fixierung der Proben in Methanol direkt im Anschluss an die Sehnengewinnung unterdrückt diese bereits. Danach erfolgte der erste Waschvorgang, dazu wurden die Schnitte für 3 mal 5 Minuten in jeweils frischen, mit Tween versetzten Phosphatpuffer gelegt. Im Anschluss daran erfolgte bei den Färbungen, die Kollagen I, Kollagen III oder Versican nachweisen sollten, die Enzymbehandlung, welche nötig war, um die durch die Antikörper zu erkennenden Epitope zu demaskieren. Es wurde dazu entweder Hyaluronidase von der Firma Sigma (bei den Kollagenfärbungen) zu 1,5 U/ml oder Chondroitinase AC (ebenfalls Sigma) zu 0,25 U/ml verdünnt und dann per Pipette auf die Schnitte aufgetragen. Auch die Kontrollen erhielten diese Enzymbehandlung. Zur Inkubation verweilten die Schnitte dann in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37°C. Danach fand wieder ein Waschvorgang, 3 mal 5 Minuten in mit Tween versetztem PBS, statt. Zur Reduktion unspezifischer Proteinbindungen wurde nun Pferdeserum (Sigma, Deutschland), 1:20 verdünnt, eingesetzt, welches 60 min auf die Schnitte einwirkte. Das Serum wurde nur vorsichtig durch Abklopfen entfernt und nicht abgewaschen. Daraufhin wurde der jeweilige Primärantikörper aufgetragen, der für 30 Minuten auf den Schnitten verblieb, bis er durch einen erneuten dreimaligen Waschvorgang entfernt wurde. Nun kam der 1:200 verdünnte Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG (H+L), ratten-adsorbiert hergestellt im Pferd, biotiniliert, Vector Laboratories, Vertrieb über Biozol) zum Einsatz, der wiederum für 30 Minuten einwirkte. Dieser biotinierte Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte nun der Nachweis der gebundenen Primärantikörper mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Kit (Vectastain ABC 'Elite', Vector Laboratories, USA), welches ebenfalls für 30 Minuten in einer Black Box auf die Schnitte einwirkte. Danach wurde der ABC-Komplex durch den üblichen Vorgang abgewaschen, woraufhin das Chromogen DAB (DAB ABC Kit Vectastain Standard, Vector Laboratories, USA) möglichst zügig aufgetragen wurde und in der Black Box 4 Minuten auf den Schnitten verblieb, bevor der braune, unlösliche Farbniederschlag durch Leitungswasser gestoppt wurde. Zur besseren Übersicht bzw. Kontrastierung fand dann noch eine Kerngegenfärbung durch filtrierte Mayer's Hämalaun statt, welches 20 Sekunden auf die Schnitte einwirkte, bevor ebenfalls in Leitungswasser für eine Minute das Bläuen stattfand. Nun durchliefen die Schnitte zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe, nämlich für jeweils 5 Minuten von 70%, 80% und 90% Ethanol und zweimal 5 Minuten in 100% Ethanol, abschließend wurden sie Xylol überführt (zweimal 5 Minuten). Dann fand analog zu der HE-Färbung das dauerhafte Eindecken mit DPX unter Vermeidung von Lufteinschlüssen statt und die Schnitte trockneten für ca. 7 Tage.



Menge	Bestandteil	Summenformel	Hersteller
0,32 g/l	di-Natriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Merck
9 g/l	Natriumchlorid	$\text{NaCl}$	Merck
1,42 g/l	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$	Merck

gelöst in 1 l Aqua dest, z.T. mit 1 ml Tween (Sigma) versetzt

Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösung PBS.

### 2.5.4 Zonale Einteilung und mikroskopische Auswertung

Alle Schnitte wurden zweimal von mir ausgewertet, ohne dass mir die Kennzeichnung der Sehne, geschweige denn ihre Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe bekannt war. Die Übereinstimmung der voneinander unabhängigen Auswertung lag bei 95%. In den Fällen, in denen es zu unterschiedlichen Beurteilungen gekommen war, wurde die Sehne durch Stefan Milz, Professor am Anatomischen Institut der LMU München, erneut und endgültig kategorisiert. Die Auswertung der HE-Färbung wurde abschließend bei allen Schnitten von Professor Milz vorgenommen.

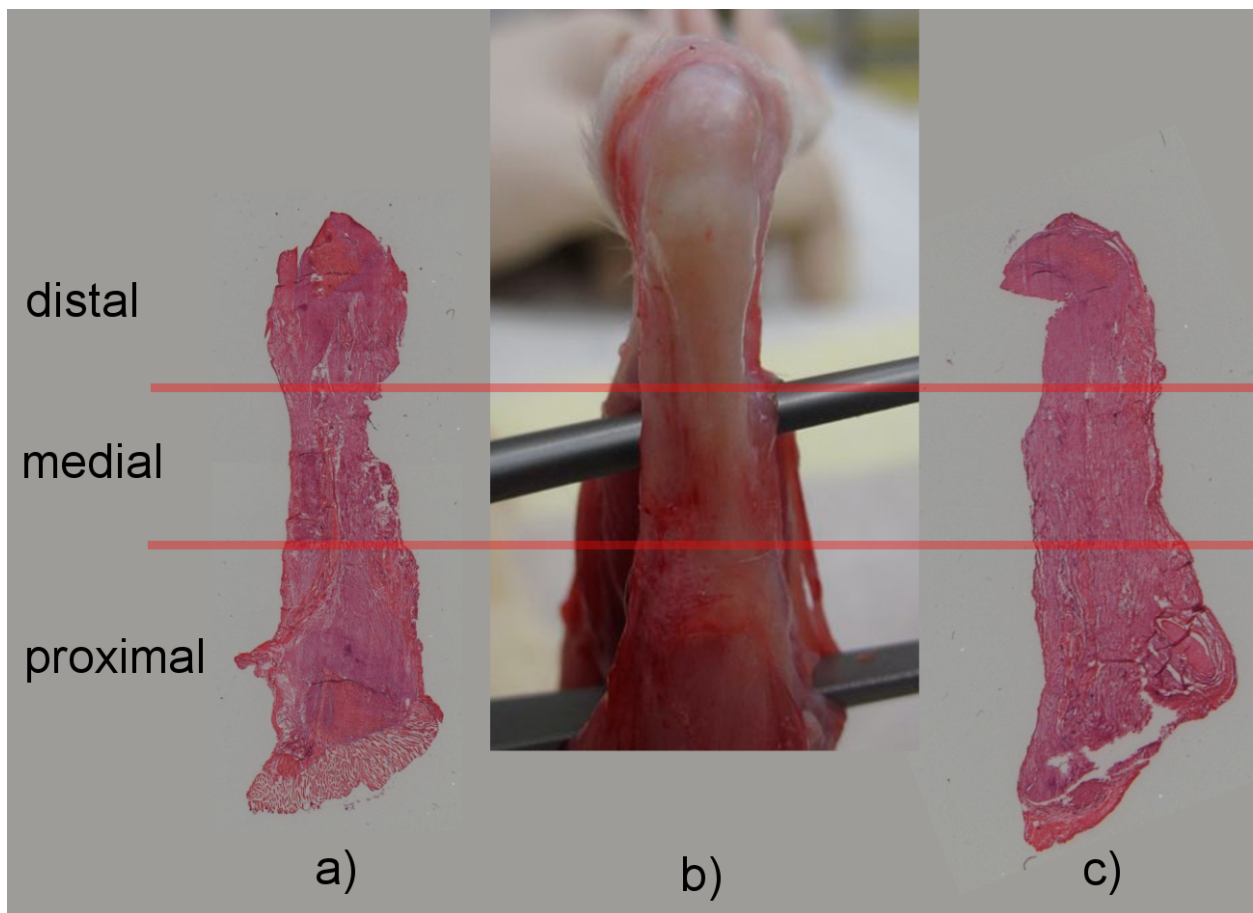


Abbildung 7: Makroskopisches Präparat (Mitte, b) im Vergleich zu angefertigten Schnitten in HE-Färbung (a und c). Zonale Einteilung in distal, medial und proximal.

Um eine differenzierte Auswertung zu ermöglichen, wurden die Schnitte gedanklich in drei Drittel, ein proximales, ein mediales und ein distales, eingeteilt (Abbildung 7) und bei der immunhistologischen Auswertung wurde jedes Drittel einzeln bewertet. Es wurde zwischen positiver Anfärbung „+“, sehr schwach positiver Anfärbung „(+“ und negativem Färbeergebnis „-“ unterschieden und auch die Verteilung bzw. das Muster der Färbung erfasst. Konnten relevante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden, wurden diese Ergebnisse in Zahlen überführt (2 für positiv, 1 für schwach positiv und 0 für negativ), um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Ein Sehnenregenerat konnte also höchstens 6 Punkte bei positiver Färbereaktion in allen drei Dritteln und konträr dazu 0 Punkte bei negativen Reaktionen in allen drei Dritteln erreichen.

Für die Auswertung der HE-Färbung wurde ein semiquantitatives Bewertungsverfahren entwickelt, in Anlehnung an das System von LONGO et al. 2009 (modifizierter MOVIN-Score nach MOVIN et al. 1997) bzw. Bonar-Skala (COOK et al. 2004), welche bei OKAMOTO et al. 2010 Anwendung fand. Es wurden neben der Kernform der Tendozyten, welche normalerweise typisch oval ist, auch die regionalen Unterschiede bezüglich der Zellzahl, welche in gesunden Sehnen sehr niedrig ist, bewertet. Darüber hinaus eine Beurteilung der erhöhten Vaskularisierung, einer abgeschwächten Anfärbbarkeit des Kollagens und vor allem sowohl der Faserstruktur als auch deren Ausrichtung, welche ja normalerweise parallel ist, statt. Diese 6 Parameter konnten jeweils mit 0 bis 3 Punkten beurteilt werden, wobei 0 Punkte bedeutete, dass kein Unterschied zu gesundem Sehngewebe beobachtet werden konnte. 1 Punkt sagte aus, dass das Gewebe nur leicht verändert aussah, wohingegen 2 Punkte eine deutlich erkennbar nicht gesunde Sehne kennzeichneten. 3 Punkte erhielt das Regeneratgewebe, wenn es sich in dem jeweils zu beurteilenden Parameter deutlichst von gesundem Sehngewebe unterschied. Somit konnten sowohl die einzelnen Merkmale der Sehnen miteinander verglichen werden, als auch eine Summe gebildet werden, die die Gesamtqualität des Regenerats abbilden sollte. Ein Sehnenregenerat konnte bestenfalls in der Summe 0 Punkte erreichen, was bedeuten würde, dass es sich um eine vollkommen gesund erscheinende Sehne handeln würde. Das schlechteste zu erzielende Ergebnis waren 18 Punkte, wenn ein Exemplar in allen 6 Bereichen kaum Ähnlichkeit mit gesundem Sehngewebe hatte.

## ***2.6 Statistische Analyse***

Die zuvor erläuterten Punktwerte wurden dazu genutzt, mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS Statistics und geeigneter statistischer Tests herauszufinden, ob die gefundenen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bFGF-LV-MSK, eGFP-LV-MSK und PBS, aber auch zwischen den beiden Auswertzeitpunkten von 14 und 28 Tagen, statistisch signifikant waren, also festzustellen, inwiefern diese Unterschiede auch durch Zufall bedingt sein könnten. Dazu wurde zuvor ein Signifikanzniveau von 95% festgelegt. Je nach Ausprägung der Merkmale

kamen parametrische Tests, wie der Fisher-Exact-Test, zum Einsatz (bei bis zu drei Merkmalsausprägungen, z.B. Pro-Collagen I bei den 14-Tage-Tieren) oder aber nicht-parametrische Tests wie der Kruskal-Wallis-Test, wenn es viele Ausprägungen gab (z.B. beim semiquantitativen HE-Score), um die Aussagekraft des Tests möglichst hoch zu halten. Das ist der Grund, warum beispielsweise bei der Procollagen I Färbung je nach Auswertzeitpunkt andere Tests durchgeführt wurden, da die Merkmalsausprägung unterschiedlich war (nach 14 Tagen drei, nach 28 Tagen sechs ermittelte Summenwerte) und es bei Anwendung der gleichen Tests zu Verzerrungen gekommen wäre. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse durch geeignete Tabellen und Graphiken veranschaulicht.

## 3. Ergebnisse

### *3.1 Biomechanische Ergebnisse*

Da die biomechanische Analyse dieses Projekts Gegenstand einer eigenständigen Arbeit ist, sollen hier nur knapp die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst werden:

Eine Verbesserung der biomechanischen Funktion konnte im Hinblick auf die maximale Versagenslast prozentual zur gesunden Gegenseite in den Stammzellgruppen nur nach 14 Tagen festgestellt werden (eGFP-Gruppe zur PBS-Gruppe  $p = 0,036$ ; 95% Konfidenzintervall [CI], 0,02 bis 0,36 und bFGF zur PBS-Gruppe ( $p = 0,063$ ; 95% CI, -0,01 bis 0,32), wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren, die Stammzellen mit und ohne bFGF-Expression erhalten hatten, fand ( $p = 0,751$ ; 95% CI, -0,22 bis 0,16). Die Kontrollgruppe hatte nach 14 Tagen noch etwas schlechtere Ergebnisse, zum Untersuchungszeitpunkt nach 28 Tagen waren sie jedoch dank einer signifikanten Verbesserung der maximalen Versagenslast vergleichbar (( $p = 0,285$  für PBS versus eGFP;  $p = 0,296$  für PBS versus bFGF; and  $p = 0,929$  für eGFP versus bFGF).

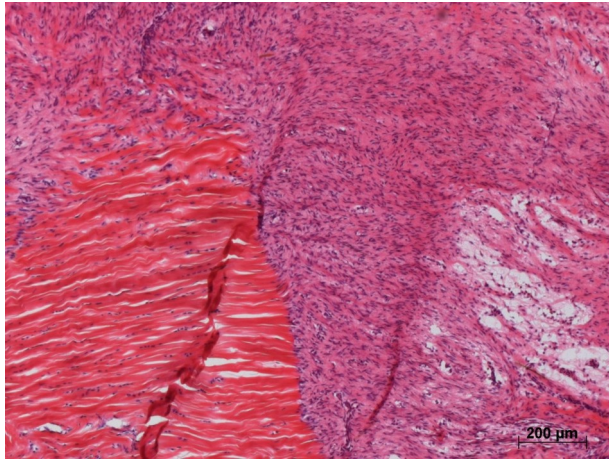
Bei der Steifigkeit fanden sich beim ersten Untersuchungszeitpunkt keine relevanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen ( $p$ -Werte zwischen 0,186 und 0,522). Nach 28 Tagen zeigte sogar die Kontrollgruppe bessere Werte ( $p = 0,024$ ; 95% CI, -0,46 bis -0,05 für PBS zu eGFP;  $p = 0,431$ ; 95% CI, -0,41 bis 0,21 für PBS zu bFGF). Zwischen der bFGF- und der eGFP zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,259$ ).

Demnach konnte man bei der biomechanischen Analyse lediglich nach 14 Tagen und dort auch nur sehr diskrete Vorteile bei den Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erkennen.

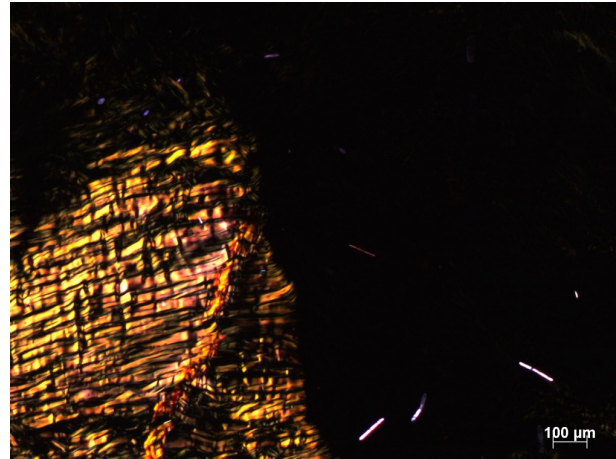
### *3.2 Histologische und immunhistochemische Ergebnisse*

#### **3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Schnitte der Sehnen, die nach 14 Tagen gewonnenen wurden, zeigten überwiegend Narbengewebe, vor allem im Übergangsbereich zu den Sehnenstümpfen (siehe Abbildungen 8 und 9).



*Abbildung 8: Übergang Sehnenstumpf zu Narbengewebe (5-fache Vergrößerung): Ausdünnung der Sehne nach oben hin sichtbar links noch vitale Sehne mit Zellkernen, an der Defektgrenze Kernverlust als Zeichen der Degeneration*



*Abbildung 9: Gleicher Ausschnitt wie links (Übergang Sehnenstumpf-Narbengewebe, 5-fach vergrößert); in der Polarisation abruptes Abbrechen der Kollagenfasern (als doppelbrechende Strukturen) erkennbar*

Eine beginnende Organisation von Granulationsgewebe hin zu typischen Sehnenstrukturen wie parallelisierten Fasern und typisch oval geformten Tendozyten konnte jedoch gesehen werden. Der Hauptunterschied zwischen den Sehnen, die nach 4 Wochen gewonnenen wurden, zu denen, die nach 2 Wochen entnommen wurden, zeigte sich zum Einen an der deutlich erhöhten Anzahl an Fasern, die zudem eine verbesserte Struktur aufwiesen, und zum Anderen in der stärker parallelisierten Anordnung. In diesen Bereichen konnte bei den 4-Wochen-Tieren kein Exemplar mehr identifiziert werden, das mit 3 Punkten zu bewerten war, dessen Gewebe also sehr stark von gesundem Gewebe abwich. Auch die Rundung der Zellkerne und die regionalen Unterschiede in der Zellzahl nahmen ab und die Intensität der Kollagenfaserfärbung erschien wieder normal. Die geringste Verbesserung war im Bereich der erhöhten Vaskularität zu beobachten. Keine einzige Sehne zeigte auch nach 4 Wochen das Erscheinungsbild einer annähernd gesunden Sehne, wie sie die gesunden Gegenseiten, die auch mit 0 Punkten bewertet werden konnten, darstellten, bzw. eine vollständige Reorganisation, weswegen keine Aussage über das endgültige histologische Ergebnis getroffen werden kann. Die zwei folgenden Tabellen (3 und 4) verdeutlichen diese Ergebnisse. Zur genaueren Analyse sei auf die statistische Auswertung unter Punkt 3.2.5 verwiesen.

No.	Gruppe	Schnitt	Faser-Struktur	Faseran-Ordnung	Kern-Form	Zell-Zahl	Vaskulari-Sierung	Kollagen-Färbung	Summe
27	PBS	1/1+2 + 20/1+2	3	2	2	3	3	2	15
31	PBS	7/1+2	2	2	2	2	2	2	13
35	PBS	1/1+2	1	1	2	2	2	2	10
38	PBS	1/1+2	2	3	2	2	2	2	13
39	PBS	1/1+2	2	2	2	3	2	2	13
46	PBS	1/1+2	3	2	2	2	2	2	13
28	eGFP	10/1+2	1	1	1	1	1	1	6
32	eGFP	1/1+2	3	3	3	3	3	2	17
37	eGFP	1/1+2	2	3	2	2	2	1	12
41	eGFP	1/1+2	1	2	2	2	2	1	10
43	eGFP	12/1+2 + 13/1+2	3	3	3	3	2	2	16
44	eGFP	1/1+2 + 10/1+2 + 20/1+2	1	1	1	2	2	1	8
29	bFGF	1/1+2	2	2	2	2	3	1	12
30	bFGF	2/1+2	2	2	2	3	2	2	13
33	bFGF	1/1+2	1	1	1	2	2	1	8
40	bFGF	1/1+2	2	2	1	1	2	2	10
42	bFGF	2/1+2	2	2	2	2	2	1	11
45	bFGF	1/1+2	3	3	2	3	2	2	15
21	gesunde Sehne	9/1+2	0	0	0	0	0	0	0
24	gesunde Sehne	20/1+2	0	0	0	0	0	0	0

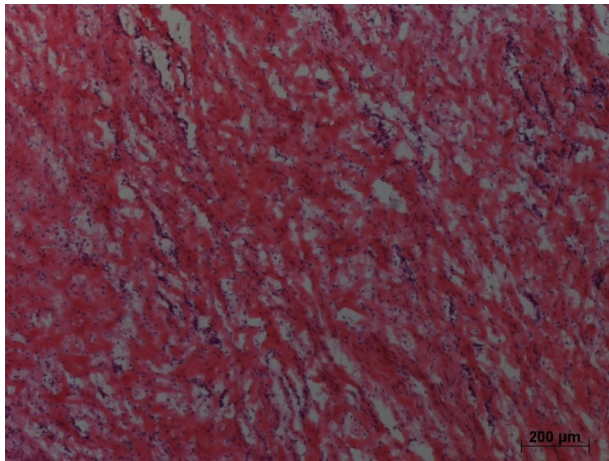
*Tabelle 3: Ergebnisse der HE-Färbung nach 14 Tagen (0 Punkte entsprechen dem Merkmal einer gesunden Sehne, 3 Punkte bedeuten deutlichst abweichendes Aussehen)*

In jeder der drei Versuchsgruppen gab es Sehnen, die viele Charakteristika einer gesunden Sehne aufwiesen, aber auch Exemplare, die sehr stark von normalem Sehngewebe abwichen und noch eindeutig als Narbe einzustufen waren, wie Tabellen 3 und 4 darstellen. Die statistische Auswertung des semiquantitativen Beurteilungsschemas wird unter Punkt 3.2.5 erläutert und auf die Tendenzen der besseren Sehnenqualität in der eGFP-LV-MS-Gruppe und der bFGF-LV-MS-Gruppe eingegangen.

