

---

**Dreidimensionale Sehnenzell-Konstrukte zur  
Verbesserung der Heilung partieller  
Sehnendefekte**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Christiane Stoll**

aus Finsterwalde

2011

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis Mai 2011 im Labor für Unfallchirurgie, AG Bioreconstruction, Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsklinik Berlin unter der Leitung von Frau PD. Dr. med.- vet. Schulze-Tanzil durchgeführt.

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med.- vet. Gundula Schulze-Tanzil

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller

Eingereicht am: 31.05.11

Disputation am: 04.07.11

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD. Dr. med.- vet Gundula Schulze-Tanzil für die Aufnahme in Ihre Forschungsgruppe und die Möglichkeit zur Promotion. Mit Ihren zahlreichen Ideen, Ihrer Geduld und Kompetenz hat Sie während der gesamten Zeit maßgeblich an dieser Arbeit mitgewirkt. Sie war mir in Ihrem zielorientierten und disziplinierten Arbeiten im wissenschaftlichen Bereich stets ein Vorbild.

Herrn Prof. Rainer H. Müller möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Hilfe bei der Zusammenstellung der Promotionskommission danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe AG Bioreconstruction danke ich für sehr lehrreiche und schöne Jahre in familiärer Atmosphäre.

Frau Claudia Conrad hat mir stets den Rücken gestärkt und mir bei allen auftretenden Fragen hilfreich zur Seite gestanden. Vielen Dank!

Frau Ulrike Marzahn möchte ich für die exzellente Hilfe bei den histologischen Färbungen danken. Ohne Herrn Benjamin Kohl und seine herausragende Geduld bei der Klärung aller technischen Schwierigkeiten wäre diese Arbeit nicht so reibungslos verlaufen.

Bei meinem Mitdoktoranden Karym El Sayed bedanke ich mich für die inspirierenden Gespräche sowie für die gemeinsame Teilnahme an den Weiterbildungen und Kongressen.

Frau Marion Lemke war stets eine kompetente Ansprechpartnerin in allen labor-technischen Fragen. Frau Dr. med.- vet. Anke Lohan danke ich für die Mithilfe am Tierversuchsprojekt.

Bedanken möchte ich mich in diesem Rahmen auch bei den ehemaligen Diplom- und Master-Studenten/ innen: Christian Rosen, Liang Li und Sylvia Hondke, ohne deren Mithilfe die vorliegende Arbeit in diesem Zeitrahmen nie entstanden wäre.

Herrn Dr. Thilo John, und Herrn Prof. Dr. Ertel danke ich für die Bereitstellung der humanen Sehnen-Proben.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Sittinger insbesondere Dr. Christian Kaps und Dr. Michaela Endres danke ich für die Möglichkeit, in Ihrem Labor die PLGA-Versuche und Analysen durchzuführen und für die hilfreichen Kommentare bei den Zwischenpräsentationen der

Ergebnisse. Herrn Samuel Vetterlein möchte ich für die Hilfe bei den RNA-Isolierungen aus den PLGA-Konstrukten danken.

Frau Annette Breier vom Institut für Polymerforschung Dresden bin ich dankbar für die Gelegenheit, die gestickten PGA-Proben für Sehnenzellen zu testen und besonders für den Einblick in die Materialverarbeitung.

Mein größter Dank geht an meine Familie. In allen Belangen konnte ich stets auf volle Unterstützung vertrauen. Meinem Freund Markus bin ich sehr dankbar für die Unterstützung vor allem in den arbeitsintensiven Zeiten und für die nicht nachlassende Motivation.

Meinem Sohn Timm danke ich, dass er mir die Kraft für diese Arbeit gab.

## Veröffentlichungen

### Posterbeiträge

**Extracellular matrix expression in 2D and 3D cultured tenocytes compared to native tendon tissue**

C. Stoll, C. Rosen, M. Endres, C. Kaps, T. John, B. Kohl, W. Ertel, G. Schulze-Tanzil  
104th Annual Meeting of the Anatomical Society, 27.-30.03.2009 Antwerpen

**Human tenocytes PLGA constructs for the regeneration of partial tendon defects**

C. Stoll, Y. Ibold, M. Endres, J. Ringe, C. Kaps, T. John, C. Rosen, B. Kohl, W. Ertel, M. Sittinger, G. Schulze-Tanzil

Retreat Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapien (BCRT), 12.10.2009 Berlin

**Gegenüberstellung der extrazellulären Matrix-Genexpression von Sehnenzellen in 2D- und 3D-Kultur sowie nativem Gewebe**

C. Stoll, C. Rosen, M. Endres, C. Kaps, T. John, B. Kohl, W. Ertel, G. Schulze-Tanzil  
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 21.- 24.10.2009 Berlin

**Expression von Anaphylatoxinrezeptoren und Komplement-regulierenden Proteinen in der Sehne**

C. Busch, B. Kohl, T. John, C. Stoll, W. Ertel, G. Schulze-Tanzil

26. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 09/ 2009 Würzburg

**Komplement in der Sehne: Einfluss von Zytokinen auf die Expression von Komplementfaktoren in menschlichen Sehnenzellen**

C. Busch, T. John, B. Kohl, W. Ertel, C. Stoll, G. Schulze-Tanzil

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 10/ 2010 Berlin (Posterpreis)

### Referate

**Tendon tissue engineering: two three-dimensional culture systems in direct comparison to monolayer and native tendon**

C. Stoll, T. John, M. Endres, C. Rosen, C. Kaps, W. Ertel, B. Kohl, G. Schulze-Tanzil  
International Bone-Tissue-Engineering Kongress (Bonetec), 10.10.2009 Hannover

### Publikationen

**Healing parameters in a novel rabbit partial tendon defect and tenocyte/ biomaterial implantation model**

C. Stoll, T. John, C. Conrad, A. Lohan, S. Hondke, W. Ertel, C. Kaps, M. Endres, M. Sittinger, J. Ringe, G. Schulze-Tanzil

Biomaterials, 2011 Jul;32(21):4806-15.

**Extracellular Matrix Expression of Human Tenocytes in Three-Dimensional Air-Liquid and PLGA Cultures Compared with Tendon Tissue: Implications for Tendon Tissue Engineering**

C. Stoll, T. John, M. Endres, C. Rosen, C. Kaps, B. Kohl, M. Sittinger, W. Ertel, G. Schulze-Tanzil

Journal of Orthopaedic Research, 2010 Sep;28(9):1170-7.

**Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes.**

T. John, D. Lodka, B. Kohl, W. Ertel, J. Jammrath, C. Conrad, C. Stoll, C. Busch, G. Schulze-Tanzil

Journal of Orthopaedic Research, 2010 Aug;28(8):1071-7.

# Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG

VERÖFFENTLICHUNGEN

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. SEHNEN	1
1.1.1 Hamstringsehne und Achillessehne	2
1.1.2 Blutversorgung	2
1.1.3 Aufbau der Sehne	3
1.1.4 Extrazelluläre Matrix (EZM)	4
1.1.5 Zelluläre Bestandteile	7
1.1.6 Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, Adhäsion	7
1.1.7 Sehnenmarker und Differenzierungsgrad	9
1.2 SEHNENVERLETZUNG	10
1.3 SEHNENHEILUNG	11
1.4 THERAPIEN UND PROBLEME	13
1.5 SEHNEN TISSUE ENGINEERING	15
1.5.1 Biomaterialien	15
1.5.2 Zellfreie Trägermaterialien	16
1.5.3 Synthetische Biomaterialien in der Sehnenheilung	16
1.5.4 Fibrin im Tissue Engineering	18
1.6 SEHNENDEFEKTMODELLE	18
2. ZIELSTELLUNG	21
3. MATERIALIEN UND METHODEN	22
3.1 MATERIALIEN	22
3.1.1 Wichtige Laborgeräte	22
3.1.2 Verbrauchsmittel	22
3.1.3 Chemikalien	23
3.1.4 Fertigsysteme, Kits	25
3.1.5 Antikörper und PCR-Primer	25
3.1.6 Puffer und Lösungen	27
3.1.7 Software	28
3.1.8 Medikamente für den Tierversuch	29
3.1.9 Humane/ lapine/ porcine Sehnen-Spender	29
3.2. METHODEN	30
3.2.1. Grundtechniken der Zellkultur	30
3.2.2 Dezellularisierung der porcinen Sehnenmatrix	32
3.2.3 Besiedlungsstrategien von Trägermaterialien	32
3.2.4 Histologie	35
3.2.5 In situ indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	37
3.2.6 Lebend-Tot-Färbung	37
3.2.7 Genexpressionsanalyse	38
3.2.8 Tierversuchsmodell	42
3.2.9 Statistik	46
5. ERGEBNISSE	47

5.1	ETABLIERUNG EINER GEEIGNETEN 3D BESIEDELUNGSSTRATEGIE FÜR BIOMATERIALIEN	47
5.1.1	Morphologie besiedelter Konstrukte in Abhängigkeit von der Besiedelungsstrategie	47
5.2	BESCHICHTUNG DER ZELLKULTURPLATTEN	49
5.1.2	Vitalität besiedelter Konstrukte in Abhängigkeit von der Besiedelungsstrategie	50
5.1.3	Histologie besiedelter Konstrukte in Abhängigkeit von der Besiedelungsstrategie	51
5.3	GENEXPRESSIONSANALYSEN	54
5.3.1	RNA-Qualitätskontrolle	54
5.3.2	Effizienzbestimmung	55
5.3.3	Agarose-Gelelektrophorese als Qualitätskontrolle	55
5.3.4	Genexpression in der 2D-Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer	56
5.3.5	Genexpression in Abhängigkeit vom Kultursystem (2D/ 3D) im Vergleich zur Sehne	57
5.4	VITALITÄT DER 3D-PLGA-KULTUREN	59
5.5	HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE ERGEBNISSE IN ABHÄNGIGKEIT VOM KULTURSYSTEM (2D/ 3D) IM VERGLEICH ZUR SEHNE	60
5.6	DEZELLULARISIERTE PORCINE SEHNENMATRIX ALS TRÄGERMATRIX	63
5.7	EVALUATION DER SPEZIESUNTERSCHIEDE IN MORPHOLOGIE UND ANATOMIE	64
5.8	TIERVERSUCHSMODELL	65
5.8.1	Versuchsdesign	65
5.8.2	Qualitätsanalyse des zu implantierenden Konstruktes	66
5.8.3	Bewertung des Tierversuches mittels makroskopischem Score	66
5.8.4	Bewertung des Tierversuches mittels der Sehnengewichte	69
5.8.5	Bewertung des Tierversuches mittels histologischem Score	70
5.8.6	Bewertung des Tierversuches mittels Elastischem Faser Score	73
5.9	VARIATION DER PGA-BIOMATERIAL-GEOMETRIE	75
6.	DISKUSSION	77
6.1	ETABLIERUNG EINER GEEIGNETEN 3D-BESIEDELUNGSSTRATEGIE FÜR POLYGLYKOLSÄURE (PGA)	78
6.2	GENEXPRESSION DER SEHNENZELLEN IN DER 2D-KULTUR IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTURDAUER	81
6.3	PRIMER-EFFIZIENZ UND BESTIMMUNG DER RNA-QUALITÄT IN NATIVEN GEWEBEN GEGENÜBER IN VITRO- KULTIVierten ZELLEN	82
6.4.	GENEXPRESSION DER SEHNENZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM KULTURSYSTEM	83
6.5	PROTEINEXPRESSION UND HISTOLOGIE VON SEHNENZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM KULTURSYSTEM	85
6.6	DE- UND REZELLULARISIERUNG EINER PORCINEN SEHNENMATRIX ZUR VERWENDUNG ALS TRÄGERMATERIAL	86
6.7	EINFLUSS EINES SEHNENZELL-PGA KONSTRUKTES AUF DIE SEHNENHEILUNG IM KANINCHENMODELL	88
6.7.1	Bewertung des Tierversuches mittels makroskopischem Score	89
6.7.2	Bewertung des Tierversuches mittels der Sehnengewichte	90
6.7.3	Bewertung des Tierversuches mittels histologischem Score	91
6.7.4	Bewertung des Tierversuches mittels Elastischem Faser Score	93
6.8	VARIATION DER PGA-GEOMETRIE	94
6.9	AUSBLICK	95
7.	ZUSAMMENFASSUNG	97
8.	ABSTRACT	99
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100
10.	LITERATUR	101

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Lokalisation der humanen Hamstring- und Achillessehne.** Die Sehnen des *M. semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. gracilis* (rot markiert), die als „Hamstringssehnen“ zusammengefasst werden, befinden sich seitlich und medial, d.h. innen, am Knie. **2**
- Abbildung 2 Hierarchischer Aufbau der Sehne.** Kollagenfibrillen lagern sich zu Kollagenfasern zusammen. Mehrere Kollagenfasern formen das Primärbündel, mehrere Primärbündel das Sekundärbündel und mehrere Sekundärbündel formen das Tertiärbündel. Alle Bündel/ Faszikel sind jeweils von Endotenon umhüllt. Die äußere Bindegewebsschicht bezeichnet man als Epitenon (Sharma and Maffulli 2005). **4**
- Abbildung 3 Beteiligung des Proteoglykans Decorin an der Fibrillogenese.** Decorin (weiß) bindet die sich formende Kollagenfibrille (verschiedene Graustufen) nahe ihres C-Terms und reguliert die Fusion und den Abstand zwischen den Fibrillen (Reed and Iozzo 2002). **5**
- Abbildung 4 Mechanische Induktion der Kollagen Typ I-Expression.** Mechanische Reize können genauso wie bestimmte Wachstumsfaktoren die Genexpression von Kollagen Typ I induzieren (Kjaer 2004). **6**
- Abbildung 5 Schematische Darstellung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion.** Je nach angesprochenem Integrinkomplex bzw. nach angesprochenen Untereinheiten unterscheidet sich die intrazelluläre Signalkaskade (Berrier and Yamada 2007). **9**
- Abbildung 6 Alters- und geschlechtsspezifische Verteilungskurven der Sehnenverletzung.** Die Häufigkeit der *M. quadriceps femoris* Sehne (links) und der Achillessehne (rechts) ist abhängig von Alter und Geschlecht (Clayton and Court-Brown 2008). **11**
- Abbildung 7 Phasen der Sehnenheilung nach Aspenberg.** a Hämatom nach Sehnenverletzung, b Invasion von Zellen und Proliferation des Paratenons, c Einwachsen von Blutgefäßen und Nervenbahnen, d loser Kollagenkallus, e mechanische Stimulation, f Reifung und Remodelling (Aspenberg 2007). **12**
- Abbildung 8 Schematische Darstellung der Nahttechniken.** Links: Kessler Naht, rechts: Bunnel Naht (Herbort, Haber et al. 2008). **13**
- Abbildung 9 Auszüge aus klinischen Scoresystemen.** A Lysholm-Score zur Beurteilung von Kreuzbandverletzungen und B VISA-Score zur Evaluation der verletzten Achillessehnen. **14**
- Abbildung 10 Biomechanisches Verhalten der zellfreien Trägermaterialien.** 4 kommerzielle Matrixscaffolds (Graft Jacket, TissueMend, Restore und Cuffpatch) im Vergleich zur *M. infraspinatus* Sehne der Schulter des Hundes (canine) (Dourte, Kuntz et al. 2008). **16**
- Abbildung 11 Chemische Strukturformeln der Biomaterialien.** (a) Polymilchsäure (PLA), (b) Polyglykolsäure (PGA) und (c) PLGA. (Liu, Ramanath et al. 2008). **17**
- Abbildung 12 Partieller Defekt in der lapinen *M. supraspinatus* Sehne der Rotatorenmanschette. Versuchsaufbau zur Biomaterial-unterstützten Sehnenheilung.** Der rechteckige Defekt wurde anhand zweier mit autologen Zellen besiedelten Biomaterialien repariert (Chen, Willers et al. 2007). **19**
- Abbildung 13 Darstellung einer 3D-Massenzellkultur.** Zwei Sehnenzell-Pellets an der Medium-Luft-Grenze auf dem Membranfilter, welcher auf einer Stahlbrücke lag. **33**
- Abbildung 14 Darstellung von 3D-Fibrinkulturen.** Vier PGA-Fibrinkulturen in Zellkultur-Petrischalen. **33**
- Abbildung 15 Darstellung der Rollerkulturen.** Auf dem Rollermischer im Brutschrank kultivierte PGA-Rollerkulturen im Bioreaktorröhrchen. **34**
- Abbildung 16 Darstellung einer Spinnerflaschenkultur.** Dynamische Besiedelung des Biomaterials in der Spinnerflasche. **34**
- Abbildung 17 Schematisches Funktionsprinzip der verwendeten PCR-Sonden.** QuantiTectProbe Prinzip der Firma Qiagen (A) und TaqMan Prinzip der Firma Applied Biosystem (B). **40**
- Abbildung 18 Implantiertes PGA-Konstrukt in lapiner, medialer *M. gastrocnemius* Sehne.** Das Sehnenzell-PGA-Konstrukt wurde mit 8 Knopflehten in den Sehnendefekt genäht. **43**
- Abbildung 19 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Sehnenzell-PGA-Konstrukte mit unterschiedlichen Besiedlungsstrategien.** Besiedelung des PGA mit Sehnenzellen durch Adhäsions-, Transwell-, Zentrifugations-, Fibrin-, Roller- und Spinnerflaschenkultur jeweils nach 14 Tagen Kulturdauer, Messbalken 200 µm. **48**

- Abbildung 20 Lichtmikroskopischer Nachweis der Zellabwanderung aus den Konstrukten.** Der mit 2 % Agarose beschichtete Plattenboden der Petrischale (links), auf welchem die PGA-Fibrinkultur (rechts) 28 d kultiviert wurde. Auf der Plattenbeschichtung sind abgewanderte, adhärente, lapine Sehnenzellen erkennbar, Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **49**
- Abbildung 21 Lebend-Tot-Färbung der Sehnenzell-PGA-Konstrukte mit unterschiedlichen Besiedelungsstrategien.** Adhäsionskultur, Transwellkultur, Zentrifugationskultur nach 21 Tagen, Fibrinkultur, Rollerkultur und Spinnerflaschenkultur nach 14 Tagen Kulturdauer, Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **51**
- Abbildung 22 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Sehnenzell-PGA-Konstrukte mit unterschiedlichen Besiedelungsstrategien.** Adhäsionskultur, Zentrifugationskultur, Transwellkultur nach 21 Tagen, Fibrinkultur, Spinnerflaschenkultur und Rollerkultur nach 28 Tagen Kulturdauer, Messbalken 100  $\mu\text{m}$ . **52**
- Abbildung 23 Analyse der RNA-Proben mittels RNA-Chip-Systems.** Gelelektrophorese der isolierten RNA aus zwei humanen Sehnen, 2D-Kultur, 3D Massenzellkultur und 3D PLGA-Kultur nach 14 und 28 Tagen. Erkennbar sind die 18 und 28 S Banden Die grüne Bande stellte die Lauffront des Fluoreszenzmarkers dar. **54**
- Abbildung 24 Darstellung einer Effizienz-Auswertung am Beispiel des Kollagen Typ I-Primers.** Die C(t)-Werte des PCR-Laufes abgetragen gegen die logarithmierte Konzentration der eingesetzten cDNA in ng. **55**
- Abbildung 25 cDNA Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten humaner Proben.** Von links: mit  $\beta 1$ -Integrin ( $\beta 1$ -Int.-), Sox9-, Decorin (Dec)-, COMP-, Kollagen Typ III (Kol III)-, Kollagen Typ I (Kol I)- Primern gewonnene Amplifikate, M = Marker. **56**
- Abbildung 26 Relative Genexpression humaner Sehnenzellen in unterschiedlichen Monolayer Passagen.** Gegen das Referenzgen, HPRT, normalisierte Genexpression für Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Decorin, Scleraxis, Aggrecan und Sox9 von humanen Hamstring-Sehnenzellen der Passagen 3, 6, 7, 8, und 12. Mittelwert und SEM \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ . **57**
- Abbildung 27 Relative Genexpression extrazellulärer Matrixkomponenten und des Transkriptionsfaktors Scleraxis in der Sehne im Vergleich zu 2D- und 3D-Kulturen.** Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Genexpression von (A) Kollagen Typ I, (B) Kollagen Typ III, (C) Decorin, (D) COMP, (E) Scleraxis, (F) Aggrecan ermittelt durch real-time RT PCR, normalisiert auf intaktes Sehnenngewebe, Referenzgen HPRT, \* $p \leq 0,05$ ,  $n \geq 3$ . **58**
- Abbildung 28 Lebend-Tot-Färbung der PLGA-Konstrukte.** PI-FDA-Färbung der humanen PLGA-Fibrinkultur nach 14 und 28 Tagen. Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **60**
- Abbildung 29 HE-Färbung von Sehne und Sehnenzellen in 2D- und 3D-Kultur.** HE-Färbung einer humanen Hamstringsehne, einer 2D-Kultur, einer Massenzellkultur wie einer PLGA-Kultur nach 14 und 28 Tagen an Gefrierschnitten, Messbalken 50  $\mu\text{m}$ . **61**
- Abbildung 30 Immunhistologischer Nachweis der Kollagen Typ I-Proteinexpression.** Kollagen Typ I-Proteinexpression der Sehne und 2D-Kultur im Vergleich zur 3D-Massenzellkultur und 3D-PLGA-Fibrinkultur nach jeweils 14 und 28 Tagen. Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **62**
- Abbildung 31 Histologische Untersuchung der De- und Rezellularisierung im Vergleich zur gesunden Sehne.** HE-Färbung von humaner, intakter Hamstringsehne; porciner, zellfreier, dezellularisierter Achillessehne mit und ohne Ultraschallbehandlung und mit humanen Hamstringsehnenzellen rezellularisierter porciner Achillessehne, Messbalken 100  $\mu\text{m}$ . **63**
- Abbildung 32 Speziesabhängiger Morphologievergleich der Zellen während der Explantationskultur.** Auswandernde Sehnenzellen aus humanen und lapinen Sehnenngewebestücken, Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **65**
- Abbildung 33 Lapine Anatomie des freigelegten Achillessehnenkomplexes.** Laterale und mediale *M. gastrocnemius* Sehne und *M. flexor digitorum superficialis* Sehne beim Kaninchen. **65**
- Abbildung 34 Qualitätsanalyse eines Implantates.** PGA-Vlies am Tag der Implantation (7 Tage *in vitro*-Kultivierung) in Lichtmikroskopie und Lebend-Tot-Färbung, Messbalken je 200  $\mu\text{m}$ . **66**
- Abbildung 35 Lapine Hinterläufe am Tag der Explantation.** Von links nach rechts: Leerdefekt, zellfreies PGA-Fibrin-, und Sehnenzell-PGA-Implantat jeweils (links) operierter Achillessehnenkomplex und (rechts) Kontrolle zum 6-Wochen-Zeitpunkt. **67**

- Abbildung 36 Auswertung des makroskopischen Scores nach 6 und 12 Wochen.** Ergebnisse des makroskopischen Scores nach 6 und 12 Wochen, dargestellt sind Mittelwerte und SEM, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ . **68**
- Abbildung 37 Sehngewichte 6 und 12 Wochen nach der Sehnen-Operation in mg.** Gewichte der operierten, medialen und der benachbarten lateralen *M. gastrocnemius* Sehne sowie der jeweiligen Kontrollsehne, Mittelwert und SEM abgebildet, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ . S.: Sehne. **69**
- Abbildung 38 Histologische Färbungen der operierten Sehnen zum 6-Wochen-Zeitpunkt.** Links: HE-Färbung und rechts: AB-Färbung an 7  $\mu\text{m}$  Paraffinschnitten, erste Reihe: rechte Kontrollsehne, zweite Reihe: Leerdefekt, dritte Reihe: PGA-Fibrin-Konstrukt, vierte Reihe: PGA-Sehnenzell-Implantat, Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **71**
- Abbildung 39 Auswertung des histologischen Scores nach 6 und 12 Wochen.** Ergebnisse des histologischen Scores nach 6 und 12 Wochen, Daten präsentiert als Mittelwert mit SEM, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ . **72**
- Abbildung 40 Histologische Begutachtung der elastischen Fasern im Sehngewebe.** Resorcin-Fuchsin-Färbung an 7  $\mu\text{m}$  Paraffinschnitten von Kontrollsehne, Leerdefekt, zellfreiem PGA und PGA-Sehnenzell-Implantat 6 Wochen nach dem Sehnendefekt, Pfeile weisen auf elastische Fasern, Messbalken 100  $\mu\text{m}$ . **73**
- Abbildung 41 Auswertung des Elastischen Faser Scores nach 6 und 12 Wochen.** Ergebnisse des Elastischen Faser Scores nach 6 und 12 Wochen, Daten präsentiert als Mittelwert mit SEM, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ . **74**
- Abbildung 42 Darstellung des gestickten PGA-Vlieses.** Oben: Makroskopische Photographie von gestickten (links) und ungewobenem PGA (rechts), unten: lichtmikroskopische Aufnahme und Lebend-Tot-Färbung eines 28 Tage alten, mit lapinen Achillessehnenzellen besiedelten gestickten PGA-Fibrin-Konstruktes, Messbalken 200  $\mu\text{m}$ . **75**

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Antikörper für die Immunfluoreszenz	<b>25</b>
<b>Tabelle 2</b> PCR-Primer der Firma Applied Biosystem(A) und Qiagen (Q)	<b>26</b>
<b>Tabelle 3</b> PCR- Pipettierschema pro Well	<b>41</b>
<b>Tabelle 4</b> Klinisch, makroskopischer Score	<b>44</b>
<b>Tabelle 5</b> Histologischer Score	<b>45</b>
<b>Tabelle 6</b> Elastischer Faser Score	<b>46</b>
<b>Tabelle 7</b> Ermittelte PCR-Effizienzen aller verwendeten Primer für humane, kultivierte Sehnenzellen und Sehnen-Gewebeproben	<b>55</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Sehnen

Sehnen sind Teil des straffen Bindegewebes und agieren im Organismus als Verbindungsglied von Knochen und Muskel. Sie übertragen die Kontraktionskraft des Muskels auf den Knochen und ermöglichen somit die Bewegung des Skeletts.