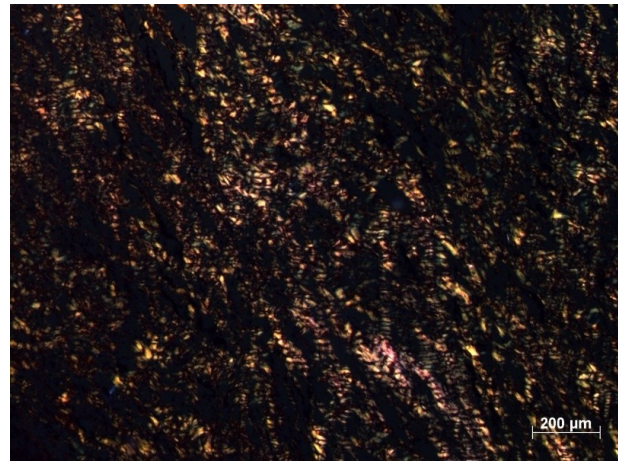
No.	Gruppe	Schnitt	Faser-Struktur	Faseran-Ordnung	Kern-Form	Zell-Zahl	Vaskulari-Sierung	Kollagen-Färbung	Summe
753	PBS	1/1 + 1/2	2	1	2	2	2	0	9
752	PBS	1/1 + 1/2	2	3	2	2	2	0	11
911	PBS	1/1 + 1/2	2	1	1	2	2	0	8
909	PBS	1/1 + 1/2	1	1	2	2	2	0	8
910	PBS	1/1 + 1/2	3	3	2	2	2	0	12
913	PBS	1/1 + 1/2	2	1	2	2	2	0	9
758	eGFP	1/1 + 1/2	1	1	2	2	2	0	8
754	eGFP	1/1 + 1/2	2	1	2	2	2	0	9
914	eGFP	1/1 + 1/2	1	1	2	2	2	0	8
915	eGFP	1/1 + 1/2	2	2	2	2	2	0	10
922	eGFP	1/1 + 1/2	2	1	1	2	1	0	7
923	eGFP	1/1 + 1/2	1	1	1	1	1	0	6
755	bFGF	1/1 + 1/2	1	1	1	2	2	0	7
756	bFGF	1/1 + 1/2	2	2	2	2	2	0	10
907	bFGF	1/1 + 1/2	1	1	1	1	1	0	6
908	bFGF	1/1 + 1/2	3	2	2	2	2	0	11
916	bFGF	1/1 + 1/2	1	1	2	2	1	0	7
912	bFGF	1/1 + 1/2	1	1	2	2	2	0	8

*Tabelle 4: Ergebnisse der HE-Färbung nach 28 Tagen (0 Punkte entsprechen dem Merkmal einer gesunden Sehne, 3 Punkte bedeuten deutlichst abweichendes Aussehen)*

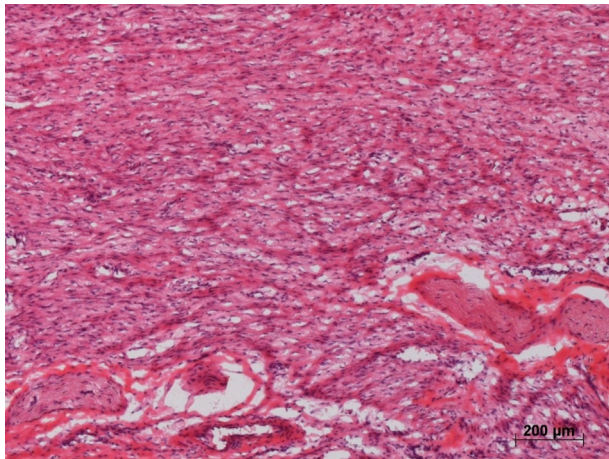
Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch das relativ gute, da faserreiche (aber noch relativ unorganisiert), Erscheinungsbild eines Sehnenregenerats der bFGF-LV-MS-Gruppe, der gleiche Ausschnitt (Abbildung 11) in der Polarisations beweist einen hohen Kollagenanteil durch hohes Vorkommen einer doppelbrechenden Struktur. Auf Abbildung 12 sieht man hingegen, dass weniger Kollagen gebildet worden ist, dennoch ist eine beginnende Faserordnung zu erkennen. Dieses Sehnenregenerat stammt von einem mit eGFP-LV-MS behandeltem Tier. Noch weniger Fasern zeigt Abbildung 13, das die Sehne eines mit PBS injizierten Tieres darstellt: Man sieht darauf den Abbruch der ehemaligen Achillessehne in besonders kollagenarmes Granulationsgewebe.



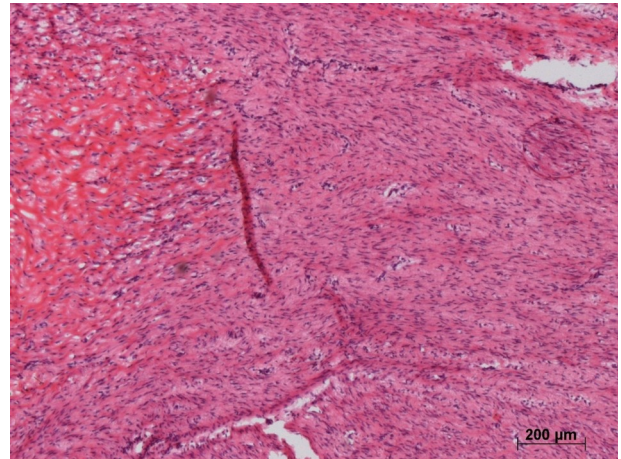
*Abbildung 10: Sehne der bFGF-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x)*



*Abbildung 11: Sehne der bFGF-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x), Polarisation*



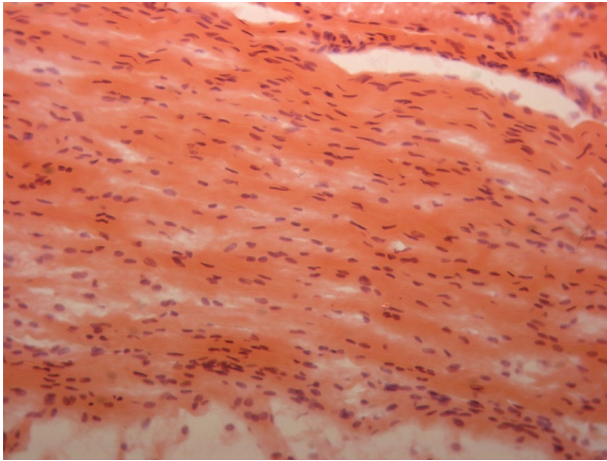
*Abbildung 12: Sehne der eGFP-LV-MS-C-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x)*



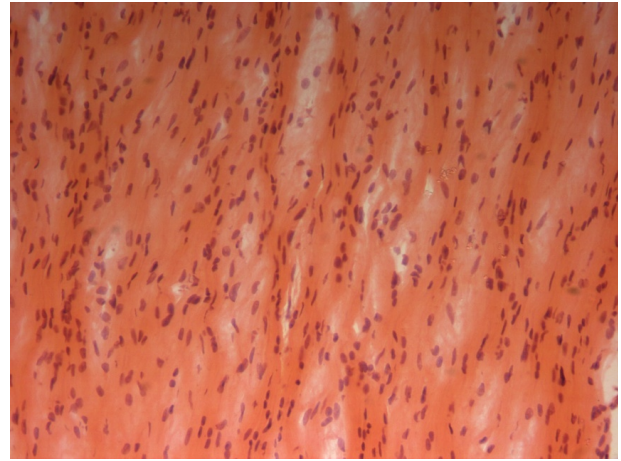
*Abbildung 13: Sehne der PBS-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x)*

Nach 4 Wochen zeigten einige Exemplare der bFGF-LV-MDC-Gruppe dichte, parallele Fasern und ovale Kerne (Abbildung 14). Abbildung 15 stellt zwar noch aufgelockertes Gewebe dar, aber man kann viele, parallele Fasern erkennen. Die Kerne sind oval, jedoch ist die Zellzahl noch deutlich erhöht.



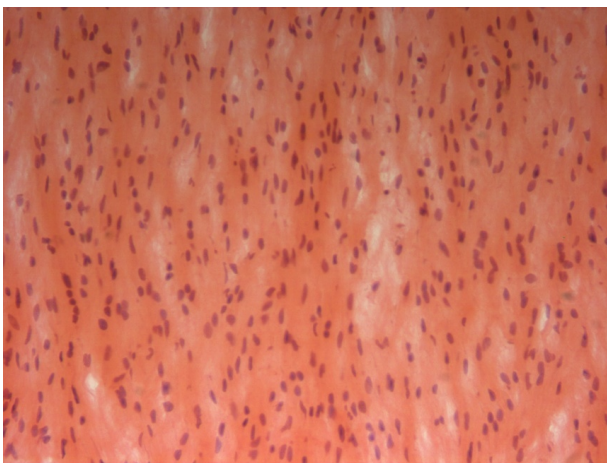


*Abbildung 14: bFGF-Sehne nach 28 Tagen (20-fach vergrößert)*

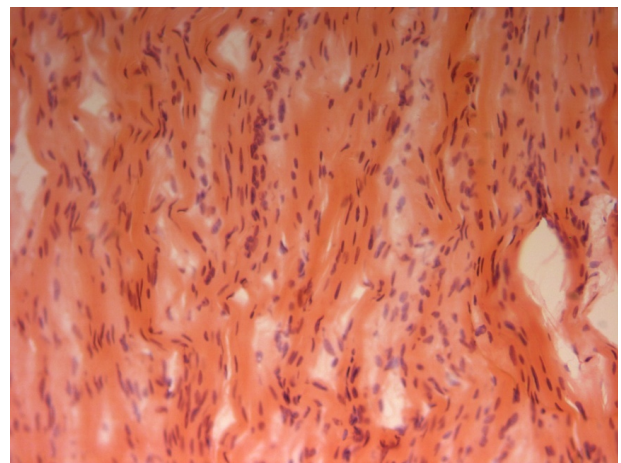


*Abbildung 15: bFGF-Sehne nach 28 Tagen (20-fach vergrößert)*

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen Sehnenregenerate der eGFP Gruppe. Auf Abbildung 16 zieht man zum einen zu viele und runde Zellkerne, die noch kaum Ähnlichkeit mit normalen Tendozyten aufweisen. Zum anderen weist diese Sehne bereits sehr viele Fasern auf, die jedoch noch nicht ausreichend voneinander abgrenzbar und parallelisiert sind. Abbildung 17 zeigt parallele Fasern, die nicht straff genug sind.

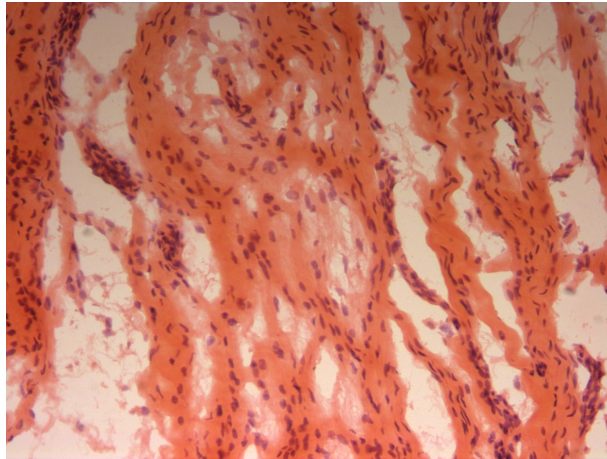


*Abbildung 16: Sehne der eGFP-LV-MS Gruppe nach 28 Tagen in 20-facher Vergrößerung*



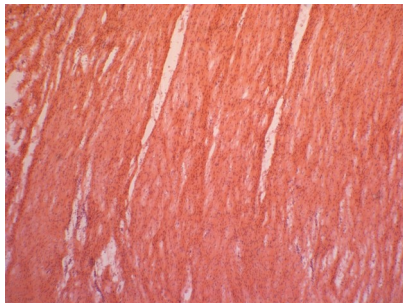
*Abbildung 17: Sehne der eGFP-LV-MS Gruppe nach 28 Tagen in 20-facher Vergrößerung*

Auf Abbildung 18 ist eine Sehne der PBS-Gruppe zu sehen, die sehr aufgelockertes Gewebe aufweist und deren Zellkerne zu rund und deren Fasern kaum parallel erscheinen.

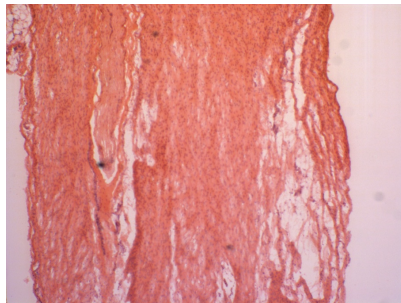


*Abbildung 18: Sehne der PBS Gruppe nach 28 Tagen, 20-fach vergrößert*

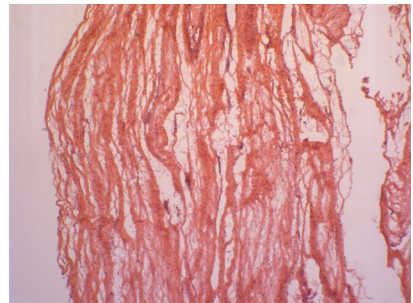
Zur Übersicht dienen die Abbildungen 19 bis 21, auf denen in 4facher Vergrößerung Sehnen jeder Gruppe dargestellt sind. Die bFGF-Sehne (Abbildung 19) weist viele, parallele Fasern auf, wirkt aber immer noch aufgelockert und zu zellreich. Die Sehne der eGFP-LV-MSK-Gruppe (Abbildung 20) erscheint ebenfalls sehr kollagenreich, die Fasern sind etwas weniger organisiert. Abbildung 21 zeigt eine Sehne der PBS-Gruppe mit wenigen Fasern und stark aufgelockertem Gewebe, insgesamt also kaum Sehnenstruktur.



*Abbildung 19: Repräsentative bFGF-Sehne nach 28-Tagen, 4-fach vergrößert*



*Abbildung 20: Repräsentative eGFP-Sehne nach 28-Tagen, 4-fach vergrößert*



*Abbildung 21: Repräsentative PBS-Sehne nach 28-Tagen, 4-fach vergrößert*

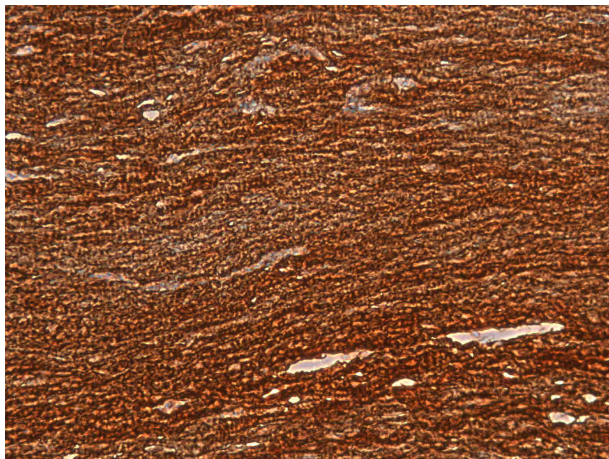
## **3.2.2 Kollagene**

### **3.2.2.1 Kollagen I**

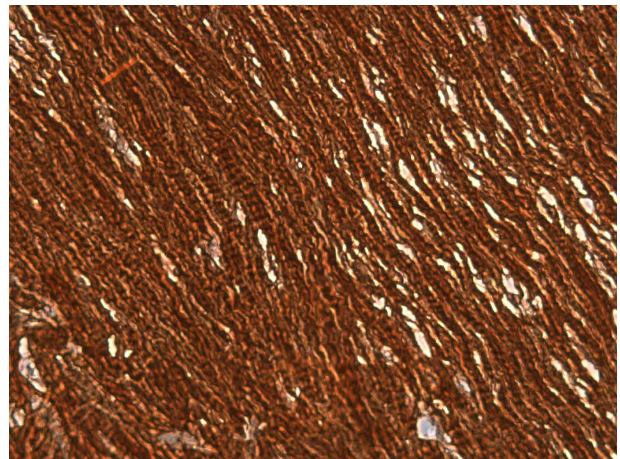
Die immunhistochemische Markierung des Kollagen Typ I fiel in allen Fällen sehr intensiv aus, sowohl bei den nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregeneraten (siehe Tabelle 5) als auch bei den nach 28 Tagen (siehe Tabelle 6) geernteten Exemplaren und den gesunden Gegenseiten (siehe auch Abbildungen 22 bis 27).

No.	Gruppe	Schnitt	Datum	Proximal	Medial	Distal
27	PBS	4/1+2	21. Aug '10	+	+	+
31	PBS	11/1	21. Aug '10	+	+	+
35	PBS	2/1	21. Aug '10	+	+	+
38	PBS	2/1	21. Aug '10	+	+	+
39	PBS	2/1	21. Aug '10	+	+	+
46	PBS	2/1	21. Aug '10	+	+	+
28	eGFP	2/1+2	21. Aug '10	+	+	+
32	eGFP	12/1	21. Aug '10	+	+	+
37	eGFP	14/1	21. Aug '10	+	+	+
41	eGFP	1/1	21. Aug '10	+	+	+
43	eGFP	1/1	21. Aug '10	+	+	+
44	eGFP	3/1	21. Aug '10	+	+	+
29	bFGF	3/1+2	21. Aug '10	+	+	+
30	bFGF	1/1	21. Aug '10	+	+	+
33	bFGF	2/1	21. Aug '10	+	+	+
40	bFGF	3/1	21. Aug '10	+	+	+
42	bFGF	2/1	21. Aug '10	+	+	+
45	bFGF	2/1	21. Aug '10	+	+	+
21	gesunde Sehne	10/1	21. Aug '10	+	+	+
24	gesunde Sehne	22/1+2	21. Aug '10	+	+	+

*Tabelle 5: Anfärbung Antigen Kollagen I der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*



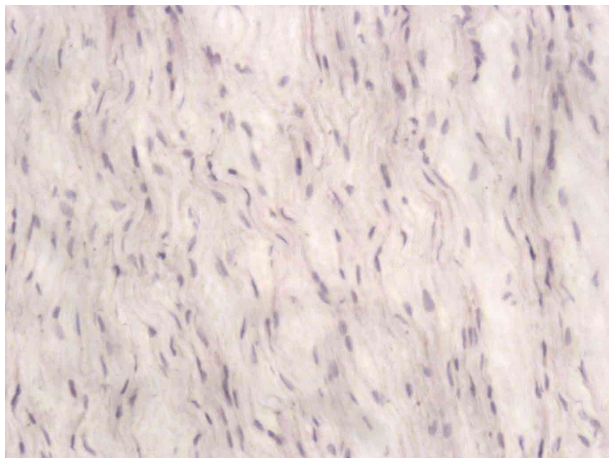
*Abbildung 22: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (eGFP-Gruppe) Kollagen I, 10 x*



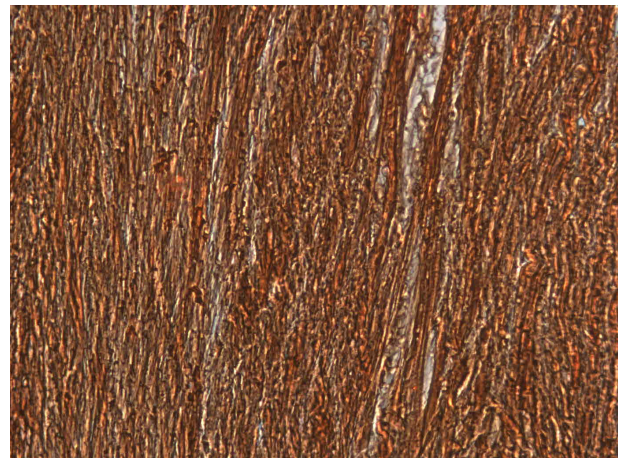
*Abbildung 23: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (bFGF-Gruppe), Kollagen I, 10 x*

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
753	PBS	3/1 + 3/2	21.2.	+	+	+
752	PBS	2/1	21.2.	+	+	+
911	PBS	2/1	21.2.	+	+	+
909	PBS	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
910	PBS	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
913	PBS	2/1	21.2.	+	+	+
758	eGFP	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
754	eGFP	2/1	21.2.	+	+	+
914	eGFP	2/1	21.2.	+	+	+
915	eGFP	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
922	eGFP	2/1	21.2.	+	+	+
923	eGFP	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
755	bFGF	2/1	21.2.	+	+	+
756	bFGF	2/1	21.2.	+	+	+
907	bFGF	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
908	bFGF	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
916	bFGF	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
912	bFGF	2/1 + 2/2	21.2.	+	+	+
757	gesunde Sehne	3/1 + 3/2		+	+	+
918	gesunde Sehne			+	+	+

*Tabelle 6: Anfärbung Antigen Kollagen I der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*



*Abbildung 24: Negativkontrolle, Kollagen I, 20 x*



*Abbildung 25: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (bFGF-Gruppe), Kollagen I, 10 x*

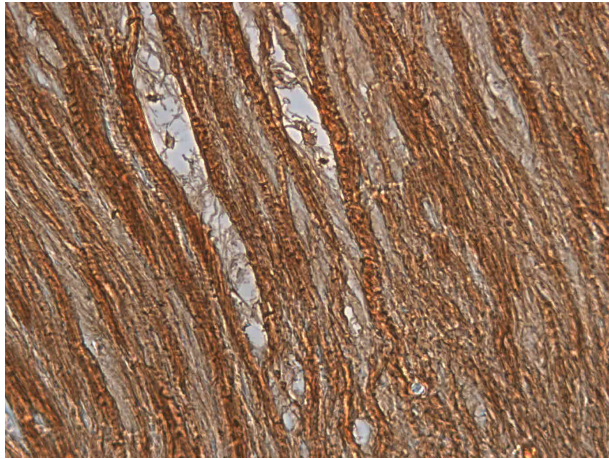


Abbildung 26: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (eGFP-Gruppe), Kollagen I, 10 x

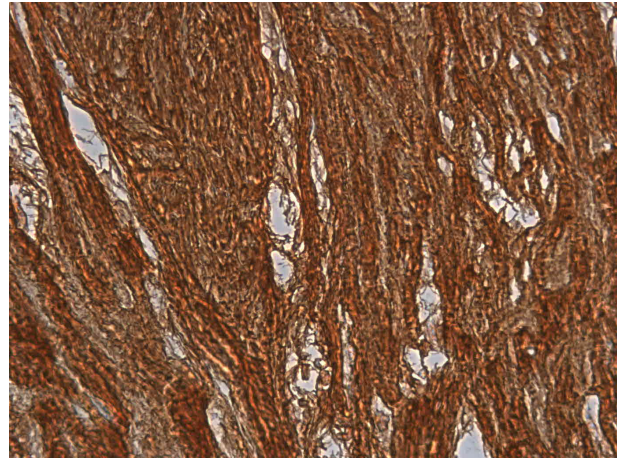


Abbildung 27: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (PBS-Gruppe), Kollagen I, 10 x

### 3.2.2.2 Kollagen III

Ebenso wie bei Kollagen Typ I verhielt es sich auch bei der Reaktion auf Kollagen Typ III: auch hier ließen sich alle Schnitte (siehe Tabellen 7 und 8 sowie Abbildungen 28 bis 33) sehr intensiv anfärben.