Jeder Muskel besitzt eine proximale (Ursprungssehne) und eine distale Sehne (Insertionssehne). Die Verbindung der Sehne zum Muskel wird als myotendinöser Übergang bezeichnet.

Die Enthesis oder osteotendinöser Übergang beschreibt die Sehnen-Knochen-Verbindung. Man unterscheidet zwischen der Insertion am Periost (Knochenhaut) oder über Sharpeysche Fasern (mineralisierte Kollagenfasern) des Knochens und der apophysären Ansatzzone. Diese ist aus folgenden Zonen aufgebaut: Sehne, nicht mineralisierter Faserknorpel und mineralisierter Faserknorpel sowie Knochen. Dieser zonale Übergang gewährleistet die graduelle Kraftübertragung, fängt entstehende Druckbelastungen auf und verhindert das Ausreißen der Sehne am Knochen (Spalazzi, Doty et al. 2006). Innerhalb dieser Enthesis sowie in Bereichen erhöhter Druckbelastung finden sich Komponenten der extrazellulären Matrix des Knorpels in der Sehne (Yoon and Halper 2005).

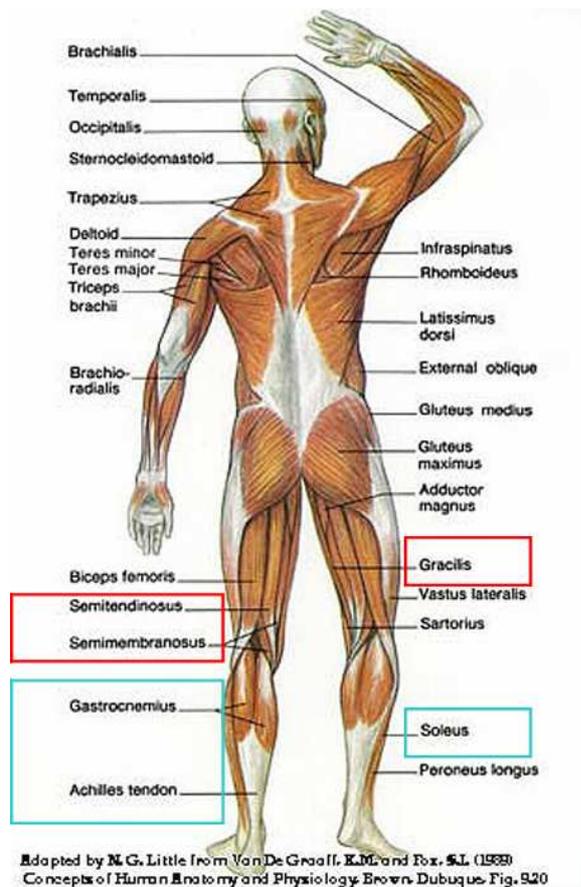
Morphologische Unterschiede der Sehnen ergeben sich durch spezifische Belastungsarten je nach Lage der Sehne und lokalen biomechanischen Erfordernissen. So erscheinen Beugesehnen rund, wohingegen Streckersehnen sich flach ausbreiten (Benjamin, Kaiser et al. 2008). Stark mechanisch belastete Sehnen z.B. der Hand, Sehnen in Regionen erhöhter Spannung oder Sehnen, die in unterschiedliche Richtungen umgelenkt werden, sind zusätzlich von Sehnenscheiden umhüllt. Diese sind zur Minderung der Reibung und Verbesserung des Gleitens mit Synovialflüssigkeit gefüllt. Neben der Sehnenscheide existieren auch andere umgebende Gewebe wie die Bursae und das zweischichtige Paratenon (z.B. in der Achillessehne), welche ebenfalls vor Reibung und Kompressionskräften schützen (Kannus 2000; James, Kesturu et al. 2008).

Die Sehne ist grundsätzlich ein bradytrophes, d.h. stoffwechselarmes Gewebe. Es ist nur spärlich mit Nerven innerviert und besitzt nur eine geringe Kapillarversorgung. Die Ernährung des Sehnengewebes erfolgt meist durch Diffusion der Gewebsflüssigkeiten (Benjamin, Kaiser et al. 2008).

### 1.1.1 Hamstringsehne und Achillessehne

In dieser Doktorarbeit wurde mit Sehnen zweier verschiedener Lokalisationen der Unterextremität gearbeitet: den sogenannten Hamstringsehnen und der Achillessehne. Hamstringsehnen befinden sich seitlich des Kniegelenks (Abb. 1).

Hamstringsehne ist dabei ein klinischer Sammelbegriff für die Sehnen des *M. semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. gracilis*. Sie werden oft in Kreuzbandoperationen als autologe (körpereigene) Transplantate verwendet.



**Abbildung 1 Lokalisation der humanen Hamstring- und Achillessehne.** Die Sehnen des *M. semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. gracilis* (rot markiert), die als „Hamstringssehnen“ zusammengefasst werden, befinden sich seitlich und medial, d.h. innen, am Knie.

Die Achillessehne setzt sich aus *M. gastrocnemius* und *M. soleus* zusammen (blau markiert) und liegt dorsal (d.h. hinten) am Knie <http://people.uleth.ca/~little/PE2110/funcanatomy/2back%20muscle.jpg>.

Die Achillessehne ist die stärkste Sehne des Organismus. Sie besteht aus der lateralen und medialen *M. gastrocnemius* und der *M. soleus* Sehne. Sie verbindet die Wadenmuskulatur mit dem Fersenbein (*Calcaneus*).

### 1.1.2 Blutversorgung

Die Sehne enthält nur wenige Blutgefäße (Lang 1960). Man findet sie hauptsächlich in den Regionen der myo- und osteotendinösen Übergänge. Die Gefäße des Paratenons laufen transversal ins Sehnengewebe und richten sich im Endotenon longitudinal zu den Kollagenfasern aus. Sie penetrieren jedoch nicht die Kollagenfaserbündel (O'Brien 1997).

Die Angiogenese (Gefäßneubildung) wird durch Wachstumsfaktoren kontrolliert.

Der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular endothelial growth factor) beeinflusst u.a. die Migration und Proliferation von Endothelzellen. Er kommt im gesunden Sehnenewebe nur in geringen Mengen vor, wohingegen er beispielsweise in degenerativen Achillessehnen hoch exprimiert vorliegt (Pufe, Petersen et al. 2005). Die Angiogenese wird im Sehnenewebe durch Inhibitoren wie Endostatin überwacht. Endostatin, ein Fragment von Kollagen XVIII, ist in der Lage, die Signaltransduktion des VEGF zu reprimieren. Die Wechselbeziehung von VEGF und Endostatin und damit verbunden die Angiogenese in Sehnen ist abhängig von mechanischen Einflüssen (Pufe, Kurz et al. 2005).

### 1.1.3 Aufbau der Sehne

Die Hauptkomponente der Sehnenmatrix ist das Kollagen Typ I. Es wird in der Sehne im Rahmen eines ständigen Remodellingprozesses (Umbau/ Neu-Strukturierung) u.a. durch mechanische Reize erneuert (Abb. 4). Kollagen Typ I liegt in der Sehne hoch organisiert vor und bildet den Grundbaustein eines komplexen dreidimensionalen Matrix-Netzwerkes.

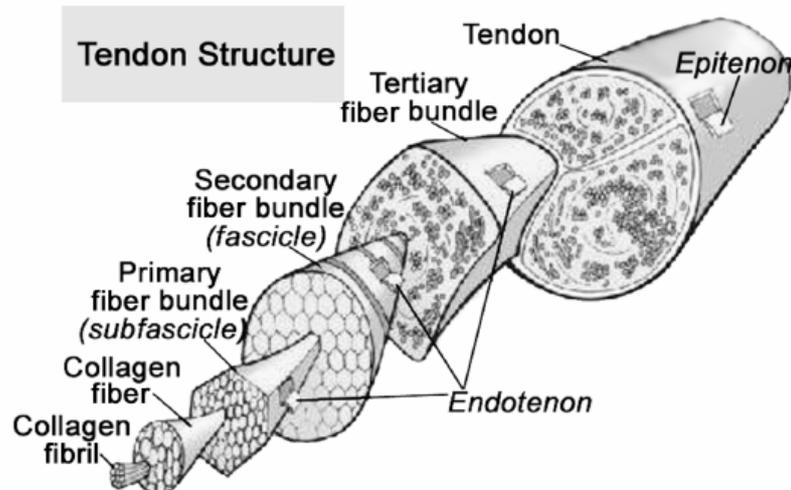
Aus der reinen Aminosäuresequenz des Kollagens entsteht intrazellulär bei der Kollagensynthese eine  $\alpha$  Helix, wobei jede dritte Aminosäure im Kollagen Glycin ist.

Drei  $\alpha$  Helices lagern sich zum Prokollagen zusammen. Nach der Ausschleusung (Exozytose) des Prokollagens aus der Zelle werden die globulären N- und C -terminalen Propeptide extrazellulär prozessiert und das Prokollagen durch Quervernetzungen zu helikalem Tropokollagen umgebaut (Canty and Kadler 2002).

5 Tropokollagen-Stränge bilden die Mikrofibrille, wovon schließlich mehrere eine Kollagenfaser formen. Entscheidend für die Widerstandskraft und Qualität der Kollagenmatrix ist dabei die Quervernetzung der Kollagenfasern durch verschiedenste Enzyme.

Kollagenfasern sind im Lichtmikroskop schon erkennbar, ihr Durchmesser beträgt 1- 50  $\mu\text{m}$  (Kannus 2000). Diese Baueinheit (Kollagenfaser) wird im Folgenden hierarchisch zu immer größeren Einheiten (Faszikeln) zusammengesetzt, welche jeweils von einer Bindegewebsschicht, dem Endotenon, umgeben sind (Abb. 2). Das Endotenon enthält die Blutgefäße und Nerven und ermöglicht außerdem das Gleiten der einzelnen Faszikel gegeneinander.

Die Kollagenfasern werden zu Sekundärbündeln zusammengefasst. Das tertiäre Bündel enthält mehrere Sekundärbündel und jede Einheit wird vom Epitenon umhüllt. Der fibrilläre Aufbau der Sehne ist Grundlage ihrer hohen mechanischen Widerstandskraft.



**Abbildung 2 Hierarchischer Aufbau der Sehne.** Kollagenfibrillen lagern sich zu Kollagenfasern zusammen. Mehrere Kollagenfasern formen das Primärbündel, mehrere Primärbündel das Sekundärbündel und mehrere Sekundärbündel formen das Tertiärbündel. Alle Bündel/ Fascikel sind jeweils von Endotenon umhüllt. Die äußere Bindegewebsschicht bezeichnet man als Epitenon (Sharma and Maffulli 2005).

Die humane Achillessehne beispielsweise trägt während des Laufens 4000- 9000 N (Curwin, Vailas et al. 1988). Nach 2 % Längendehnung verliert die Sehne ihre wellenförmige Anordnung der Kollagenfasern. Die maximale Längendehnung der Sehne beträgt 8 %. Danach kommt es zur irreversiblen Deformation bzw. zur Ruptur der Sehne (Wang 2006). Häufig gehen einem Sehnenriss Mikrotraumen oder degenerative Veränderungen der Sehnenmatrix z.B. in der Quervernetzung der Kollagenfasern voraus (Curwin, Vailas et al. 1988).

#### 1.1.4 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM umgibt die Zellen, wird von ihnen synthetisiert und beinhaltet neben der Grundsubstanz vor allem die Bindegewebsfasern. Die Bindegewebsfasern der Sehne umfassen hauptsächlich kollagene- aber auch elastische Fasern.

Kollagen ist das am meisten vorkommende Protein im Organismus (Liu, Yang et al. 1995; Yang, Crawford et al. 2004). Es ist als Hauptkomponente des Bindegewebes Teil von Sehnen, Knochen, Haut und Knorpel. Neben dem Kollagen Typ I, welches im Allgemeinen zu 65- 80 % am Trockengewicht der Sehne beteiligt ist, sind in der extrazellulären Sehnenmatrix auch Kollagen Typ III, V, XII und XIV enthalten.

Kollagen Typ III ist das zweit häufigste Kollagen der Sehne. Es steht im Gleichgewicht mit Kollagen Typ I und ist für dessen Fibrillogenese (Faseraufbau) verantwortlich.

Während der Heilung verletzter Sehnen findet sich viel Kollagen Typ III im Narbengewebe (Liu, Yang et al. 1995). Die anderen Kollagene bewirken die Quervernetzung der Kollagen Typ I-Fasern.

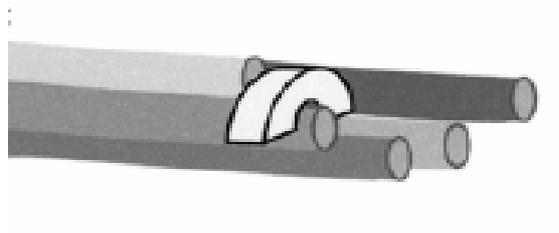
Elastin, mit einem Anteil von 1- 2 % am Trockengewicht, ermöglicht der Sehne erst die Elastizität. Es ist um das Doppelte seiner Länge dehnbar (Scott 2003). Intrazellulär wird Tropelastin synthetisiert, dessen Monomere während der Elastogenese an Mikrofibrillen (Fibrillin I und II) angelagert und quervernetzt werden (Mithieux and Weiss 2005). Eine elastische Faser besteht aus dem Hüllprotein Elastomucin und den Elastin-Mikrofibrillen. Der Anteil der elastischen Fasern steigt in verletzten Sehnen hingegen deutlich an (Jozsa and Balint 1978; Jozsa, Balint et al. 1979).

Die Grundsubstanz enthält die interstitielle Flüssigkeit, Proteoglykane und Glykoproteine.

Proteoglykane sind aus einem Kernprotein und einer oder mehrerer gebundener Glykosaminoglykanketten zusammengesetzt. Sie regulieren die Kollagen-Fibrillogenese, beeinflussen die Aktivität der Wachstumsfaktoren und bestimmen das viskoelastische Verhalten der Sehne. Aufgrund ihrer negativen Ladung und Hydrophilie können sie das 50fache ihres Gewichtes an Wasser binden (Karpakka, Virtanen et al. 1991). Der Gesamtanteil der PGs teilt sich auf 90 % kleine „small leucine-rich proteoglycan“ (SLRP) und 10 % große Proteoglykane auf.

Das wichtigste Proteoglykan in der Sehne ist Decorin. Es gehört zur Gruppe der SLRP-Familie. Das 90- 140 kDA schwere Decorin bindet neben Kollagen Typ I auch Fibronectin und beeinflusst bzw. inhibiert die Fibrillogenese. Es bindet am C-Term der entstehenden Kollagenfibrille und reguliert so Quervernetzungen und den Abstand der Kollagenfibrillen zueinander (Abb. 3) (Reed and Iozzo 2002).

In Decorin-Knockout-Tieren beispielsweise ist das Kollagen-Netzwerk mit veränderter Faserausrichtung und erhöhter Faserlänge nur lose gepackt (Nakamura, Hart et al. 2000).



**Abbildung 3 Beteiligung des Proteoglykans Decorin an der Fibrillogenese.** Decorin (weiß) bindet die sich formende Kollagenfibrille (verschiedene Graustufen) nahe ihres C-Terms und reguliert die Fusion und den Abstand zwischen den Fibrillen (Reed and Iozzo 2002).

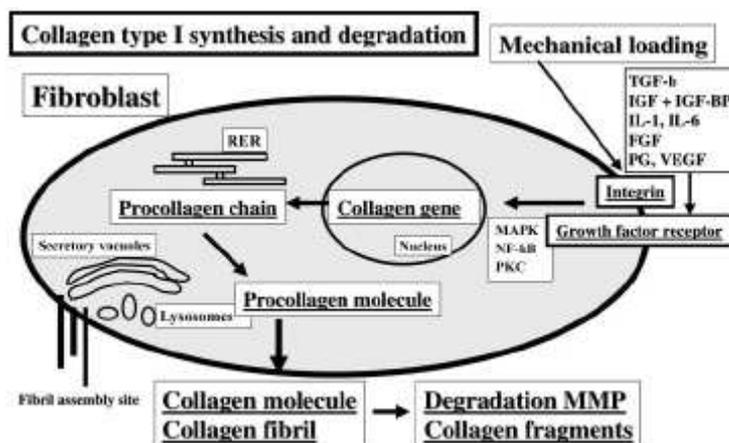
Aggrecan gehört zu den modular aufgebauten, großen Proteoglykanen. Es ist ein Knorpel-spezifisches Matrixprotein, welches in der Sehne nur in geringer Menge vorkommt. Bei Druckbelastung ändert sich die Verteilung der kleinen und großen PGs von 90 % zu 10 % auf je 50 % (Yoon and Halper 2005). In der Sehne dient Aggrecan als „Schmierstoff“ und hilft beim Gleiten der Fibrillen gegeneinander.

Glykosaminoglykane kommen in der Sehne seltener vor als im Knorpel. Es findet sich in der Sehne hauptsächlich Dermatan-sulfat. Chondroitin-sulfat ist nur in Zonen erhöhten Drucks nachweisbar, Heparan-sulfat dagegen nur im myotendinösen Übergang (Jarvinen, Kannus et al. 1991; Jozsa, Kvist et al. 1991; Kannus 2000).

Glykoproteine mit 50- 100 kDa besitzen eine kleinere Zuckerkomponente als die Proteoglykane. Im Sehngewebe konnten z.B. Fibronectin, Tenascin C und Undulin nachgewiesen werden (Jozsa, Kvist et al. 1991; Kannus and Jozsa 1991).

COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) ist als Glykoprotein in der Sehne ebenfalls exprimiert und findet sich insbesondere in beanspruchten Sehnen. Möglicherweise ist COMP an der Widerstandskraft gegenüber Druck beteiligt und bewahrt vor Überlastungen. Das erklärt den Zusammenhang der COMP-Expression in Druck belasteten Arealen und den relativ geringen Verletzungshäufigkeiten bei erhöhtem COMP-Gehalt (Smith and Heinegard 2000).

Die Zusammensetzung der EZM variiert je nach Beanspruchung (Wang 2006). So konnte der Zusammenhang von mechanischer Belastung oder Training und erhöhter Kollagen Typ I-Synthese sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden (Abb. 4) (Curwin, Vailas et al. 1988; Langberg, Rosendal et al. 2001).



**Abbildung 4 Mechanische Induktion der Kollagen Typ I-Expression.** Mechanische Reize können genauso wie bestimmte Wachstumsfaktoren die Genexpression von Kollagen Typ I induzieren (Kjaer 2004).

### 1.1.5 Zelluläre Bestandteile

Das Sehngewebe ist relativ zellarm, es beinhaltet nur 5 % Zellen (Trockenmasse). 95 % der enthaltenen Zellen sind Sehnenzellen. 5 % andere Zellspezies wie Knorpel-, glatte Muskel- oder Endothelzellen können in der Sehne nachgewiesen werden.

Die Aufgabe der Sehnenzellen ist die Synthese der extrazellulären Matrix, wie deren Degradation und Neustrukturierung während des Remodellingprozesses. Sie sind mechanosensitiv und können damit über eine Mechanotransduktion den Umbau der Matrix als Antwort auf veränderte biomechanische Belastung initiieren (Abb. 4) (Chiquet, Renedo et al. 2003; Asundi and Rempel 2008). Ein Synonym für Sehnenzellen ist Tendozyt (Latein: tendo = Sehne). Noch nicht vollständig differenzierte Vorläuferzellen werden als Tendoblasten bezeichnet. Sie erscheinen abgerundeter und besitzen eine höhere Proliferations- und Syntheseleistung. Ihre Größe variiert von 20- 70 µm. Sehnenzellen sind dagegen 80- 300 µm groß (Kannus 2000). Eine typische humane Sehnenzelle hat einen spindelförmigen Zellkörper mit länglichem Nukleus. Sie liegen zwischen den Kollagenfasern der EZM in Reihe hintereinander.

Mithilfe ihrer langen Zellfortsätze halten Sehnenzellen (Ralphs, Benjamin et al. 1998) zu den Nachbarzellen in Reihe Kontakt. Sehnenzellen exprimieren die Gap Junction Proteine, Connexin 32 und 43. Gap Junctions agieren als chemische Synapsen und spielen dabei eine Rolle bei der Mechanotransduktion zwischen den Nachbarzellen. Connexin 32 verbindet Sehnenzellen in Reihe.

Sehnenzellen, die zudem mit ihren flügelartigen Fortsätzen die Kollagenfasern umgreifen, interagieren mit den Sehnenzellen aus den Nachbarreihen über Gap Junctions aus Connexin 43 (Waggett, Benjamin et al. 2006).

Ebenfalls in Sehnenzellen nachweisbar sind Adhärenz-Zellkontakte, die Aktinfilamente (Ralphs, Waggett et al. 2002) benachbarter Sehnenzellen verbinden. Longitudinale Aktin-Stressfasern sind über N-Cadherin und Vinculin innerhalb der Zelle in Zugrichtung miteinander verbunden (Wall and Banes 2005).

### 1.1.6 Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, Adhäsion

Die Interaktion einer Zelle zur Außenwelt und z.B. zu Trägermaterialien wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle gewährleistet. Adhäsion beruht dabei auf der Wechselwirkung von zelleigenen Adhäsionsproteinen mit der EZM. In der Sehne sind die Matrixkomponenten Kollagen Typ I und Fibronectin prominente Adhäsionsstrukturen (Qin, Yang et al. 2005).

Transmembrane Proteine in der Sehnenzellplasmamembran übertragen Reize von außen durch eine intrazelluläre Signaltransduktion über verschiedene Botenmoleküle innerhalb der Zelle. Die spezifische Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des Transmembranproteins stellt dabei den adäquaten Reiz dar.

Derzeit sind drei unterschiedliche Adhäsionsmolekülgruppen beschrieben: die Selektine, die Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie. Jedoch spielen davon nur die Integrine in der Sehne eine Rolle. Sie sind für den Kontakt der Sehnenzelle zur extrazellulären Matrix verantwortlich. Eine Inhibierung der Integrin-Matrix-Interaktion kann in der Induktion des Zelltodes resultieren (AbiEzzi, Gesink et al. 1995).

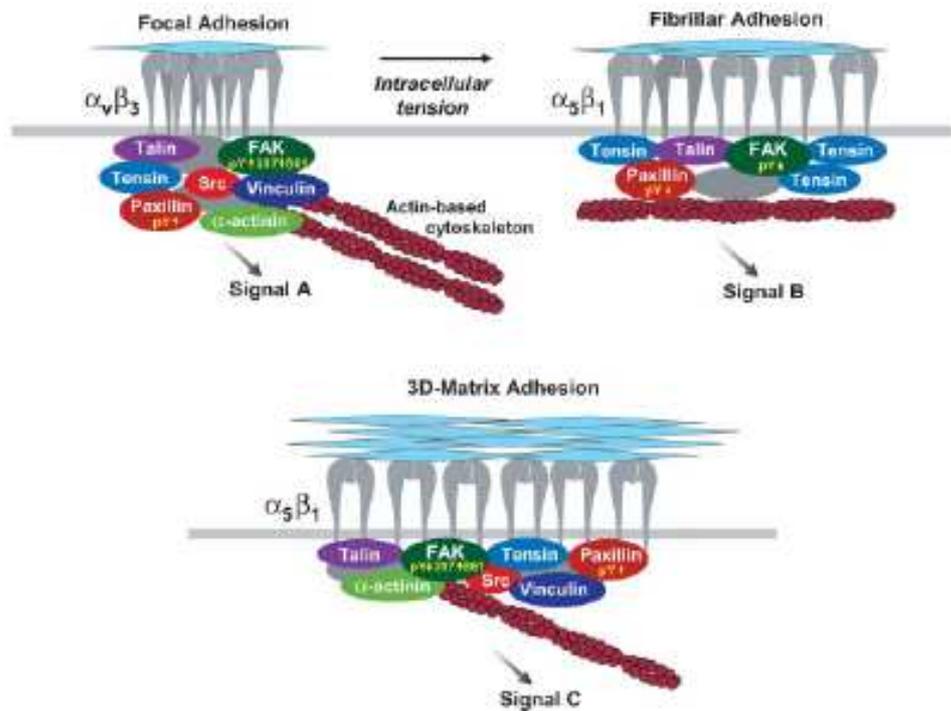
In Fibroblasten konnte beispielsweise nach Hemmung der Integrin-Signaltransduktion mittels Blockierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase eine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden (Hungerford, Compton et al. 1996).

Man unterscheidet derzeit 24 verschiedene Integrine, die sich jeweils aus einer der 18  $\alpha$  und einer der 8  $\beta$  Untereinheiten zusammensetzen. Sie sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären und intrazellulären Domäne.

Die  $\beta 1$ -Untereinheit ist in Sehne/ Sehnenzellen bisher am häufigsten beschrieben (Yao, Bestwick et al. 2006; Sendzik, Shakibaei et al. 2010). Liganden der extrazellulären  $\beta 1$ -Domäne der Integrine sind Kollagen, Laminin und Fibronectin. Die typische Bindungsstelle innerhalb der Liganden ist die RGD Sequenz, eine Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D). Die intrazelluläre Domäne des Integrins interagiert über eine Vielzahl intrazellulärer Botenstoffe mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts.

Man unterscheidet die Integrin-assoziierten Matrixkontakte in fokale Adhäsion, fibrilläre und 3D-Matrix-Adhäsion (Abb. 5). Je nachdem welche Untereinheiten des Integrins bzw. welcher Adhäsionskomplex angesprochen wird, variiert die Abfolge der intrazellulären Signalkaskade und die Zellantwort.

Die Zelle ist somit in der Lage, über Integrine zwischen verschiedenen Zellumgebungen bzw. zweidimensionalen (2D) und dreidimensionalen (3D) Kultivierungen in der Zellkultur sowie Oberflächenstruktur und Chemie von Biomaterialien zu unterscheiden. Vinculin, ein Zytoskelettprotein, agiert dabei als eine wichtige Kontaktstelle der Integrine zum intrazellulären Aktin-Zytoskelett. Über die Adhäsionsqualitäten kann via Integrine im Folgenden letztendlich das Genexpressionsprofil und damit der Differenzierungszustand der Zellen beeinflusst werden (Berrier and Yamada 2007).



**Abbildung 5** Schematische Darstellung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion. Je nach angesprochenem Integrinkomplex bzw. nach angesprochenen Untereinheiten unterscheidet sich die intrazelluläre Signalkaskade (Berrier and Yamada 2007).

### 1.1.7 Sehnenmarker und Differenzierungsgrad

Zur Identifikation eines bestimmten Zelltypes werden Markermoleküle benötigt, anhand derer die Zellart von anderen unterschieden werden kann. So wäre es theoretisch möglich ausdifferenzierte Sehnenzellen von Vorläufer-, Endothel-, oder Knorpelzellen zu separieren.

In der Literatur werden einige Markermoleküle für Sehnenzellen beschrieben. Jedoch sind sie nicht spezifisch und wurden auch in anderen Geweben (wie Knorpel) und Zellen (wie Knorpelzellen) neben der Sehne nachgewiesen.

Scleraxis, ein Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktor, kann in allen Phasen der Sehnenzellentwicklung nachgewiesen werden (Schweitzer, Chyung et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Scleraxis die Kollagen Typ I-Synthese in Sehnenzellen aktiviert (Lejard, Brideau et al. 2007).

Tenomodulin ist ein Transmembranprotein in Sehnen, Bändern und Epimysium der Skelettmuskeln. In geringen Mengen konnte es ebenfalls in anderen Geweben wie Herz, Leber und Augen nachgewiesen werden. Es wird von Scleraxis induziert und zählt zu den Markermolekülen der Sehne (Shukunami, Takimoto et al. 2006; Murchison, Price et al. 2007). Es reguliert die Sehnenzellproliferation, steuert den Zellgehalt der Sehne und beeinflusst den Kollagenfibrillen-Durchmesser (Docheva, Hunziker et al. 2005).

Das Glykoprotein Tenascin C wird in der gesunden Sehne exprimiert, wo es an der Kollagenfibrillen-Organisation beteiligt ist. Tenascin ist aber auch bei verletzten Sehnen im Faserknorpel assoziiert aber auch in der Nähe von Blutgefäßen vorzufinden. Die 300 kD Isoform wirkt vermutlich an der Faserknorpelentstehung bei degenerierten Sehnen mit (Riley, Harrall et al. 1996).

Aufgrund der relativen Zellarmut der Sehne kann bei einer Zellisolierung nur eine begrenzte Anzahl von Zellen gewonnen werden. Die Expansion der Sehnenzellen in der Zellkultur ist für den künstlichen Gewebeersatz unumgänglich. Mit steigender *in vitro*-Kulturdauer kann allerdings ein phänotypischer Drift (Yao, Bestwick et al. 2006) wahrgenommen werden. Dieser ist z.B. erkennbar an einer zunehmend rundlicheren Morphologie der typischerweise lang gestreckten, multipolaren Sehnenzellen. Ebenso ist bekannt, dass Veränderungen in der sehnentypischen Genexpression auftreten (Almarza, Augustine et al. 2008). Das Einbringen von kultivierten Zellen in eine dreidimensionale Umgebung unterstützt möglicherweise die Stabilisierung der sehnenpezifischen Gen- und Proteinexpression. Als Gründe hierfür werden die Interaktionen der Zellen mit der Umgebung, d.h. der EZM und benachbarten Zellen diskutiert (Kleinman, Philp et al. 2003).

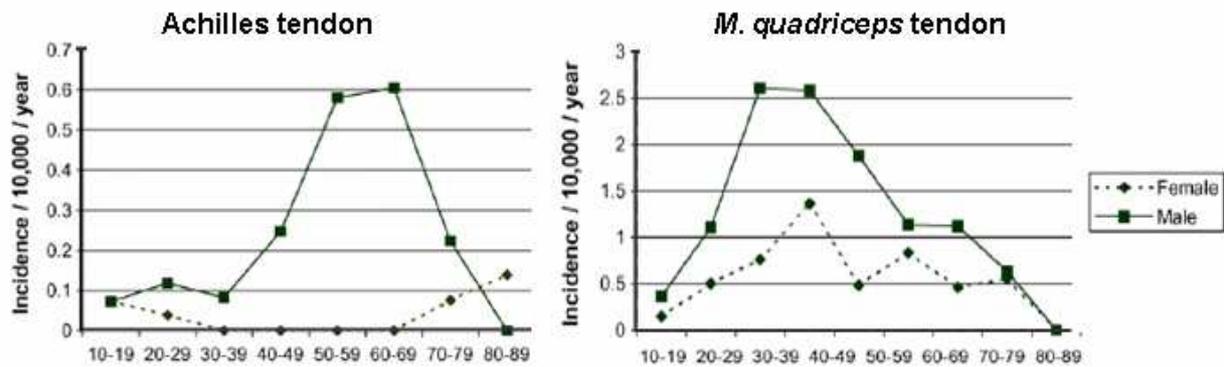
## 1.2 Sehnenverletzung

36.6 % aller Verletzungen des Bewegungsapparates treten am Knie auf, 19.9 % an Knöchel und Fuß und in 7.7 % der Fälle ist die Schulter betroffen.

Häufige Diagnosen bei muskuloskelettalen Verletzungen sind: Zerrungen (32.6 %), Bänder-/Meniskusrisse (21.5 %), Brüche (10.5 %) und Läsionen von Muskel und Sehne (8.8 %) (Steinbruck 1999). Epidemiologische Daten belegen, dass Sehnenverletzungen bei einem mittleren Alter von 33 Jahren bei Männern und 43 Jahren bei Frauen auftreten (Clayton and Court-Brown 2008).

Gerade Achillessehne, Kreuzband und Rotatorenmanschette der Schulter sind häufig betroffene Verletzungsareale (Rees, Wilson et al. 2006). Man unterscheidet in spontane Rupturen und Überlastungsverletzungen (September, Schwellnus et al. 2007).

Trägt man die Häufigkeit der Verletzung gegen das Alter der Patienten ab, so ergibt sich für jede Sehne eine andere Darstellung z.B. für die Achillessehne und die *M. quadriceps* Sehne (Sehne des Oberschenkelstreckers) (Abb. 6).



**Abbildung 6 Alters- und geschlechtsspezifische Verteilungskurven der Sehnenverletzung.** Die Häufigkeit der *M. quadriceps femoris* Sehne (links) und der Achillessehne (rechts) ist abhängig von Alter und Geschlecht (Clayton and Court-Brown 2008).

Daran ist zu erkennen, dass Verletzungen der Achillessehne zumeist bei jungen, sportlichen Patienten vorkommen. Verletzungen der Quadricepssehne des Kniegelenkes treten im Gegensatz dazu häufig zwischen dem 40.- 80. Lebensjahr auf (Clayton and Court-Brown 2008) und sind wahrscheinlich auf Alterung des Gewebes als intrinsischer Faktor zurückzuführen.

Während des Alterungsprozesses sind in der Sehne eine Verminderung der Zellzahl, der elastischen Fasern und der Durchblutung schon ab dem 30. Lebensjahr zu beobachten (Amlang and Zwipp 2006).

### 1.3 Sehnenheilung

Sehnenheilung kann prinzipiell von zwei verschiedenen Lokalisationen ausgehen. Die Heilung wird als intrinsisch bezeichnet, wenn sie durch Proliferation und EZM-Sekretion der Sehnenzellen vor Ort geschieht. Extrinsische Heilung beruht hingegen auf der Migration von Zellen aus umgebenden Geweben (Sharma and Maffulli 2005).

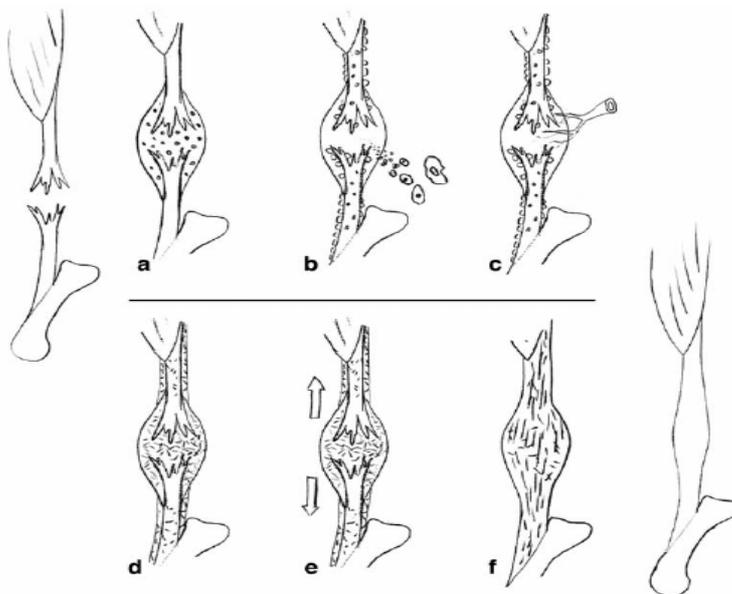
Bei extrinsischer Heilung kommt es häufig zur Formation von Narbengewebe und Adhäsionen mit umgebenden Geweben, die das Gleiten behindern (Koob and Summers 2002).

Unabhängig vom beteiligten Zelltyp können zeitliche Phasen während des Heilungsprozesses einer verletzten Sehne unterschieden werden (Abb. 7). Die erste, hämorrhagische Phase beginnt durch Verletzung kleiner Kapillaren bzw. Einblutungen im Gewebe unmittelbar nach

dem Sehnen trauma. Die im Blut enthaltenen Zellen veranlassen vor Ort die Rekrutierung anderer Zelltypen und den Beginn der zweiten Phase.

Die entzündliche Phase spielt sich zwischen 24 bis 48 Stunden nach der Verletzung ab. Hier infiltrieren Makrophagen und Leukozyten das Gewebe. Wachstumsfaktoren und Zytokine werden freigesetzt.

Danach folgt die Proliferationsphase von Fibroblasten oder Sehnenzellen vor Ort, welche schließlich in der Remodellingphase die vorhandene EZM abbauen, neu synthetisieren, wieder aufbauen und strukturieren. Diese letzte Phase umfasst Monate bis zu einem Jahr (Aspenberg 2007; Woo 2009). Das Hauptproblem der natürlichen Sehnenheilung sind die lange Dauer sowie die Narbenbildung mit einhergehender Funktionsminderung (Sharma and Maffulli 2005).



**Abbildung 7 Phasen der Sehnenheilung nach Aspenberg.** a Hämatom nach Sehnenverletzung, b Invasion von Zellen und Proliferation des Paratenons, c Einwachsen von Blutgefäßen und Nervenbahnen, d loser Kollagenkallus, e mechanische Stimulation, f Reifung und Remodelling (Aspenberg 2007).

Ebenfalls kann eine Instabilität oder Steifigkeit (vor allem Kreuzband) im verletzten Sehnenareal auftreten. Die Notwendigkeit der unterstützten Sehnenheilung gegenüber der körpereigenen Heilung wird ersichtlich, wenn man die neu-synthetisierte Sehnenmatrix betrachtet. Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen verändert sich im Laufe der Zeit und unter normaler biomechanischer Belastung. Das neue Gewebe wird jedoch wahrscheinlich in seiner Biomechanik dem natürlichen, gesunden Gewebe nicht entsprechen (Hildebrand, Jia et al. 2002).

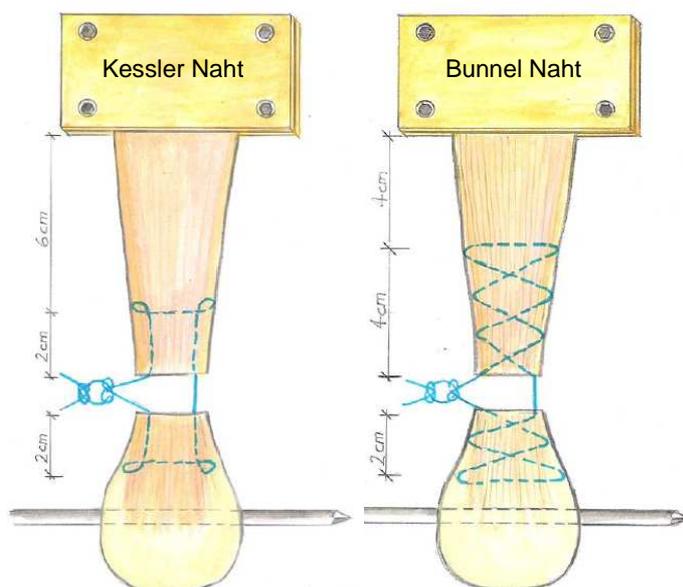
## 1.4 Therapien und Probleme

Zu den herkömmlichen (konservativen) Behandlungen bei Sehnenverletzung zählen nach wie vor die Ruhigstellung und Fixierung. Gerissene Sehnen sind jedoch ohne Operation nur behandelbar, wenn die Enden der Sehne nah beieinander liegen.

Operative (chirurgische) Therapien teilt man in klassische Sehnennaht unter Anwendung spezieller Nahttechniken und Sehnen transplantation ein. Geeignete Nahttechniken mit nicht resorbierbarem Fadenmaterial nach Kirschmayer, Kessler, Becker, Bunnell (Abb. 8) finden genauso wie Fibrinverklebung Anwendung.

Als Sehnen transplantate verwendet man hauptsächlich Autotransplantate, d.h. Gewebe aus dem eigenen Körper. Verbunden hiermit ist jedoch eine Morbidität am Entnahmeort.

Da operative Behandlungen bei Sehnenverletzungen bzw. die Transplantation von autologen Sehnen ebenso wie die natürliche Sehnenheilung mit der Entstehung von Narbengewebe und Einschränkungen der Leistungsfähigkeit verbunden sind, werden neue Ansätze zur verbesserten Sehnenheilung benötigt.



**Abbildung 8 Schematische Darstellung der Nahttechniken.** Links: Kessler Naht, rechts: Bunnell Naht (Herbort, Haber et al. 2008).

Das Risiko einer Ruptur nach einer Sehnenoperation ist geringer als bei nicht-operativen Behandlungen jedoch kommen häufig Komplikationen wie Infektionen oder Adhäsionen in der postoperativen Phase hinzu (Khan and Carey Smith 2008). In einer Studie von Cetti et al. ergaben sich nach Operation von rupturierten Achillessehnen außerdem in der Mehrheit der untersuchten Patienten Kollagendegenerationen, akute Entzündungen und Nekrosen (Cetti, Junge et al. 2003). Nicht zu vergessen sind die entstehenden Morbiditäten am Entnahmeort der Transplantate.



Histologische Bewertungssysteme werden in der Humanmedizin nicht angewandt. Zur Verbesserung der Gewebeheilung werden einige Technologien des Tissue Engineering bereits verwendet

## **1.5 Sehnen Tissue Engineering**

### 1.5.1 Biomaterialien

Viel versprechend ist der Einsatz von Biomaterialien in verletzten Sehnen. Das Biomaterial übernimmt zeitweilig die Funktion der extrazellulären Matrix. Es bietet den Zellen am Verletzungsort ein Gerüst zur Adhäsion und Matrixproduktion sowie stimulierende Zell- Zell- als auch Zell- Matrixkontakte. An ein Biomaterial werden zudem weitere Anforderungen gestellt. Es soll biokompatibel sein, d.h. keine Entzündungsantwort auslösen und dieselben mechanischen Kennwerte aufweisen wie das ursprüngliche Gewebe. Es muss eine interkonnektierende Porosität aufweisen, um ein vollständiges Eindringen der Zellen und ihre dreidimensionalen Interaktionen zu gewährleisten. Gleichfalls sollte es in geeigneter Kinetik biodegradierbar sein und die Degradation erst nach Aufbau der neuen Gewebematrix beginnen. Es hat idealerweise eine optimale Oberflächenstruktur zur Unterstützung der Zelladhärenz und ist reproduzierbar herzustellen.

Man unterteilt generell in natürliche und synthetische Materialien. Natürliche Materialien besitzen vergleichbare biomechanische Kennwerte wie das zu ersetzende Gewebe und ähnliche physiologische Qualitäten. Im Gegensatz dazu können synthetische Materialien reproduzierbar und in größerer Zahl hergestellt werden. Sie sind außerdem nicht infektiös (Rosso, Marino et al. 2005).

Beispiele für synthetische Trägermaterialien sind Polyglykolsäure (PGA) und sein Co-Polymer Polylaktid-Co-Glykolidsäure (PLGA). Zu den natürlichen Materialien zählt z.B. eine dezellularisierte Sehnenmatrix.

In künstlichen Sehnendefekten wurden in wissenschaftlichen Studien bisher verschiedenste Biomaterialien eingesetzt, um die Heilung und Synthese einer geordneten EZM zu beschleunigen.

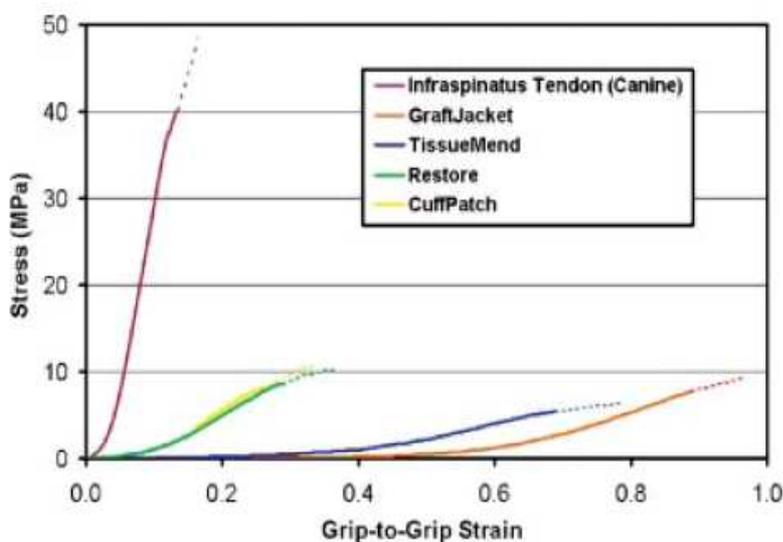
Als natürliche Trägersubstanzen wurden für die Sehne Chitosan (Bagnaninchi, Yang et al. 2007), ein Polymer aus Chitin, Seide (Altman, Horan et al. 2002), Kollagen und zellfreie (dezellularisierte) Sehnen/ Membranen beschrieben (Ide, Kikukawa et al. 2009).

Das Entfernen des immunogenen Materials (=Zellen) macht dezellularisierte Sehnen oder die Dünndarm-Submukosa als Biomaterial erst attraktiv.

Sie haben den Vorteil, dass sie extrazelluläre Matrixkomponenten enthalten, die bei verschiedenen Spezies konserviert (unverändert) sind und die Adhäsion der Zellen, die Migration und Proliferation unterstützen (Ingram, Korossis et al. 2007). Jedoch ist die Prozedur zum Entfernen aller ortsständigen Zellen über chemisch-physikalische Methoden teilweise mit dem Verlust der geordneten Matrixstruktur und Gefahr von Rückständen der Dezellularisierungsagentien verbunden. Außerdem besteht das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern.

### 1.5.2 Zellfreie Trägermaterialien

Kommerziell erhältlich sind bisher nur zellfreie Trägermaterialien. Beispiele sind „GraftJacket“ (Wright Medical Technology), eine zellfreie Matrix aus humaner Dermis oder „TissueMend“ (TEI Biosciences, Stryker Orthopaedics), welches aus fötaler Rinderhaut produziert wird. „Restore“, hergestellt von Depuy Orthopaedics, und das „CuffPatch“ der Firma Organogenesis basieren auf einer zellfreien porcinen Dünndarm-Submukosa (Longo, Lamberti et al. 2010). Abbildung 10 deutet an, dass die derzeitigen Transplantate jedoch nicht annähernd den biomechanischen Anforderungen einer intakten Sehne entsprechen (Dourte, Kuntz et al. 2008).



**Abbildung 10**  
**Biomechanisches Verhalten**  
**der zellfreien**  
**Trägermaterialien.** 4  
 kommerzielle  
 Matrixscaffolds (Graft  
 Jacket, TissueMend, Restore  
 und Cuffpatch) im Vergleich  
 zur *M. infraspinatus* Sehne  
 der Schulter des Hundes  
 (canine) (Dourte, Kuntz et al.  
 2008).

### 1.5.3 Synthetische Biomaterialien in der Sehnenheilung

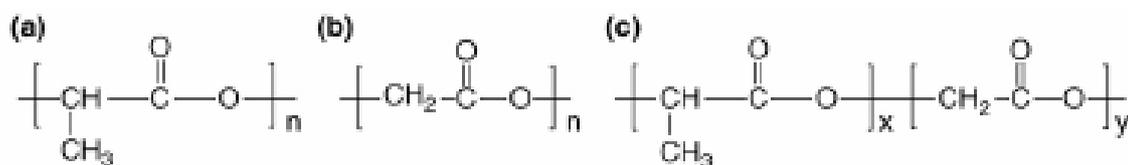
Die Mehrheit der synthetischen Biomaterialien für das Sehnen Tissue Engineering sind degradierbare Polyester (Liu, Ramanath et al. 2008).

Das Spektrum reicht von PGA über PLA und deren Co-Polymer PLGA. Ihre Degradationsprodukte sind die natürlichen Metabolite Milchsäure und Glykolsäure und folglich in geringen Konzentrationen nicht toxisch.

PGA wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Es ist ein resorbierbares Trägermaterial mit einem Molekulargewicht von ca. 50.000 kDA. Die Resorption *in vivo* ist für das ungewobene PGA der Firma Alpha Research mit 40 und 60 Tagen angegeben. Die mechanische Festigkeit beträgt in Folge von Hydrolyse nach 7 Tagen noch 50 % (Alpha Research).

PLGA fand in dieser Arbeit ebenfalls Anwendung. Die Monomere sind über Esterbindungen miteinander verknüpft (Abb. 11). Es weist eine höhere Degradationszeit als PGA auf.

PLGA findet aufgrund seiner Charakteristika neben dem Einsatz im Tissue Engineering auch z.B. Anwendung bei der parentalen Darreichung von Medikamenten (Luck, Pistel et al. 1998).



**Abbildung 11 Chemische Strukturformeln der Biomaterialien.** (a) Polymilchsäure (PLA), (b) Polyglykolsäure (PGA) und (c) PLGA. (Liu, Ramanath et al. 2008).

Die Biodegradierbarkeit und Eignung der Polyester für orthopädische Zwecke wurde belegt (Athanasίου, Niederauer et al. 1996).

Entscheidend für die Tauglichkeit des Biomaterials ist die biomechanische Widerstandskraft. Sie lässt sich bei synthetischen Materialien in erster Linie durch die Geometrie, welche über verschiedenste Verarbeitung des Polymerfadens erreicht werden kann, bestimmen. Bezogen auf Zellbesiedelung, Matrixexpression aber auch mechanische Kennwerte erweisen sich Konstrukte mit linear ausgerichteter Geometrie der Biomaterial-Fasern entsprechend den Kollagenfasern *in vivo* im Vergleich zu ungeordneten Fasern als besser geeignet (Moffat, Kwei et al. 2009; Inui, Kokubu et al. 2010).

Eine weitere mögliche Optimierung ist das Aufbringen von Zellen auf die Konstrukten, die selbstständig extrazelluläre Matrixbestandteile produzieren. Jedoch müssen dabei Faktoren wie Besiedlungsstrategie und -dichte, Zellzahl Adhäsion, Vitalität und EZM-Produktion berücksichtigt werden. Vorteil von eingebrachten Zellen ist deren gewebetypische Matrixsynthese und Strukturierung der EZM.

Nachteilig bei der Verwendung allogener Zellen ist die mögliche körpereigene Abstoßungsreaktion nach Implantation.

Denkbar zur Unterstützung der Matrixsynthese vor Ort sind mesenchymale Stammzellen, Haut-Fibroblasten und Sehnenzellen (Liu, Chen et al. 2006). Obwohl Stammzellen erfolgreich *in vivo* eingesetzt werden konnten, bleibt jedoch die Frage nach einer sicheren und stabilen Differenzierung ungeklärt (Juncosa-Melvin, Boivin et al. 2006).

#### 1.5.4 Fibrin im Tissue Engineering

Fibrin ist ein natürlicher Bestandteil des Blutplasmas. Die lösliche Vorstufe Fibrinogen reagiert während der Blutgerinnung mit der Endopeptidase, Thrombin, zu einem stabilen, unlöslichen Fibrinpolymer, welches in der Lage ist, eine Wunde zu verschließen.

In der Humanmedizin werden humanes Fibrinogen und Thrombin verwendet, um mögliche Antikörperreaktionen gegen Fremdproteine zu vermeiden. Fibrinkleber dient als hämostatisches Mittel und zur Unterstützung der Wundheilung (Janmey, Winer et al. 2009).

Es ist beschrieben, dass Fibrin *in vivo* als auch *in vitro* nach wenigen Tagen schrumpft und nach 4 Wochen degradiert ist. Der Vorteil des Fibrin-Hydrogels liegt in der guten Zellverteilung im Gel und in der relativ einfachen Handhabung. Kombiniert mit einem zugfesten Biomaterial wurde das Fibrinnetz bereits im Sehnen Tissue Engineering angewandt (Sahoo, Ouyang et al. 2006)

### **1.6 Sehnendefektmodelle**

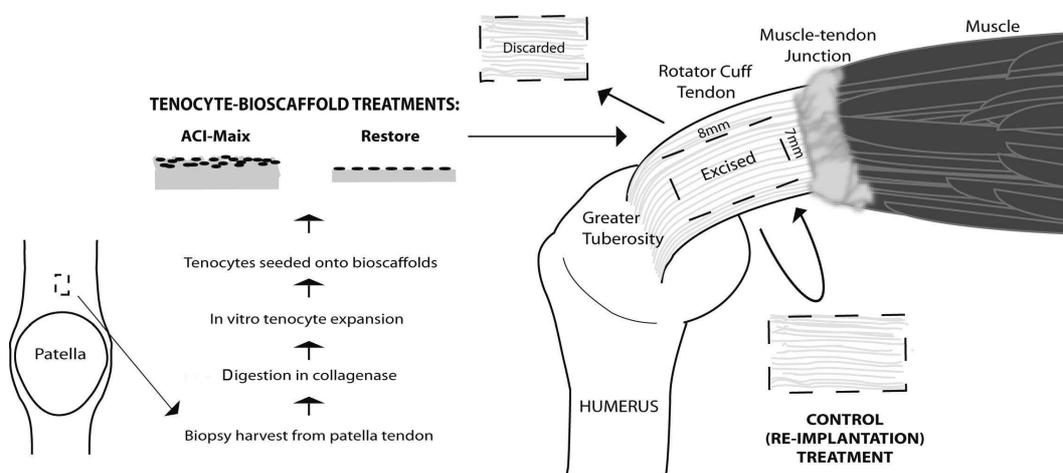
Die überwiegende Mehrzahl der experimentellen Daten zur Sehnenheilung stammt aus Tierversuchen. Im Vergleich zu klinischen Studien können im Tierversuch statistisch aussagekräftige Daten durch höhere Fallzahlen und weniger Variabilität zwischen den Individuen erhoben werden (Lin, Lee et al. 1999). Kaninchen werden aufgrund ihrer Größe im Vergleich zu Mäusen und Ratten häufig als Versuchstiere für chirurgische Eingriffe verwendet. Man kann generell zwei Versuchsansätze unterscheiden. Bei der Transsektion der Sehne wird diese komplett durchtrennt, wohingegen im partiellen Defekt die umgebenden Fasern intakt verbleiben. Zunächst sollen Beispiele für Transsektionen folgen.