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
27	PBS	8/1+2	22. Aug '09	+	+	+
31	PBS	9/1+2	22. Aug '09	+	+	+
35	PBS	20/1+2	22. Aug '09	+	+	+
38	PBS	3/1+2	22. Aug '09	+	+	+
39	PBS	4/1+2	22. Aug '09	+	+	+
46	PBS	3/1+2	22. Aug '09	+	+	+
28	eGFP	12/1+2	22. Aug '09	+	+	+
32	eGFP	9/1+2	22. Aug '09	+	+	+
37	eGFP	9/1+2	22. Aug '09	+	+	+
41	eGFP	4/1+2	22. Aug '09	+	+	+
43	eGFP	4/1+2	22. Aug '09	+	+	+
44	eGFP	21/1+2	22. Aug '09	+	+	+
29	bFGF	6/1+2	22. Aug '09	+	+	+
30	bFGF	3/1+2	22. Aug '09	+	+	+
33	bFGF	3/1+2	22. Aug '09	+	+	+
40	bFGF	4/1+2	22. Aug '09	+	+	+
42	bFGF	5/1+2	22. Aug '09	+	+	+
45	bFGF	4/1+2	22. Aug '09	+	+	+
21	gesunde Sehne	17/1+2	22. Aug '09	+	+	+
24	gesunde Sehne	42025	22. Aug '09	+	+	+

Tabelle 7: Anfärbung Antigen Kollagen III der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
753	PBS	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
752	PBS	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
911	PBS	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
909	PBS	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
910	PBS	3/1	22.2.	+	+	+
913	PBS	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
758	eGFP	2/1	22.2.	+	+	+
754	eGFP	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
914	eGFP	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
915	eGFP	3/1	22.2.	+	+	+
922	eGFP	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
923	eGFP	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
755	bFGF	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
756	bFGF	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
907	bFGF	3/1	22.2.	+	+	+
908	bFGF	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+
916	bFGF	3/1	22.2.	+	+	+
912	bFGF	3/1	22.2.	+	+	+
757	gesunde Sehne	5/1	22.2.	+	+	+
918	gesunde Sehne	3/1 + 3/2	22.2.	+	+	+

Tabelle 8: Anfärbung Antigen Kollagen III der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate

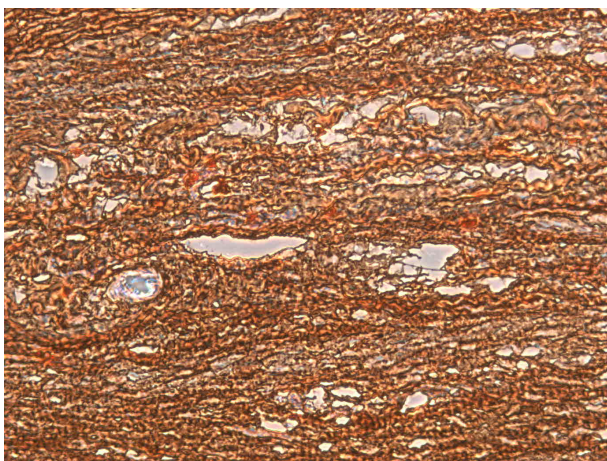


Abbildung 28: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (eGFP-Gruppe), Coll III, 10 x

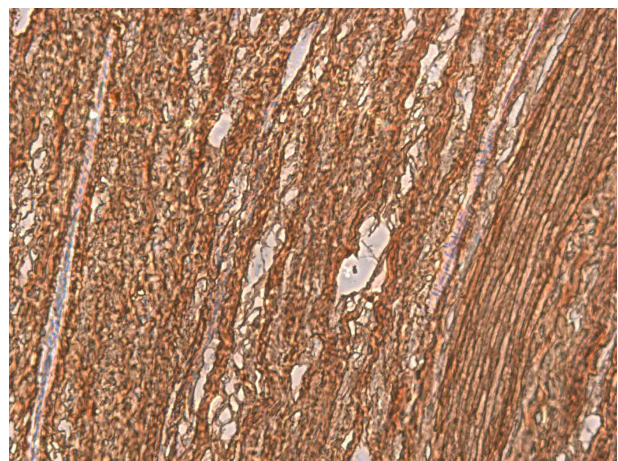
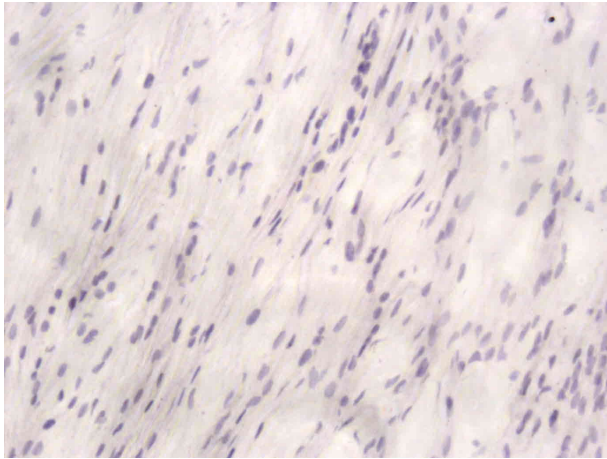
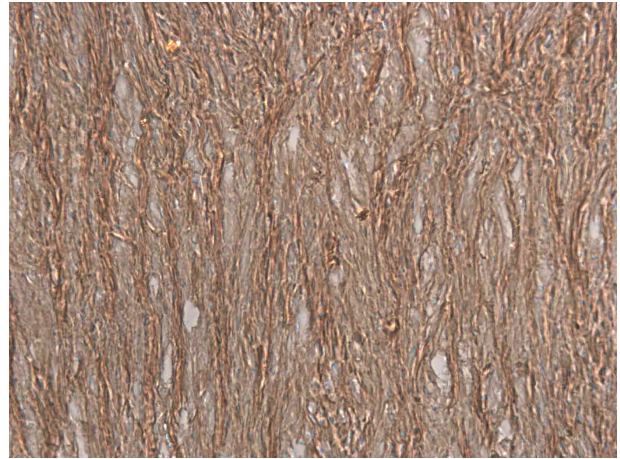


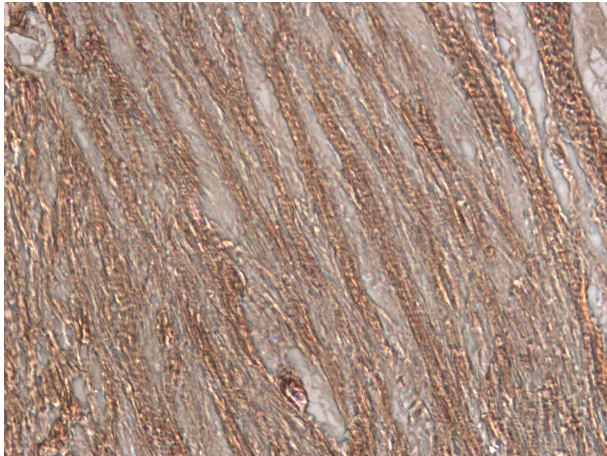
Abbildung 29: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (bFGF-Gruppe), Coll III, 10 x



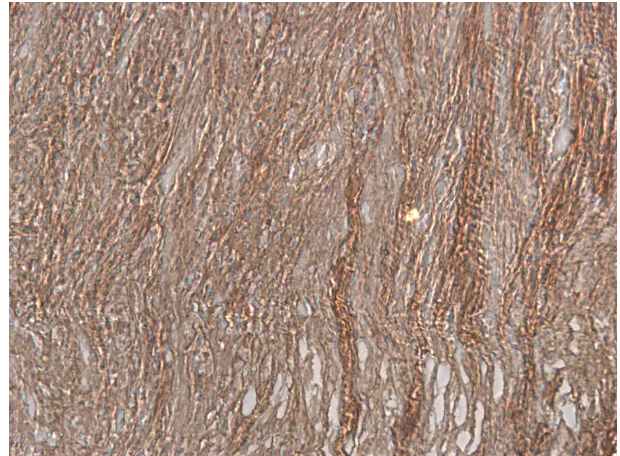
*Abbildung 30: Negativkontrolle Coll III, 20 x*



*Abbildung 31: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (bFGF-Gruppe), Coll III, 10 x*



*Abbildung 32: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (eGFP), Coll III, 10 x*



*Abbildung 33: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (PBS-Gruppe), Coll III, 10 x*

### **3.2.2.3 Pro-Kollagen I**

Bei der immunhistochemischen Markierung des Kollagenvorläuferproteins Pro-Kollagen Typ I zeigten sich unterschiedliche Reaktionen. Manche Regionen waren gar nicht gefärbt, andere nur sehr schwach und wieder andere sehr intensiv (siehe Abbildungen 34 bis 41). Eine Umrechnung in die semiquantitative Erfassung durch Punkte von 0-2 ergab für jedes Sehnenregenerat eine gewisse Summe (siehe Tabellen 9 und 10) und insgesamt waren relevante Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen, wie die unter Punkt 3.2.5 dargestellte statistische Analyse zeigt. Die gesunden Sehnen reagierten negativ.

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal	Summe
27	PBS	3/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
31	PBS	2/1+2	23. Aug '09	1	1	0	2
35	PBS	17/1+2	23. Aug '09	0	1	1	2
38	PBS	6/1+2	23. Aug '09	1	1	0	2
39	PBS	7/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
46	PBS	6/1+2	23. Aug '09	1	1	0	2
28	eGFP	4/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
32	eGFP	16/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
37	eGFP	15/1+2	23. Aug '09	2	1	1	4
41	eGFP	5/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
43	eGFP	5/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
44	eGFP	17/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
29	bFGF	42013	23. Aug '09	1	1	1	3
30	bFGF	6/1+2	23. Aug '09	1	2	0	3
33	bFGF	8/1+2	23. Aug '09	1	2	1	4
40	bFGF	7/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
42	bFGF	7/1+2	23. Aug '09	1	2	1	4
45	bFGF	7/1+2	23. Aug '09	2	1	1	4
21		13/1+2	23. Aug '09	0	0	0	0
24		15/1+2	23. Aug '09	0	0	0	0

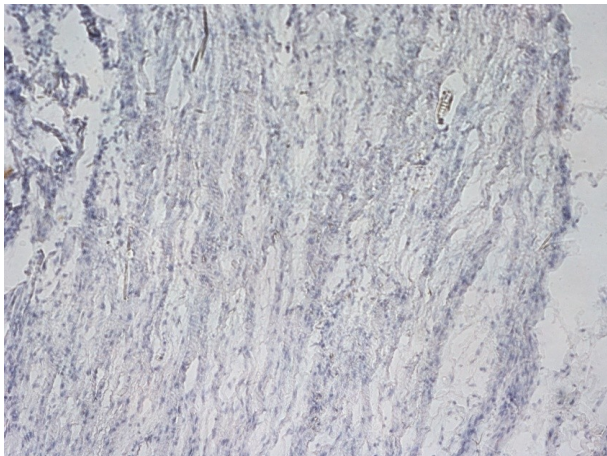
*Tabelle 9: Anfärbung Antigen Pro-Kollagen I der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal	Summe
753	PBS	6/1 + 6/2	3.3.	1	1	1	3
752	PBS	6/1 + 6/2	3.3.	0	1	1	2
911	PBS	5/1 + 5/2	3.3.	1	0	0	1
909	PBS	5/1 + 5/2	3.3.	0	1	2	3
910	PBS	5/1 + 5/2	3.3.	2	1	0	3
913	PBS	5/1 + 5/2	3.3.	0	2	2	4
758	eGFP	6/1 + 6/2	3.3.	1	2	2	5
754	eGFP	5/1 + 5/2	3.3.	0	1	0	1
914	eGFP	5/1 + 5/2	3.3.	1	2	2	5
915	eGFP	5/1 + 5/2	3.3.	1	2	0	3
922	eGFP	5/1 + 5/2	3.3.	2	2	1	5
923	eGFP	5/1 + 5/2	3.3.	2	2	2	6
755	bFGF	5/1 + 5/2	3.3.	2	2	1	5
756	bFGF	5/1 + 5/2	3.3.	1	2	1	4
907	bFGF	5/1 + 5/2	3.3.	1	2	2	5
908	bFGF	5/1 + 5/2	3.3.	1	2	1	4
916	bFGF	5/1 + 5/2	3.3.	1	2	2	5
912	bFGF	5/1 + 5/2	3.3.	2	2	2	6
757		6/1 + 6/2	3.3.	0	0	0	
918		5/1 + 5/2	3.3.	0	0	0	

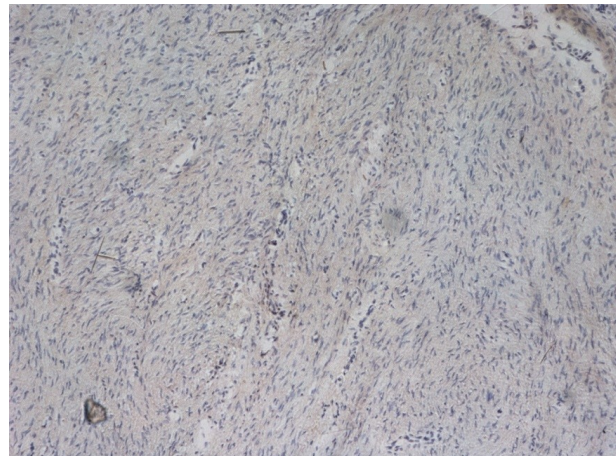
*Tabelle 10: Anfärbung Antigen Pro-Kollagen I der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*



Abbildung 34 zeigt zum Vergleich die Negativkontrolle, wo keinerlei Braunfärbung zu finden ist.



*Abbildung 34: Negativkontrolle Pro-Collagen I (14 Tage), 5 x*

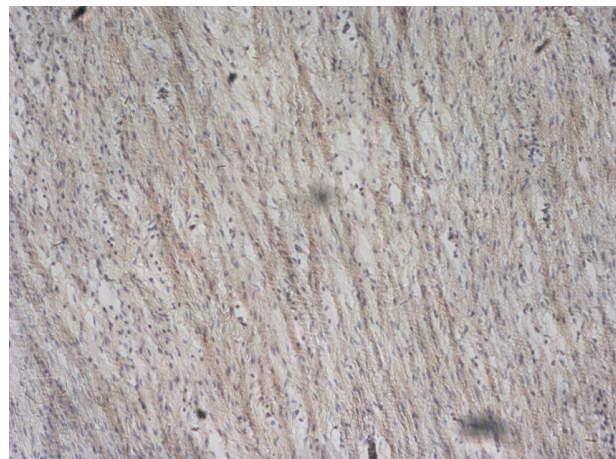


*Abbildung 35: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (PBS-Gruppe) nach 14 Tagen, 5 x*

Auf dem exemplarischen Bild eines Tieres der PBS-Gruppe (Abbildung 35), dessen Sehne nach 14 Tagen gewonnenen wurde, sieht man eine sehr dezente bis kaum vorhandene Braunfärbung im relativ unorganisierten Narbengewebe, was auf eine sehr geringe Pro-Kollagenproduktion hinweist.



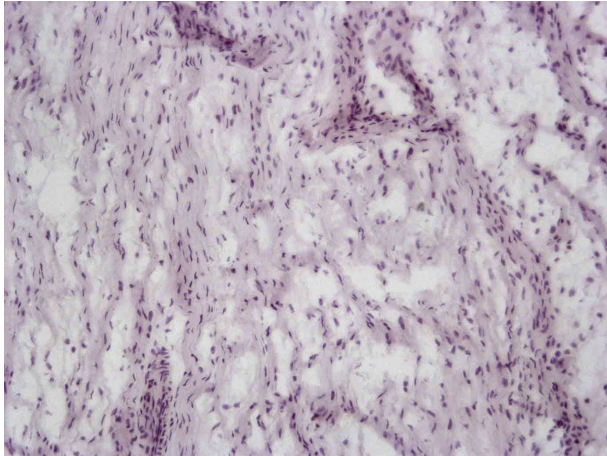
*Abbildung 36: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (eGFP-Gruppe) nach 14 Tagen, 5 x*



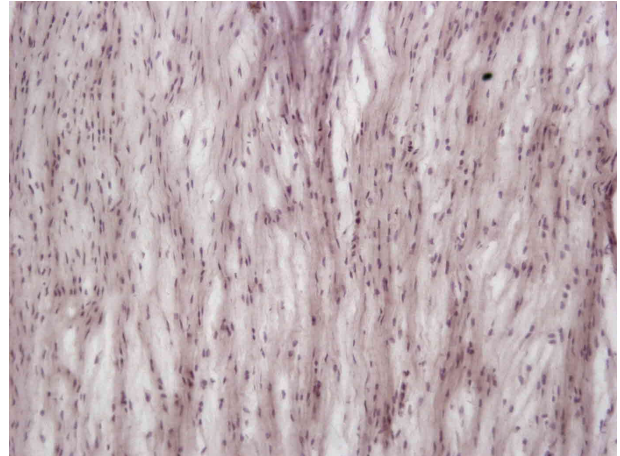
*Abbildung 37: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (bFGF-Gruppe) nach 14 Tagen, 5 x*

Im Gegensatz dazu sieht man auf dem Bild einer Sehne eines Tieres, das mit eGFP transduzierte Stammzellen erhalten hatte (Abbildung 36iii), sowohl deutlich besser organisiertes Gewebe als auch eine intensive Farbreaktion als Zeichen für eindeutig vorhandenes Pro-Kollagen I. Das Bild (Abbildung 37) einer Sehne der bFGF-LV-Gruppe zeigt parallelisierte Fasern mit einer noch intensiveren Anfärbung.

Nach 28 Tagen sind die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen eindrücklich: Denn im Gegensatz zu den Stammzellgruppen zeigt ein exemplarisches Bild der PBS-Gruppe nur einen sehr schwachen, aber im Vergleich zur Negativkontrolle immerhin einen vorhandenen Farbniederschlag:

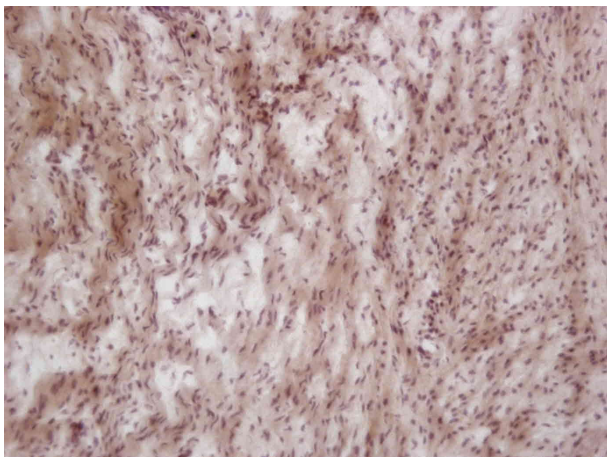


*Abbildung 38: Negativkontrolle Pro-Coll I (28 Tage), 10 x*

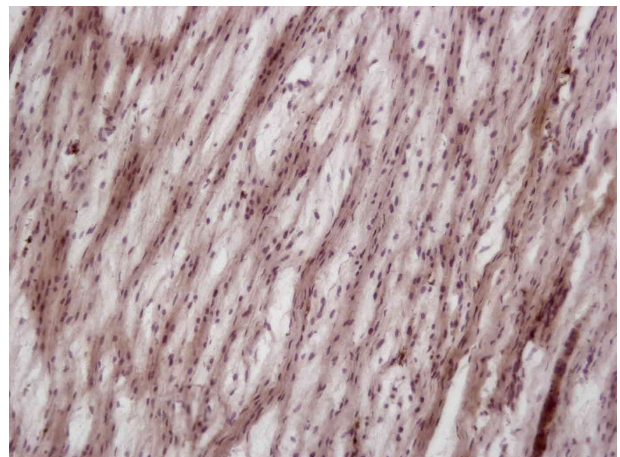


*Abbildung 39: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (PBS-Gruppe) nach 28 Tagen, 10 x*

Die Sehnen der eGFP-Tiere sind im Schnitt deutlich intensiver gefärbt als die der PBS-Tiere und das am besten organisierte Gewebe mit der durchschnittlich deutlichsten Farbreaktion ist bei den Sehnen der bFGF-LV-MS-C-Gruppe festzustellen:



*Abbildung 40: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (eGFP-Gruppe) nach 28 Tagen, 5 x*



*Abbildung 41: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (bFGF-Gruppe) nach 28 Tagen, 10 x*

### 3.2.3 Glykoproteine, Proteoglykane und Intermediärfilament

#### 3.2.3.1 Laminin

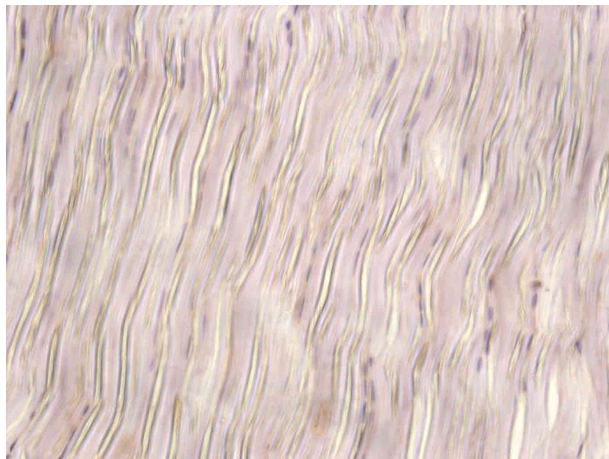
Alle Sehnenregenerate zeigten unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit eine intensive positive Reaktion in allen drei Dritteln, wie die folgenden Tabellen (11 und 12) zeigen. Die zur Kontrolle angefärbten gesunden Gegenseiten zeigten hingegen wenn überhaupt dann nur im Übergangsbereich sehr schwache bis größtenteils gar keine Anfärbung. Die Kontrollen waren negativ.

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
27	PBS	5/1+2	21. Aug '09	+	+	+
31	PBS	17/1+2	21. Aug '09	+	+	+
35	PBS	16/1+2	21. Aug '09	+	+	+
38	PBS	7/1+2	21. Aug '09	+	+	+
39	PBS	8/1+2	21. Aug '09	+	+	+
46	PBS	7/1+2	21. Aug '09	+	+	+
28	eGFP	3/1+2	21. Aug '09	+	+	+
32	eGFP	18/1+2	21. Aug '09	+	+	+
37	eGFP	16/1+2	21. Aug '09	+	+	+
41	eGFP	2/1+2	21. Aug '09	+	+	+
43	eGFP	2/1+2	21. Aug '09	+	+	+
44	eGFP	16/1+2	21. Aug '09	+	+	+
29	bFGF	7/1+2	21. Aug '09	+	+	+
30	bFGF	7/1+2	21. Aug '09	+	+	+
33	bFGF	10/1+2	21. Aug '09	+	+	+
40	bFGF	6/1+2	21. Aug '09	+	+	+
42	bFGF	8/1+2	21. Aug '09	+	+	+
45	bFGF	8/1+2	21. Aug '09	+	+	+
21		12/1+2	21. Aug '09	(+)	-	-
24		16/1+2	21. Aug '09	(+)	-	-

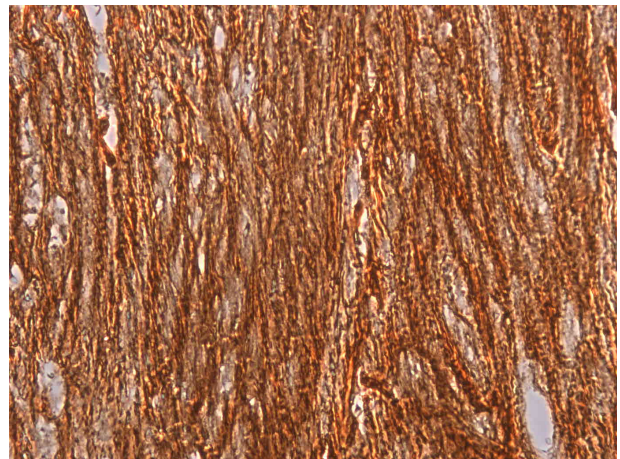
Tabelle 11: Anfärbung Antigen Laminin der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
753	PBS	10/1 + 10/2	8.3.	+	+	+
752	PBS	9/1 + 9/2	8.3.	+	+	+
911	PBS	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
909	PBS	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
910	PBS	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
913	PBS	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
758	eGFP	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
754	eGFP	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
914	eGFP	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
915	eGFP	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
922	eGFP	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
923	eGFP	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
755	bFGF	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
756	bFGF	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
907	bFGF	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
908	bFGF	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
916	bFGF	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
912	bFGF	6/1 + 6/2	8.3.	+	+	+
757		6/1 + 6/2	8.3.	-	-	-
918		6/1 + 6/2	8.3.	-	-	-

*Tabelle 12: Anfärbung Antigen Laminin der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*

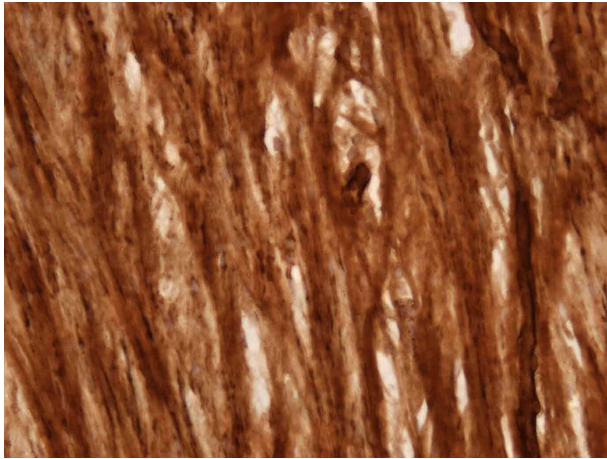


*Abbildung 42: Gesunde Sehne nach immunhistochemischer Markierung von Laminin, 10 x*

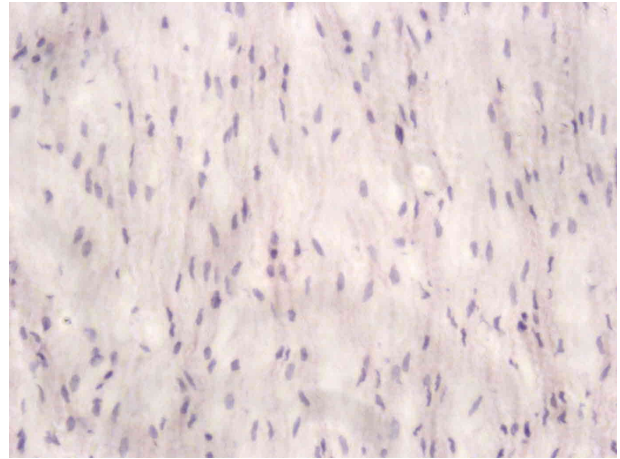


*Abbildung 43: Regeneratgewebe nach Markierung von Laminin (bFGF-Gruppe nach 14 Tagen), 10 x*

Abbildung 42 zeigt in 10-facher Vergrößerung das ungefärbte gesunde Sehnenngewebe. Lediglich Gefäßwände zeigen eine Farbreaktion. Daneben sieht man in Abbildung 43 das stark reagierende Regeneratgewebe in einem typischen Beispiel (Exemplar der bFGF-Gruppe nach 14 Tagen).