Kryger und Mitarbeiter veröffentlichten 2007 eine Studie in der ein 1,5 cm langer Defekt der *M. flexor profundus* Sehne (Sehne des Beugemuskels des Unterarmes) mit rezellularisierter *M. flexor digitorum profundus* Sehne repariert wurde.

Es wurde zusätzlich beschrieben, dass alle eingesetzten Zelltypen adäquat waren (Stammzellen aus dem Fett und Knochenmark, Sehnenzellen und Zellen der Sehnenscheide) (Kryger, Chong et al. 2007).

Die Arbeitsgruppe um Philajamäki beschrieb im Jahr 2008 einen kompletten Achillessehnendefekt (Pihlajamäki, Tynnininen et al. 2008). Nach Freilegen des Achillessehnenkomplexes wurden 2 der 3 Sehnen 22 mm proximal zum Calcaneus geschnitten. Nach Vernähen der Sehnenstümpfe via Kessler Naht, wurden sie mit einer PGA-Membran umhüllt. Anhand dieser Studie wurde belegt, dass Immobilisierung *post OP* keinen Einfluss auf die Biodegradation des Biomaterials (PGA) oder auf die Narbenbildung besitzt. Partielle Defekte wurden u.a. von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet, um unterschiedliche Aspekte der Sehnenheilung zu untersuchen.

Vergleichend analysierten Chen und Mitarbeiter kommerziell erhältliche Transplantate aus porciner Dünndarm-Submukosa („Restore“) mit einem Kollagen-Biomaterial (Chen, Willers et al. 2007). Autologe Patellar-Sehnenzellen wurden dafür auf die Implantate gebracht und in einen rechteckigen, 7 x 8 mm<sup>2</sup>, Defekt der Rotatorenmanschette der Schulter des Kaninchens eingebracht (Abb. 12). Die Implantation der autologen Zellen führte zur verbesserten Sehnenheilung verglichen mit den zellfreien Kontrollen.



**Abbildung 12** Partieller Defekt in der lapinen *M. supraspinatus* Sehne der Rotatorenmanschette.

Versuchsaufbau zur Biomaterial-unterstützten Sehnenheilung. Der rechteckige Defekt wurde anhand zweier mit autologen Zellen besiedelten Biomaterialien repariert (Chen, Willers et al. 2007).

Für die Achillessehne sind außerdem folgende Modelle beschrieben worden:

Ein mit Knochenmark-Stammzellen (BMSC) besiedeltes Fibrin-PLGA-Konstrukt wurde in einen 1 cm langen Achillessehnendefekt der *M. gastrocnemius* Sehne eingenäht (Ouyang, Goh et al. 2003).

Besiedelte Scaffolds wiesen bessere Morphologie und Steifigkeit der heilenden Sehne sowie ein geringeres Maß an infiltrierten Entzündungszellen gegenüber den zellfreien PLGA-Konstrukten auf.

Young und Mitarbeiter setzten einen 1 cm langen Defekt in die *M. gastrocnemius* Sehne und vernähten die Kollagen-Implantate über eine modifizierte Kessler Naht. Als Kontrolle diente der Defekt mit der Naht allein. Herausgefunden werden konnte eine größere biomechanische Widerstandskraft der mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Konstrukte gegenüber den genähten Defekten (Young, Butler et al. 1998).

Liu et al. untersuchten den Effekt des Zelltyps (Sehnen- und Hautzellen) auf die Sehndefektheilung an 45 Schweinen. Ungewobenes PGA Trägermaterial, welches mit Haut- oder Sehnen-Fibroblasten besiedelt wurde, wurde mit einer Dünndarm-Submukosa umhüllt. Nach Freilegen der *M. flexor digital superficialis* Sehne wurde ein 2 cm großes Sehnenstück präpariert, das Zell-Konstrukt implantiert und durch eine Kessler Naht fixiert. Die Konstrukte wurden 7 Tage *in vitro* vor der Implantation in die Sehne kultiviert. Nach 6, 14 und 26 Wochen wurde festgestellt, dass die Zell-Konstrukte histologisch und mechanisch den zellfreien Kontrollen überlegen waren (Liu, Chen et al. 2006).

Alle Arbeiten zeigen die Vorteile von implantierten Zellen auf den Trägermaterialien im Vergleich zu Biomaterialien allein. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ebenfalls ein partieller Sehndefekt im Kaninchen untersucht werden. Der kreisrunde Defekt maximaler Größe wird in der medialen *M. gastrocnemius* Sehne des Achillessehnenkomplexes reproduzierbar 2 cm über dem Fersenbein durch PGA repariert. Der Effekt von im Vlies implantierten ausdifferenzierten Sehnenzellen auf die Heilung vor Ort sollte im Weiteren untersucht werden.

## 2. Zielstellung

Funktionseinschränkungen nach Sehnenverletzungen bestehen selbst nach einem medizinischen Eingriff mehrere Monate. Die Heilung geht zudem einher mit der Formation von Narbengewebe, welches mit teils stark reduzierter biomechanischer Stabilität assoziiert sein kann.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, die Heilung von Sehnendefekten durch Implantation dreidimensionaler (3D)-Biomaterial-Konstrukte zu unterstützen.

Es sollte nach Isolierung und Expansion der Sehnenzellen in der zweidimensionalen (2D) Kultur die 3D-Anzucht auf dem Biomaterial erfolgen. Als synthetische Biomaterialien fanden Polyglykolsäure (PGA) und das Co-Polymer PLGA Anwendung. Eine natürliche Sehnenmatrix (porcine Achillessehne) sollte ebenfalls in Grundzügen evaluiert und mit den synthetischen Trägermaterialien verglichen werden.

Ein Arbeitsansatz war, herauszufinden, ob Sehnenzellen in der 2D-Kultur dedifferenzieren. Des Weiteren ergab sich die Frage, ob sie, eingebracht in eine dreidimensionale Umgebung, einen stabileren Differenzierungsstatus im Vergleich zur 2D-Kultur aufweisen und sich der Sehne annähern. Die Sehnenzell-Konstrukte sollten im Weiteren in Histologie, Protein- und Genexpression mit der intakten Sehne sowie mit der 2D-Expansionskultur verglichen werden. Augenmerk wurde in den Analysen auf charakteristische EZM-Komponenten von Sehne und Knorpel ebenso wie auf Sehnen- und Knorpel-typische Transkriptionsfaktoren gelegt.

Nach der *in vitro*-Optimierung sollte das Biomaterial-Sehnenzell-Konstrukt in einem Tiermodell untersucht werden. Mithilfe eines partiellen Achillessehnen-Defektes im Kaninchen sollten Rückschlüsse auf die Eignung des besiedelten Biomaterials gezogen werden. Zur Beurteilung der Sehnendefektheilung nach 6 und 12 Wochen sollte ein systematisches Scoresystem, das klinische und histologische Kriterien nutzt, selbst erarbeitet werden. Kontrollgruppen sollten zum einen Aufschluss über die körpereigene Heilungskapazität geben sowie zum anderen das Potential allogener Sehnenzellen aufdecken, an der Formation eines neuen Gewebes mitzuwirken, welches das Ursprungsgewebe imitiert.

Die Abhängigkeit des Expressionsprofils der Sehnenzellen vom Kultursystem sollte in dieser Arbeit kritisch betrachtet werden. Dieses Wissen zur *in vitro*-Biologie von Sehnenzellen könnte eine Basis für weitere Untersuchungen im Sehnen Tissue Engineering darstellen.

Die Arbeit sollte Aufschluss über die Eignung von PGA zur Defektheilung geben und übertragbare Analysetools für die Bewertung der Sehnenheilung *in vivo* bereitstellen.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Wichtige Laborgeräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer Comphor Mini	BioRad Laboratories, Inc., USA,
Bioanalyser	Agilent Technologies, Inc., USA
Brutschrank Hera cell 150	Thermo Electron Corporation, DE
cDNA-Zykler Master Cycler	Eppendorf, DE
Feinwaage APX 60	Denver Instruments, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, DE
Invertmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, DE
GelDoc 2000	BioRad Laboratories, Inc., USA
Kamera Canon Eos Digital	Canon, DE
Kamera Olympus XC30	Olympus, JP
Kryostat Microm HM 550	Fisher Scientific, DE
Mikroskop Axioskop 25	Carl Zeiss, DE
Mikrotiterplattenphotometer GENius	Tecan Trading AG, CHE
Nano Drop 1000	Peqlab, DE
Paraffinschneidegerät HM 350	Microm, DE
PCR-Zykler Opticon	BioRad Laboratories, Inc. USA
Roller Mixer Stuart SRT9D	Bibby Scientific Limited, UK
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific, DE
Ultra Turrax T25	IkaWerke, DE
Unglasierter Mörser und Pistel	VWR International, DE
UV-Filtersatz 09	Carl Zeiss, DE
UV-Filtersystem XF 03	Omega Optical, USA
UV-Filtersystem XF 103-2	Omega Optical, USA
Wasserbad (Paraffin) HIR Z 097	Kunz Instruments, DK

##### 3.1.2 Verbrauchsmittel

Neben üblichen Laborutensilien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Glaswaren, etc:

6, 12, 96 Well Platten	Nunc, Sarstedt (Zellkultur), DE
Alginat	Sigma-Aldrich, USA

Biopsie Stanze, 4 mm, 3 mm	Pfm, DE
Filterröhrchen, Bioreaktorröhrchen (gasdurchlässig)	TPP, CHE
Deckgläschen	Menzel Gläser, DE
Einfriergefäß Kryocontainer	Nalgene, USA
Heparinspritze, 1 ml	Braun, DE
Kanüle, Microlane 23G, 25G	BD Bioscience, USA
Kryomold Intermediate	Sakura, USA
Kryoröhrchen	VWR, CA
Membranfilter, 0,2 µm	Satorius, DE
Objektträger (super frost)	R.Langensbrinck, DE
PGA, Soft PGA Felt TE (1,1 mm dick)	Alpha Research, DE
PLGA	Ethicon, DE
Skalpell	Feather, JP
Spinnerflaschen	Bellco, USA
Steriflip, 100 µm	Sarstedt, DE
Tissue Tek	Sakura, USA
Transwell, 0,4 µm	Corning Inc., USA
Ultra-Low Attachment Platten	VWR, USA
Zellkulturflaschen, T25, T75, T175	Sarstedt, DE
Zellschaber	TPP, CHE

### 3.1.3 Chemikalien

4, 6 -Diamidino- 2- phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, DE
Aceton ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Agarose, high resolution	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Alcianblau 8GS	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Brom-Chloro-Propanol	Sigma-Aldrich, USA
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Trichlormethan/ Chloroform	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
DMEM:Ham`s F12 1:1	Biochrom AG, DE
Entellan	Merck KGaA, DE
Eosin G	Carl Roth GmbH und Co KG, DE

---

Eserserum	Chemicon, USA
essentielle Aminosäuren, 50 x MEM-AS	Biochrom AG, DE
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, DE
Ethanol	Merck KGaA, DE
Ethidiumbromidlösung, 1 %	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Fluoresceindiacetat (FDA)	Fluka, Steinheim, DE
Fluoromount	Southern Biotech, USA
Formalin, 35 %	Hedinger GmbH & Co. KG, DE
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, DE
GeneRuler DNA ladder, ultra low range	Fermentas International Inc., CA
Gentamycin	Biochrom AG, DE
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Guanidin HCL	Roth, Karlsruhe, D
HANKs Salt Solution	Biochrom AG, DE
Hämatoxylin nach Harris	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Kernechtrot	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Kollagenase NB5	Serva Elektrophoresis, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
L-Glukose, 10 %	Merck KGaA, DE
L-Glutamin, 200 mM lyophilisiert für 5 ml	Biochrom AG, DE
Loading Dye Solution, 6x Konzentrat (Ladepuffer für DNA-Gele)	Fermentas International Inc., CA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Natriumazid, NaN <sub>3</sub>	Merck KGaA, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 %	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Paraffin	Merck KGaA, DE
Paraformaldehyd, 4 % in PBS (PFA)	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Partricin, 50 mg/ml	Biochrom AG, DE
Penicillin / Streptomycin, 10000 IU / 10 mg/ ml	Biochrom AG, DE
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, DE
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, DE
Propidiumiodid (PI) (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich (Fluka), USA

Proteaseinhibitoren complete mini	Roche Diagnostics GmbH, DE
Qiazol	Qiagen, DE
RNAlater	Qiagen, DE
RLT-Lysepuffer	Qiagen, DE
Saccharose	Sigma-Aldrich, USA
Tissuecol Duo S, 2 ml Immuno (Fibrinkleber)	Baxter Deutschland GmbH, DE
TRISHydrochlorid (Tris)	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Tris Base	Merck KGaA, DE
Triton X 100	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau, 1 %	Biochrom AG, DE
Trypsin / EDTA-Lösung (10 x)	Biochrom AG, DE
Tween-20	Sigma-Aldrich, USA
TissueTek	Sakura Finetek, NL
Vitamin C	Sigma-Aldrich, USA

### 3.1.4 Fertigsysteme, Kits

QuantiTec Gene Expression Assay	Qiagen, DE
QuantiTec Reverse Transcription Kit	Qiagen, DE
RNA Nano Lab Chip	Agilent Technologies, Inc., USA
RNase freies Dnase Kit	Qiagen, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen, DE
Taqman Gene Expression Assay	Applied Biosystem, USA

### 3.1.5 Antikörper und PCR-Primer

#### **3.1.5.1 Antikörper**

*Tabelle 1 Antikörper für die Immunfluoreszenz*

Antigen	Antikörper	Faktor	Firma
$\beta$ 1-Integrin	monoklonal Maus Anti Human $\beta$ 1-Integrin	20	Chemicon International, USA

Decorin	polyklonal Kaninchen Anti Human Decorin	20	Acris Antibodies GmbH DE
Kollagen Typ I	polyklonal Kaninchen Anti Human Kollagen Typ I	50	Acris Antibodies GmbH, DE
Kollagen Typ II	polyklonal Kaninchen Anti Human Kollagen Typ II	50	Acris Antibodies GmbH DE
Vinculin	monoklonal Maus Anti Human Vinculin	40	Sigma-Aldrich, DE
Kaninchen	Alexa 555 Esel Anti Kaninchen IgG	200	Invitrogen, DE
Kaninchen	Alexa 488 Esel Anti Kaninchen IgG	200	Invitrogen, DE
Maus	Alexa 488 Esel Anti Maus IgG	200	Invitrogen, DE
Kontrolle	Maus IgG	20	Invitrogen, DE
Kontrolle	Kaninchen IgG	20	Invitrogen, DE

### 3.1.5.2 PCR-Primer

Tabelle 2 PCR-Primer der Firma Applied Biosystem(A) und Qiagen (Q)

Gen		Primersequenz Vorwärts/ rückwärts	Sonde/ NM	bp
Aggrecan	A		NM_0132272.2	93
Kollagen Typ I	Q	GGCAACGATGGTGCTAA/ GACCAGCATCACCTCTGTC	AATGCCTGGTGAACGTG	138
Kollagen Typ III	A		NM_000090.3	66
COMP	A		NM_000095.2	101
Decorin	A		NM_133503.2	77
Elastin	A		NM_001081753.1	71
HPRT	A		NM_000194.1	100
Scleraxis	A		NM_001080514.1	63
Sox 9	A		NM_000346.2	102

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

#### *3.1.6.1 Zellkultur*

##### Zellkulturmedium:

DMEM: Ham's F12 1: 1 mit je 1 % Vitamin C, Penicillin/ Streptomycin, Partricin, essentiellen Aminosäuren, L-Glutamin

##### Wachstumsmedium:

Zellkulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS)

##### Einfriermedium:

90 % FKS + 10 % DMSO

##### 2,5 % Alginatbeschichtung:

2,5 g Alginat ad 100 ml 0,15 M NaCl

##### 2 % Agarosebeschichtung:

2 g Agarose ad 100 ml steriles PBS

##### Poly-L-Lysin-Lösung (Glasplättchenbeschichtung):

500 µl Poly-L-Lysin + 49,5 ml steriles PBS

##### Kollagenaselösung (enzymatischer Abbau der extrazellulären Sehnenmatrix):

0,1 % Kollagenase + 0,5 % FKS in Zellkulturmedium

##### Dezellularisierungspuffer:

1 % SDS, 0,2 % Natriumazid, 5 mM Na-EDTA, 0,4 % PMSF, Protease-Inhibitoren in 0,5 M Tris-Puffer (pH 8,0)

#### *3.1.6.2 Histologie*

##### Alcianblaulösung (Alcianblau-Färbung):

0,5 g Alcianblau ad 50 ml 3 % Essigsäure (pH 2,5)

##### HCl-Ethanol (Elastika-Färbung):

97,3 ml 96 % Ethanol + 2,7 ml 37 % HCl

##### Natriumcarbonatlösung (Von Kossa-Färbung):

5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 200 µl Formaldehyd (35 %) ad 100 ml Aqua dest.

#### *3.1.6.3 In situ Immunfluoreszenz*

##### TBS 1x:

100 ml 0,5 M TRIS HCl + 100 ml 1,5 M NaCl + 800 ml Aqua dest.

##### Blockierungslösung:

5 % Eserserum + 1 % Triton X 100 in 1 x TBS

Primär-/ Sekundärantikörper:

jeweilige Verdünnung in Blockierungslösung (siehe Tabelle 1)

**3.1.6.4 Lebend-Tot-Färbung**Propidiumiodid-Gebrauchslösung (PI):

50 µl der Originallösung (1 mg/ ml) + 4,95 ml PBS

Fluoresceindiacetat-Stocklösung (FDA):

3 µg FDA je 1 ml Aceton

Fluoresceindiacetat-Gebrauchslösung:

5 µl FDA Stocklösung + 4,995 ml PBS

**3.1.6.5 Genexpressionsanalyse**TE (Tris-EDTA)-Puffer (Agarose Elektrophorese):

10 mM TRIS HCL + 1 mM Na-EDTA in Aqua dest.

Probenpuffer (Agarose Elektrophorese):

6 x Ladepuffer 1:6 in TE Puffer

TAE-Puffer 50x (Agarose Elektrophorese):

2 M TRIS Base + 1 M Essigsäure + 0,1 M Na-EDTA

Ethidiumbromid Bad (Agarose Elektrophorese):

20 µl Ethidiumbromid in 400 ml Aqua dest.

RNA-Lysepuffer (RNA Isolierung):

1,5 ml RLT-Puffer + 15 µl β-Mercaptoethanol

3 % Agarose Gel:

4,5 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer

**3.1.7 Software**

Mikroskopie CellD Imaging Software Olympus Europa Holding GmbH, DE

Statistik GraphPad Prism 5 GraphPad Software, Inc., USA

RT-PCR Opticon Monitor 3 MJ Research, Inc., USA

### 3.1.8 Medikamente für den Tierversuch

Augensalbe Bepanthen	Bayer, DE
Domitor	Pfizer, DE
Gentamycin	WDT, DE
Ketamin	WDT, DE
Rimadyl	Pfizer, DE
Rompun	Bayer, DE
T 61	Intervet, DE

### 3.1. 9 Humane/ lapine/ porcine Sehnen-Spender

#### **Mensch:**

60 Spender, Geburtsjahre von 1924 bis 1991

#### **Kaninchen:**

30 New Zealand White Rabbits im Tierversuch; weiblich, 2,8 bis 3,8 kg, Charles River, DE

#### **Schwein:**

Hybridschweine, 3- 6 Monate alt, aus kooperierenden Arbeitsgruppen

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Grundtechniken der Zellkultur**

#### ***3.2.1.1 Zellisolierung via Explantkultur***

Nach steriler Präparation der humanen wie auch der lapinen Sehnen bzw. Entfernen des Muskel- und Fettgewebes sowie des Paratenons und Epitenons wurden die Sehnen in etwa 4 mm<sup>2</sup> kleine Stücke geteilt.

Für die Explantkultur wurden diese Gewebestücke in eine T25 Zellkulturflasche überführt und mit Wachstumsmedium versorgt. Sehnenzellen wanderten nach etwa 14 Tagen aus dem Gewebe auf die Zellkulturplastik aus und konnten expandiert werden.

#### ***3.2.1.2 Enzymatische Zellisolierung***

Eine weitere Möglichkeit, Sehnenzellen aus ihrer extrazellulären Sehnenmatrix herauszulösen, war der enzymatische Abbau. Hierfür benötigte man 0,1 % Kollagenase-Lösung, welche 17 h in der Spinnerflasche unter permanentem Rühren bei 36 rpm im Brutschrank auf die zerkleinerte Sehne einwirkte. Übrig gebliebene Matrixbestandteile wurden mit Hilfe eines Zellfilters (Steriflip, 100 µm Porengröße) entfernt. Die Zellen im Durchlauf wurden bei 400 g pelletiert, im frischen Wachstumsmedium gespült und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### ***3.2.1.3 Kultivierung und Expansion von Sehnenzellen in der Monolayerkultur***

Die Kultivierung von Sehnenzellen erfolgte im Brutschrank in gesättigter Luftfeuchtigkeit bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid. Nach Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit 5 % Trypsinlösung von den Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellen wurden suspendiert und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in neuem Medium suspendiert und in einer größeren Zellkulturflasche (z.B. T175) expandiert. Zellen einer konfluenten Flasche wurden zur Expansion auf zwei bis drei neue Flaschen verteilt.

#### ***3.2.1.4 Auftauen und Einfrieren von Sehnenzellen***

In Stickstoff gelagerte Zellen wurden möglichst schnell auf 37 °C erwärmt, mit Wachstumsmedium versetzt und zentrifugiert. Das durch Zentrifugation bei 400 g entstandene Pellet konnte zusammen mit frischem Wachstumsmedium in eine T75 Flasche gegeben und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt werden.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst mit 5 % Trypsinlösung von den Zellkulturflaschen gelöst und nach dem Pelletieren durch 5 min, 400 g in Einfriermedium suspendiert und in Kryogefäße abgefüllt. Vor der Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden sie zunächst über spezielle Einfriergefäße (Kryocontainer) mit einer Geschwindigkeit von -1 °C pro Min auf -80 °C gebracht.

### **3.2.1.5 Zellzahlbestimmung**

Um die Zellzahl verlässlich zu erfassen, wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert, pelletiert und in einem definierten Volumen neu suspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1: 10 in Trypanblau verdünnt. Der Bestimmung der Gesamtzellzahl in der Neubauer Zählkammer wurde folgende Berechnung zu Grunde gelegt:

$$\text{Zellzahl der 4 Quadrate} / 4 * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

### **3.2.1.6 Oberflächenbeschichtung**

Während der Kultivierung von Sehnenzellen auf Trägermaterialien war oft das Abwandern der Zellen aus der angelegten 3D-Kultur auf die Zellkulturplastik zu beobachten. Ziel sollte daher sein, die Zellzahl auf dem Konstrukt konstant zu halten. Miteinander verglichen wurden Beschichtungen aus Alginat, Agarose und die Ultra-Low Attachment Platten bezüglich der Sehnenzellmorphologie und der visuell wahrnehmbaren Wachstumsrate.

Standard im Labor war die Beschichtung der Zellkulturplatte mit 2,5 % Alginatlösung. Hierfür wurde die steril filtrierte Alginatlösung auf die Platte gegeben, verteilt und Reste abgesaugt. Durch langsame Zugabe von 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung polymerisierte die Beschichtung nach 15 min. Nachdem die überschüssige Lösung abgenommen wurde, wurde zweimal mit 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen.

Für die 2 % Agarosebeschichtung wurde selbige in der Mikrowelle gelöst und heiß mit einem Filter mit der Porengröße von 0,2 µm steril filtriert, um anschließend auf der Platte dünn gegossen und noch mal mit PBS gespült zu werden. Die Ultra-Low Attachment Platte war gebrauchsfertig zu erwerben.

### **3.2.1.6 Beschichtung von Glasplättchen mit Poly-L-Lysin**

Untersuchungen der Morphologie wie auch der Proteinexpression mittels immunhistologischer Färbungen erforderten die Besiedelung der Zellen auf sterilen Glasplättchen. Diese konnten angefärbt unter dem Mikroskop gut betrachtet werden.

Da Glas keine attraktive Adhäsionsgrundlage für Sehnenzellen darstellte, wurden die Plättchen als erstes nach dem Waschen in PBS für 15 min mit einer 1 % Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. Diese trocknete über Nacht im Brutschrank ab, bevor Sehnenzellen im Wachstumsmedium auf den beschichteten Glasplättchen ausgesät wurden.