*Abbildung 44: Positive Markierung der Fasern, Antigen Laminin (Sehne der bFGF-Gruppe, 14 Tage), 20 x*



*Abbildung 45: Negativkontrolle Laminin, 20 x*

Abbildung 44 zeigt in 20facher Vergrößerung, dass tatsächlich die Fasern positiv auf den Lamininantikörper reagierten (zur Verdeutlichung gegenübergestellt der Negativkontrolle, Abbildung 45).

### **3.2.3.2 Fibronektin**

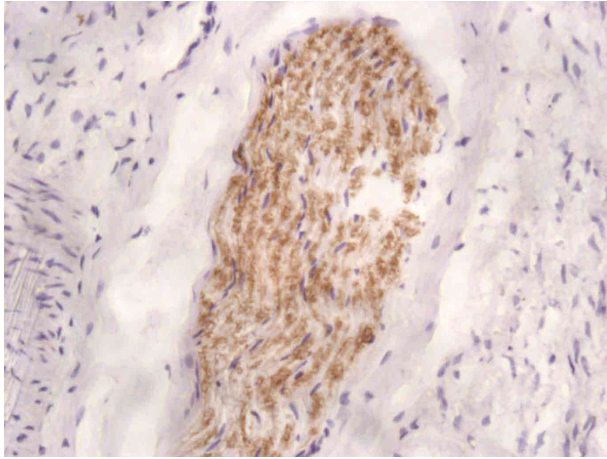
Die Reaktion auf den Antikörper HFN 7,1, der gegen Fibronektin gerichtet ist, führte zu positiven Reaktionen von Nerven und Gefäßwänden, wie auch aus den folgenden Abbildungen (46 und 47) hervorgeht. Das vorherrschende Granulationsgewebe sowie Sehngewebe reagierte negativ bis ganz schwach positiv. Relevante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht detektierbar. Die Kontrollen waren negativ. Die Ergebnisse werden in Tabellen den 13 und 14 dargestellt.

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
27	PBS	13/1+2	23. Aug '09	-	+	-
31	PBS	16/1+2	23. Aug '09	(+)	-	-
35	PBS	15/1+2	23. Aug '09	-	+	-
38	PBS	8/1+2	23. Aug '09	-	(+)	-
39	PBS	11/1+2	23. Aug '09	+	+	-
46	PBS	8/1+2	23. Aug '09	-	+	-
28	eGFP	19/1+2	23. Aug '09	-	+	-
32	eGFP	17/1+2	23. Aug '09	-	+	+
37	eGFP	17/1+2	23. Aug '09	-	(+)	-
41	eGFP	12/1+2	23. Aug '09	-	+	-
43	eGFP	23/1+2	23. Aug '09	-	-	-
44	eGFP	8/1+2	23. Aug '09	-	-	-
29	bFGF	8/1+2	23. Aug '09	-	-	-
30	bFGF	8/1+2	23. Aug '09	-	+	(+)
33	bFGF	14/1+2	23. Aug '09	-	(+)	-
40	bFGF	8/1	23. Aug '09	-	(+)	(+)
42	bFGF	9/1+2	23. Aug '09	-	-	-
45	bFGF	9/1+2	23. Aug '09	-	-	+
21		8/1	23. Aug '09	(+)	(+)	(+)
24		12/1+2	23. Aug '09	(+)	(+)	-

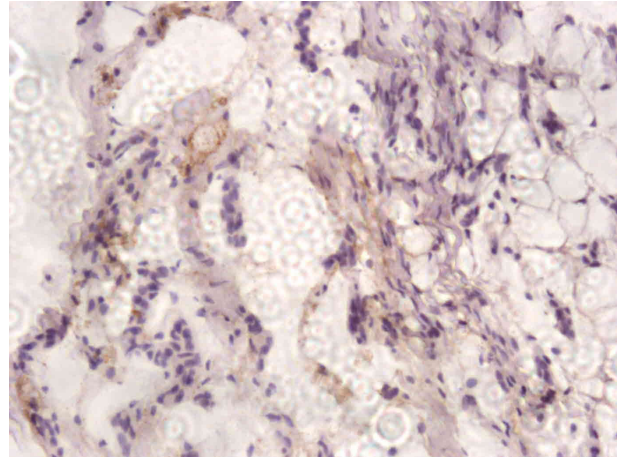
Tabelle 13: Anfärbung Antigen Fibronektin der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
757		8/1 + 8/2	4.3.	-	(+)	-
918		8/1 + 8/2	4.3.	-	(+)	-
753	PBS	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
752	PBS	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
911	PBS	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
909	PBS	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
910	PBS	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
913	PBS	8/1 + 8/2	4.3.	-	(+)	-
758	eGFP	5/1 + 5/2	4.3.	-	-	-
754	eGFP	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
914	eGFP	9/1 + 9/2	4.3.	-	-	-
915	eGFP	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
922	eGFP	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
923	eGFP	9/1 + 9/2	4.3.	(+)	(+)	(+)
755	bFGF	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
756	bFGF	10/1 + 10/2	4.3.	-	-	(+)
907	bFGF	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
908	bFGF	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
916	bFGF	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-
912	bFGF	8/1 + 8/2	4.3.	-	-	-

Tabelle 14: Anfärbung Antigen Fibronektin der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate



*Abbildung 46: Regeneratgewebe mit Nerv nach Markierung von Fibronectin, 20 x*



*Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis von Fibronectin vor allem in den Gefäßwänden des Regeneratgewebes, 20 x*

Abbildungen 46 und 47 zeigen in 20-facher Vergrößerung das größtenteils negative Regeneratgewebe mit den positiv reagierenden Gefäßwänden und Nerven

### **3.2.3.3 Versican**

Die Anfärbung des Antigens Versican mit Hilfe des Antikörpers 12C5 führte zu durchweg positiven Reaktionen unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit und sowohl nach 14 wie auch nach 28 Tagen (siehe Tabellen 15 und 16), auch wenn das Färbeergebnis nicht so homogen ausfiel wie bei den Kollagenen und Laminin, sondern durchaus fleckig erscheinen konnte. Auch die gesunden Sehnen der Gegenseiten reagierten positiv. Die Kontrollen waren negativ.

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
27	PBS	4/2011	23. Aug '09	+	+	+
31	PBS	14/1+2	23. Aug '09	+	+	+
35	PBS	18/1+2	23. Aug '09	+	+	+
38	PBS	4/1+2	23. Aug '09	+	+	+
39	PBS	5/1+2	23. Aug '09	+	+	+
46	PBS	4/1+2	23. Aug '09	+	+	+
28	eGFP	20/1+2	23. Aug '09	+	+	+
32	eGFP	10/1+2	23. Aug '09	+	+	+
37	eGFP	11/1+2	23. Aug '09	+	+	+
41	eGFP	13/1+2	23. Aug '09	+	+	+
43	eGFP	3/1+2	23. Aug '09	+	+	+
44	eGFP	19/1+2	23. Aug '09	+	+	+
29	bFGF	11/1+2	23. Aug '09	+	+	+
30	bFGF	5/1+2	23. Aug '09	+	+	+
33	bFGF	4/1+2	23. Aug '09	+	+	+
40	bFGF	2/1+2	23. Aug '09	+	+	+
42	bFGF	6/1+2	23. Aug '09	+	+	+
45	bFGF	5/1+2	23. Aug '09	+	+	+
21		16/1+2	23. Aug '09	+	+	+
24		18/1+2	23. Aug '09	+	+	+

Tabelle 15: Anfärbung Antigen Versican der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate

No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal
753	PBS	5/1 + 5/2	24.2.	+	+	+
752	PBS	5/1 + 5/2	24.2.	+	+	+
911	PBS	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
909	PBS	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
910	PBS	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
913	PBS	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
758	eGFP	3/1 + 3/2	24.2.	+	+	+
754	eGFP	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
914	eGFP	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
915	eGFP	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
922	eGFP	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
923	eGFP	4/1	24.2.	+	+	+
755	bFGF	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
756	bFGF	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
907	bFGF	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
908	bFGF	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
916	bFGF	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
912	bFGF	4/1 + 4/2	24.2.	+	+	+
757		2/1 + 2/2	24.2.			
918		4/1 + 4/2	24.2.			

Tabelle 16: Anfärbung Antigen Versican der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate

Abbildungen 48 und 49 zeigen das selbe Exemplar der bFGF-Gruppe nach 28 Tagen mit der sehr unterschiedlich starken Farbreaktion als Zeichen für die fleckige Anfärbung.



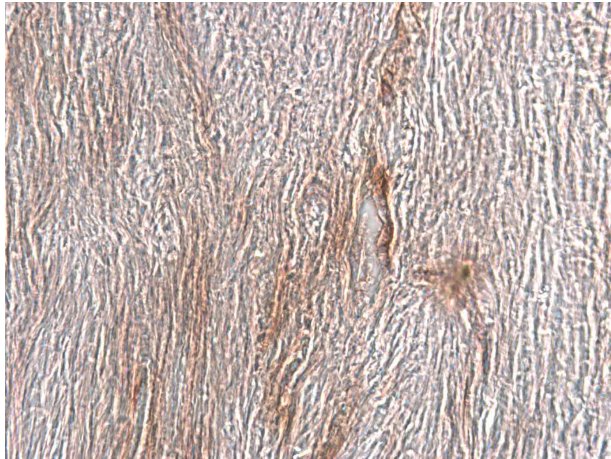


Abbildung 48: Immunhistochemische Markierung von Versican (bFGF-Gruppe, 28 Tage), 10 x (Farbreaktion schwach)

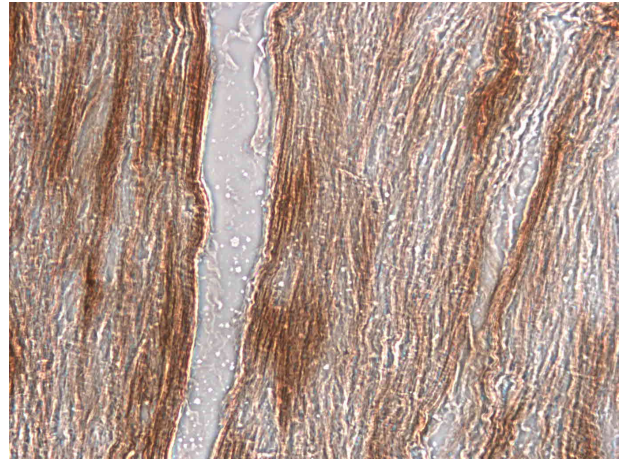


Abbildung 49: Immunhistochemische Markierung von Versican (bFGF-Gruppe, 28 Tage), 10 x (Farbreaktion stark)

Abbildungen 50 und 51 zeigen Sehnenregenerate der eGFP- und der PBS-Gruppe nach 28 Tagen.

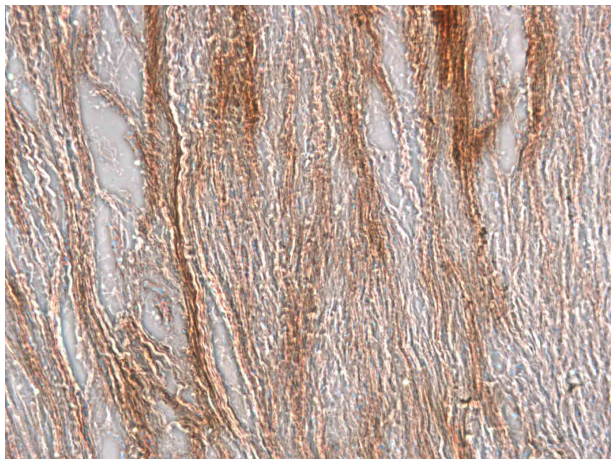


Abbildung 50: Immunhistochemische Markierung von Versican (eGFP-Gruppe, 28 Tage), 10 x

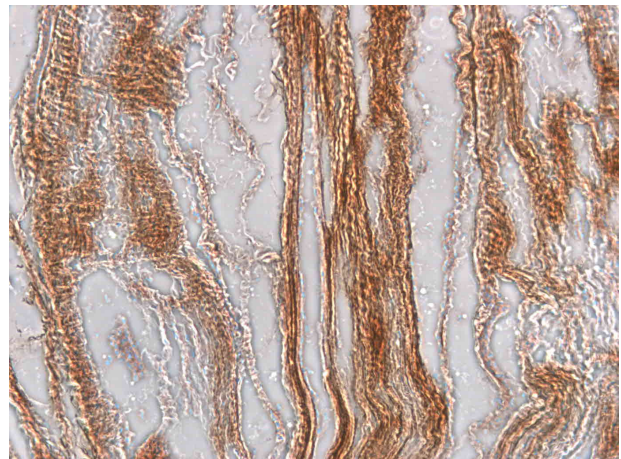
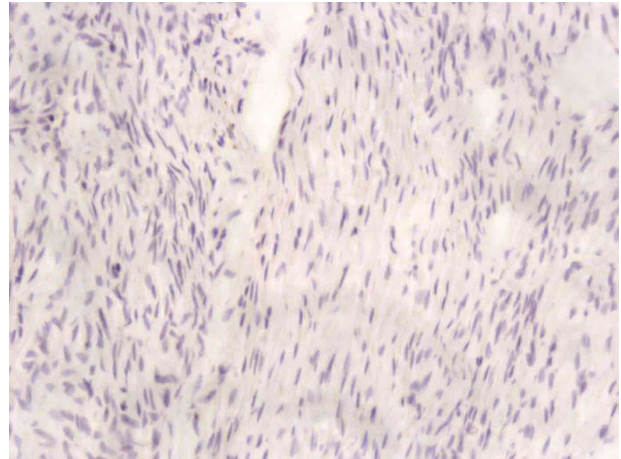


Abbildung 51: Immunhistochemische Markierung von Versican (PBS-Gruppe, 28 Tage), 10 x

Abbildung 52 zeigt eine gesunde Gegenseite mit typischer positiver Versicanreaktion (10-fach vergrößert), Abbildung 53 in 20-facher Vergrößerung eine Negativkontrolle.



*Abbildung 52: Gesunde Sehne nach Markierung von Versican, 10 x*



*Abbildung 53: Negativkontrolle Versican, 20 x*

### **3.2.3.4 Vimentin**

Bei der immunhistochemischen Markierung dieses Intermediärfilaments konnte man unterschiedliche Intensitäten der Reaktion feststellen, weswegen eine Umrechnung der Auswertung in Zahlen von 0-2 stattfand und die Summen ermittelt wurden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass aufgrund der Anfärbemethodik keine quantitativen Aussagen (MILZ et al. 2005) getroffen werden können (näher erläutert unter Punkt 4.1.2), sind die Ergebnisse aber nicht aussagekräftig genug, um relevante Gruppenunterschiede darzustellen. Die gesunden Gegenseiten zeigten keine Anfärbereaktion. Die Kontrollen waren negativ. (vgl. auch Tabellen 17 und 18).

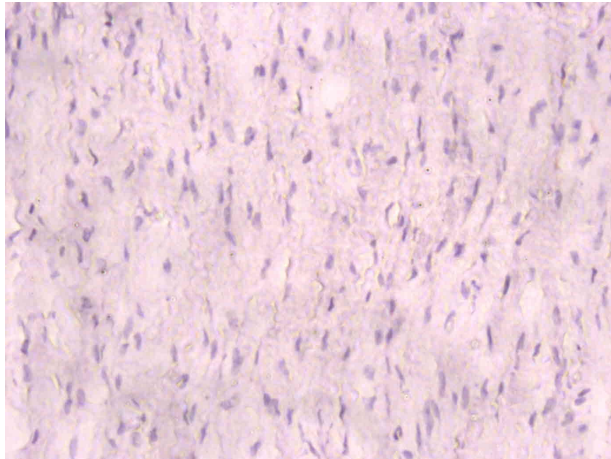
No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal	Summe
27	PBS	2/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
31	PBS	1/1+2	23. Aug '09	1	1	0	2
35	PBS	19/1+2	23. Aug '09	0	1	1	2
38	PBS	5/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
39	PBS	6/1+2	23. Aug '09	1	2	0	3
46	PBS	5/1+2	23. Aug '09	0	1	0	1
28	eGFP	42010	23. Aug '09	2	1	1	4
32	eGFP	6/1+2	23. Aug '09	0	1	1	2
37	eGFP	17/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
41	eGFP	9/1+2	23. Aug '09	2	1	0	3
43	eGFP	19/1+2	23. Aug '09	1	1	0	2
44	eGFP	18/1+2	23. Aug '09	2	2	1	5
29	bFGF	4/1+2	23. Aug '09	1	2	1	4
30	bFGF	4/1+2	23. Aug '09	1	2	1	4
33	bFGF	7/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
40	bFGF	5/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
42	bFGF	4/1+2	23. Aug '09	1	2	2	5
45	bFGF	6/1+2	23. Aug '09	1	1	1	3
21		15/1+2	23. Aug '09	0	0	0	0
24		19/1+2	23. Aug '09	0	0	0	0

*Tabelle 17: Anfärbung Antigen Vimentin der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*

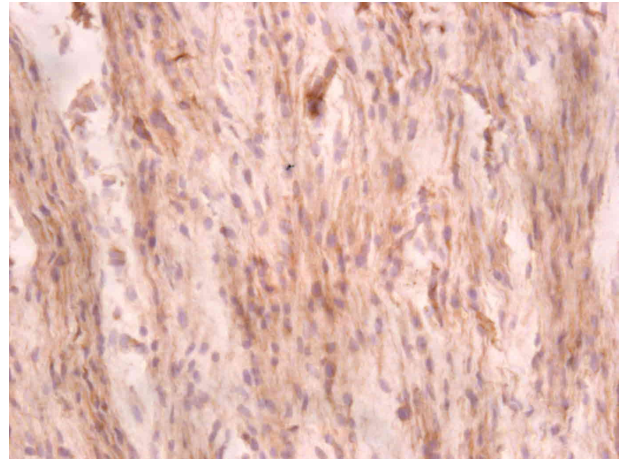
No.	Gruppe	Schnitt	Date	Proximal	Medial	Distal	Summe
753	PBS	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
752	PBS	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
911	PBS	7/1 + 7/2	7.3.	1	2	1	4
909	PBS	7/1 + 7/2	7.3.	1	2	2	5
910	PBS	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
913	PBS	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	2	6
758	eGFP	7/1 + 7/2	7.3.	1	2	2	5
754	eGFP	7/1 + 7/2	7.3.	0	2	1	3
914	eGFP	7/1 + 7/2	7.3.	1	2	2	5
915	eGFP	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
922	eGFP	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
923	eGFP	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
755	bFGF	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	2	6
756	bFGF	7/1 + 7/2	7.3.	1	2	1	4
907	bFGF	9/1 + 9/2	7.3.	1	2	1	4
908	bFGF	7/1 + 7/2	7.3.	1	2	1	4
916	bFGF	7/1 + 7/2	7.3.	2	2	1	5
912	bFGF	7/1 + 7/2	7.3.	1	1	1	3
757		7/1 + 7/2	7.3.	0	0	0	0
918		7/1 + 7/2	7.3.	0	0	0	0

*Tabelle 18: Anfärbung Antigen Vimentin der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate*

Abbildung 54 zeigt eine Negativkontrolle in 20facher Vergrößerung, Abbildung 55 ist ein typisches Beispiel für eine starke positive Farbreaktion eines PBS-Exemplares nach 28 Tagen.

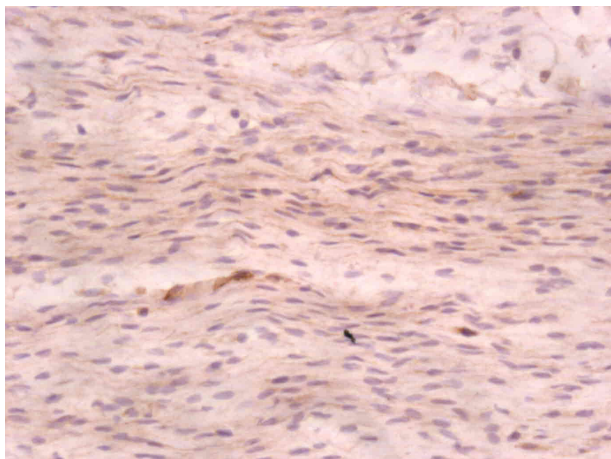


*Abbildung 54: Negativkontrolle Vimentin, 20 x*

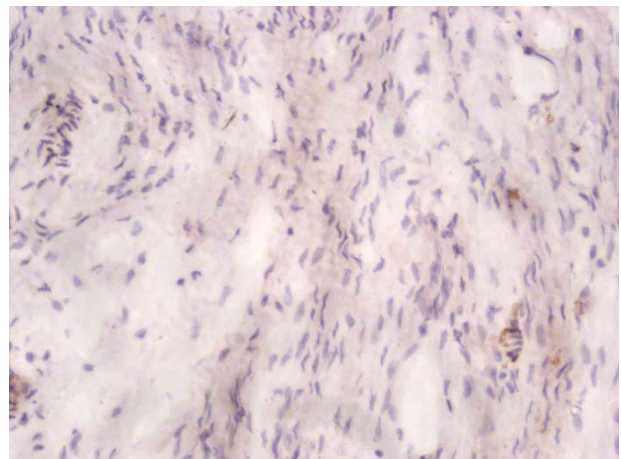


*Abbildung 55: Markierung von Vimentin bei einem Sehnenregenerat der PBS-Gruppe (28 Tage), 20 x*

Abbildung 56 zeigt die positive Reaktion bei einem bFGF-Exemplar nach 28 Tagen, Abbildung 57 die kaum vorhandene Reaktion einer eGFP-Sehne nach 14 Tagen (20x).



*Abbildung 56: Intensive Anfärbung der Vimentinmarkierung bei einer Sehne der bFGF-Gruppe (28 Tage), 20 x*



*Abbildung 57: Dezentler Nachweis von Vimentin bei einer Sehne der eGFP-Gruppe (14 Tage), 20x*

Abbildung 58 verdeutlicht die regionalen Unterschiede der Anfärbung: auf dem linken Bildrand sind leichte positive Reaktionen zu erkennen, auf dem rechten Bildrand bleibt eine Reaktion gänzlich aus.

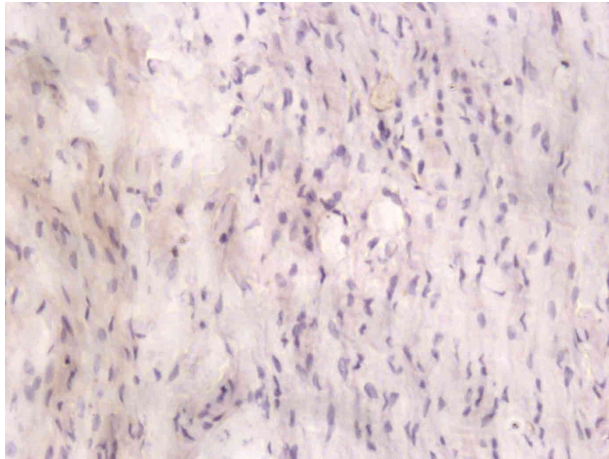


Abbildung 58: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in einer Sehne der eGFP-Gruppe nach 14 Tagen, 20 x

### 3.2.4 Statistische Analyse

Bei der statistischen Analyse wurde sich auf die Färbungen konzentriert, die relevante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen präsentierten. Dies waren im Wesentlichen die HE-Färbung und der Nachweis des Pro-Collagen I, das Rückschlüsse auf die aktive Kollagensynthese zulässt.

#### 3.2.4.1 HE-Färbung

Zunächst einmal ist festzuhalten, dass sich das histologische Erscheinungsbild nach 4 Wochen deutlich verbessert hatte im Vergleich zu dem Ergebnis nach 2 Wochen. In Zahlen wird diese Beobachtung durch das Sinken des semiquantitativen Punktwerts belegt, dessen Verringerung in den Gruppen bFGF-LV-MSK und PBS auch statistisch signifikant war (siehe Tabelle 19). Die auch in der eGFP-Gruppe deutlich sichtbare Tendenz ist aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant, was sicherlich auch der geringen Gruppengröße angelastet werden kann. Die Grafik 59 veranschaulicht die Entwicklung der Punktwerte in niedrigeren, also gesunden Sehngewebe ähnlicheren, Punkteregeonen.

Gruppe	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
bFGF	4,500	25,500	-2,177	,026
eGFP	9,000	30,000	-1,457	,180
PBS	2,000	23,000	-2,618	,009

Tabelle 19: Statistischer Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte in der HE-Färbung, aufgeschlüsselt in die 3 Versuchsgruppen

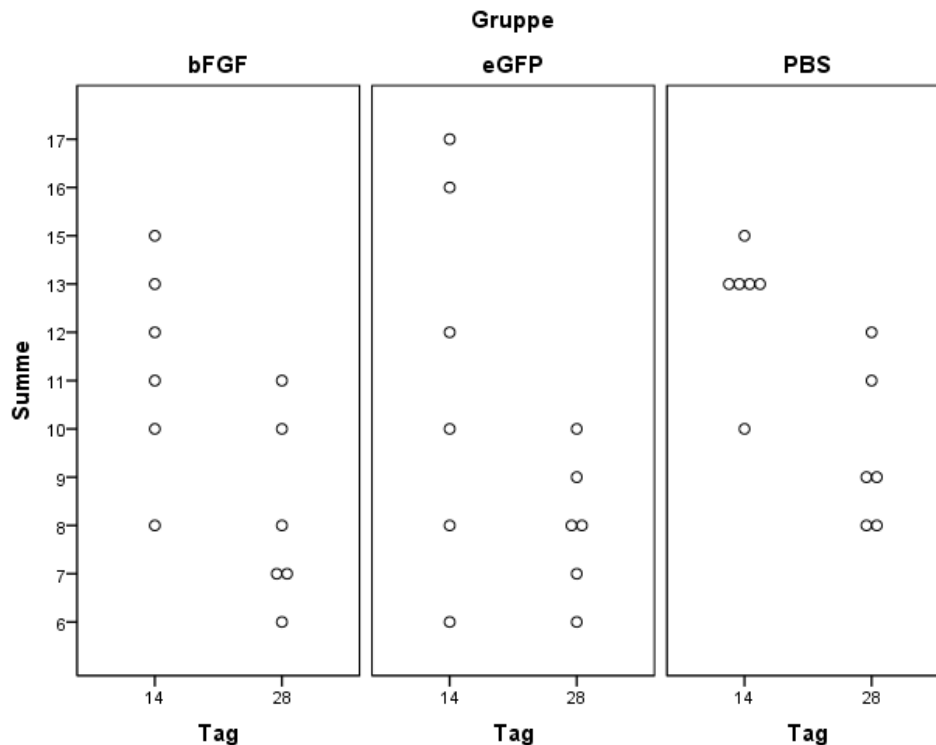


Abbildung 59: Vergleich der erzielten Summenwerte in den einzelnen Gruppen zu den unterschiedlichen Auswertzeitpunkten

Bei genauerer Analyse der 14-Tage-Tiere fällt auf, dass die Summen der bFGF-Gruppe merkbar niedriger sind. Die eGFP-Gruppe hat das beste Regenerat vorzuweisen, aber auch das schlechteste, die Varianz ist also sehr hoch. Die PBS-Gruppe hat nur ein einziges Sehnenregenerat mit verhältnismäßig niedriger Punktzahl (10), die anderen Regenerate sind homogen schlecht. Diese deutliche Tendenz, dass die beiden Stammzellgruppen bessere histologische Ergebnisse liefern, ist aufgrund der geringen Gruppengrößen und der hohen Merkmalsausprägung (9 verschiedene Punktwerte, bestes Regenerat 6 Punkte, schlechtestes 17), also einer sehr hohen Standardabweichung, statistisch nicht signifikant, wie die Anova-Analyse (Tabelle 20) ergab.

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	11,111	2	5,556	,588	,568
Innerhalb der Gruppen	141,833	15	9,456		
Gesamt	152,944	17			

Tabelle 20: Analyse der Summenwerte nach 14 Tagen (one-way analysis of variance, bzw. one-way ANOVA)

Dennoch ist festzuhalten, dass die Stammzellgruppen histologisch größtenteils besser verheilt waren als die Kontrollgruppe. Die eGFP-Gruppe präsentierte ein heterogeneres Bild bezüglich der Regeneratsqualität im Vergleich zur bFGF-Gruppe (siehe Tabelle 21 und Abbildung 62).

Gruppe	N		Mittelwert	Median	Standard-Abweichung	Minimum	Maximum
	Gültig	Fehlend					
bFGF	6	0	11,50	11,50	2,429	8	15
eGFP	6	0	11,50	11,00	4,370	6	17
PBS	6	0	13,17	13,00	1,835	10	15

Tabelle 21: Statistik der Summenwerte der HE-Färbung nach 14 Tagen

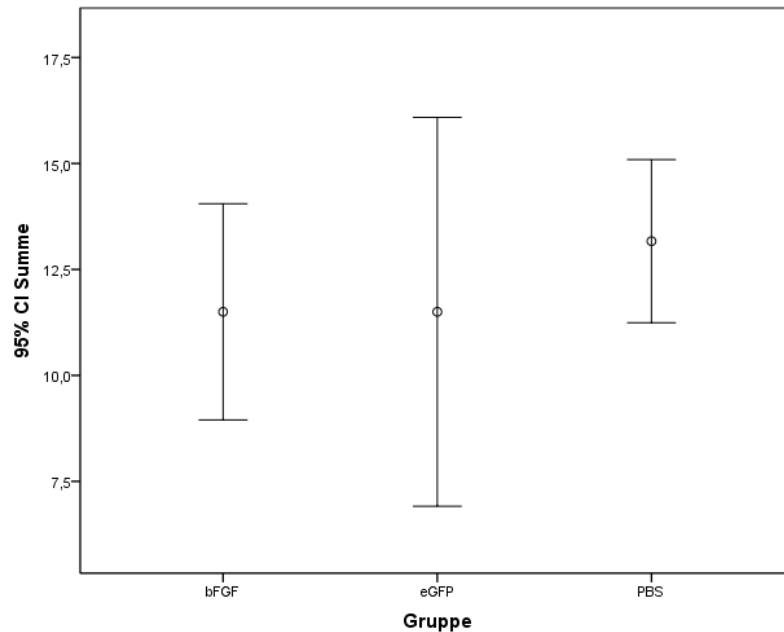


Abbildung 60: Vergleich der Punktwerte der drei Versuchsgruppen zum Auswertzeitpunkt 14 Tage

Die Analyse der einzelnen Parameter ergab ebenfalls keine signifikanten Gruppenunterschiede. Ähnlich verhielt es sich auch zum Auswertzeitpunkt 28 Tage. Auch hier konnte aufgrund geringer Fallzahl und hoher Standardabweichung nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Unterschiede zufällig entstanden sein könnten (siehe Tabelle 22).

Ränge		
Gruppe	N	Mittlerer Rang
bFGF	6	8,08
eGFP	6	8,00
PBS	6	12,42
Gesamt	18	

statistisches Ergebnis	
	Summe
Chi-Quadrat	2,776
Freiheitsgrade (df)	2
<b>asymptotische Signifikanz</b>	<b>,250</b>

*Tabelle 22: Analyse der Summenwerte der HE-Färbung nach 28 Tagen. Kruskal-Wallis Test.*

Die bFGF-Gruppe und die eGFP-Gruppe zeigten im Mittel zwar histologisch bessere Ergebnisse und Differenzen zwischen den Versuchsgruppen sind nicht von der Hand zu weisen, eine statistische Signifikanz kann aber nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 23).

Gruppe	N		Mittelwert	Median	Standard- Abweichung	Minimum	Maximum
	Gültig	Fehlend					
bFGF	6	0	8,17	7,50	1,941	6	11
eGFP	6	0	8,00	8,00	1,414	6	10
PBS	6	0	9,50	9,00	1,643	8	12

*Tabelle 23: Statistik der Summenwerte der HE-Färbung nach 28 Tagen*

Auch die Abbildung 61 veranschaulicht, dass die beiden Stammzellgruppen nach 28 Tagen tendenziell besser geheiltes Regeneratgewebe präsentierten. Vor allem die Faserstruktur und die Anordnung der Fasern (beides siehe Abbildung 62) wurde bei den Versuchsgruppen deutlich besser bewertet als bei der Kontrollgruppe mit PBS.



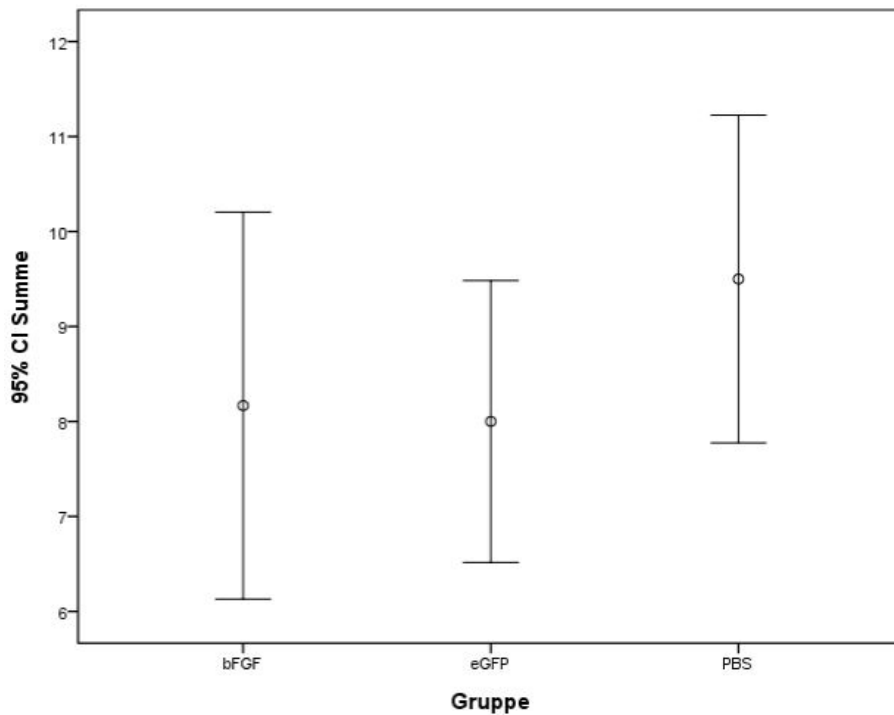


Abbildung 61: Vergleich der Punktwerte der drei Versuchsgruppen zum Auswertzeitpunkt 28 Tage

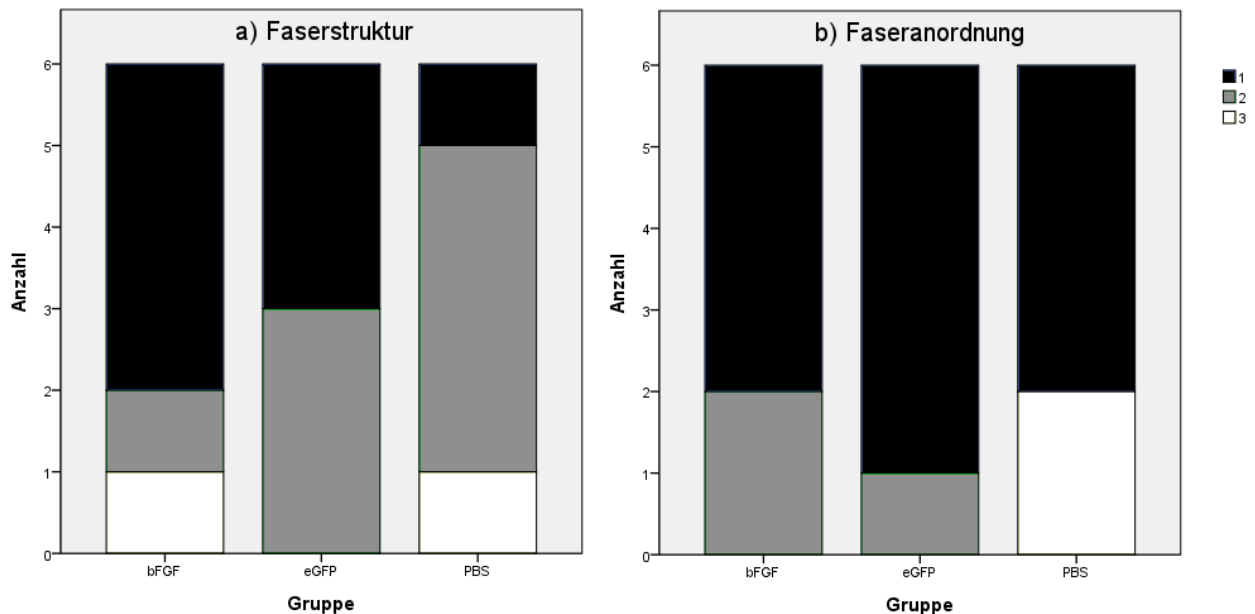


Abbildung 62: Faserstruktur (links) und Faseranordnung (rechts) nach 28 Tagen

Immerhin vier der sechs bFGF-Tiere zeigten nur noch eine leicht veränderte Faserstruktur im Vergleich zur gesunden Sehne, bei den eGFP-Tieren waren es drei mit leichten Veränderungen und drei mit deutlicheren, aber moderaten, aber keine einzige mit eindeutig abnormalem Erscheinungsbild der Faserstruktur. Bei den Tieren der Kontrollgruppe konnte nur eine Sehne mit nur einem Punkt bewertet werden, alle anderen fünf Sehnen zeigten mindestens deutlich sichtbare Veränderungen hinsichtlich der Struktur ihrer Fasern. Bezüglich der Faseranordnung ist

festzuhalten, dass sowohl alle bFGF-Tiere als auch alle eGFP-Tiere entweder nur leicht veränderte Parallelisierung im Vergleich zu gesunden Sehnen zeigten, oder aber (zwei bFGF-Tiere und nur ein eGFP-Tier) deutlichere, aber noch moderate Abweichungen. Kein Regenerat dieser Gruppen wies eine eindeutig abnormale Anordnung auf. In der PBS-Gruppe waren es aber sogar zwei Exemplare mit diesem pathologischen Erscheinungsbild.

Insgesamt bestätigte die statistische Analyse der HE-Färbung die Tendenz, dass beide Stammzellgruppen ein histologisch besseres Bild präsentierten als die Kontrollgruppe, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die gefunden Unterschiede durch Zufall bedingt sind.

### 3.2.4.2 Pro-Kollagen Typ I

Der Nachweis von Pro-Kollagen Typ I, das eine aktive Kollagenproduktion anzeigt, ergab relevante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, die auch statistisch signifikant waren, und zwar sowohl nach 14 Tagen als auch nach 28 Tagen. Die Pro-Kollagen I Produktion war nach 28 Tagen tendenziell höher als nach 14 Tagen (Abbildung 63, unten), was auf einen verstärkten Umbau und eine noch nicht abgeschlossene Sehnenheilung schließen lässt. In der bFGF-Gruppe war der Anstieg der Reaktion auf den anti-Pro-Kollagen-I Antikörper auch signifikant, wie Tabelle 24 zeigt.

Gruppe	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
bFGF	3,000	24,000	-2,529	,011	<b>,015</b>
eGFP	9,500	30,500	-1,465	,143	<b>,180</b>
PBS	13,000	34,000	-,863	,388	<b>,485</b>

Tabelle 24: Statistischer Vergleich der Auswertzeitpunkte 14 und 18 Tage des Pro-Kollagen I -Nachweises

Die genauere Analyse der nach 14 Tagen gewonnenen Regenerate ergab, dass mit einem p-Wert von 0,014 im Fisher-Exact-Test eine durch Zufall entstandene stärkere Reaktion der Versuchsgruppen auf den Antikörper ausgeschlossen werden kann (siehe Tabelle 25). Allerdings unterschied sich nur die bFGF-Gruppe hochsignifikant von der PBS-Gruppe (p-Wert: 0,037), die Gruppe der eGFP-Tiere unterschied sich knapp nicht signifikant von der PBS-Gruppe (p-Wert: 0,061), die Werte der bFGF-Gruppe und der eGFP-Gruppe sind ähnlich (p-Wert: 0,545). Die beiden Stammzellgruppen beinhalteten auch deutlich mehr Exemplare, die mindestens drei Punkte in der Bewertung der Färbereaktion erhalten haben (p-Wert von 0,015).

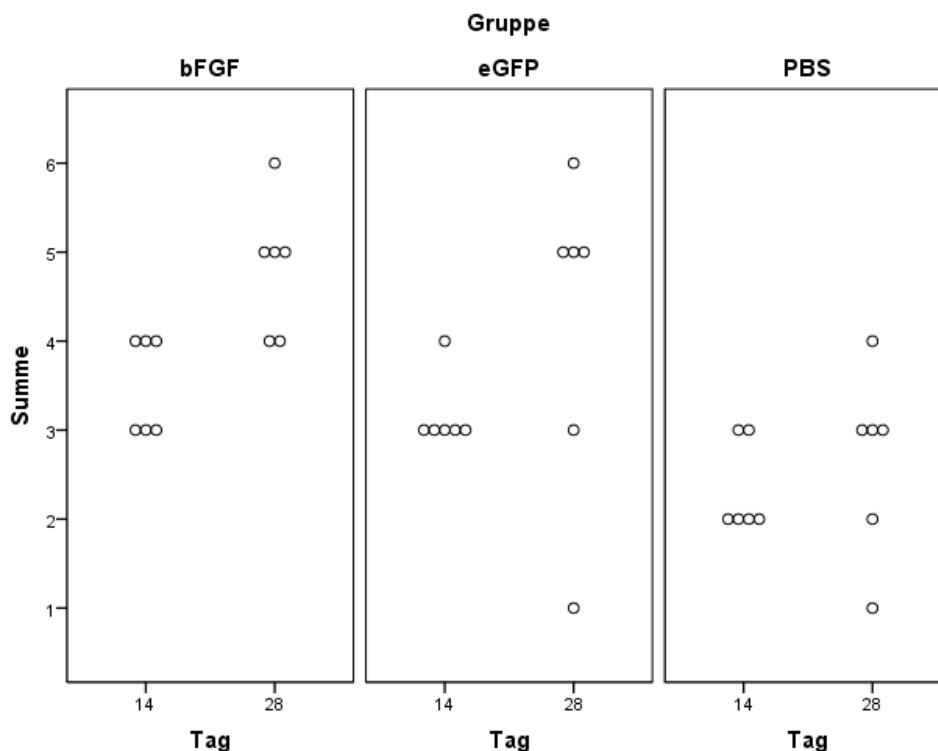


Abbildung 63: Vergleich des Pro-Kollagen-I-Nachweises in den Versuchsgruppen zu beiden Auswertzeitpunkten

Gruppe	N		Mittelwert	Median	Standard- Abweichung	Minimum	Maximum
	Gültig	Fehlend					
bFGF	6	0	3,50	3,50	,548	3	4
eGFP	6	0	3,17	3,00	,408	3	4
PBS	6	0	2,33	2,00	,516	2	3

Tabelle 25: Auswertung des Pro-Kollagen I-Nachweises nach 14 Tagen

Auch nach 28 Tagen konnte mittels statistischer Tests eine eindeutige Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, da im Kruskal-Wallis-Test ein p-Wert von 0,028 ermittelt wurde. Der Vergleich zwischen der bFGF- und der PBS-Gruppe fiel mit einem p-Wert von 0,004 hochsignifikant aus. Die Werte der bFGF-LV-MSK und eGFP-LV-MSK waren vergleichbar (p-Wert: 0,818), und auch der Unterschied zwischen eGFP-LV-MSK zu PBS nicht signifikant (p-Wert von 0,132), was hauptsächlich der hohen Standardabweichung in der eGFP-Gruppe (1,835) geschuldet ist. Ein interessantes Detail ist die Tatsache, dass die Gruppenunterschiede vor allem im medialen Drittel besonders deutlich sind (p-Wert von 0,012). Dies könnte zum Einen auf das vermehrte Vorhandensein des ursprünglichen Gewebes in den Sehnenstümpfen proximal und distal oder zum Anderen darauf, dass medial die meisten Zellen appliziert wurden, zurückzuführen sein. Tabelle 26 und Abbildung 64 veranschaulichen die Ergebnisse.