### 3.2.2 Dezellularisierung der porcinen Sehnenmatrix

Um eine Sehnenmatrix als Trägermaterial anwenden zu können, mussten zuerst alle ursprünglichen Zellen über osmotischen Schock in Aqua dest. und chemische Detergenzien entfernt werden. Zunächst wurde die Sehne präpariert und in gleichmäßig kleine, 1 cm lange, Stücke zerteilt. Ebenso war darauf zu achten, dass die Stücke eine einheitliche Dicke aufwiesen. Im Anschluss wurden sie in destilliertem Wasser bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag aufgetaut. Es folgten 24stündige Inkubationen in Dezellularisierungspuffer und destilliertem Wasser. Zur Desinfektion kam ein Schritt in 70 % Ethanol hinzu. Dieser wurde ebenfalls durch mehrmaliges Waschen in sterilem PBS entfernt, um eine Zytotoxizität verbliebener Ethanolrückstände auszuschließen.

Zur Auflockerung der kompakten kollagenen Sehnenmatrix sollten Ultraschallimpulse bei 70 W für 45 sec und 50 % Amplitude verwendet werden.

### 3.2.3 Besiedelungsstrategien von Trägermaterialien

Aufgabe war, eine geeignete Methode zu etablieren, Zellen effizient und dauerhaft auf der Trägersubstanz zu fixieren. Alle Kulturen, ob statisch oder dynamisch besiedelt, wurden nach den folgenden Besiedelungen in einer Alginat-beschichteten Platte über insgesamt 4 Wochen kultiviert. Der Mediumwechsel fand alle 2- 3 Tage statt.

Folgende Kulturformen wurden angefertigt:

#### *Statische Besiedelungsstrategien*

##### **3.2.3.1 Adhäsionskultur**

2 Millionen Zellen wurden je cm<sup>2</sup> Trägermaterial als Suspension auf das Trägermaterial pipettiert und ohne Medium für 30 min zur Adhäsion in den Brutschrank gestellt, um die Zellen nicht vom Trägermaterial zu spülen. Danach erfolgte die Zugabe von frischem Wachstumsmedium. Das Volumen der Zellsuspension orientierte sich am Volumen des Biomaterials. Für 100 mm<sup>3</sup> Biomaterial wurden 100 µl Zellsuspension zur Adhäsion verwendet.

### 3.2.3.2 Transwellkultur

Die Zellsuspension, welche 2 Mio. Sehnenzellen beinhaltete, wurde mit der Pipette langsam in 1 cm<sup>2</sup> Trägermaterial einmassiert. Eine 6 Well Platte wurde mit einem Transwell bestückt und bis zur Membran des Inserts mit Wachstumsmedium befüllt. Das Konstrukt wurde nach 1 h gewendet und weitere 24 h auf der Transwellmembran kultiviert.

### 3.2.3.3 Massenzellkultur

Sehnenzellen wurden mit 400 g für 5 min pelletiert und alle Flüssigkeit sorgfältig abgenommen. Mit einer Pipettenspitze wurden 10 µl des Zellpellets angesaugt und auf dem Membranfilter abgesetzt. Aus einem Pellet konnten mehrere Massenzellkulturen angefertigt werden.



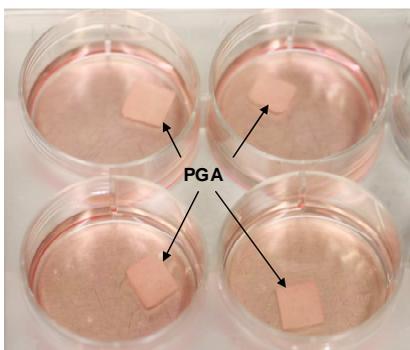
Der Membranfilter wurde zuvor zurechtgeschnitten, autoklaviert und auf einem Metallbrückchen in einer Petrischale platziert, die bis auf Filterhöhe mit Medium aufgefüllt wurde. (Abb. 13). Das Pellet befand sich an der Luft- Medium- Grenze.

**Abbildung 13 Darstellung einer 3D-Massenzellkultur.** Zwei Sehnenzell-Pellets an der Medium-Luft-Grenze auf dem Membranfilter, welcher auf einer Stahlbrücke lag.

### 3.2.3.4 Zentrifugationskultur

Zunächst wurde das Biomaterial auf die Größe eines Lochs der 96 Wellplatte steril ausgestanzt und hineingelegt. Die Zellsuspension (2 Mio. Zellen/ cm<sup>2</sup> Vlies) wurde danach auf das Material gegeben und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension abgenommen, das Konstrukt gewendet und die Suspension erneut auf das Biomaterial zentrifugiert.

### 3.2.3.5 Fibrin-assoziierte Biomaterialkultur



Auf 1 cm<sup>2</sup> sterile Trägersubstanz (PGA; PLGA, dezellularisierte Sehne) wurden 2\* 10<sup>6</sup> Sehnenzellen mit Hilfe von Fibrinkleber fixiert.

**Abbildung 14 Darstellung von 3D-Fibrinkulturen.** Vier PGA-Fibrinkulturen in Zellkultur-Petrischalen.

Hierzu mussten die Zellen zuerst trypsinisiert und pelletiert werden. Nach gewissenhaftem Entfernen des Überstandes, wurden exakt 100  $\mu$ l Wachstumsmedium zum trockenen Pellet gegeben. Zu 100  $\mu$ l Zellsuspension wurden 50  $\mu$ l Fibrinogen pipettiert und luftblasenfrei homogenisiert. Die Suspension wurde vorsichtig auf das Scaffold pipettiert und dort mit, in PBS 1: 10 verdünnten, Thrombin für 10 min polymerisiert (Abb. 14).

### *Dynamische Besiedelungsstrategien*

#### **3.2.3.6 Rollerkultur**

Das Trägermaterial wurde direkt in 5 ml Zellsuspension, die  $2 \cdot 10^6$  Zellen je  $\text{cm}^2$  Vlies enthielt, gegeben und im Bioreaktor- Falconröhrchen, welches den Gasaustausch gewährleistete, auf dem Rollermischer bei 36 rpm für 72 h im Brutschrank gedreht (Abb. 15).



**Abbildung 15 Darstellung der Rollerkulturen.** Auf dem Rollermischer im Brutschrank kultivierte PGA-Rollerkulturen im Bioreaktorröhrchen.

#### **3.2.3.7 Spinnerflaschenkultur**



Für die Spinnerflaschenkultur wurde ein Titandraht gebogen und autoklaviert. Das Biomaterial wurde in der Spinnerflasche auf dem Draht senkrecht in den Flüssigkeitsstrom gehängt (Abb. 16). Die Spinnerflasche wurde mit einer Zellsuspension, die  $2 \cdot 10^6$  Sehnenzellen je  $\text{cm}^2$  Vlies beinhaltete, gefüllt, so dass das Medium das Scaffold gut bedeckte. Die Kultur wurde bei 75 rpm im Brutschrank für 72 h gerührt.

**Abbildung 16 Darstellung einer Spinnerflaschenkultur.** Dynamische Besiedelung des Biomaterials in der Spinnerflasche.

### **3.2.3.8 Besiedelung einer dezellularisierten Matrix durch Injektionstechnik**

Die Aufgabe war, eine zuvor dezellularisierte Sehnenmatrix homogen sowohl in der Mitte wie auch am Rand des Gewebes zu rezellularisieren. Zur Ummantelung der Sehne wurde diese mit Alginat überzogen und mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung polymerisiert (siehe Oberflächenbeschichtung). Nach dem Aushärten des Alginats wurden 100 µl der Zellsuspension (1 Mio. Zellen/ cm Sehne) mit Hilfe einer Heparinspritze und einer 23 G Kanüle langsam in die dezellularisierten Sehnenstücke injiziert.

## **3.2.4 Histologie**

Zur vergleichenden Analyse der Gewebestruktur sollten Gefrierschnitte und für den Tierversuch Paraffinschnitte angefertigt werden. Paraffinschnitte ermöglichten trotz höherem Arbeitsaufwand einen besseren Gewebestrukturerhalt.

### **3.2.4.1 Gefriereinbettung und -schnitte**

Das Gewebe wurde präpariert. Nach 15 min Fixierung durch steriles 4 % Paraformaldehyd (PFA), diente eine steril-filtierte 30 % Saccharose-Lösung der Entwässerung des Gewebes über 24 Stunden via Diffusion.

Anschließend wurde das Gewebe in das Einbettungsmedium Tissue Tek luftblasenfrei gelegt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C im Tiefkühler gelagert.

Längsschnitte der Sehnen wurden mit einer Schnittdicke von 7 µm im Kryostat angefertigt. 3D-Konstrukte aus PGA oder PLGA wurden dagegen anhand von 10 µm Gefrierschnitten begutachtet.

### **3.2.4.2 Paraffineinbettung und -schnitte**

Zunächst erfolgte die Fixierung des Gewebes mit Hilfe von 4 % PFA in PBS. Um die lapinen Achillessehnen in Paraffin einzubetten, war es zudem notwendig, das Gewebe jeweils 24 h in aufsteigender Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 %) zu entwässern. Es folgten Inkubationen in Xylol und schließlich in Paraffin, bevor sie ohne Luftblasen in die Paraffin-Kassetten über Metallformen gegossen werden konnten. Geschnitten wurden die erkalteten Paraffinblöcke in 7 µm, um sie mit den Sehnen-Gefrierschnitten vergleichen zu können.

Grundlegend für alle folgenden histologischen Färbungen galt, dass Gefrierschnitte zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Paraffinschnitte hingegen mussten zunächst über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert werden.

#### **3.2.4.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung**

Diese Färbung diente der Darstellung der allgemeinen Morphologie. Hämatoxylin färbte basophile, saure Substrate in den Zellen wie z.B. Nukleinsäuren und Endoplasmatisches Reticulum (z.B. Zellkern) blau. Eosin hingegen färbte alle acidophilen, basischen Strukturen wie Zytoplasma-Proteine oder Kollagen rot.

Die Gewebeschnitte wurden in Hämatoxylin für 6 min gefärbt und im Anschluss in Leitungswasser gebläut. Zur Gegenfärbung wurde 4 min in Eosin gebadet und nach mehrmaligem Spülen in Aqua dest. über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan konserviert.

#### **3.2.4.4 Alcianblau-Färbung**

Alcianblau als Phthalocyanin, mit Kupfer als Zentralatom, färbte elektrostatisch saure Proteoglykane blau. Diese Färbung wurde gewählt, um das Vorkommen Knorpel-typischer Matrixkomponenten in den Sehnenpräparaten zu visualisieren. Die Schnitte wurden dafür zunächst für 3 min in 1 % Essigsäure gebracht, um dann in 1 % Alcianblau-Lösung für 30 min gefärbt zu werden. Abgespült wurde mit 3 % Essigsäure. Folgend auf den Waschschrift in destilliertem Wasser, wurde als Gegenfärbung der Zellkerne Kernechtrot verwendet. Entwässert wurden die gefärbten Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol. Mit Hilfe von Entellan wurden sie haltbar gemacht.

#### **3.2.4.5 Elastika-Färbung**

Der positiv geladene Resorcin-Fuchsin-Farbstoff band sich während der Färbung polar ans negativ geladene Elastomuzin, welches die Hüllschicht der elastischen Fasern bildete.

Nach 5 min Inkubation in der Resorcin-Fuchsin-Lösung, wurde mit Aqua dest. gespült und für exakt 60 sec mit HCl-Ethanol differenziert. Nach 10 min Waschung in Leitungswasser und Aqua dest. wurden die Zellkerne mit Kernechtrot angefärbt. Zur Konservierung wurde über einen aufsteigenden Alkoholgradienten und Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

#### **3.2.4.6 Von Kossa-Färbung**

In der Von Kossa-Färbung stellten sich Calciumsalze bzw. eine calcifizierte Matrix, charakteristisch für Knochengewebe, schwarz dar. Die Schnitte wurden für 30 min in 2,5 % wässriger Silbernitratlösung im Dunkeln gefärbt und danach mehrfach in Aqua dest. gespült. Es folgte die Reduktion für 7 min mit der Natriumcarbonat-Lösung. Es wurde gründlich in Aqua dest. gespült und 10 min in Kernechtrot gefärbt. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach einer Inkubation in Xylol eingedeckelt.

### 3.2.5 In situ indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Durch die affine Bindung eines Antikörpers konnten spezifische Antigene z.B. innerhalb eines Gefrierschnittes (*in situ*) identifiziert werden. Um freie Bindungsstellen auf dem Objektträger vor der Immundetektion zu „verdecken“, wurde der Schnitt zuerst mit einer proteinreichen Lösung blockiert. Es kam 5 % Eseserum zum Einsatz. Wenn ein intrazelluläres Antigen nachzuweisen war, wurde der Blockierungslösung 0,1 % Triton X 100 zugesetzt, um die Zellmembran zu permeabilisieren und für den Antikörper das Zytoplasma zugänglich zu machen. Als Isotypkontrollen wurden Antikörper derselben Subklasse des jeweiligen Primärantikörpers verwendet. Färbungen ohne Primärantikörper kontrollierten zudem die unspezifische Reaktivität des Sekundärantikörpers.

Alle Färbeschritte wurden zum Verdunstungsschutz in einer feuchten Kammer durchgeführt, um die Antikörpermenge gering zu halten. Der Primärantikörper wurde in der Blockierungslösung verdünnt (Tab. 1), nach Entfernen der Blockierung direkt aufgetragen und für 45 min inkubiert. Pro Schnitt waren etwa 50 µl nötig. Es folgten 3 gründliche Waschschritte mit 1x TBS-Puffer, um alle nicht gebundenen Immunglobuline zu entfernen und falsch-positive Ergebnisse zu verhindern.

Der mit einer fluoreszierenden Gruppe (Alex 488, Alexa 555) gekoppelte Sekundärantikörper konnte auf die Schnitte aufgegeben werden und wurde ebenfalls für 45 min im Dunkeln inkubiert. Dieser Sekundärantikörperlösung wurde zudem der DAPI-Farbstoff 1:200 zugesetzt, welcher durch Interkalation in der DNA den Zellkern erkenntlich machte. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBS-Puffer, wurden die Schnitte mit Hilfe von Fluoromount konserviert und mit dem Fluoreszenzmikroskop nach dem Aushärten ausgewertet. Zur Verfügung standen UV Filter, die das Lichtspektrum zwischen 500 - 550 nm, etwa 330 nm und 450 - 490 nm bündelten und das Objekt zur Emission anregten.

### 3.2.6 Lebend-Tot-Färbung

Vitale Zellen besaßen im Zytoplasma Esterasen, die in der Lage waren, Fluoresceindiacetat (FDA) zu Fluorescein zu metabolisieren. Diese Zellen erschienen in der Färbung grün. Propidiumiodid (PI) hingegen durchdrang nur tote Zellen bzw. Zellmembranen, die porös waren. Tote Zellen wurden daher rot angefärbt.

Nachdem die Konstrukte dreimal mit PBS gewaschen wurden, um Mediumreste zu entfernen, wurden sie mit der FDA-Gebrauchslösung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die PI-Lösung hatte darauf 1 min Zeit im Dunkeln in die DNA der toten Zellen zu interkalieren. Ungebundene Farbstoffmoleküle wurden durch drei Waschschritte in PBS entfernt. Analysiert werden konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

### 3.2.7 Genexpressionsanalyse

#### **3.2.7.1 RNA-Isolierung**

##### *RNA Isolierung aus Sehngewebe*

Um sicherzustellen, dass nur Sehnen-RNA gewonnen wird, musste das Gewebe zuerst sauber vom Binde-, Muskel und Fettgewebe präpariert werden. Das Gewebe wurde zur Stabilisierung der Ribonukleinsäuren über Nacht bei 4 °C in einem denaturierenden RNAlater-Puffer gelagert. Die RNA-Isolierung erfolgte am darauf folgenden Tag. Da mit verschiedenen Ausgangsmaterialien gearbeitet wurde, ergaben sich unterschiedliche Isolierungsabläufe.

Bei einer geringen Sehnenmenge (z.B. Kaninchensehne) wurde das Gewebe durch flüssigen Stickstoff tiefgefroren und unter Eiskühlung mit dem Turrax in RNA-Lysepuffer (Qiazol) homogenisiert.

Bei humanen Proben, die meist mehr Gewebe umfassten, wurde die Sehne in einen unglasierten Mörser gegeben und vorsichtig mit einem in Stickstoff gekühltem Stempel zu einem Pulver zerstoßen. Verhindert wurde das Auftauen des Gewebes durch stetige Zugabe von Stickstoff. Das Sehnenpulver wurde sofort in gekühlten Qiazol aufgenommen.

Es schloss sich in beiden Fällen eine Phenol-Chloroform-Extraktion an. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform je 1,0 ml Qiazol und anschließender 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 12000 g, 15 min gekühlt zentrifugiert. Nur die obere wässrige Phase enthielt RNA-Moleküle und wurde vorsichtig abpipetiert. Zur RNA-Fällung wurde das gleiche Volumen an 70 % Ethanol in DEPC-Wasser zugefügt.

Dieses Gemisch wurde auf die Qiagen RNA-Säule gegeben und an die enthaltene Silicamembran gebunden. Die RNA konnte dann, entsprechend der Qiagen Arbeitsanleitung, über verschiedene Waschschrte mit unterschiedlichen Puffersystemen eluiert werden. DNase-Lösung wurde zwischen den Waschschrten zusätzlich für 15 min eingesetzt, um Kontaminationen zu beseitigen.

##### *RNA-Isolierung aus Zellen*

Als erster Schritt wurde der RNA-Lysepuffer auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gegeben.

Mit dem Zellschaber konnte der Boden der Zellkulturfläche gründlich abgeschabt und die Zell-Puffer-Mischung suspendiert, komplett abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Nachdem das gleiche Volumen an 70 % Alkohol in DEPC-Wasser dazugegeben wurde, wurde die RNA wieder über die Qiagen Säule eluiert.

### ***RNA-Isolierung aus besiedelten Biomaterialien (z.B. PGA)***

Das gefrorene, mit Sehnenzellen besiedelte Biomaterial wurde in gekühltem Qiazol aufgenommen und sofort auf Eis geturraxt bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Zu 1,5 ml Gemisch wurde 0,3 ml Brom-Chloro-Propanol dazugegeben und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 45 min Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C konnte die wässrige Phase abgenommen und gleiches Volumen 70 % Ethanol dazugegeben werden. Das Eluat wurde nach Aufreinigung mit der Qiagen Säule im Folgenden bei -80 °C gelagert.

#### ***3.2.7.2 RNA Quantitäts- und Qualitätsmessung***

Die Konzentration der RNA wurde zunächst photometrisch mit dem Nano Drop 1000 bestimmt. Das Gerät war zudem in der Lage, mögliche Kontaminationen der RNA-Proben durch Proteine oder Phenolreste aus der Isolierung mittels der Quotientenangabe von 260/ 280 nm aufzudecken. Ein Wert um 2 galt als „reine“ RNA.

Die Qualität der RNA jedoch wurde genauer mit dem Bioanalyser überprüft. Die Methode beruhte auf der elektrophoretischen Auftrennung der Proben in den Mikrokanälen des RNA Chips. Die Konzentration der Proben konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmarkers, eines in die Ribonukleinsäure interkalierenden Farbstoffes (Nano Dye Konzentrat), im Gerät erfasst werden.

Aussage über die RNA-Qualität wurde durch Analyse der Säugetier-charakteristischen Banden ribosomaler RNA, 18 und 28 S, in der Gelelektrophorese bzw. über deren Degradationsprodukte gewonnen. Der Kennwert dafür war der RIN-Wert (RNA-Integritätsnummer) zwischen 1 und 10. Er galt als das Qualitätsmerkmal. Nur RNA-Proben mit einem RIN Wert über 7 fanden Einzug in die PCR -Analysen.

#### ***3.2.7.3 cDNA-Synthese***

Die Umschreibung der isolierten RNA in *copy* DNA wurde mittels QuantiTec Reverse Transkription Kit von Qiagen unter Eiskühlung durchgeführt. Alle Reagenzien und die RNA wurden zunächst aufgetaut. Der Arbeitsablauf teilte sich in zwei Schritte. Anfangs wurde die genomische DNA mittels Wipeout Buffer bei 42 °C für 2 min eliminiert.

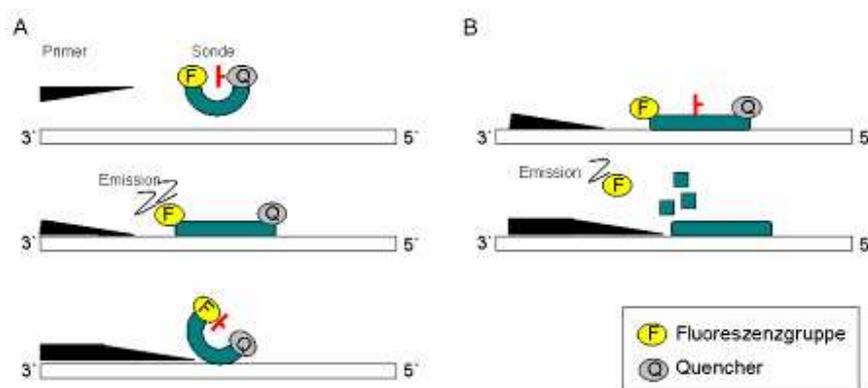
Es folgten nach der Abkühlung die Zugaben des RT Primer-Mixes sowie der Reversen Transkriptase im QuantiScript RT-Puffersystem. Die Reaktion fand im cDNA-Zykler für 15 min bei 42 °C statt. Es wurde im Weiteren davon ausgegangen, dass die Konzentration der cDNA der der eingesetzten RNA entspricht.

### 3.2.7.4 Real-time RT PCR

Mit Hilfe der real-time RT Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten bestimmte Gensequenzen selektiv vervielfältigt und detektiert werden. Das PCR-Programm bestand aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt.

Die Denaturierung (95 °C) diente der Auftrennung des DNA-Doppelstranges, um im Annealingschritt (55 °C) eine Hybridisierung der PCR-Primer an die entstandenen Einzelstränge zu ermöglichen. Während der Elongation (72 °C = optimale Reaktionstemperatur der Taq-Polymerase) verknüpften die Polymerasen die Startermoleküle (Primer) mit den freien Nukleotiden zum komplementären Zweitstrang. Theoretisch erfolgte eine exponentielle Vermehrung der DNA mit jedem Zyklus.

Es kamen genspezifische Sonden (Primer) zum Einsatz (Tabelle 2), welche komplementär zu einem typischen und konservierten Bereich der nachzuweisenden Gensequenz waren. Diese Sonden trugen an ihrem 5` Ende eine Fluoreszenzgruppe (FAM Farbstoff) und am 3` Ende einen Quencher.



**Abbildung 17 Schematisches Funktionsprinzip der verwendeten PCR-Sonden.** QuantiTectProbe Prinzip der Firma Qiagen (A) und TaqMan Prinzip der Firma Applied Biosystem (B).

**Qiagen** (Abb. 17A) lieferte Sonden, welche nach dem QuantiTect Probe Prinzip funktionierten. Durch die Bindung der Sonde an die DNA war die räumliche Nähe zwischen fluoreszierendem Reporter und Quencher, die Voraussetzung der Inhibition, nicht mehr gegeben. Die emittierte Fluoreszenz konnte daher während des Annealing- Schrittes detektiert werden.

Sonden der Firma **Applied Biosystems** (Abb. 17B) fungierten nach dem TaqMan Prinzip. Hier konnte durch den Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer („FRET“, sterische Hinderung) bei der Bindung an die DNA keine Fluoreszenz detektiert werden. Im Laufe der Elongation entfernte die Polymerase mit ihrer 5´-3`Exonuklease-Aktivität die Fluoreszenzgruppe von der Sonde, die dann frei im Medium emittierte. Die Detektion erfolgte hier während der Elongationsphase.

Die Stärke des Fluoreszenzsignals war dabei proportional zur Menge des PCR-Produktes. Die Auswertung erfolgte mittels der C(t)-Werte der einzelnen Proben. Ein C(t)-Wert entsprach genau dem PCR-Zyklus, bei welchem die Fluoreszenz den Schwellenwert (treshold) überschreitet. Pro Well wurden 20 µl Ansatz pipettiert, welcher sich aus den Komponenten cDNA, Master Mix, Primer und Wasser zusammensetzte (Tabelle 3):

*Tabelle 3 PCR- Pipettierschema pro Well*

	Qiagen	AB
cDNA	1 µl	1 µl
Master Mix	10 µl	10 µl
Primer	2 µl	1 µl
PCR Wasser	7 µl	8 µl

Die Hypoxanthin –Phosphoribosyltransferase (HPRT), ein Enzym des Purinstoffwechsels, wurde als interne Kontrolle bei jedem einzelnen PCR-Lauf verwendet. Die Expression des Zielgenes wurde durch die Expression des Referenzgens normalisiert. Die relative Quantifizierung basierte auf der  $\Delta\Delta C(t)$ -Auswertung von Pfaffl (Pfaffl 2001).

### **3.2.7.5 Effizienzbestimmung**

Notwendigerweise sollte die Effizienz der Primer analysiert werden. Während eines idealen Laufes und unter theoretisch perfekten Bedingungen (keine Begrenzung durch fehlende Nukleotide, Primer, Sonden, etc) wurde eine Verdopplung der cDNA innerhalb eines PCR-Zyklus erreicht. Entscheidend dabei war auch die Bindungskapazität des Primers an die gesuchte Gensequenz. Um diese Qualität zu untersuchen, wurden cDNA-Verdünnungsreihen mit mindestens 5 Stufen ( $c_{DNA} = 100; 10; 1; 0,1$  und  $0,01$  ng/ µl) angelegt. Es folgte ein normaler PCR-Lauf mit 45 Zyklen.

Durch die graphische Auftragung der logarithmierten cDNA-Konzentration gegen den C(t)-Wert, konnte man anhand der Steigung der Geraden die Effizienz berechnen:  $E = 10^{-1/m}$ .

Die Effizienzwerte sollten im Bereich zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

### **3.2.7.6 Agarose-Gelelektrophorese als Qualitätskontrolle**

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate sollte gezeigt werden, dass die richtige Gensequenz vervielfältigt wurde. Zunächst wurde ein 3 % Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 4,5 g Agarose eingewogen, auf 150 ml mit TAE-Puffer aufgefüllt, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und luftblasenfrei in die Agarose-Gelelektrophoresekammer Comphor Mini gegossen. Die Proben wurden nach Aushärten des Gels mit 6 µl TAE-Puffer und 2 µl Ladepuffer versetzt und vorsichtig in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zu beachten war die Ausrichtung des Gels im elektrischen Feld. Die negativ geladenen Proben wanderten in 2 Stunden bei 120 V zum Pluspol. Im Anschluss wurde das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und an der GelDoc-UV-Einheit fotografiert. Anhand des eingesetzten GeneRuler DNA-Markers konnte die Größe des Amplifikates überprüft werden.