Gruppe	N		Mittelwert	Median	Standard- Abweichung	Minimum	Maximum
	Gültig	Fehlend					
bFGF	6	0	4,83	5,00	,753	4	6
eGFP	6	0	4,17	5,00	1,835	1	6
PBS	6	0	2,67	3,00	1,033	1	4

Tabelle 26: Auswertung des Pro-Kollagen-I-Nachweises nach 28 Tagen

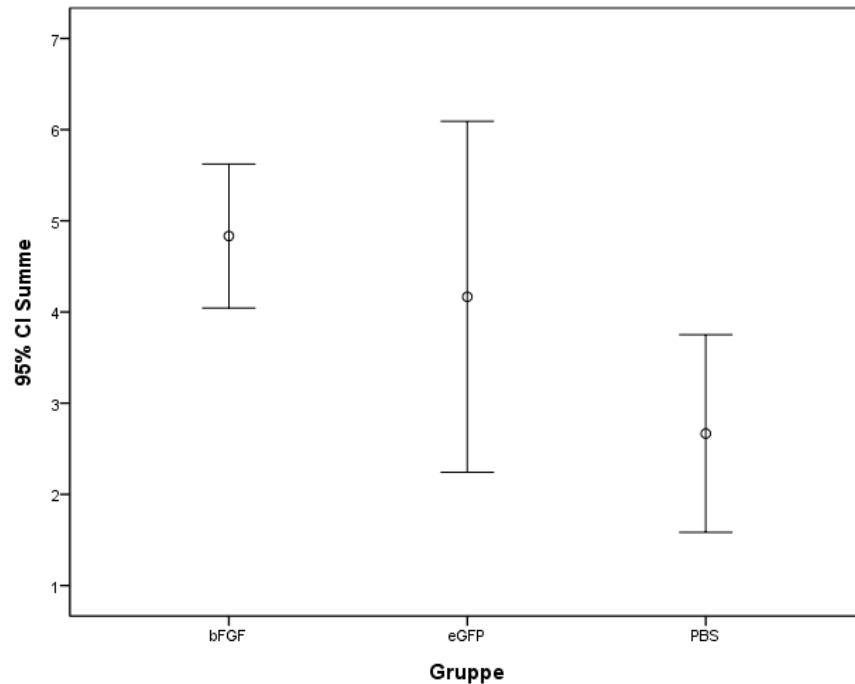


Abbildung 64: Vergleich des Pro-Kollagen-I-Nachweises in den Gruppen nach 28 Tagen

Sowohl nach 14, als auch nach 28 Tagen war in den Stammzellgruppen also eine stärkere Kollagenproduktion durch einen im Vergleich zur PBS-Gruppe erhöhten Pro-Kollagen-Anteil nachzuweisen, wobei in beiden Fällen die bFGF-Gruppe hochsignifikante Unterschiede zur PBS-Gruppe aufwies, während die Vergleiche der anderen Gruppenkonstellationen Tendenzen ergaben, nämlich dass sich die Werte von eGFP-LV-MSK-Gruppe und bFGF-LV-MSK nicht relevant unterschieden und die eGFP-Gruppe zwar bessere, aber noch nicht statistisch signifikante Verbesserungen zur PBS-Gruppe präsentierte.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei allen Tieren war sowohl nach 14 Tagen als auch nach 28 Tagen die Kontinuität der Achillessehne wieder hergestellt.

In der histologischen Untersuchung unterschied sich das untersuchte Gewebe deutlich zu gesundem Sehngewebe. Außer der Anfärbarkeit des Kollagens in der HE-Färbung, welche nach 28 Tagen bei allen Tieren der einer gesunden Sehne glich, zeigten alle anderen Parameter (Zellzahl, Kernform, Faserstruktur, Fasernordnung, Vaskularisierung) schwächere oder stärkere Abweichungen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Das Erscheinungsbild ähnelte nach 28 Tagen eher dem von gesundem Sehngewebe als nach 14 Tagen, es fand also eine Verbesserung statt, diese war allerdings nur in der bFGF-Gruppe statistisch signifikant. In der Tendenz zeigten die Stammzellgruppen ein besseres histologisches Erscheinungsbild als die Kontrollgruppe, diese Beobachtung verblieb aber ohne statistische Signifikanz.

In der Immunhistochemie reagierten die Sehnen aller Versuchsgruppen bei manchen Antigenen entweder gleich intensiv wie intaktes Sehngewebe (Kollagen I, Kollagen III, Versican) oder genau entgegengesetzt (Laminin). Heterogene Ergebnisse lieferten die Anfärbeversuche von Fibronectin und Vimentin, allerdings waren hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festzustellen. Anders als bei den gesunden Gegenseiten konnte bei den Sehnenregeneraten Pro-Kollagen Typ I nachgewiesen werden, was auf eine aktive Kollagensynthese hinweist. Die Stammzellgruppen produzierten darüber hinaus mehr Pro-Kollagen als die Kontrollgruppe.

Das bedeutet, dass die Stammzellgruppen histologisch etwas besser erschienen und eine aktivere Kollagensynthese vermutet werden kann. Diese diskreten Veränderungen führten in jedem Fall nicht zu einer nennenswerten Verbesserung der biomechanischen Stabilität, sondern allenfalls zu dezenten Vorteilen nach 14 Tagen. Nach 28 Tagen waren in der Biomechanik keine Unterschiede mehr festzustellen.

Statistisch signifikant bessere Ergebnisse der Stammzellgruppe, welche zusätzlich bFGF exprimierte, im Vergleich zur reinen Stammzell-Versuchsgruppe konnten weder in der Histologie und der Immunhistochemie noch in der Biomechanik nachgewiesen werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Wertigkeit der Methode

#### 4.1.1 Studiendesign

Als Stärken des gewählten Studiendesigns sind die Untersuchung zweier Eigenschaften, nämlich der biomechanischen und der morphologischen, des Regeneratgewebes (z.B. auch bei OKAMOTO et al. 2010) und die zweizeitige Auswertung nach 14 und 28 Tagen zu bewerten. Dadurch konnte beispielsweise die Erkenntnis gewonnen werden, dass es bereits nach 2 Wochen nicht nur zu einem kontinuierlichem Regenerat gekommen ist, sondern es sich dabei auch um ein biomechanisch erstaunlich stabiles Regeneratgewebe handelt. Darüber hinaus ermöglichte die zweizeitige Auswertung die Hypothese, dass es durch den Einsatz der Stammzellen gerade zu Anfang zu einer Beschleunigung des Heilungsvorgangs kommen kann (beachtenswert sind die vergleichbaren Ergebnisse mit Vorteilen in den Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe zum frühen Auswertzeitpunkt von Okamoto et al. 2010) sowie die Feststellung, dass auch nach 4 Wochen die Heilung keinesfalls als abgeschlossen gelten kann, wenn man das histologische Erscheinungsbild und das verstärkte Vorkommen von Pro-Kollagen Typ I bedenkt. Eine weiterführende Langzeitstudie war also durchaus angeraten und wurde inzwischen auch durchgeführt. Andere Studien zu der Thematik haben im Übrigen das Pro-Kollagen Typ I-Vorkommen nicht erfasst (z.B. URDZIKOVA et al. 2014; OKAMOTO et al 2010), obwohl man gerade dieses zur Beurteilung der Kollagensynthese heranziehen sollte (vgl. LÜLLMANN-RAUCH 2012). Hier ist die vorliegende Arbeit daher überlegen. Als eine Schwäche ist hingegen die geringe Fallzahl für die Histologie/ Immunhistochemie von nur sechs Sehnen pro Gruppe und Auswertzeitpunkt zu nennen, die aufgrund der Heterogenität der Ergebnisse und der durch die kleine Fallzahl bedingten Einschränkung der möglichen statistischen Tests oftmals eine statistische Signifikanz verhinderte. Diese kleine Fallzahl war jedoch durch die Einstufung des histologischen/ immunhistochemischen Anteils der Studie als „Orientierungsstudie“ bedingt und deshalb unumgänglich. In der sich anschließenden Langzeitstudie wird die Fallzahl erhöht.

Sowohl als Vor-, als auch als Nachteil kann die einseitig erfolgte Operation und die damit nur sehr kurzzeitig erfolgte bis fehlende Immobilisation der Ratten gesehen werden. Zum einen ist das Vorgehen damit näher an der Realität, da es äußerst selten zu beidseitigen Achillessehnenrupturen kommt. Zum anderen hat die frühzeitige Belastung des operierten Beines durch die Ratten enorme Auswirkungen auf den Heilungsprozess. So fanden Murrell et al. 1994 in einem Rattenmodell heraus, dass die Immobilisation hochsignifikant zu einer deutlich verlangsamten bzw. verschlechterten funktionalen und mechanischen Heilung der Achillessehne

fürte. Auch BRING et al. beschrieben 2010 negative Auswirkungen der längeren Immobilisation auf die Sehnenheilung an einem Rattenmodell mit Defekt der Achillessehne. Es ist also theoretisch möglich, dass der Effekt der Belastung, die ja in allen drei Gruppen gleich ist, den Effekt der Stammzellen bzw. des Wachstumsfaktor bFGF übersteigt und somit auch das Ergebnis in Richtung geringerer Gruppenunterschiede verzerrt. Man könnte also von einer Maskierung der zu untersuchenden Einflüsse durch den Einfluss der Belastung auf den Heilungsprozess ausgehen. Diese These wird von der Tatsache gestützt, dass OKAMOTO et al. (2010) in einer Studie über den Vergleich verschiedener Stammzellen mit ähnlichem Studiendesign vergleichsweise signifikantere Gruppenunterschiede feststellen konnten. Die Arbeitsgruppe hatte beide Achillessehnen operiert, daraus resultiert logischerweise eine starke Immobilisation der Ratten, die ihre Beine folglich lange nicht belasten konnten. Dieses Vorgehen war für die in dieser Arbeit beschriebene Studie jedoch weder gewünscht noch geeignet, da das gleichzeitige Operieren beider Beine dem bayerischen Tierschutzgesetz widerspricht und auch eine andersartige Ruhigstellung zum einen schwierig zu bewerkstelligen ist und zum anderen als mögliche Tierquälerei eingestuft werden kann.

#### **4.1.2 Stammzellverfahren und Tieroperation**

Bei allen Verfahrensweisen, die im Laufe der Stammzellprozessierung eingesetzt wurden, handelt es sich um Methoden, die im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums rechts der Isar der TU München etabliert und standardisiert sind und auch schon mehrfach publiziert wurden. Die Zellen wurden wie 1995 von LENNON et al. beschrieben gewonnen und nach der Methode von NEUHUBER et al. 2008 kultiviert. Die lentivirale Transduktion erfolgte wie von WÜBBENHORST et al. 2010 beschrieben und wurde auch dementsprechend auf ihre Effizienz per Durchflusszytometrie (für eGFP) und reverse Transkriptase PCR und ELISA (für bFGF) überprüft. Da die eGFP-transduzierten Zellen zu  $96.3 \pm 2.5$  % positive Ergebnisse für eGFP zeigten, nicht transduzierte Zellen und bFGF-Zellen aber nur zu 0,5% eine Hintergrundfluoreszenz zeigten, kann von einer erfolgreichen eGFP-Transduktion ausgegangen werden. Die Transduktion von bFGF wurde aufgrund der Erkenntnisse von NICKEL 2007 in Zelllysaten überprüft. Als Ergebnis konnte eine 50- bis 60-fache Steigerung der Genexpression gegenüber nichttransduzierten bzw. eGFP-transduzierten Zellen festgestellt werden. Somit kann von einer erfolgreichen Methode ausgegangen werden. Das Differenzierungspotential der Zellen in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung wurde wie von NEUHUBER et al. 2008 beschrieben untersucht und hier zeigte sich, dass es in allen Fällen erhalten geblieben war. Interessanterweise war das Potenzial der eGFP-transduzierten Zellen in Richtung der adipogenen und osteogenen Differenzierung im Vergleich zu den nichttransduzierten Zellen und den bFGF-transduzierten Zellen reduziert, während die chondrogene Differenzierung immer gleich war.

Auch die Tieroperation, ebenso wie die Tierhaltung, Euthanasie und Sehnenentnahme, erfolgten standardisiert. Die Entscheidung Achillessehnen von Ratten zu untersuchen fiel unter anderem deshalb, weil dies in der Literatur vielfach beschrieben wurde: Dass sich insbesondere Achillessehnen eignen ist bei CHONG et al. 2007 zu lesen, auch wenn hier ein Kaninchenmodell genutzt wird. ZHANG et al. 2003 und OKAMOTO et al. 2010 führten ihre Versuche schließlich an Rattenachillessehnen durch. Durch randomisierte Zuteilung der Tiere zu den Gruppen und die Tatsache, dass die Gruppenzugehörigkeit nur der Tierärztin, nicht aber den Operateuren bekannt war und auch erst nach abgeschlossener Auswertung aufgelöst wurde, konnte systematische Verzerrung weitestgehend ausgeschlossen werden und Objektivität sichergestellt werden. Nur zwei verschiedene Operateure kamen bei Operation und Entnahme zum Einsatz, auch die Assistenz wurde konstant durch die gleichen Personen ausgeführt. Um für alle Tiere, unabhängig zu welcher Gruppe sie gehörten, gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurden auch den Ratten der Kontrollgruppe eine Lösung injiziert, die, quasi im Sinne eines Placebos, lediglich Pufferlösung - PBS- enthielt. Der Substanzdefekt wurde gezielt durch einen Punch ausgelöst, um bei allen Tieren einen gleich großen Defekt an exakt gleicher Stelle zu gewährleisten. Auch wenn die Durchführung so standardisiert wie möglich erfolgte, ist als eine mögliche Schwachstelle die Applikation der Stammzellen zu nennen. Wir folgten hier genau dem Protokoll, dennoch kann nicht sicher festgestellt werden, wie viele Zellen nun genau wo ankamen. Dementsprechend wäre es also überlegenswert, präpariertes Trägermaterial einzusetzen.

#### **4.1.3 Vorbereitung der Proben und immunhistochemische Färbung**

Die Verfahren, die zur Vorbereitung und Färbung des gewonnenen Materials angewandt wurden, sind zum großen Teil bereits mehrfach eingesetzt worden (ADAMCZYK 2008; JAKOB 2007; TISCHER et al. 2002; TISCHER et al. 2007) und können demnach als etabliert angesehen werden.

Durch die Entnahme direkt nach erfolgter Euthanasie und die sofortige Fixierung in Methanol konnte erreicht werden, dass Autolyseprozesse durch Gewebeenzyme verhindert und die Feinstruktur erhalten wurde. Die Verwendung von Methanol hat mehrere Vorteile: Zum einen beeinträchtigt sie möglichst wenig die spätere Markierung einzelner Proteine. Formalin, das häufiger zur Fixierung eingesetzt wird, führt nämlich durch Methylenbrückenbildung zur Vernetzung der Aminosäuren von zu untersuchenden Proteinen (FRENCH et al. 1945; BOSKEY et al. 1982), und auf seinen Einsatz wurde daher verzichtet. Zum anderen führt die Methanolfixierung dazu, dass die Proteine durch Denaturierung in ihrer Position im Präparat fixiert werden ohne durch chemische Interferenz die Immunhistologie zu stören und desweiteren dazu, dass die endogene Peroxidaseaktivität unterbunden wird und es dadurch zu weniger Hintergrundmarkierungen kommt (JAKOB 2007). Anstelle von Paraffineinbettung wurde die Anfertigung von Gefrierschnitten gewählt, da bei dieser Technik eine sehr gute Antigenerhaltung im Gewebe erzielt wird und gerade Substanzen, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, dennoch



nachgewiesen werden können (KNIPPING 2003). Bei der Paraffineinbettung kommt es außerdem aufgrund der hohen Temperaturen zu Proteindenaturierungen, die eine Detektion der eGFP-exprimierenden Stammzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie verhindert hätten. Wahrscheinlich bedingt durch die hohe Hintergrundfluoreszenz der Sehnen und der nicht gänzlich zu vermeidenden Lichtexposition der Proben (eGFP ist sehr lichtempfindlich) war dies jedoch leider nicht möglich.

Das Schneiden der Sehnen mit dem Cryomicrotom stellte eine weitere Schwierigkeit dar. Die Schnitte neigten dazu, zu reißen, und auch die Aufnahme auf den Objektträger gelang nur schwer faltenfrei. Nach einigen Vorversuchen mit gesunden Sehnen (jeweilige Gegenseiten der operierten Tiere) wurde beschlossen, die Sehnen für eine Woche in fünfprozentiger EDTA-Lösung zu entkalken. Wie sich anschließend in der Histologie zeigte, war dies aufgrund der Entzündungsvorgänge bei manchen Exemplaren mit verbundenen Verkalkungen auch durchaus sinnvoll. In jedem Fall wurden die Sehnen dadurch geschmeidiger. Als Schnittdicke wurden 12 µm festgelegt, was sich als guter Kompromiss zwischen möglichst optimaler histologischer Auswertung bei dünneren Schnitten und geringerer Tendenz zu reißen bei dickeren Schnitten erwies. Dennoch konnten Risse und Fältelungen nicht ganz vermieden werden, was zwar nur sehr selten die Auswertung beeinträchtigte, aber sicherlich als Schwachpunkt der Methodik gewertet werden kann. Außerdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es kaum möglich war, alle Schnitte immer von der gleichen Stelle der Sehne anzufertigen, da die Sehnen sehr heterogene Stärken aufwiesen. Es wurde aber versucht, mindestens 12 Objektträger à 2 Schnitte pro Sehne aus der Mitte der Sehne zu erhalten, so dass alle relevanten Färbungen die gleiche Region darstellen. Die Orientierung der einzelnen Schnitte im Bezug auf die Einteilung in distales Drittel, mittleres Drittel und proximales Drittel war im Großteil der Fälle problemlos möglich, da nahezu immer ein Teil des Muskels im Anschluss an einen intakt gebliebenen Sehnenstumpf mit angeschnitten wurde.

Im nächsten Schritt, der immunhistochemischen Färbung, nutzt man die Fähigkeit von Antikörpern aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen und Anziehungskräften auf Ionenbasis sowie hydrophoben Wechselwirkungen spezifische Proteinstrukturen zu binden. Dieses zugrunde liegende komplexe Schlüssel-Schloss-Prinzip wurde von LEHNINGER et al 1994 und KIERNAN 1999 beschrieben. Grundlegend für den Nachweis mittels Immunhistochemie ist die Spezifität des Antikörpers bezüglich des gesuchten Antigens. Da monoklonale Antikörper in der Regel spezifischer sind als polyklonale (MILZ 2005), wurden ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet. Zum Einsatz kamen nur Antikörper, die bereits mehrfach erfolgreich verwendet wurden und als etabliert gelten können, um das eventuelle Auftreten von Kreuzreaktionen zu minimieren.

Als Detektion kam ein biotinierter, im Pferd hergestellter Sekundärantikörper zum Einsatz. Dieser reagierte mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, der schließlich mit dem Chromogen Diaminobenzidin zu einem Farbniederschlag führte. Aufgrund dieser (zum Teil verstärkenden) Zwischenschritte ist keine quantitative, sondern lediglich eine qualitative Aussage möglich: Ist das Makromolekül vorhanden oder nicht (JAKOB 2007). Die Farbtintensität korreliert nicht unbedingt mit der Menge des vorhandenen Antigens (MILZ 2005). Dennoch kann gerade die Verteilung und das Muster des Farbniederschlags in einer Region Rückschlüsse zulassen: Ist die gesamte Region komplett gefärbt, lässt dies auf ein kontinuierlicheres Vorhandensein des Antigens schließen als wenige schwach gefärbte Flecken. Kam es jedoch, wie vorallem bei Kollagen I und III, bei allen Proben zu einer kompletten und starken Farbreaktion, ist keine Aussage mehr möglich, ob einzelne Sehnen mehr oder weniger Kollagen produziert haben als andere, obwohl dies durchaus sein kann und es bei der vorliegenden Fragestellung durchaus interessant gewesen wäre. Dieser Umstand muss also sehr wohl als eine Schwäche der Methode angesehen werden.

## ***4.2 Diskussion der Ergebnisse***

Die von uns untersuchten Tiere konnten ihr linkes Hinterbein bereits nach fünf bis sieben Tagen wieder verwenden, zeigten nach zehn bis zwölf Tagen ein normales Gangbild und bereits an unserem ersten Untersuchungszeitpunkt (14 Tagen) fanden wir in allen Fällen eine vollständige Defektdeckung vor. Dies spricht für das stärkere Selbstheilungspotential des Rattengewebes im Vergleich zum Menschen, welches in der Literatur ausreichend beschrieben ist (z.B. von CARPENTER et al. 1998 oder MAJEWSKI et al. 2009) und welches man bei der Interpretation stets beachten sollte.

Die gewonnenen Sehnenregenerate zeigten eine erstaunliche biomechanische Stabilität, waren aber dennoch noch weit von den Werten einer gesunden Sehne entfernt.

Ähnliches ergab auch die histologische Untersuchung: Es offenbarte sich mehrheitlich zellreiches Narbengewebe mit einzelnen Kennzeichen von Sehnengewebe, insbesondere von Kollagenfasern, welche mehr oder weniger parallel verliefen. Auch bei der immunhistochemischen Untersuchung zeigten sich sowohl Ähnlichkeiten zu gesundem Sehnengewebe wie auch deutliche Unterschiede: Auf der einen Seite entsprach die starke Anfärbung von Kollagen I, Kollagen III und Versican als wichtigem Proteoglykan (BODE-LESNIEWSKA et al. 1996) zumindest qualitativ der von gesunden Sehnen, so dass die Grundzusammensetzung der Extrazellulärmatrix als ähnlich angesehen werden kann. Über die quantitative Übereinstimmung kann aufgrund der semi-quantitativen Anfärbemethodik keine genaue Aussage getroffen werden, zumal alle Exemplare eine starke Anfärbung zeigten. URDZIKOVA et al. beschrieben 2014 an einem Rattenmodell mit durch Collagenase induzierter Achillessehnenverletzung und anschließender Behandlung mit humanen mesenchymalen Stammzellen eine differenziertere

quantitative Analyse dieser 3 Extrazellulärmatrixbestandteile, indem sie die Farbreaktion auf den Antigen-Antikörper-Komplex in 4 Grade einteilen und zuordnen konnten. Dass die Differenzierung bei dem hier geschilderten Projekt nicht möglich war, könnte zum einen auf sensitivere Primärantikörper wie auch eine vergleichsweise größeren Verstärkung im Färbeprozess zurückgeführt werden. Zum anderen kann die starke Anfärbung aber auch bedeuten, dass das gesuchte Antigen in unseren Proben tatsächlich in großer und dem gesunden Gewebe vergleichbarer Anzahl vorkam. Im Hinblick auf die Tatsache, dass in gesundem Sehnenmaterial das stabilere Kollagen I vorherrschend ist (PARRY et al. 1978) und auch bei unseren gesunden Gegenseiten kein quantitativer Unterschied der Reaktion auf Kollagen I und III festgestellt werden konnte, ist diese Hypothese jedoch unwahrscheinlich. Aufgrund der starken Reaktion aller Exemplare aller Gruppen auf beide Kollagene kann daher nicht beurteilt werden, inwieweit ein Wechsel von Kollagen III zu Kollagen I stattfand und wie weit somit das *Remodelling* mit Zunahme der mechanischen Kraft als dritte Phase der Sehnenheilung vorangeschritten ist.