## 3.2.8 Tierversuchsmodell

Das *in vitro*-optimierte PGA-Konstrukt sollte im Kaninchen-Tierversuchsprojekt mit der Genehmigungsnummer G 0396/09, entsprechend den geltenden Tierschutzbestimmungen, untersucht werden. Es wurde die lapine Achillessehne als größte und stärkste Sehne im Organismus gewählt.

### **3.2.8.1 Implantatherstellung und Qualitätsanalyse**

Lapine Zellen der drei präparierten Achillessehnenstränge (mediale und laterale *M. gastrocnemius* und *M. flexor digitorum superficialis* Sehne) wurden von zwei Spendertieren durch enzymatische Zellisolierung gewonnen und über drei Passagen in der Zellkultur expandiert. In der vierten Passage konnten mit diesen Primärzellen die PGA-Fibrinkulturen angelegt werden. Auf ein 8 mm rundes PGA-Vlies wurden stets 2 Millionen Sehnenzellen aufgebracht und 7- 8 Tage *in vitro* kultiviert. Die Qualität der Implantate bestimmte man durch eine Lebend-Tot-Färbung. Am Tag der Implantation wurde ein 3 mm Stück heraus gestanzt und in den Defekt implantiert. Vom PGA-Rest wurden histologische Färbungen vorgenommen.

### 3.2.8.2 Versuchsdesign

Mit 4 Etablierungstieren wurde das Sehnendefektmodell ausgetestet. 24 New Zealand White Rabbits (Kaninchen) wurden in drei Versuchsgruppen zufällig eingeordnet. Das Körpergewicht der Tiere am Tag der Operation betrug zwischen 2,8 und 3,8 kg. Sie bewohnten die Käfige zu zweit oder dritt und bekamen Futter und Wasser *ad libitum*.

Tiere der Leedefektgruppe bekamen nur den 3 mm gestanzten Sehnendefekt. In der PGA-Gruppe implantierte man ein zellfreies PGA-Fibrin-Konstrukt während der Sehnendefekt der Haupt-Versuchsgruppe mit dem Sehnenzell-PGA-Vlies repariert wurde. Analysiert wurde die Heilung der künstlich verletzten Sehne nach 6 und 12 Wochen.

### 3.2.8.3 Sehnendefektmodell

Das Kaninchen wurde durch intramuskuläre Injektion von 12 mg/ kg KG Ketamin und 120 µl/ kg KG Domitor narkotisiert. Nach Rasur des Hinterbeines und weiteren Vorbereitungen des sterilen Eingriffs, wurde der Achillessehnenkomplex freigelegt und die Sehnenstränge der Achillessehne vorsichtig voneinander getrennt.

2 cm über dem Fersenbein (Calcaneus) in der Mittelsubstanz der medialen *M. gastrocnemius* Sehne wurde mit Hilfe einer 3 mm Biopsiestanze ein runder Defekt gesetzt. Dieser verblieb entweder als „Leerdefekt“ ungefüllt oder wurde durch PGA in Kombination mit Fibrin stabilisiert. Das PGA-Fibrin-Konstrukt mit und ohne Sehnenzellen wurde mit Einzelknopfnähten (6.0 Vicryl Faden) in der Sehne fixiert (Abb. 18).

Nach der Implantation wurde das Paratenon und das tiefe Blatt der *Fascia cruris* durch eine kontinuierliche Naht mit einem resorbierbaren Vicrylfaden (6.0 Vicryl Faden) geschlossen. Die Kutisnaht erfolgte mit einem 5.0 Prolenefaden über Einzelknopfhefte.

Post OP und 3 weitere Tage wurde Rimaldyl mit einer Konzentration vom 4 mg/ kg KG zur Analgesie und Gentamycin (5 mg/ kg KG) zur Antibiose appliziert. Die Hautfäden wurden



nach 8 Tagen entfernt. Die Tiere konnten sich ohne Immobilisierung in ihren Käfigen bewegen.

**Abbildung 18** Implantiertes PGA-Konstrukt in lapiner, medialer *M. gastrocnemius* Sehne. Das Sehnenzell-PGA-Konstrukt wurde mit 8 Knopfhäften in den Sehnendefekt genäht.

### 3.2.8.4 Bewertung des Tierversuches/ Scoresysteme

3 Wochen nach dem Eingriff wurde der Bewegungsablauf aller Tiere überprüft und im selbst entworfenen klinisch-makroskopischen Score aufgenommen.

Nach 6 und 12 Wochen wurden die Tiere mit 0,3 ml/ kg KG Rompun und 0,6 ml/ kg KG Ketamin in eine tiefe Narkose gelegt und mit intrakardialer Injektion von T61 getötet.

Am Tag der Implantatentnahme wurden Merkmale wie Verwachsungen, Schwellung, Veränderung der Sehnenfarbe, Oberfläche oder Integration des PGAs anhand des Makroscores (Tab. 4) bewertet und fotodokumentiert. Das exakt 3 cm lange Implantat-Sehnenstück wurde zudem entnommen und gewogen.

Basis für den zweiten und dritten Score waren histologische Färbungen. Der histologische Score (Tab. 5) umfasst Ergebnisse der Hämatoxilin-Eosin- sowie der Alcianblau-Färbung.

Durch die Resorcin-Fuchsin-Färbung konnten Aussagen zu Gehalt und Verteilung elastischer Fasern im Sehngewebe getroffen werden (Tab. 6).

Tabelle 4 Klinisch, makroskopischer Score

KLINISCH	Pkt	Gewebefarbe	Pkt
<b>Belastung/ Gangbild/ Lahmheit</b>		Weiß, glänzend, wie Umgebung	1
Bein belastet	1	Matt weiß oder rosa	0
Bein nicht belastet, Lahmheit	0		
		<b>Oberfläche im Defektbereich</b>	
<b>Schwellung/ Rötung</b>		Glatt, intakt	1
Keine Schwellung, keine Rötung	2	Höckerig, rau	0
Tastbare Schwellung, keine Rötung	1		
Tastbare Schwellung, Rötung	0	<b>Benachbarte Sehnenstränge</b>	
		Unverändert	1
MAKROSKOPISCH		Verändert (rau, rosa, narbig, dick,...)	0
<b>Verbindung der Sehne mit Haut/ Verschieblichkeit</b>			
Nicht verwachsen, verschieblich	1	<b>Einzelne Sehnenstränge der Gastrocnemius Sehne</b>	
Adhäsion, nicht verschieblich	0	Normal verwachsen	1
		Adhäsion, stark verwachsen	0
<b>Verbindung der Sehne mit Paratenon/ Verschieblichkeit</b>			
Nicht verwachsen, verschieblich	1	<b>Niveau des Defektes</b>	
Adhäsion, nicht verschieblich	0	Auf Sehnenniveau	1
		Über Sehnenniveau	0
<b>Sehnenriss</b>			
Nicht vorhanden	1	<b>Übergang Vlies zum gesunden Gewebe, Ränder</b>	
Vorhanden	0	Kein Übergang sichtbar, Vlies integriert	1
		Spalten, Kallusgewebe, ausgerissene Defektränder	0

<b>Form der Achillessehne</b>			
Normal	3	<b>Defekt</b>	
Leicht verdickt	2	Defektgröße etwa 3 mm	1
Mittelmäßig verdickt	1	Defekt vergrößert, nicht eindeutig abgrenzbar	0
Stark verdickt	0	Größe: _____ breit, _____ lang	
<b>Entzündung</b>		Bemerkungen:	
Nicht vorhanden	1		
Vorhanden (Ödeme, Schwellung, Rötung etc)	0		

Tabelle 5 Histologischer Score

	Pkt
<b>Matrixorganisation der gesamten Sehne</b>	
Wellenförmig, dicht und parallel angeordnete kollagene Fasern	2
Teils kompakt, teils locker oder ungeordnet	1
Looser Zell-Matrix Verbund, ungeordnet („Granulationsgewebe“)	0
<b>Proteoglykangehalt (Alcianblau-Färbung)</b>	
Normal	1
Fokal erhöht	0
<b>Zellularität/ Zell-Matrix-Verhältnis</b>	
Physiologische Zelldichte	2
Lokal erhöhte Zelldichte	1
Überwiegend erhöhte Zelldichte oder verminderte Matrix	0
<b>Zellausrichtung</b>	
Uniaxial	2
In Arealen ungeordnet, zu 10-50%	1
Über 50% ungeordnet	0
<b>Zellverteilung</b>	
Homogen, physiologisch	1
Fokal, zellreiche Areale	0
<b>Morphologie der Zellkerne (Sehnenzellen)</b>	
Überwiegend lang gestreckt, heterochromatisch (Tendozyt)	2
Gemisch, 10 bis 30% groß oval, euchromatisch oder polymorph heterochromatisch	1
Überwiegend groß oval, euchromatisch oder polymorph heterochromatisch Tendo-, Fibroblasten	0
<b>Organisation des Füllgewebes im Tendonkallus</b>	
Homogen, gesamtes Gewebe sehnähnlich	2
Heterogen, lokale Abweichungen oder schwer abgrenzbar	1
Gesamte Sehne komplett verändert	0
<b>Übergang Defekt zum normalen Gewebe</b>	
Scaffold weitestgehend integriert, keine Lücken am Rand sichtbar	2
Erkennbarer Übergang	1
Abrupter Übergang, Spalten/Lücken sichtbar, deutliches Kallusgewebe	0

<b>Ausmaß der Kallusbildung</b>	
Normal (nur im Defektbereich oder deutlich lokalisiert)	1
Überschießend (ganzer Sehnenstrang verändert, verdickt)	0
<b>Degenerative Veränderung /Gewebemetaplasie</b>	
Nicht vorhanden	3
Mäßige Ödembildung	2
Starke Ödeme mit Fetteinschlüssen, Zelluntergang, fibrinoide Ablagerungen, Faserdestruktion	1
Knorpel-, Knochenbildung (Alcianblau-, von Kossa-Färbung)	0
<b>Vaskularisierung</b>	
Hypo-vaskularisiert (wie gesunde Sehne (v.a. kleine Kapillaren))	1
Hyper-vaskularisiert	0
<b>Entzündung</b>	
Keine Infiltrate	1
Infiltrierende Entzündungszellen (z.B. Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten, Fremdkörperriesenzellen)	0

Tabelle 6 Elastischer Faser Score

<b>Elastische Faser- Menge</b>	<b>(Resorcin-Fuchsin-Färbung)</b>	Pkt
der Kontrollsehne vergleichbar, nicht vorhanden		2
mehr elastische Fasern		1
Deutlich mehr Fasern als Kontrolle		0
<b>Elastische Faser- Verteilung</b>	<b>(Resorcin-Fuchsin-Färbung)</b>	
Kontrolle/ nicht vorhanden		3
fokal (< 1/3): auf Defektbereich begrenzt		2
fokal (< 1/3): im umliegenden Sehngewebe		1
generalisiert (2/3), in gesamter Sehne inklusive Defektbereich		0

### 3.2.9 Statistik

Alle Daten wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5 Software ausgewertet und dargestellt. Die graphischen Abbildungen zeigen den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Als statistischer Test wurde aufgrund der zu vergleichenden Gruppenanzahl die ANOVA-Analyse mit dem Bonferroni-Test ausgewählt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  bestimmt.

## 5. Ergebnisse

Das Ziel dieser Doktorarbeit war, die langwierige Sehnenheilung durch geeignete Trägermaterialien zu unterstützen. Es sollte zu diesem Zweck zunächst ein dreidimensionales (3D) Sehnenzell-Konstrukt etabliert werden, welches in Histologie und Expressionsprofil mit der natürlichen Sehne möglichst viele Übereinstimmungen zeigt.

Aufbauend auf die *in vitro*-Analysen sollte das optimierte 3D-Konstrukt in einem partiellen Achillessehnen-Defektmodell im Kaninchen im Hinblick auf seine Auswirkung auf die Sehnenheilung getestet werden.

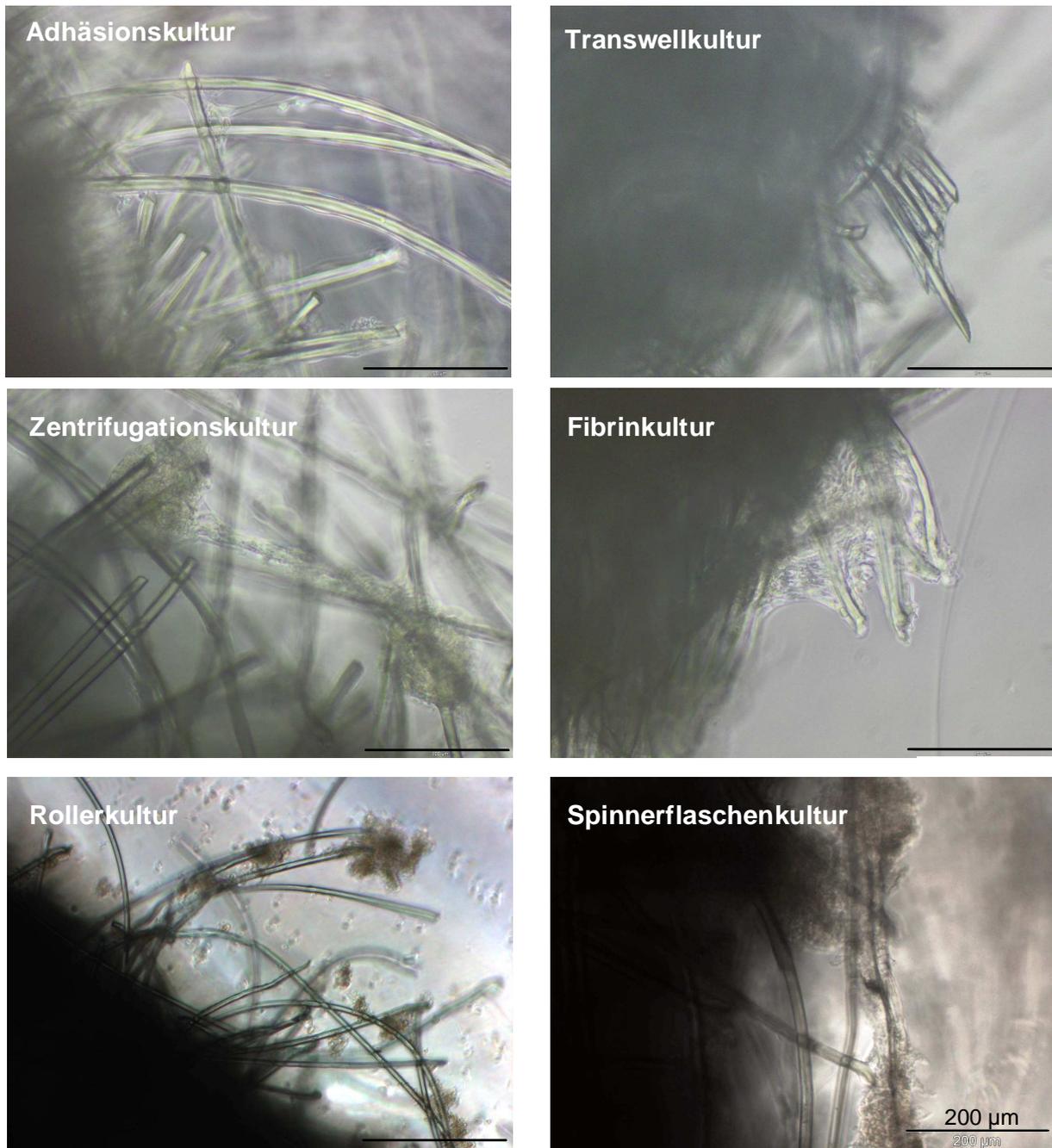
### 5.1 Etablierung einer geeigneten 3D Besiedelungsstrategie für Biomaterialien

Zunächst sollten Strategien zur gleichmäßigen und über die gesamte Versuchszeit konstanten Fixierung der Sehnenzellen auf dem Trägermaterial getestet werden. Aufgrund der leichten Verfügbarkeit wurden alle Etablierungsarbeiten mit kommerziell erhältlichen Polyglykolsäure (PGA)-Vliesen durchgeführt. Beim direkten Vergleich einer Biomaterial-Kultur mit der 2D-Kultur und der Sehne wurde jedoch PLGA wegen seiner langsameren Degradationszeit eingesetzt. Die folgenden Besiedelungen entstanden im Laufe dieser Doktorarbeit und beinhalteten verschiedene Versuchsreihen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit sowohl humanen als auch lapinen Sehnenzellen.

#### 5.1.1 Morphologie besiedelter Konstrukte in Abhängigkeit von der Besiedelungsstrategie

Es sollten folgende Besiedelungsstrategien lichtmikroskopisch verglichen werden: Die Adhäsionskultur, bei der Sehnenzellen für 30 min auf dem Biomaterial adhärten, die Transwellkultur, bei der das Sehnenzell-Pellet durch die Transwellmembran mit Nährmedium versorgt wurde und die Zentrifugationskultur, die mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes angefertigt wurde. Des Weiteren wurden die Fibrinkultur, bei welcher die Zellsuspension durch Fibrinkleber am Biomaterial fixiert wurde und die dynamisch besiedelten Kulturen aus der Spinnerflasche und dem Bioreaktorröhrchen zur Analyse herangezogen. Da PGA als ungewobenes und dichtes Vlies verwendet wurde, war die lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen nur im Randbereich möglich.

Sowohl die Adhäsionskultur als auch die Transwellkultur (Abb. 19) zeigten nur eine spärliche Besiedelung des PGA-Vlieses mit den Zellen. Nach Tag 14 und Tag 28 waren mehr Zellen auf den Boden der Zellkulturplastik abgewandert als auf dem PGA-Konstrukt.



**Abbildung 19 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Sehnenzell-PGA-Konstrukte mit unterschiedlichen Besiedlungsstrategien.** Besiedelung des PGA mit Sehnenzellen durch Adhäsions-, Transwell-, Zentrifugations-, Fibrin-, Roller- und Spinnerflaschenkultur jeweils nach 14 Tagen Kulturdauer, Messbalken 200 µm.

Die Fibrinkultur zeigte sowohl nach 14 Tagen als auch über den gesamten vierwöchigen Versuchszeitraum eine gleichmäßige Verteilung der Sehnenzellen auf dem PGA-Vlies.

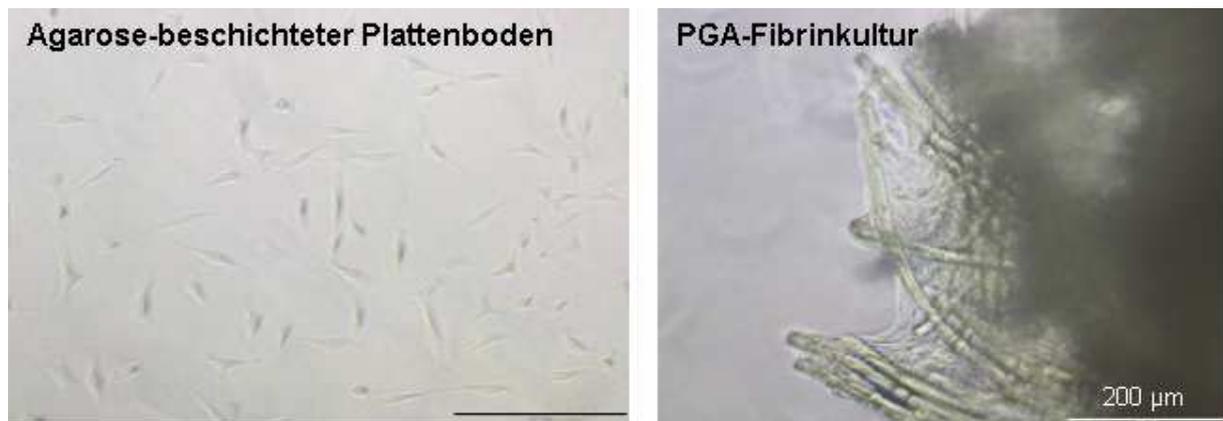
Es konnte in allen fibrinfixierten Ansätzen die Ausbildung von EZM zwischen den PGA-Fasern beobachtet werden, aus dem Vlies herausragende Biomaterial-Fasern waren stets mit Sehnenzellen bewachsen. Das lichtmikroskopische Bild der Zentrifugationskultur wies nach 14 Tagen Zellkonglomerate auf. Nach 28 Tagen erschienen diese Vliese dicht bewachsen und

von extrazellulärer Matrix (EZM) bedeckt. Die Rollerkulturen waren hingegen gekennzeichnet durch vereinzelte Zellaggregate, welche locker an den Biomaterial-Fasern hingen. Nach 4 Wochen waren die Vliese frei von Zellen.

In der dynamischen Besiedelung der Spinnerflasche waren nach 14 Tagen Kulturdauer ausgedehnte Zellcluster zu beobachten.

## 5.2 Beschichtung der Zellkulturplatten

Eine Abwanderung der Sehnenzellen aus den 3D-Kulturen auf die Zellkulturplastik konnte zu Beginn der Arbeiten dieses Projektes oft beobachtet werden. Es sollte daher eine Alternative gefunden werden, die den Zellverlust durch Abwanderung von den Konstrukten minimiert. Plattenbeschichtungen aus 2,5 % Alginate sowie aus 2 % Agarose wie auch die kommerziell erhältlichen Ultra-Low Attachment Platten wurden miteinander verglichen. Während nach sechs Tagen noch bei keiner Beschichtung Zellen auswanderten, konnten nach vier Wochen viele Zellen auf den Beschichtungen aus Alginate und im Besonderen aus Agarose beobachtet werden (Abb. 20).



**Abbildung 20 Lichtmikroskopischer Nachweis der Zellabwanderung aus den Konstrukten.** Der mit 2 % Agarose beschichtete Plattenboden der Petrischale (links), auf welchem die PGA-Fibrinkultur (rechts) 28 d kultiviert wurde. Auf der Plattenbeschichtung sind abgewanderte, adhärenzreiche, lapine Sehnenzellen erkennbar, Messbalken 200 µm.

Der Unterschied war die bessere Zellverträglichkeit des Alginatbodens gegenüber der Agarosebeschichtung.

Unterschiede zwischen den Alginatkonzentrationen konnten nicht beobachtet werden. Am besten schnitt die Ultra-Low Attachment Platte ab, jedoch war sie die teuerste Anwendung.

Die Sehnenzell-Konstrukte wurden entsprechend dieser Analyse auf Alginate beschichteten Platten gezüchtet.

### 5.1.2 Vitalität besiedelter Konstrukte in Abhängigkeit von der Besiedelungsstrategie

Einen Eindruck über die Vitalität der Zellen in den unterschiedlich besiedelten Konstrukten gewann man durch die Lebend-Tot-Färbung. Vitale Zellen erschienen grün, während tote Zellen aber auch unspezifisch gefärbte PGA-Fasern an einer roten Fluoreszenz zu erkennen waren.

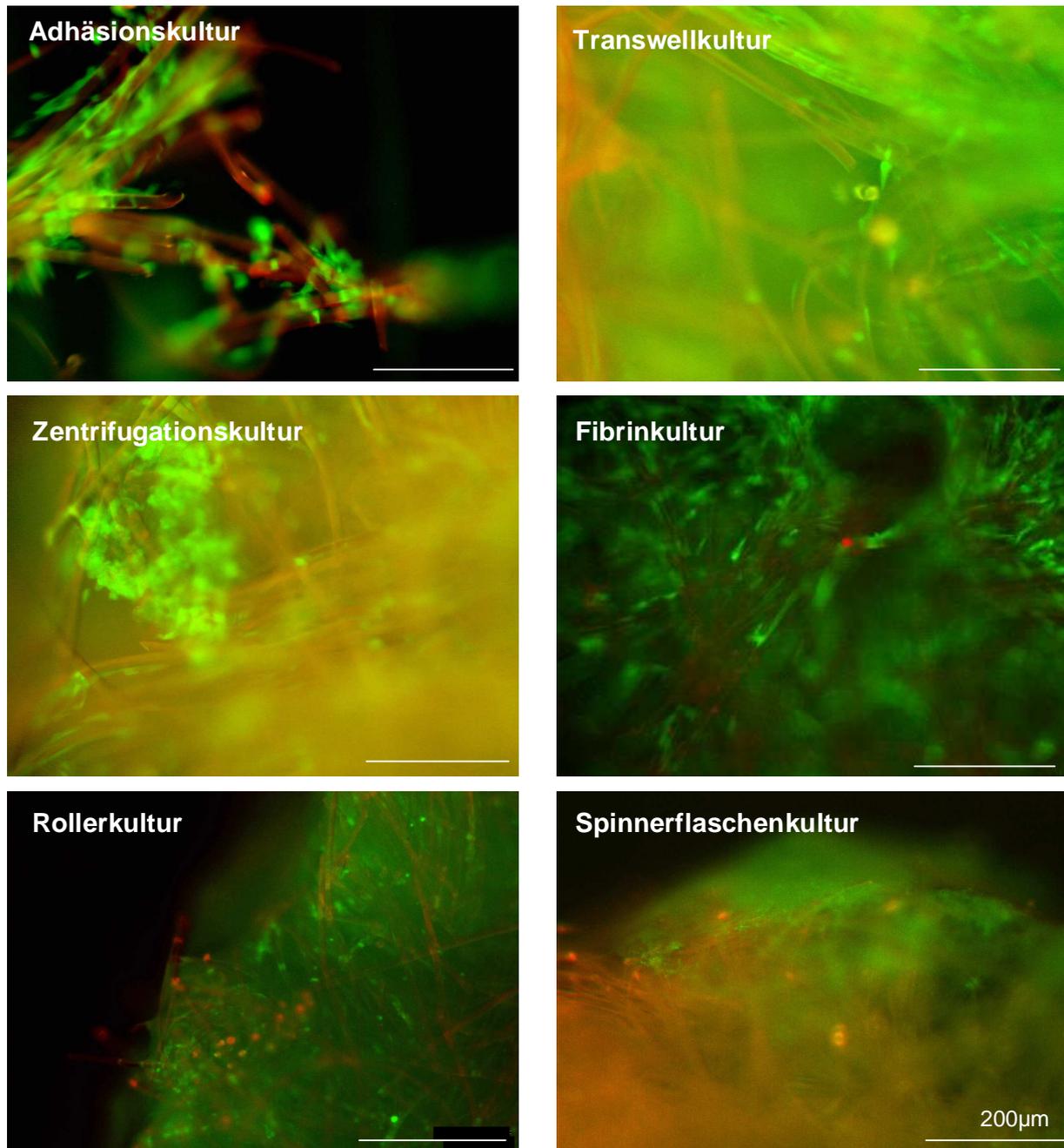
Die Vitalitätsfärbungen der Adhäsions- und Transwellkultur wiesen genau wie auch in der Lichtmikroskopie bereits zu Beginn der Kulturdauer kaum mehr Zellen auf und beinhalteten nach 21 Tagen nur wenig Areale mit vitalen Zellen (Abb. 21).