Anders als die gesunden Sehnen reagierten die Regenerate beim Nachweis von Pro-Collagen I und Laminin. Letzteres ist als wichtigster Bestandteil der Basalmembran sowohl in Granulationsgewebe zu finden (SMOLA et al. 2001), als auch ein Zeichen für die Kapillarisation des Gewebes (LÜLLMANN-RAUCH 2012), weswegen es als Zeichen der Vaskularisierung im Rahmen der Defektheilung betrachtet werden kann. Der starke Nachweis von Laminin in den Regeneraten im Vergleich zu den gesunden Sehnen zeigt also, dass diese sehr gut vaskularisiert sind, was im Rahmen der Wundheilung zu erwarten war.

Als weiteres Zeichen der Sehnenheilung ist der Nachweis von Pro-Collagen Typ I zu werten, da diese Kollagenvorstufe nicht in gesundem Sehnen Gewebe vorkommt, sondern eine aktive Kollagensynthese beweist.

Insgesamt deuten also sowohl Histologie als auch Immunhistochemie auf Gewebe hin, dass sich im Umbau von Narben- zu Sehnenregeneratgewebe befindet und sowohl Kennzeichen von Granulationsgewebe als auch von Sehnen Gewebe aufweist. Auch die biomechanische Untersuchung unterstützte dieses Ergebnis, indem zwar durchaus stabiles Gewebe festgestellt werden konnte, diese Stabilität im Vergleich zur gesunden Sehne aber doch durchaus geringer ausfiel.

Die Entwicklung der Sehnen vom ersten zum zweiten Untersuchungszeitpunkt, aber vor allem die auch nach 28 Tagen noch nicht abgeschlossene Reorganisation des Gewebes sowie die hohe Pro-Kollagen-Produktion nach 28 Tagen weisen darauf hin, dass der Heilungsvorgang noch nicht abgeschlossen ist und endgültige Aussagen über Vor- und Nachteile der Behandlung nicht getroffen werden können, weswegen basierend auf diesen Erkenntnissen eine Langzeitstudie angeregt und inzwischen durchgeführt wurde.

Deutliche Vorteile der Stammzellgruppen gegenüber der Kontrollgruppe konnten nicht gefunden werden, stattdessen präsentierten alle Gruppen das oben geschilderte Übergangsgewebe aus Narbe und Sehnenregenerat mit den dafür typischen immunhistochemischen Ergebnissen. Allerdings konnte in den Stammzellgruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein signifikant erhöhtes Prokollagenvorkommen als Zeichen für die erhöhte Kollagensynthese festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten die Proben dieser 2 Gruppen tendenziell bessere histologische Ergebnisse, diese blieben jedoch – wahrscheinlich aufgrund der geringen statistischen Power – insignifikant und führten vor allem zu keiner (bzw. nach 14 Tagen zu einer marginalen) Verbesserung der biomechanischen Stabilität. URDZIKOVA et al. (2014) führten im gleichen Zeitraum ebenfalls eine Studie an Rattenachillessehnen durch, welche mit humanen multipotenten mesenchymalen Stammzellen behandelt wurden. Sie fanden zwar signifikante Vorteile in den Versuchsgruppen, die biomechanischen Ergebnisse lieferten allerdings lediglich Tendenzen, blieben statistisch aber im nicht signifikanten Bereich. Auch in dieser Studie führten die Stammzellen also nicht zu einer signifikant erhöhten biomechanischen Stabilität und dies trotz eindeutig verbessertem histologischen Erscheinungsbild. Das zeigt, dass es in jedem Fall sinnvoll ist, neben dem histologischen Erscheinungsbild auch die biomechanischen Eigenschaften zu testen. Man sollte aus diesem Grund auch unbedingt bei der Interpretation von Studien, die keine biomechanische Testung beinhalten (CHAN et al. 2000; HOPPE 2014), bedenken, dass über die konkreten biomechanischen Auswirkungen der Behandlung und somit über die Funktion des Regeneratgewebes keine abschließende Beurteilung erfolgen kann, weil auch ein verbessertes histologisches Erscheinungsbild nicht immer eine signifikant bessere biomechanische Stabilität bedeuten muss.

Im Gegensatz zu unserer Studie konnten OKAMOTO et al. 2010 sowohl histologische als biomechanische Vorteile der Behandlung mit mesenchymalen wie auch mit Knochenmarkstammzellen nachweisen. Wichtige Unterschiede im Protokoll waren zum einen die vollständige Immobilisation, wie unter Punkt 4.1.1 erläutert. Die bei Mobilisation schneller ablaufenden Heilungsprozesse (BRING et al. 2010) könnten eventuelle Vorteile der Versuchsgruppen maskieren, insbesondere da mehrere Studien vor allem in den frühen Heilungsstadien Verbesserungen bzw. Unterschiede feststellen konnten (CHAN et al. 2000; ZHANG et al. 2003; CHONG et al. 2007) und diese frühen Phasen durch die Mobilisation schneller abgeschlossen sind. Zum anderen durchtrennten Okamoto et al. die Achillessehne statt einen wirklichen Substanzdefekt zu setzen. Da das Selbstheilungspotential bei Rattenachillessehnen deutlich höher als beim Menschen ist, entsteht nach einer reinen Durchtrennung deutlich weniger Regeneratgewebe als es beim Menschen zu erwarten wäre (vgl. CARPENTER et al. 1998 und MAJEWSKI et al. 2009). Dadurch wird die Vergleichbarkeit des Modells mit dem Menschen erschwert.

Unsere Hypothese, dass die eingesetzten mesenchymalen Stammzellen eindeutig positive Effekte auf die Heilung der Rattenachillessehne haben, konnte also nicht bestätigt werden, da die gefundenen Unterschiede zu gering waren.

Desweiteren muss die Fragestellung überprüft werden, ob sich durch die konstante Produktion von bFGF durch die Stammzellen eine Verbesserung hinsichtlich Aussehen und Funktion der Sehne feststellen ließ. Bei unserem Projekt fanden sich jedoch keinerlei signifikante Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe, die die bFGF-exprimierenden-Stammzellen erhalten hatte, und der anderen Stammzellgruppe. Dies ist insofern verwunderlich, als die positiven Effekte von FGF auf die Sehnenheilung inzwischen mehrmals festgehalten werden konnten: Im Rattenmodell von IDE et al. (2009) zeigten Versuchstiere, die eine lokale Applikation von bFGF erhalten hatten, in der biomechanischen Testung eine reißfestere Sehnen- Knochen- Insertion als die Vergleichsgruppe. Schon im Jahr 2000 stellten CHAN et al. bei Rattenpatellarsehnen, die eine Augmentation mit bFGF erhalten hatten, nach 7 Tagen ein verstärktes Vorkommen von Kollagen III und eine höhere Zellproliferationsrate fest und schlussfolgerten, dass sich bFGF positiv auf frühe Heilungsstadien auswirkte. Eine Erklärung, warum die positiven Effekte nur nach 7 Tagen, nicht aber zu späteren Zeitpunkten gefunden werden konnten, könnte der kurzfristige Effekt einer einmaligen Proteinapplikation sein. Mesenchymale Stammzellen nach lentiviraler Transduktion des bFGF-Gens sollten hingegen kontinuierlich den Wachstumsfaktor freisetzen und somit zu langfristigeren Vorteilen führen. Wir konnten zwar nachweisen, dass die Transduktion erfolgreich und effektiv war, die davon erwarteten positiven Effekte blieben jedoch aus. Ein Grund dafür könnte sein, dass die für die Sehnenheilung benötigte Menge an bFGF niedrig, die native bFGF-Produktion der Stammzellen somit ausreichend ist und zusätzliches bFGF keine Auswirkungen mehr hat. FUKUI et al. (1998) beobachteten bei hohen Dosen von bFGF sogar eine ungünstige Wirkung auf die Sehnenheilung und kamen zu dem Schluss, dass eine geringere und bedarfsorientierte Dosis zu einem besseren Regenerationsverhalten führt.

Darüber hinaus stellte HOPPE in ihrer Arbeit über die Verbesserung der Sehnenheilung durch Wachstumsfaktoren 2014 fest, dass sowohl bFGF als auch GCSF, wenn kontinuierlich und einzeln verabreicht, zu einer signifikanten Verbesserung des *Remodellings* in der HE-Färbung bei chronischen Rotatorenmanschettenläsionen bei der Ratte führten, eine Kombination beider Wachstumsfaktoren jedoch nicht nur keine weitere Verbesserung erbrachte, sondern diese Versuchsgruppe sogar ähnlich abschnitt wie die unbehandelte Kontrollgruppe. Wie bei unserem Projekt blieben also synergistische Effekte aus. Möglicherweise werden diese durch noch nicht bekannte Interaktionsmechanismen verhindert.

Zusammenfassend gibt es also vielversprechende Ansätze, mit Stammzellen oder Wachstumsfaktoren vor allem das histologische Erscheinungsbild und dies vor allem in der frühen Heilungsphase zu verbessern. Langzeitergebnisse insbesondere in Bezug auf die biomechanische Stabilität liegen noch nicht ausreichend vor. Eine Kombination der beiden Konzepte, die für sich

genommen Verbesserungen erbringen konnten, durch die Verwendung von Wachstumsfaktor-exprimierenden Stammzellen ergab keinen entscheidenden Vorteil. Da es bisher also keine Erkenntnisse dazu gibt, inwiefern sowohl der Einsatz von Wachstumsfaktoren als auch eine Behandlung mit Stammzellen oder gar die Kombination aus beiden das langfristige Ergebnis der Sehnenheilung vor allem im Hinblick auf die Funktionalität positiv beeinflusst, sollte diese Arbeit dazu führen, einen Einsatz beim Menschen derzeit kritisch zu überdenken.

## 5. Zusammenfassung

In dieser tierexperimentellen Studie wurde das Heilungsverhalten der Rattenachillessehne nach einem im Rahmen einer Operation gesetzten Defekt histologisch, immunhistochemisch und biomechanisch zu zwei Zeitpunkten, nämlich nach 14 und nach 28 Tagen, untersucht. Die Tiere waren direkt im Anschluss einmalig entweder mit mesenchymalen Stammzellen mit stabiler Expression von *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), mesenchymalen Stammzellen mit Transduktion des Markerngens *enhanced Green Fluorescent Proteine* (eGFP) oder einer reinen Pufferlösung (*Phosphate-buffered saline*, PBS) ohne therapeutischen Effekt als Kontrolle behandelt worden. Die Fragestellung lautete zum einen, ob die Stammzellen zu einem verbesserten histologischen Ergebnis und erhöhter biomechanischer Stabilität führen würden, und zum anderen, ob die Expression von bFGF und damit die Kombination zweier vielversprechender Ansätze in der Behandlung von Sehnenverletzungen zusätzliche Verbesserungen mit sich brächte.

Nach der Stammzellgewinnung und -vorbereitung, welche nach einem etablierten Protokoll erfolgte, und der standardisierten Operation wurden die Sehnenregenerate entnommen und entweder für die biomechanische Testung hinsichtlich maximaler Versagenlast und Steifigkeit oder für die histologische Untersuchung vorbereitet. Die entstandenen Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und mit Hilfe eines semiquantitativen Scores ähnlich dem MOVIN-Score beurteilt. Darüber hinaus erfolgte der immunhistochemische Nachweis verschiedener Kollagene und Bestandteile der Extrazellulärmatix, um einen Eindruck der Zusammensetzung des Gewebes im Hinblick auf stattfindende Reparatur- und *Remodelling*vorgänge zu gewinnen.

Alle Proben zeigten bereits nach 14 Tagen durchaus biomechanische Stabilität, waren im Vergleich zu gesunden Sehnen aber auch nach 28 Tagen noch minderwertig. Zu beiden Auswertzeitpunkten konnten bei allen Proben histologisch ein Mischgewebe mit deutlichen Kennzeichen einer Narbe mit sich beginnend ausbildenden Sehnencharakteristika festgestellt werden. Die histologische Qualität war jedoch sehr heterogen und es gab große Unterschiede zwischen den Exemplaren innerhalb der Versuchsgruppen. Tendenziell war das histologische

Erscheinungsbild der Stammzellgruppen besser, was sich auch im semiquantitativen Score nachweisen ließ, jedoch blieben statistisch signifikante Ergebnisse aus. Das kann zum einen daran liegen, dass die Verbesserungen zu diskret waren, zum anderen auch an einer zu niedrigen statistischen Power wegen der eher kleinen Versuchsgruppengröße insbesondere im Hinblick auf die hohen Standardabweichungen. Bei der immunhistochemischen Untersuchung ergaben sich bis auf die Ausnahme Pro-Kollagen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, was im Hinblick auf den Nachweis von Kollagen I und III, welcher bei allen Proben stark positiv ausfiel, auch an Verstärkerprozessen in der Färbemethodik und dem Umstand, dass somit keine genauen quantitativen Analysen möglich sind, liegen kann. In den Proben der Stammzellgruppen konnte zu beiden Auswertzeitpunkten statistisch signifikant mehr Pro-Kollagen nachgewiesen werden, was für eine erhöhte Kollagensynthese und eine weiterhin stattfindende Umorganisation des Gewebes spricht. Endgültige Aussagen über die Sehnenheilung können demnach nicht getroffen werden. Allerdings führte diese erhöhte Kollagensynthese nur zu marginalen Verbesserungen in der Biomechanik nach 14 Tagen, nach 28 Tagen waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen. Man kann also festhalten, dass sich durch die Stammzellen nur leichte Vorteile in der Frühphase ergaben, und die Proben beider Stammzellgruppen denen der Kontrollgruppe nicht eindeutig überlegen waren. Darüber hinaus ergab sich entgegen der Erwartungen auch kein zusätzlicher Vorteil der bFGF-Expression, es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stammzellgruppen.

Die Verfolgung zweier in der Literatur bisher als vielversprechend beschriebener Wege, die Sehnenheilung zu verbessern, führte daher trotz standardisierter und effektiver Verfahren zu keinen signifikanten Vorteilen. In Zusammenschau mit anderen aktuellen Studien sollte dies zu einer kritischen Betrachtung des eventuellen Einsatzes mesenchymaler Stammzellen zur Verbesserung der Sehnenheilung beim Menschen führen. Es sollten Studien abgewartet werden, die signifikante und vor allem langfristige Vorteile gerade auch hinsichtlich der biomechanischen Funktion nachweisen.

# Literaturverzeichnis

- Adamczyk, C. (2008): Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Sehnen- und Bandansätze am Os pisiforme. Dissertation, LMU München, 2008.
- Asher RA, Perides G, Vanderhaeghen JJ, Bignami A. Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of an hyaluronate-protein complex. *J Neurosci Res.* 28: 410-21, 1991
- Aspenberg, P. & Virchenko, O. (2004). Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 75(1), 93-99.
- Bailey AJ, Lapiere CM (1973) Effect of an additional peptide extension of the N-terminus of collagen from dermatosparatic calves on the crosslinking of collagen fibres. *Eur. J Biochem* 34: 91±96
- Banks, A., Downey, M., Martin, D., & Miller, S. (2001). Foot and ankle surgery. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Beskin JL, Sanders RA, Hunter SC, Hughston JC. Surgical repair of Achilles tendon ruptures. *The American journal of sports medicine* 1987;15:1-8.
- Bode-Lesniewska, B., Dours-Zimmermann, M. T., Odermatt, B. F., Briner, J., Heitz, P. U., & Zimmermann, D. R. (1996). Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(4), 303-312.
- Boskey, A.L., Cohen M.L., Bullough P. (1982): Hard tissue biochemistry: A comparison of fresh-frozen and formalin-fixed tissue samples. *Calcif Tissue int.* 34: 328-331, 1982
- Braun, A. (1999). Praktische orthopädie. Darmstadt: Steinkopff Verlag
- Bring D RC, Renstrom P, Salo P, Hart D, Ackermann P. Prolonged immobilization compromises up-regulation of repair genes after tendon rupture in a rat model. *Scand J Med Sci Sports* 2010 Jun;20(3):411-7 Epub 2009 Jul 2. 2010
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009; 217:318-24.
- Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: a biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* (1998); 7: 599-605



- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2739-49. Epub 2007 Jul 26.
- Chan BP, Chan KM, Mafulli N (1997) Effect of basic fibroblast growth factor: an in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop* 342: 239±247
- Chan, B. P., Fu, S. C., Qin, L., Lee, K. M., Rolf, C. G., & Chan, K. M. (2000). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthopaedica*, 71(5), 513-518.
- Chiodo, C., & Wilson, M. (2006). Current concepts review: Acute ruptures of the achilles tendon. *Foot & ankle international*, 27(4), 305-313
- Chiodo, C., & Wilson, M. (2006). Current concepts review: Acute ruptures of the achilles tendon. *Foot & ankle international*, 27(4), 305-313
- Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, et al. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles-tendon model. *The journal of bone and joint surgery*.2007Jan;89(1):74-81
- Cook JL, Feller JA, Bonar SF, Khan KM. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *J Orthop Res*. 2004;22:334-8.
- Duffy FJ, Seiler JG, Gelberman RH (1995) Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg* 20: 645±649
- Engvall E, Davis GE, Dickerson K, Ruoslahti E, Varon S, Manthorpe M.: Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: localization of the neurite-promoting site *J Cell Biol*. 1986 Dec;103(6 Pt 1):2457-65.
- Enzura Y, Rosen V, Nifuji A (1996) Introduction of hypertrophy in healing patellar tendon by implantation of human recombinant BMP 12. *J Bone Min Res* 11: 401
- Feibel, J., & Bernacki, B. (2003). A review of salvage procedures after failed achilles tendon repair. *Foot and ankle clinics*, 8, 105-114
- Fox, J. M., Blazina, M. E., Jobe, F. W., Kerlan, R. K., Carter, V. S., Shields Jr, C. L., & Carlson, G. J. (1975). Degeneration and rupture of the Achilles tendon. *Clinical orthopaedics and related research*, 107, 221-224.
- French, D., & Edsall, J. T. (1945). The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Protein Chem*, 2(277-335), 6.

- Fukui N, Katsuragawa Y, Sakai H, Oda H, Nakamura K. Effect of local application of basic fibroblast growth factor on ligament healing in rabbits. *Rev Rhum Engl Ed (1998)*; 65: 406-414
- Gabra N, Khiat A, Calabres (1994) Detection of elevated basic fibroblast growth factor during early hours of in vitro angiogenesis using a fast ELISA immunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1423±1430
- GBE Bund (Gesundheitsberichterstattung des Bundes) (2015): Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungs-/Wohnort, ICD10. Die aufgerufene Tabelle bezieht sich auf: Region: Deutschland, ICD10: M65-M68 Krankheiten der Synovialis und der Sehnen, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 1987". URL: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/\\_XWD\\_FORMPROC?TARGET=&PAGE=\\_XWD\\_106&OPINDEX=1&HANDLER=\\_XWD\\_CUBE.SETPGS&DATACUBE=\\_XWD\\_132&D.001=1000001&D.946=14533](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_106&OPINDEX=1&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_132&D.001=1000001&D.946=14533). (Aufgerufen am 22.7.2015)
- Gelberman R, Goldberg V, An KN, Banes A (1988) Tendon. In: Woo SLY, Buckwalter JA (eds) Injury and repair of musculoskeletal soft tissue. *Am Acad Orthop Surg* 5±40
- Graumann, W. (Ed.). (2004). *CompactLehrbuch Anatomie: in 4 Bänden* (Vol. 1). Schattauer Verlag.
- Grotendorst GR, Martin GR, Pencer D (1985) Stimulation of granulation tissue formation by PDGF in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 76: 2323±2329
- Heinzeller Thomas, Büsing Carl M. (2001): *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*, Thieme, Stuttgart; Auflage: 1 (11. Juli 2001)
- Hirsch D. (2011): *Regulierte lentivirale Expression von Wachstumsfaktoren in Primärzellen zur Therapie osteochondraler Defekte*, TU München, Dissertation 2011
- Hoppe, H. (2014). *Verbesserung der Sehnenheilung durch Wachstumsfaktoren nach induzierter M. supraspinatus-Ruptur am Rattenmodell - Vergleich verschiedener Applikationsformen*. Doktorarbeit. Technische Universität München.
- Hsu C, Chang J. (2004) Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am (2004)*; 29:551-563
- Hufner, T., Brandes, D., Thermann, H., Richter, M., Knobloch, K., & Krettek, C. (2006). Long-term results after functional nonoperative treatment of achilles tendon rupture. *Foot & ankle international*, 27(3), 167-171

- 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*
- Ignatz RA, Massague J (1986) TGF- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 26: 4337±4345
- Ikeda, T., Kubo, T., Arai, Y., Nakanishi, T., Kobayashi, K., Takahashi, K., Imanishi J, Takigawa M. & Hirasawa, Y. (1998). Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *The Journal of rheumatology*, 25(9), 1666-1673.
- Isaacs, W. B., Cook, R. K., Van Atta, J. C., Redmond, C. M., & Fulton, A. B. (1989). Assembly of vimentin in cultured cells varies with cell type. *Journal of Biological Chemistry*, 264(30), 17953-17960.
- Isbach, J. (2007): Die operative Versorgung der Achillessehnenruptur unter Berücksichtigung der Behandlungsergebnisse aus den Jahren 1992 bis 1997. Dissertation, Universität Münster, 2007
- Jakob, J. (2007): Die molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Lig. coracoacromiale. Dissertation, LMU München, 2007
- Jozsa L, Kannus P, Reffy A, Demel Z (1984) Fine structural alterations of collagen fibers in degenerative tendinopathy. *Arch Orthop Trauma Surg* 103: 47±51
- Jozsa L, Kannus P. (1997): Human tendons. Anatomy, physiology and pathology. *Human kinetics, USA 1997: 1-574*
- Jozsa, L., Kvist, M., Balint, B. J., Reffy, A., Jarvinen, M., Lehto, M., & Barzo, M. (1989). The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. *The American Journal of Sports Medicine*, 17(3), 338-343.
- Ju, Y. J., Muneta, T., Yoshimura, H., Koga, H., & Sekiya, I. (2008). Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell and tissue research*, 332(3), 469-478.
- Kannus P, Jozsa L. (1991): Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1991;73:1507-25
- Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 2000 December 3;10(6):312-20

- Kashiwagi, K., Mochizuki, Y., Yasunaga, Y., Ishida, O., Deie, M., & Ochi, M. (2004). Effects of transforming growth factor- $\beta$  1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, 38(4), 193-197.
- Khan, R. J. K., Fick, D., Brammar, T. J., Crawford, J., & Parker, M. J. (2004). Interventions for treating acute achilles tendon ruptures. The Cochrane Database of Systemic Reviews (3), 1-37
- Kiernan, J. A. (1999). Histological and histochemical methods: theory and practice. *Shock*, 12(6), 479. [Kiernan JA (1999): Histological und histochemical methods: theory and practice. Oxford: Butterworth-Heinemann. 390-418]
- Kinner, B., Seemann, M., Roll, C., Schlumberger, A., Englert, C., Nerlich, M., & Prantl, L. (2009). [Sports and activities after achilles tendon injury of the recreational athlete]. *Sportverletzung Sportschaden: Organ der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin*, 23(4), 210-216.
- Kitaoka, H. (2002). The foot and ankle. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Knipping (2003): Untersuchungen zur Regulation der seromukösen Drüsen der respiratorischen Nasenschleimhaut des Menschen. Habilitation 2003. Halle-Wittenberg
- Knobloch, K., Thermann, H., & Hufner, T. (2007). Achilles tendon rupture - early functional options with special emphasis on rehabilitation issues. *Sportverletzung Sportschaden*, 21(1), 34-40
- Kosaka T, Yamamoto K. (2011): Long-term effects of chronic Achilles tendon rupture treatment, using reconstruction with peroneus brevis transfer, on sports activities. *West Indian Med J. 2011 Dec;60(6):628-35.*
- Kvist, M., Hurme, T., Kannus, P., Järvinen, T., Maunu, V. M., Jozsa, L., & Järvinen, M. (1995). Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *The American journal of sports medicine*, 23(3), 359-364.
- Lagergren C, Lindholm A. (1959): Vascular distribution in the Achilles tendon; an angiographic and microangiographic study. *Acta chirurgica Scandinavica* 1959;116:491-5
- Lapiere CH, Nusgen B, Pierard GE (1977) Interaction between collagen I and III in conditioning bundles organization. *Conn Tiss Res* 5: 1±29
- Le Blanc K, Ringd'en O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:586-91.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM; Kohlenhydrate. In: Tschesche H (Hrsg.) (1994): *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg; 1994; 345- 363

- Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI (1995): A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* (219): 211-22.
- Lill H, Moor C, Schmidt A, Echtermeyer V (1996) Aktueller Stand der Behandlung von Achillessehnenrupturen. *Chirurg* (67):1160–1165
- Longo, U. G., Franceschi, F., Ruzzini, L., Rabitti, C., Morini, S., Maffulli, N., & Denaro, V. (2007). Characteristics at Haematoxylin and Eosin staining of ruptures of the long head of the biceps tendon. *British journal of sports medicine* (43): 603-7.
- Lou J, Manske PR, Aoki M, Joyce ME (1996) Adenovirus-mediated gene transfer into tendon and tendon sheath. *J Bone Joint Surg Am* (14): 513±517
- Lüllmann-Rauch, R. (2012): *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme.
- Maffulli N, Moller HD, Evans CH (2002): Tendon healing: can it be optimised? *Br J Sports Med* 2002;(36):315-316
- Maffulli N, Waterston SW, Squair J, Reaper J, Douglas AS (1999). Changing incidence of Achilles tendon rupture in Scotland: a 15-year study. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine* 1999;(9):157-60
- Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, Rosager S, Hanson P, Aagaard P, Krogsgaard M, Kjaer M. (2002): Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix Biol.* 2002;(21):369-77.
- Mahler F, Fritschy D. (1992): Partial and complete ruptures of the Achilles tendon and local corticosteroid injections. *British journal of sports medicine* 1992;(26):7-14.
- Majewski M, Ochsner PE, Liu F, Fluckiger R, Evans CH. (2009): Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am J Sports Med* (2009); 37: 2117-2125
- Majewski M, Rickert M, Steinbrück K (2000) Die frische Achillessehnenruptur. Eine prospektive Untersuchung zur Beurteilung verschiedener Therapiemöglichkeiten. *Orthopäde* 29:670–676
- Majewski, M., Widmer, K., & Steinbrück, K. (2002). Achilles tendon rupture: 25 year's experience in sport-orthopedic treatment. *Sportverletzung Sportschaden*, 16(4), 167-173.
- Mason ML, Allen HS (1941) The rate of healing of tendons: an experimental study of tensile strength. *Ann Surg* (113): 424±459
- Mayne, R. (1988). Preparation and applications of monoclonal antibodies to different collagen types. *Clinical biochemistry*, 21(2), 111-115.