Die 3D-Kulturen, die durch Zentrifugation hergestellt wurden, offenbarten genauso wie in der Lichtmikroskopie Zellcluster aus jedoch vitalen Zellen.

Innerhalb der Fibrinkultur konnte man viele grün gefärbte Zellen entdecken, die die typischen Matrixsegelchen bildeten. Die Anzahl der toten Zellen war in allen angelegten Fibrinkulturen und zu allen Analysezeitpunkten sichtbar geringer als die der lebenden Zellen. Als weiteres wichtiges Charakteristikum konnte in diesem Kultursystem eine Zellproliferation im Laufe der Kulturdauer beobachtet werden (siehe auch Abb. 28).

Die Sehnenzell-Rollerkultur erwies sich als spärlich besiedelt aber mit guter Vitalität der wenigen Zellen.

Die Spinnerflaschenkultur zeigte lebende jedoch auch eine Vielzahl an toten Zellen.

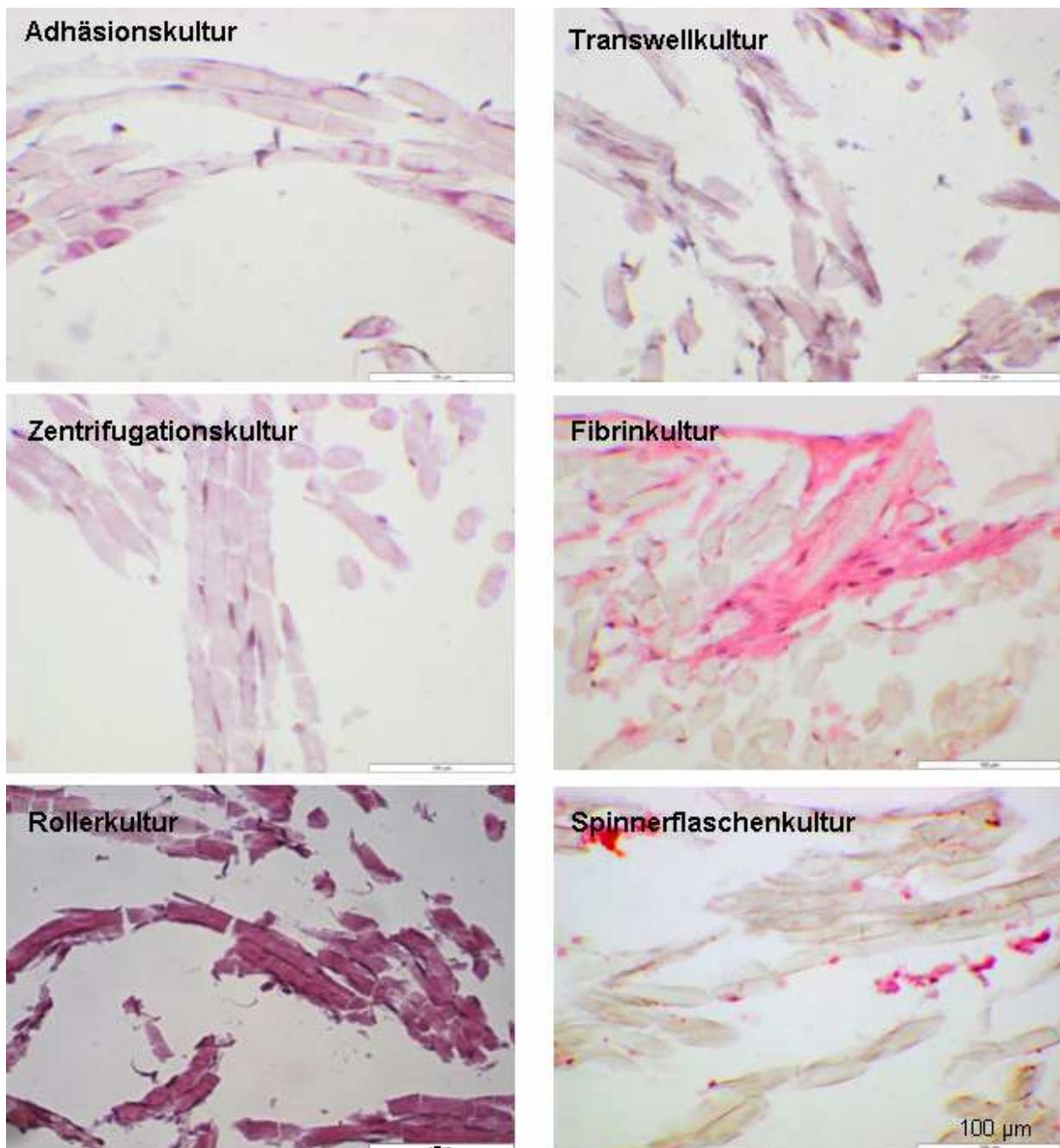


**Abbildung 21 Lebend-Tot-Färbung der Sehnzelle-PGA-Konstrukte mit unterschiedlichen Besiedlungsstrategien.** Adhäsionskultur, Transwellkultur, Zentrifugationskultur nach 21 Tagen, Fibrinkultur, Rollerkultur und Spinnerflaschenkultur nach 14 Tagen Kulturdauer, Messbalken 200 µm.

### 5.1.3 Histologie besiedelter Konstrukte in Abhängigkeit von der Besiedlungsstrategie

Es wurden an 10 µm Gefrierschnitten HE-Färbungen durchgeführt, um einen besseren Überblick über die Morphologie der 3D-Konstrukte zu gewinnen.

Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin violett anfärbt, das Zytoplasma, EZM wie auch die PGA-Fasern durch den Eosin-Farbstoff rosa. Die Anfertigung solcher Gewebeschnitte von 3D-Kulturen erwies sich jedoch als schwierig. PGA-Konstrukte, die wenig synthetisierte EZM enthielten, die die Biomaterial-Fasern zusammenhielt, zerissen beim Schneiden.



**Abbildung 22** Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Sehnenzell-PGA-Konstrukte mit unterschiedlichen Besiedlungsstrategien. Adhäsionskultur, Zentrifugationskultur, Transwellkultur nach 21 Tagen, Fibrinkultur, Spinnerflaschenkultur und Rollerkultur nach 28 Tagen Kulturdauer, Messbalken 100 µm.

Adhäsions-, Transwell- und Zentrifugationskultur offenbarten histologisch nach 21 Tagen Kulturdauer nur wenige Zellen auf den PGA-Fasern (Abb. 22). Es konnte in der HE-Färbung dieser Kultursysteme kaum EZM dargestellt werden.

Die Fibrinkultur wies nach 28 Tagen im Allgemeinen mehr Zusammenhalt der einzelnen Biomaterial-Fasern auf. Es konnten große Areale durch Matrix gebundener, zusammenhängender PGA-Fasern dokumentiert werden. Eine neu ausgeprägte EZM und Reste des Fibrinklebers waren in dieser Kulturform sehr gut erkennbar. Des Weiteren lagen degradierende, fragmentierte PGA-Fasern und länglich-ovale Sehnenzellkerne vor.

Die dynamische Roller-PGA-Kultur führte zu einer starken Degradation des PGA-Biomaterials, was an der starken, unspezifischen Farbstoffanlagerung und den Faserbruchstücken zu erkennen war. Die histologische Färbung der Spinnerflaschenkultur zeigte Adhäsionen von Sehnenzellen entlang der PGA-Fasern. Der Gehalt an Sehnenmatrix war jedoch sichtbar geringer gegenüber der Fibrinkultur.

Diese morphologischen und histologischen Analysen führten zur Selektion der Fibrinkultur als für Sehnenzellen geeignetes 3D-Kultursystem. Sie zeigte eine konstante und gleichmäßige Besiedelung des Trägermaterials bei relativ einfacher Herstellung. Des Weiteren war eine Synthese der typischen EZM in dieser Kulturform in allen Analysen deutlich detektierbar. Sie sollte im Folgenden mit der Sehne, der 2D-Kultur und der Massenzellkultur verglichen werden.

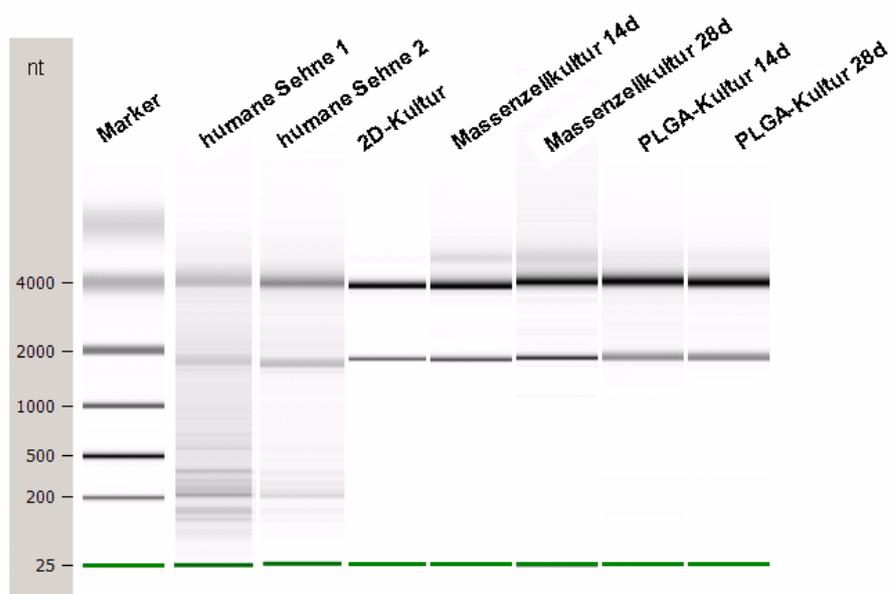
### 5.3 Genexpressionsanalysen

Die Analysen zur Genexpression wurden als sensitive Methode gewählt, um den Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf Sehnenzellen in den unterschiedlichen 2D- und 3D-Systemen zu identifizieren. Als Bezugspunkt sollte die native Sehne dienen.

Zunächst waren Kontrollen zur Qualität der isolierten RNA durchzuführen, sowie die Effizienz aller verwendeter PCR-Primer und deren Amplifikatgrößen zu bestimmen.

#### 5.3.1 RNA-Qualitätskontrolle

Mit Hilfe des RNA-Chip-Systems der Firma Agilent wurde über die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben deren Qualität bestimmt. Das Qualitätsmerkmal, die RNA-Integritätsnummer (RIN-Wert), wurde Gerät-intern aus dem Verhältnis der 18 und 28 S Bande in der Elektrophorese bestimmt. Für die PCR-Analysen kamen nur Proben in Frage, die einen RIN-Wert über 7 besaßen (Pfaffl 2001).

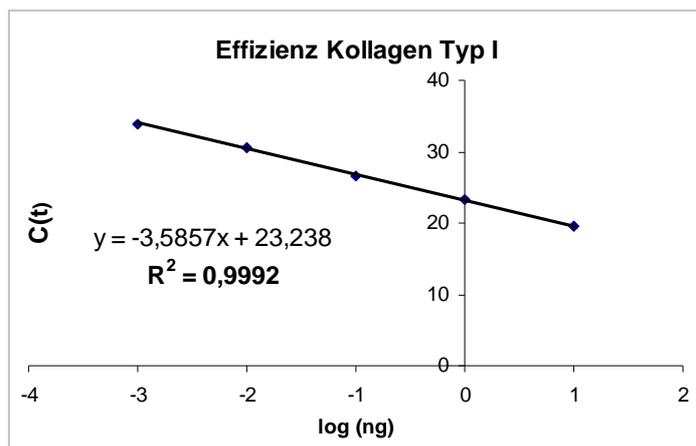


**Abbildung 23 Analyse der RNA-Proben mittels RNA-Chip-Systems.** Gelelektrophorese der isolierten RNA aus zwei humanen Sehnen, 2D-Kultur, 3D Massenzellkultur und 3D PLGA-Kultur nach 14 und 28 Tagen. Erkennbar sind die 18 und 28 S Banden Die grüne Bande stellte die Lauffront des Fluoreszenzmarkers dar.

Die in der Abbildung 23 exemplarisch dargestellten Proben wiesen alle- außer den humanen Sehnen- RIN-Werte über 7 auf. Die humanen Sehnenproben enthielten oft Degradationsprodukte, welche als zusätzliche Banden sichtbar wurde und konnten nicht für die PCR verwendet werden.

### 5.3.2 Effizienzbestimmung

Die verwendeten PCR-Primer für die Zielgene Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Decorin, COMP, Aggrecan, Scleraxis, Sox9,  $\beta$ 1-Integrin und HPRT mussten auf ihre PCR-Effizienz untersucht werden. Aus der graphischen Darstellung bzw. der Funktionsgleichung der Geraden wurde mit deren Anstieg die Effizienz ermittelt (Abb. 24). Zudem galt der Regressionskoeffizient als Gütemerkmal der Effizienzanalyse (Tab. 7).



**Abbildung 24** Darstellung einer Effizienz-Auswertung am Beispiel des Kollagen Typ I-Primers. Die C(t)-Werte des PCR-Laufes abgetragen gegen die logarithmierte Konzentration der eingesetzten cDNA in ng.

Es ergaben sich folgende Werte (Tabelle 7):

*Tabelle 7* Ermittelte PCR-Effizienzen aller verwendeten Primer für humane, kultivierte Sehnenzellen und Sehnen-Gewebeproben

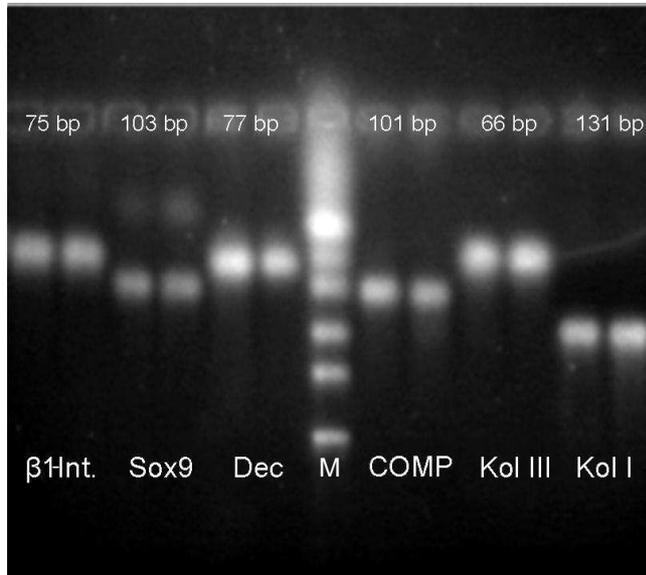
Effizienz Sehnenzellen <i>in vitro</i>		R <sup>2</sup>	Effizienz Sehne		R <sup>2</sup>
Kollagen Typ I	1,88	0,9953	Kollagen Typ I	1,9	0,9992
Kollagen Typ III	1,82	0,9964	Kollagen Typ III	1,95	0,9963
Decorin	1,85	0,9835	Decorin	1,85	0,9967
COMP	2,11	0,9985	COMP	2,1	0,9935
Scleraxis	1,9	0,9961	Scleraxis	1,87	0,9968
Aggrecan	2,03	0,9895	Aggrecan	1,87	0,9939
Sox9	1,96	0,9935	Sox9	2,11	0,9929
$\beta$ 1-Integrin	1,89	0,9831	$\beta$ 1-Integrin	1,9	0,9998
HPRT	1,97	0,9973	HPRT	1,98	0,9998

Diese Effizienzen wurden in der PCR-Kalkulation nach Pfaffl miteinbezogen (Pfaffl 2001).

### 5.3.3 Agarose-Gelelektrophorese als Qualitätskontrolle

Eine weitere PCR-Kontrolle sollte herangezogen werden, um die Größe des PCR-Amplifikates in Zweierbestimmung nachzuweisen. Das exemplarische Bild (Abb. 25) einer cDNA-Gelelektrophorese zeigte Proben, die mit  $\beta$ 1-Integrin-, Sox9-, Decorin-, COMP-, Kollagen Typ III- und I - Primern vervielfältigt wurden.

Außer beim Sox9 konnten in keiner Bahn Nebenprodukte nachgewiesen werden. Es war eine distinkte Bande zu erkennen. Mit Hilfe des GeneRuler-DNA-Markers konnten die Molekulargewichte der Amplifikate ermittelt werden. Sie stimmten mit den Angaben der Hersteller für die zu amplifizierenden Fragmente überein (vgl. Tab. 2).

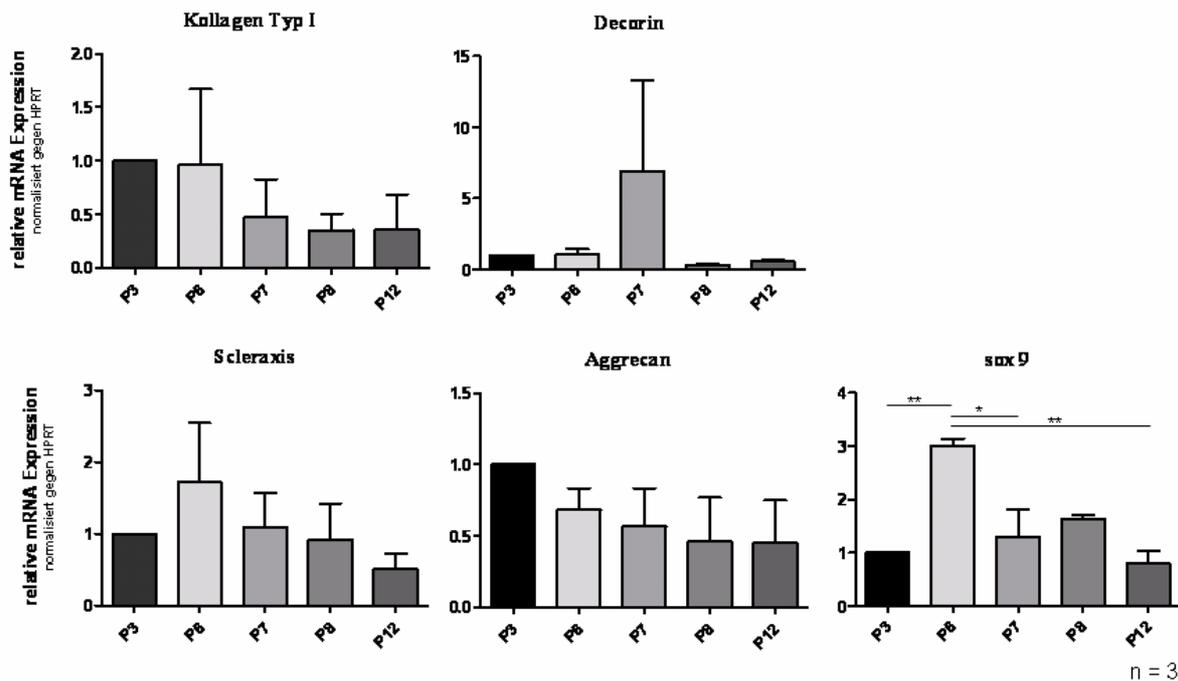


**Abbildung 25 cDNA Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten humaner Proben.** Von links: mit  $\beta$ 1-Integrin ( $\beta$ 1-Int.)-, Sox9-, Decorin (Dec)-, COMP-, Kollagen Typ III (Kol III)-, Kollagen Typ I (Kol I)- Primern gewonnene Amplifikate, M = Marker.

#### 5.3.4 Genexpression in der 2D-Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Humane Sehnenzellen wuchsen in der Zellkultur langsam. Es wurden mindestens sechs Passagen benötigt, um eine ausreichende Zellzahl für die 3D-Kulturen zur Verfügung zu haben. Bekannt ist, dass Zellen in der Zellkultur häufig ihren charakteristischen Phänotyp und ihre Genexpression verändern, d.h. dedifferenzieren.

Zu ermitteln war, der Einfluss der Kulturdauer bzw. der Passagenzahl auf die Genexpression. Dafür wurde in diesem Versuch die Genexpressionen humaner Hamstring-Sehnenzellen dreier verschiedener Patienten in den Passagen 3- 12 genauer analysiert. Die Genexpression für typische Sehnenmatrixkomponenten wie Kollagen Typ I, Decorin oder Scleraxis als Sehnen-Transkriptionsfaktor wurde betrachtet. Ebenso wurde Augenmerk auf Knorpel-Matrixkomponenten (Aggrecan, Sox9) gelegt, um eine mögliche Transdifferenzierung der Sehnenzellen in Richtung Knorpel identifizieren zu können. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) wurde in allen PCR-Analysen als interne Kontrolle (Housekeeping-Gen) geführt (Abb. 26).



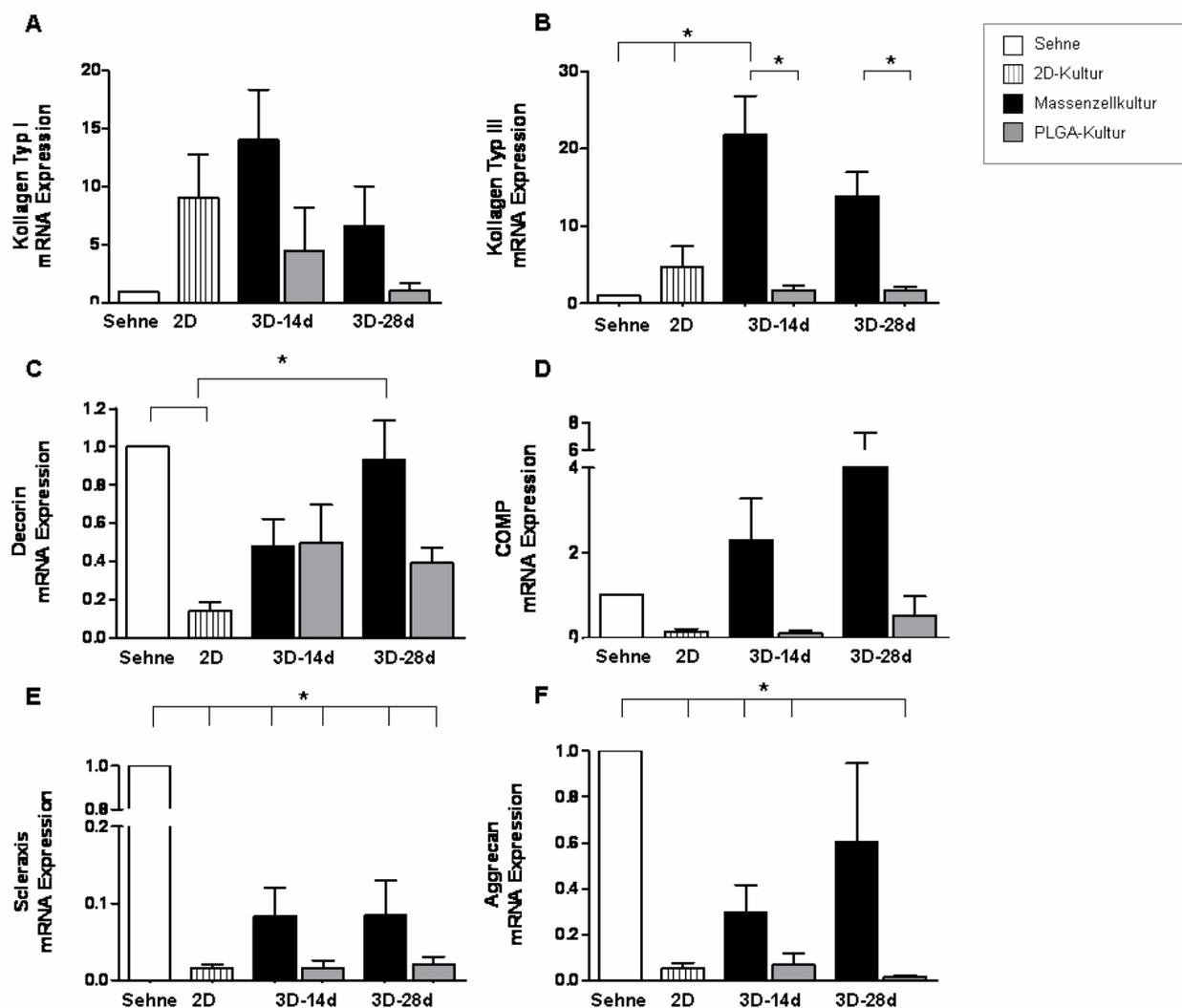
**Abbildung 26 Relative Genexpression humaner Sehnzellen in unterschiedlichen Monolayer Passagen.** Gegen das Referenzgen, HPRT, normalisierte Genexpression für Kollagen Typ I, Decorin, Scleraxis, Aggrecan und Sox9 von humanen Hamstring-Sehnzellen der Passagen 3, 6, 7, 8, und 12. Mittelwert und SEM \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

Weder in der Genexpression der Hauptmatrixkomponenten Kollagen Typ I, des wichtigen Proteoglykans Decorin, des „Sehnenmarkers“ Scleraxis noch des Knorpel-Matrixproteins Aggrecan konnte eine signifikante Abweichung innerhalb der Passagen 3- 12 aufgedeckt werden. Sox9, ein chondrogener Transkriptionsfaktor, hingegen war in seiner Genexpression in Passage 6 signifikant gegenüber der dritten, jedoch auch der siebenten und zwölften Passage erhöht.