- McDonald, J. A., Broekelmann, T. J., Matheke, M. L., Crouch, E., Koo, M., & Kuhn 3rd, C. (1986). A monoclonal antibody to the carboxyterminal domain of procollagen type I visualizes collagen-synthesizing fibroblasts. Detection of an altered fibroblast phenotype in lungs of patients with pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 78(5), 1237.
- McMahon, J. M., Conroy, S., Lyons, M., Greiser, U., O'Shea, C., Strappe, P., Howard L, Murphy M, Barry F & O'Brien, T. (2006). Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem cells and development*, 15(1), 87-96.
- Miller, D., Waterson, S., Reaper, J., Barrass, V., & Maffulli, N. (2005). Conservative management, percutaneous or open repair of acute achilles tendon rupture:A retrospective study. *Scottish Medical Journal*, 50(4), 160-165
- Milz S, Benjamin M, Putz R. (2005): Molecular parameters indicating adaptation to mechanical stress in fibrous connective tissue. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2005;178:1-71.
- Milz S. (2002): Molekulare Parameter der mechanischen Beanspruchung des faserreichen Bindegewebes. Habilitationsschrift München 2002
- Möller, H. D., Evans, C. H., & Maffulli, N. (2000). Aktuelle Aspekte der Sehnenheilung. *Der Orthopäde*, 29(3), 182-187.
- Molloy T, Wang Y, Murrell G. (2003): The roles of growth factors in tendon and ligamenthealing. *Sports Med*. 2003;33(5):381-94
- Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C. (1997): Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop Scand (1997)*; 68: 170-175
- Murrell, G. A., Lilly, E. G., Goldner, R. D., Seaber, A. V., & Best, T. M. (1994). Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. *Journal of orthopaedic research*, 12(4), 582-591.
- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. (2008): Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental hematology* 2008;36:1176-85.
- Nickel W. (2007): Unconventional secretion: an extracellular trap for export of fibroblast growth factor 2. *Journal of cell science* 2007;120:2295-9.
- O'Brien T (1992) Functional anatomy and physiology of tendons. *Clin Sports Med* 11: 505±520
- Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H. (2010): Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *The Journal of bone and joint surgery American (Vol 92)*:2776-84

- Olsen BR, Ninomiya Y(1993): Collagens. In: Kreis T, Vale R (Hrsg.) (1993) *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*. Oxford Univ Press. 32- 47.
- Ömeroğlu, S., Peker, T., Türközkan, N., & Ömeroğlu, H. (2009). High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 129(2), 281-286.
- Özkan, I., Shino, K., Nakamura, N., Natsu-Ume, T., Matsumoto, N., Horibe, S., Tomita, T., Kaneda, Y. & Ochi, T. (1999). Direct in vivo gene transfer to healing rat patellar ligament by intra-arterial delivery of haemagglutinating virus of Japan liposomes. *European journal of clinical investigation*, 29, 63-67.
- Parry DAD, Barnes GRG, Craig AS (1978) A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relationship between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc Roy Soc London* 203: 305±321
- Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J (1995) Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-aa in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-bb and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest* 96: 1336±1350
- Pluta, K., Luce, M. J., Bao, L., Agha-Mohammadi, S., & Reiser, J. (2005). Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *The journal of gene medicine*, 7(6), 803-817.
- Potenza AD (1962). Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 44: 49±64
- Renström, P. A. F. H. (1997). *Sportverletzungen und Überlastungsschäden*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag
- Riley G. (2004): The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology* 2004 February 1;43(2):131-42
- Schiebler, T.H., W. Schmidt & K. Zilles (1999): *Anatomie*. 7. Auflage. Springer Verlag.
- Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., Gerg, M., Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D. & Wilsch, J. (2008). A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharmaceutical research*, 25(12), 2946-2962.
- Schoen RC, Bentley KL, Klebe RJ. (1982). Monoclonal antibody against human fibronectin which inhibits cell attachment. *Hybridoma*, 1(2), 99-108.
- Schuenke M, E Schulte, U Schumacher, M Voll & K Wesker (2004): *Prometheus. Lerntatlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme.
- Scott, J. E. (2003). Elasticity in extracellular matrix ‘shape modules’ of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *The Journal of physiology*, 553(2), 335-343.

- Seemann M. (2009): *Lebensqualität, Sportfähigkeit und Freizeitverhalten nach Achillessehnenruptur*. Dissertation. Regensburg 2009.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2005). Current concepts review - tendon injury and tendinopathy: Healing and repair. *The Journal of bone and joint surgery*, 87-A(1), 187-202
- Smola, H., Eming, S. A., Hess, S., Werner, S., & Krieg, T. (2001): Wundheilung und Wundheilungsstörungen: Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen* 2001; 98(43): A 2802-2808 / B-2387 / C-2235
- Sorrenti, S. (2006). Achilles tendon rupture: Effect of early mobilization in rehabilitation after surgical repair. *Foot & ankle international*, 27(6), 407-410
- Steinbrück, K. (2000). Achillessehnenrupturen im Sport – Epidemiologie, aktuelle Diagnostik, Therapie und Rehabilitation. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 51(5). 154-160.
- Tang JB, Cao Y, Zhu B, Xin KQ, Wang XT, Liu PY (2008): Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. an in vivo study. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 May;90(5):1078-89.
- Thermann H (1999) Die Behandlung der Achillessehnenruptur. *Orthopäde* 28:82–97
- Thompson, F., Cracchiolo, A., Adelaar, R., Fleming, L., Simons, G., & Black, K. (1994). *Operative foot surgery*. Philadelphia: Saunders Company
- Tischer T., Milz S., Maier M., Schieker M., Benjamin M. (2002): An immunohistochemical study of the rabbit suprapatella, a sesamoid fibrocartilage in the quadriceps tendon containing aggrecan. *J Histochem Cytochem* 50: 955-960.
- Tischer T., Vogt S., Aryee S., Steinhäuser E., Adamczyk C., Milz S., Martinek V., Imhoff A.B. (2007): Tissue Engineering of the anterior cruciate ligament: a new method using acellularized tendon allografts and autologous fibroblasts. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 127 (2007): 735-741
- Toh WS, Liu H, Heng BC, Rufaihah AJ, Ye CP, Cao T. (2005): Combined effects of TGFbeta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth factors* 23:313-21.
- Urdzikova, L. M., R. Sedlacek, T. Suchy, T. Amemori, J. Ruzicka, P. Lesny, V. Havlas, E. Sykova & P. Jendelova (2014): Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. *Biomedical engineering online*, 13(1), 42.
- Vogel, R., Amar, L., Thi, A. D., Saillour, P., & Mallet, J. (2004). A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Human gene therapy*, 15(2), 157-165.



- Vogt, S., Ansah, P., & Imhoff, A. B. (2007). Complete osseous avulsion of the adductor longus muscle: acute repair with three fiberwire suture anchors. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 127(8), 613-615.
- Vogt, S., Ueblacker, P., Geis, C., Wagner, B., Wexel, G., Tischer, T., Krüger, A., Plank, C., Anton, M., Martinek, V., Imhoff, A.B. & Gansbacher, B. (2008). Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV. G pseudotyped retroviral vector. *Biomaterials*, 29(9), 1242-1249.
- Vogt, S., Wexel, G., Tischer, T., Schillinger, U., Ueblacker, P., Wagner, B., Hensler D, Wilisch J, Geis C, Wübbenhorst D, Aigner J, Gerg M, Krüger A, Salzmann GM, Martinek V, Anton M, Plank C, Imhoff AB, & Gansbacher, B. (2009). The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodelling and repair of osteochondral defects. *Biomaterials*, 30(12), 2385-2392.
- Wang XJ, Dong Z, Zhong XH, Shi RZ, Huang SH, Lou Y, Li QP. Transforming growth factor-beta1 enhanced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365:548-54.
- Welsch U. (2005): *Histologie: Lehrbuch Histologie*. München: Urban&Fischer.
- Williams IF, McCullagh KG, Silver IA (1984): The distribution of type I and III collagens and fibronectin in the healing equine tendon. *Conn Tiss Res* 12: 211±227
- Wübbenhorst, D., Dumler, K., Wagner, B., Wexel, G., Imhoff, A., Gansbacher, B., Vogt, S. & Anton, M. (2010). Tetracycline-regulated bone morphogenetic protein 2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects. *Arthritis & Rheumatism*, 62(7), 2037-2046.
- Zhang, F., Liu, H., Stile, F., Lei, M. P., Pang, Y., Oswald, T. M., Beck, J., Dorsett-Martin, W. & Lineaweaver, W. C. (2003). Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 112(6), 1613-1619.
- Zschäbitz, P.D.A. (2005): Anatomie und Verhalten von Sehnen und Bändern. *Der Orthopäde* 34(6):516–525.

**Ergebnisse dieser Dissertation wurden im Rahmen folgender Publikation veröffentlicht:**

- Kraus, T.M., F.B. Imhoff; G. Wexel, A. Wolf, D. Hirsch, L. Lenz, U. Stöckle, S. Buchmann, T. Tischer, A.B. Imhoff, S. Milz, M. Anton, S. Vogt, (2014): Stem Cells and Basic Fibroblast Growth Factor Failed to Improve Tendon Healing. An in Vivo Study Using Lentiviral Gene Transfer in a Rat Model. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 96(9), 761-769.



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper: alle monoklonal und aus der Maus gewonnen.....	23
Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösung PBS.....	25
Tabelle 3: Ergebnisse der HE-Färbung nach 14 Tagen (0 Punkte entsprechen dem Merkmal einer gesunden Sehne, 3 Punkte bedeuten deutlichst abweichendes Aussehen).....	30
Tabelle 4: Ergebnisse der HE-Färbung nach 28 Tagen (0 Punkte entsprechen dem Merkmal einer gesunden Sehne, 3 Punkte bedeuten deutlichst abweichendes Aussehen).....	31
Tabelle 5: Anfärbung Antigen Kollagen I der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	35
Tabelle 6: Anfärbung Antigen Kollagen I der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	36
Tabelle 7: Anfärbung Antigen Kollagen III der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate. .	38
Tabelle 8: Anfärbung Antigen Kollagen III der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate. .	38
Tabelle 9: Anfärbung Antigen Pro-Kollagen I der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate .....	40
Tabelle 10: Anfärbung Antigen Pro-Kollagen I der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate .....	41
Tabelle 11: Anfärbung Antigen Laminin der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	44
Tabelle 12: Anfärbung Antigen Laminin der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	45
Tabelle 13: Anfärbung Antigen Fibronectin der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate. .	47
Tabelle 14: Anfärbung Antigen Fibronectin der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate. .	47
Tabelle 15: Anfärbung Antigen Versican der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	49
Tabelle 16: Anfärbung Antigen Versican der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	49
Tabelle 17: Anfärbung Antigen Vimentin der nach 14 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	52
Tabelle 18: Anfärbung Antigen Vimentin der nach 28 Tagen gewonnenen Sehnenregenerate.....	52
Tabelle 19: Statistischer Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte in der HE-Färbung, aufgeschlüsselt in die 3 Versuchsgruppen.....	54
Tabelle 20: Analyse der Summenwerte nach 14 Tagen (one-way analysis of variance, bzw. one-way ANOVA).....	55
Tabelle 21: Statistik der Summenwerte der HE-Färbung nach 14 Tagen.....	56
Tabelle 22: Analyse der Summenwerte der HE-Färbung nach 28 Tagen. Kruskal-Wallis Test.....	57
Tabelle 23: Statistik der Summenwerte der HE-Färbung nach 28 Tagen.....	57
Tabelle 24: Statistischer Vergleich der Auswertezeitpunkte 14 und 18 Tage des Pro-Kollagen I -Nachweises.....	59
Tabelle 25: Auswertung des Pro-Kollagen I-Nachweises nach 14 Tagen.....	60
Tabelle 26: Auswertung des Pro-Kollagen-I-Nachweises nach 28 Tagen.....	61

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch eine Sehne (ZSCHÄBITZ 2005).....	8
Abbildung 2: Anatomie der Achillessehne (SCHUENKE et al. 2004).....	10
Abbildung 3: Schematisches Verhalten einer Sehne unter Belastung (ZSCHÄBITZ 2005).....	11
Abbildung 4: Wundheilungskaskade (HSU 2004).....	12
Abbildung 5: Studiendesign.....	17
Abbildung 6: Operationsablauf: a) Injektion; b) Verursachen des Defektes; c) Durchtrennte Achillessehne; d) Substanzeffekt im Punch.....	20
Abbildung 7: Makroskopisches Präparat (Mitte, b) im Vergleich zu angefertigten Schnitten in HE-Färbung (a und c). Zonale Einteilung in distal, medial und proximal.....	25
Abbildung 8: Übergang Sehnenstumpf zu Narbengewebe (5-fache Vergrößerung): Ausdünnung der Sehne nach oben hin sichtbar links noch vitale Sehne mit Zellkernen, an der Defektgrenze Kernverlust als Zeichen der Degeneration.....	29
Abbildung 9: Gleicher Ausschnitt wie links (Übergang Sehnenstumpf-Narbengewebe, 5-fach vergrößert); in der Polarisation abruptes Abbrechen der Kollagenfasern (als doppelbrechende Strukturen) erkennbar.....	29
Abbildung 10: Sehne der bFGF-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x).....	32
Abbildung 11: Sehne der bFGF-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x), Polarisation.....	32
Abbildung 12: Sehne der eGFP-LV-MSK-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x).....	32
Abbildung 13: Sehne der PBS-Gruppe nach 14 Tagen (Vergrößerung 5 x).....	32
Abbildung 14: bFGF-Sehne nach 28 Tagen (20-fach vergrößert).....	33
Abbildung 15: bFGF-Sehne nach 28 Tagen (20-fach vergrößert).....	33
Abbildung 16: Sehne der eGFP-LV-MSK Gruppe nach 28 Tagen in 20-facher Vergrößerung.....	33
Abbildung 17: Sehne der eGFP-LV-MSK Gruppe nach 28 Tagen in 20-facher Vergrößerung.....	33
Abbildung 18: Sehne der PBS Gruppe nach 28 Tagen, 20-fach vergrößert.....	34
Abbildung 19: Repräsentative bFGF-Sehne nach 28-Tagen, 4-fach vergrößert.....	34
Abbildung 20: Repräsentative eGFP-Sehne nach 28-Tagen, 4-fach vergrößert.....	34
Abbildung 21: Repräsentative PBS-Sehne nach 28-Tagen, 4-fach vergrößert.....	34
Abbildung 22: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (eGFP-Gruppe) Kollagen I, 10 x .....	35
Abbildung 23: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (bFGF-Gruppe), Kollagen I, 10 x .....	35
Abbildung 24: Negativkontrolle, Kollagen I, 20 x.....	36
Abbildung 25: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (bFGF-Gruppe), Kollagen I, 10 x .....	36
Abbildung 26: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (eGFP-Gruppe), Kollagen I, 10 x .....	37
Abbildung 27: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (PBS-Gruppe), Kollagen I, 10 x .....	

.....	37
Abbildung 28: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (eGFP-Gruppe), Coll III, 10 x.	39
Abbildung 29: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 14 Tagen (bFGF-Gruppe), Coll III, 10 x.	39
Abbildung 30: Negativkontrolle Coll III, 20 x.....	39
Abbildung 31: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (bFGF-Gruppe), Coll III, 10 x.	39
Abbildung 32: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (eGFP), Coll III, 10 x.....	40
Abbildung 33: Repräsentatives Sehnenregenerat nach 28 Tagen (PBS-Gruppe), Coll III, 10 x...	40
Abbildung 34: Negativkontrolle Pro-Collagen I (14 Tage), 5 x.....	42
Abbildung 35: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (PBS-Gruppe) nach 14 Tagen, 5 x.....	42
Abbildung 36: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (eGFP-Gruppe) nach 14 Tagen, 5 x.....	42
Abbildung 37: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (bFGF-Gruppe) nach 14 Tagen, 5 x.....	42
Abbildung 38: Negativkontrolle Pro-Coll I (28 Tage), 10 x.....	43
Abbildung 39: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (PBS-Gruppe) nach 28 Tagen, 10 x.....	43
Abbildung 40: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (eGFP-Gruppe) nach 28 Tagen, 5 x.....	43
Abbildung 41: Exemplarische Reaktion auf das Antigen Pro-Coll I (bFGF-Gruppe) nach 28 Tagen, 10 x.....	43
Abbildung 42: Gesunde Sehne nach immunhistochemischer Markierung von Laminin, 10 x....	45
Abbildung 43: Regeneratgewebe nach Markierung von Laminin (bFGF-Gruppe nach 14 Tagen), 10 x.....	45
Abbildung 44: Positive Markierung der Fasern, Antigen Laminin (Sehne der bFGF-Gruppe, 14 Tage), 20 x.....	46
Abbildung 45: Negativkontrolle Laminin, 20 x.....	46
Abbildung 46: Regeneratgewebe mit Nerv nach Markierung von Fibronectin, 20 x.....	48
Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis von Fibronectin vor allem in den Gefäßwänden des Regeneratgewebes, 20 x.....	48
Abbildung 48: Immunhistochemische Markierung von Versican (bFGF-Gruppe, 28 Tage), 10 x (Farbreaktion schwach).....	50
Abbildung 49: Immunhistochemische Markierung von Versican (bFGF-Gruppe, 28 Tage), 10 x (Farbreaktion stark).....	50
Abbildung 50: Immunhistochemische Markierung von Versican (eGFP-Gruppe, 28 Tage), 10 x	50
Abbildung 51: Immunhistochemische Markierung von Versican (PBS-Gruppe, 28 Tage), 10 x.	50
Abbildung 52: Gesunde Sehne nach Markierung von Versican, 10 x.....	51
Abbildung 53: Negativkontrolle Versican, 20 x.....	51
Abbildung 54: Negativkontrolle Vimentin, 20 x.....	53
Abbildung 55: Markierung von Vimentin bei einem Sehnenregenerat der PBS-Gruppe (28 Tage),	

20 x.....	53
Abbildung 56: Intensive Anfärbung der Vimentinmarkierung bei einer Sehne der bFGF-Gruppe (28 Tage), 20 x.....	53
Abbildung 57: Dezentler Nachweis von Vimentin bei einer Sehne der eGFP-Gruppe (14 Tage), 20x.....	53
Abbildung 58: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in einer Sehne der eGFP-Gruppe nach 14 Tagen, 20 x.....	54
Abbildung 59: Vergleich der erzielten Summenwerte in den einzelnen Gruppen zu den unterschiedlichen Auswertzeitpunkten.....	55
Abbildung 60: Vergleich der Punktwerte der drei Versuchsgruppen zum Auswertzeitpunkt 14 Tage.....	56
Abbildung 61: Vergleich der Punktwerte der drei Versuchsgruppen zum Auswertzeitpunkt 28 Tage.....	58
Abbildung 62: Faserstruktur (links) und Fasernanordnung (rechts) nach 28 Tagen.....	58
Abbildung 63: Vergleich des Pro-Kollagen-I-Nachweises in den Versuchsgruppen zu beiden Auswertzeitpunkten.....	60
Abbildung 64: Vergleich des Pro-Kollagen-I-Nachweises in den Gruppen nach 28 Tagen.....	61

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei all jenen bedanken, die über die vergangenen Jahre hinweg zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich **Herrn Prof. Dr. med. A. B. Imhoff** für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Klinik.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. S. Vogt** für die hervorragende Betreuung und Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Versuche und des Schreibens hinweg bedanken.

**Herrn Prof. Dr. med. S. Milz** und **seinem Team**, insbesondere **Frau C. Harbauer** und **Frau G. Zigleder**, gilt mein besonderer Dank für die wissenschaftliche Betreuung, die Einarbeitung in die histologische Methodik und die Unterstützung bei der praktischen Durchführung.

Bei **Frau Dr. med. vet. G. Wexel**, **Herrn Dr. med. T. Kraus** und **Herrn F. Imhoff** bedanke ich mich für die partnerschaftliche Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung der Tierexperimente.

**Herrn Dr. Tibor Schuster** danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Und natürlich gilt mein Dank auch meinem Mann für sein Verständnis und seine Hilfe, meinen Söhnen für den wunderbaren Ausgleich zur Arbeit, meinem Bruder für sein fachliches Interesse und die Motivation und meinen Eltern, ohne die und deren Unterstützung diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.