### 5.3.5 Genexpression in Abhängigkeit vom Kultursystem (2D/ 3D) im Vergleich zur Sehne

Im Vergleich zur nativen Sehne sollte dokumentiert werden, welchen Einfluss die Kultivierung der Sehnzellen in der 2D- und 3D-PLGA-Kultur auf deren Genexpression hat. Alle Diagramme zeigen die relative mRNA-Expression bezogen auf die Sehne und normalisiert gegen das Referenzgen HPRT (Abb. 27).

Zu bemerken war eine deutliche Veränderung der Genexpression aller untersuchten Zielgene zwischen Sehne und 2D-Kultur.



**Abbildung 27 Relative Genexpression extrazellulärer Matrixkomponenten und des Transkriptionsfaktors Scleraxis in der Sehne im Vergleich zu 2D- und 3D-Kulturen.** Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Genexpression von (A) Kollagen Typ I, (B) Kollagen Typ III, (C) Decorin, (D) COMP, (E) Scleraxis, (F) Aggrecan ermittelt durch real-time RT PCR, normalisiert auf intaktes Sehngewebe, Referenzgen HPRT, \* $p \leq 0,05$ ,  $n \geq 3$ .

Die Genexpression von Kollagen Typ I war in allen *in vitro*-Kulturen höher als in der Sehne. Gerade in der 2D-Kultur war eine starke Erhöhung gegenüber der Sehne zu beobachten. Diese Expressionssteigerung konnte jedoch durch Einbringen der Zellen in eine 3D-Kultur, gerade in der Biomaterial-Kultur, nach 28 Tagen wieder gesenkt werden (Abb. 27A). Das Expressionslevel der PLGA-Kultur nach 28 Tagen war dem der Sehne angenähert.

Die Kollagen Typ III-Genexpression war wieder signifikant in der Monolayer-Kultur zur Sehne erhöht.

Kollagen Typ III wurde in der Massenzellkultur in seiner Genexpression um ein Vielfaches gesteigert, sank aber nach 28 Tagen wieder ab. In der PLGA-3D-Kultur verblieb Kollagen Typ III auf einem ähnlichen Expressionslevel wie in der Sehne (Abb. 27B).

Bei der Bewertung von Decorin, einem wichtigen Proteoglykan der Sehne, fiel eine signifikante Reduktion in der 2D-Kultur auf. Durch die 3D-Kultivierung der Sehnenzellen ließ sich die Genexpression wieder in Richtung Sehne steigern (Abb. 27C). In der Massenzellkultur nach 28 Tagen war diese Erhöhung gegenüber der 2D-Kultur signifikant.

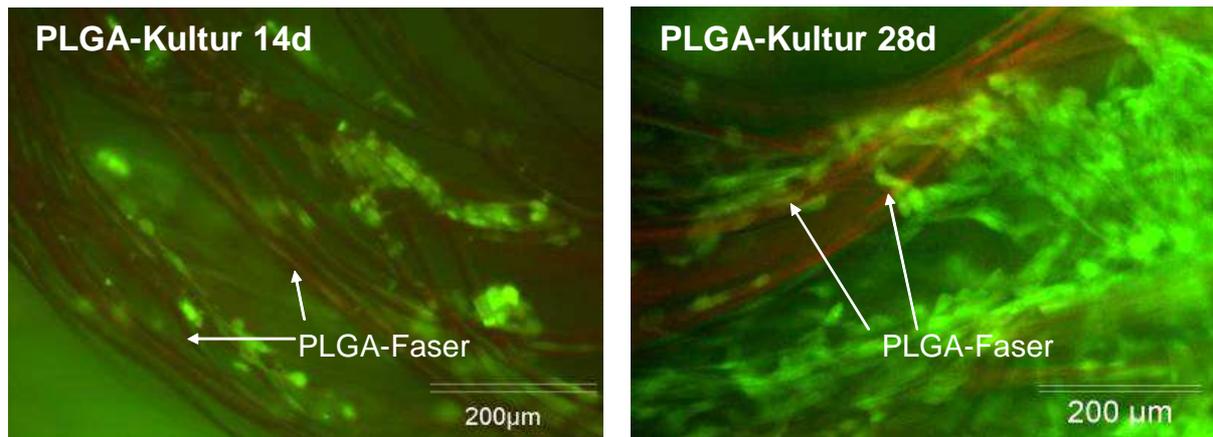
COMP, als typisches Knorpelmatrixprotein, welches auch in der Sehne exprimiert wird, zeigte in der 2D-Kultur aber auch in der PLGA-Kultur nach 14 Tagen eine Reduktion der relativen mRNA-Menge gegenüber dem Sehngewebe. Die Massenzellkultur hingegen führte zu einer Steigerung nach 14 und besonders nach 28 Tagen (Abb. 27D). Die PLGA-Kultur zeigte nach 28 Tagen eine der Sehne ähnliche Genexpression.

Scleraxis, als Transkriptionsfaktor der Sehne, war in allen angelegten Proben signifikant gegenüber dem Gewebe reduziert, konnte aber unter 3D-Bedingungen leicht induziert werden (Abb. 27E).

Das Knorpelmatrixprotein Aggrecan war in allen Proben im Vergleich zur Sehne in seiner Expression reprimiert, stieg nur in der Massenzellkultur im Kulturverlauf an (Abb. 27F).

#### **5.4 Vitalität der 3D-PLGA-Kulturen**

Vor den histologischen Färbungen und den Proteinexpressionsstudien sollte die Vitalität der Sehnenzellen auf dem neuen PLGA-Biomaterial untersucht werden. Lebend-Tot-Färbungen der PLGA-Vliese aller 4 Spender bewiesen eine zelldichte Besiedelung der gesamten PLGA-Fläche mit einer hohen Vitalität der Zellen. Ebenso konnte im Laufe der Kultivierung von 2 zu 4 Wochen eine Proliferation, d. h. Zellvermehrung, (Abb. 28) beobachtet werden.



**Abbildung 28 Lebend-Tot-Färbung der PLGA-Konstrukte.** PI-FDA-Färbung der humanen PLGA-Fibrinkultur nach 14 und 28 Tagen. Messbalken 200  $\mu\text{m}$ .

### 5.5 Histologische und immunhistologische Ergebnisse in Abhängigkeit vom Kultursystem (2D/ 3D) im Vergleich zur Sehne

Die Morphologie der humanen Hamstringsehne, der 2D-Kultur sowie der 3D-Massenzellkultur und 3D-PLGA-Kultur nach jeweils 14 und 28 Tagen wurde durch HE-Färbungen überprüft (Abb. 29).

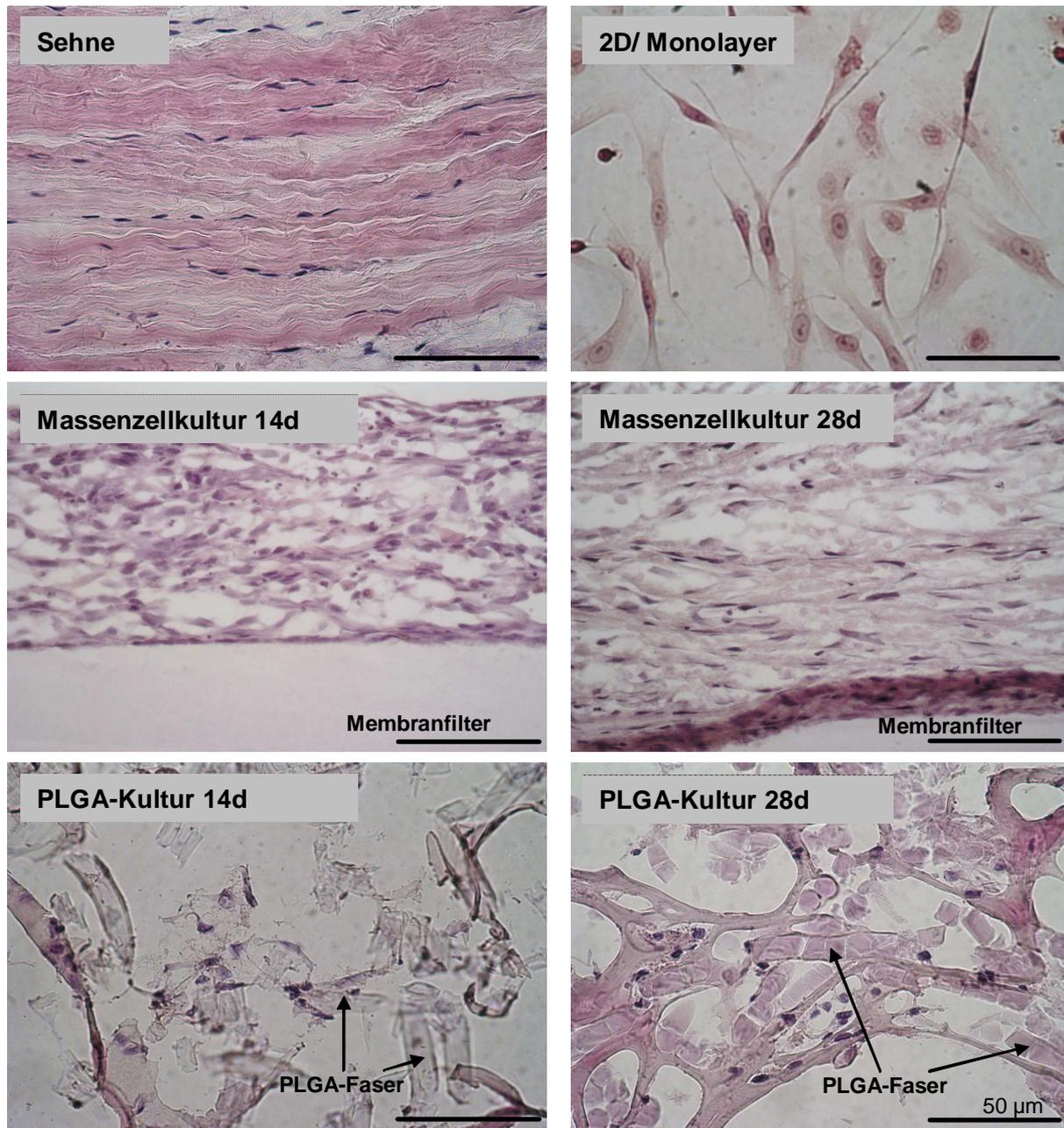
Die Sehne war gekennzeichnet durch wellenförmig angelegte Kollagenfasern, die die uniaxial ausgerichteten Sehnenzellen enthielten. Die kleinen Zellkerne der Sehnenzellen waren oval und lang gestreckt.

In der Monolayer oder 2D-Kultur waren die Zellen größer, ungerichtet, hatten zumeist rundlich-ovale Zellkerne und den typischen spindelförmigen Zellkörper mit langen Zellfortsätzen. Extrazelluläre Matrix konnte nicht detektiert werden.

Die Massenzellkultur, als Trägermaterial-freie Kultur, diente der Charakterisierung der Zellen, wenn Zell-Zellkontakte gegeben waren aber die Interaktion der Zelle zur Matrix zu Beginn der Kulturzeit fehlte. Die Sehnenzellen lagen pelletiert auf einem Membranfilter an der Medium-Luft-Grenze. Nach 14 Tagen besaßen die Zellen einen runden Zellkern und keine Orientierung, nahmen aber nach 28 Tagen besonders in der unteren Zellschicht des Pellets eine Längsausrichtung mit ausgestreckter Zellform und länglichen Kernen an. Die Synthese der Sehnenmatrix konnte besonders nach 28 Tagen beobachtet werden. Es waren mehr Zellen im Vergleich zur Sehne enthalten.

Innerhalb der PLGA-Kultur wuchsen Sehnenzellen mit runden Zellkernen entlang der Fasern. Es war jedoch zu erkennen, dass sie EZM bildeten.

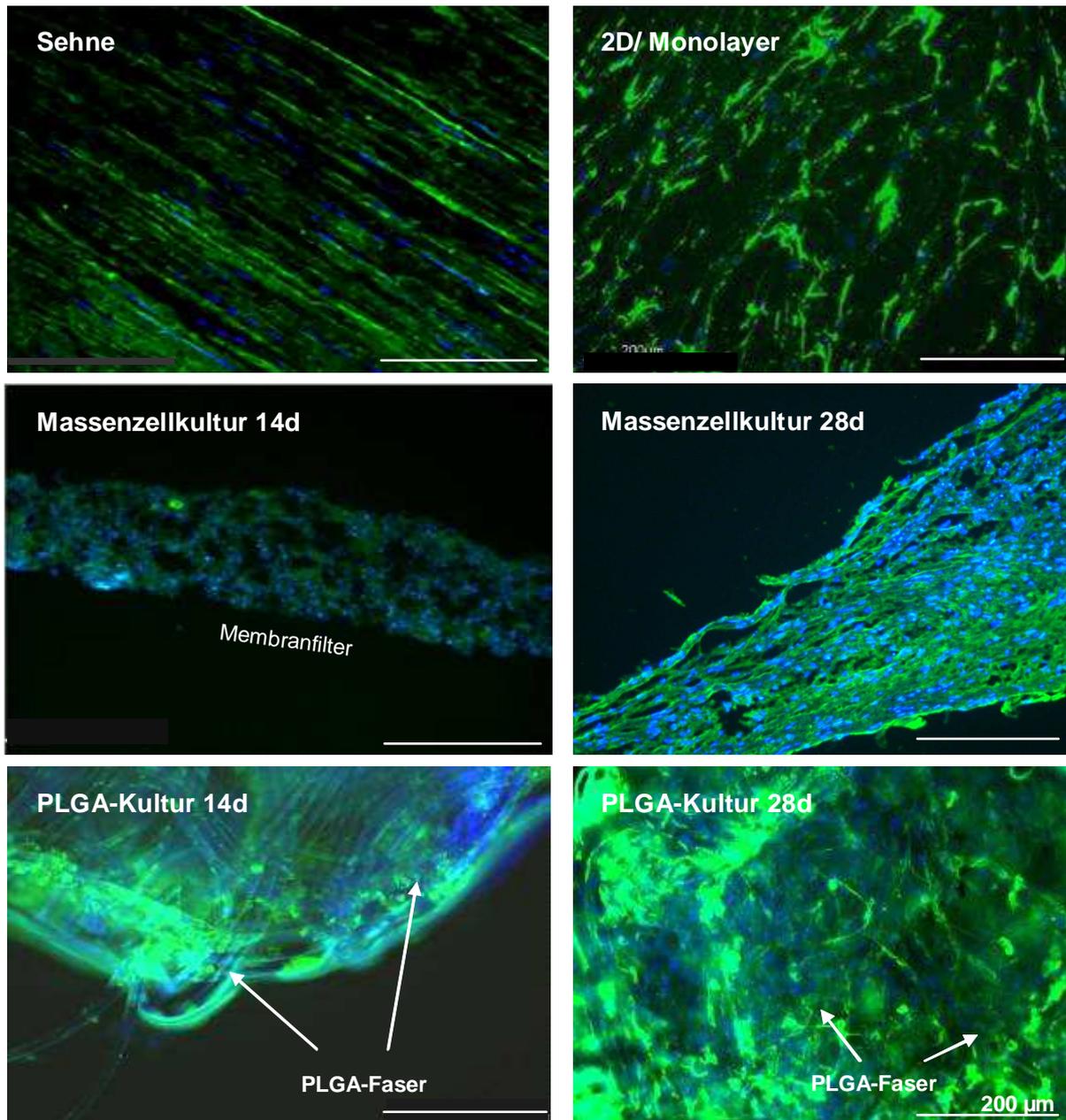
Nach 28 Tagen war außerdem die Degradation der Biomaterial-Fasern detektierbar. Eine lineare Ausrichtung der Zellen war durch die Geometrie des Biomaterials nicht möglich.



**Abbildung 29 HE-Färbung von Sehne und Sehnenzellen in 2D- und 3D-Kultur.** HE-Färbung einer humanen Hamstringsehne, einer 2D-Kultur, einer Massenzellkultur wie einer PLGA-Kultur nach 14 und 28 Tagen an Gefrierschnitten, Messbalken 50 µm.

Um ein genaueres Bild der Matrixausbildung in den verschiedenen Kultursystemen und den Interaktionen der Zellen zum Biomaterial zu erlangen, wurden immunhistologische Färbungen der Komponenten Kollagen Typ I und II,  $\beta$ 1-Integrin und Vinculin an Gewebeschnitten und an mit Sehnenzellen besiedelten Glasplättchen als 2D-Kultur durchgeführt.

Abbildung 30 präsentiert den Immunfluoreszenz-Nachweis von Kollagen Typ I.



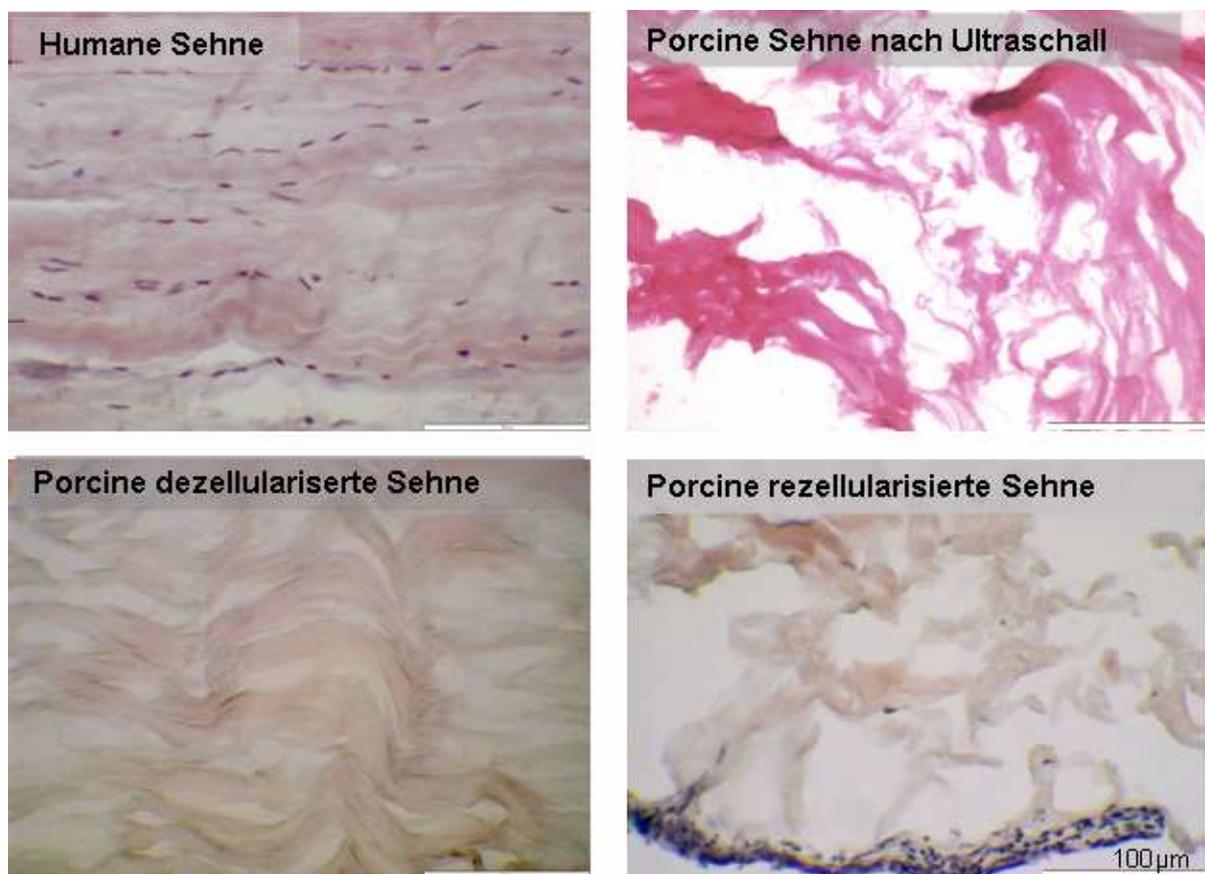
**Abbildung 30 Immunhistologischer Nachweis der Kollagen Typ I-Proteinexpression.** Kollagen Typ I-Proteinexpression der Sehne und 2D-Kultur im Vergleich zur 3D-Massenzellkultur und 3D-PLGA-Fibrinkultur nach jeweils 14 und 28 Tagen. Messbalken 200 µm.

Während die Sehne parallel verlaufende Kollagenfaserbündel mit eingebetteten Sehnenzellen offenbart, fand man in beiden 3D-Kulturen und zu allen Versuchszeitpunkten Kollagen Typ I ohne Orientierung. Im Vergleich der Massenzellkultur und PLGA-assoziierten Kultur nach 14 Tagen mit dem späteren 28-Tage-Zeitpunkt konnte eine Erhöhung der zellassoziierten, netzartigen Kollagen Typ I-Expression festgestellt werden. Ebenfalls konnten Kollagen Typ II wie auch  $\beta$ 1-Integrin und Vinculin innerhalb der PLGA-Konstrukte immunmarkiert werden.

Die Knorpel-typische Kollagen Typ II-Expression war zu beiden Zeitpunkten und in allen Kultursystemen schwach.  $\beta$ 1-Integrin, als Adhäsionsmolekül zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix aber auch Vinculin als intrazellulärer Bestandteil der Zell-Matrix-Interaktion waren dagegen deutlich zu erkennen (nicht gezeigt). Expressionsunterschiede ließen sich zwischen den Zeitpunkten jedoch nicht detektieren.

### 5.6 Dezellularisierte porcine Sehnenmatrix als Trägermatrix

Grundgedanke dieser Arbeiten war, neben synthetischen Trägermaterialien wie PGA und PLGA eine natürliche Sehnenmatrix als Trägermaterial für die humanen Sehnenzellen zu testen.



**Abbildung 31** Histologische Untersuchung der De- und Rezellularisierung im Vergleich zur gesunden Sehne. HE-Färbung von humaner, intakter Hamstringsehne; porciner, zellfreier, dezellularisierter Achillessehne mit und ohne Ultraschallbehandlung und mit humanen Hamstringsehnenzellen rezellularisierter porciner Achillessehne, Messbalken 100  $\mu$ m.

Um spätere immunologische Abstoßungsreaktion *in vivo* bei Transplantation der rezellularisierten Sehnenmatrix zu verhindern, wurden zunächst alle ursprünglichen Sehnenzellen aus dem Gewebe entfernt.

Der Erfolg dieser Arbeitsschritte wurde vor der Rezellularisierung anhand von HE-Färbungen überprüft (Abb. 31). Es wurden keine Zellkerne bzw. keine Zellen innerhalb der Sehnenmatrix nach der Dezellularisierung gefunden.

Schwierig war, eine gleichmäßige Neubesiedelung mit humanen Sehnenzellen zu erreichen. Hierfür wurden Ultraschallimpulse für 45 Sekunden bei 70 W und 50 % Amplitude eingesetzt, um die Matrix aufzulockern und für die neuen Zellen besser zugänglich zu machen. Jedoch musste festgestellt werden, dass die kollagenen Fasern ihre Längsausrichtung verloren. Es fand sich nur noch eine ungeordnete Matrix. Daher wurde ohne Ultraschall weitergearbeitet.

Die Neubesiedelung oder Rezellularisierung der Sehne geschah über verschiedene Strategien wie z.B. Injektion der Zellsuspension in die Sehne, Zentrifugation der Zellen in die Matrix, Inkubation in der Zellsuspension oder via Adhäsionskultur.

Leider konnte stets nur der Randbereich der Matrix und die aufgelockerten Kollagenfaserbündel mit Zellen besiedelt werden. Die kompakte Sehnenmatrix konnte mit keiner Besiedelungsstrategie erfolgreich von den Zellen durchdrungen werden, sie blieb in den Versuchen weitestgehend zellfrei.

Es wurde zudem ein Verlust der in die kollagene Matrix eingebrachten Zellen während der weiteren Kultivierung der neu-besiedelten Sehnenmatrix im Lauf der Versuchszeit beobachtet. Nach mehreren Versuchsdurchläufen mit nur mäßigem Erfolg wurde die natürliche Sehnenmatrix als Biomaterial im Rahmen dieses Projektes nicht weiter verfolgt.

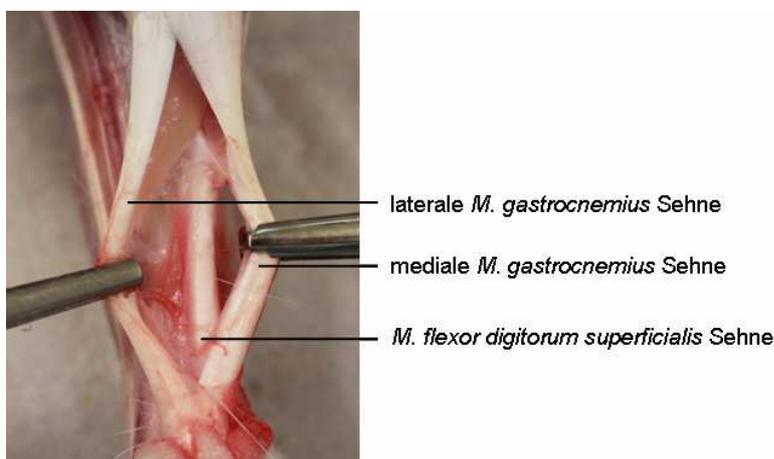
## **5.7 Evaluation der Speziesunterschiede in Morphologie und Anatomie**

In Vorbereitung eines Tiermodells im Kaninchen wurden die Sehnenzellen des Kaninchens mit den humanen verglichen. Während der Explantationskultur fiel auf, dass lapine Sehnenzellen in der Zellkultur insgesamt einen kleineren Zellkörper und kürzere Zellfortsätze gegenüber den humanen Zellen besaßen (Abb. 32). Weiterhin ließ sich insgesamt eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber den humanen Sehnenzellen beobachten.



**Abbildung 32 Speziesabhängiger Morphologievergleich der Zellen während der Explantationskultur.** Auswandernde Sehnenzellen aus humanen und lapinen Sehngewebestücken, Messbalken 200 µm.

Die Kaninchen-Achillessehne wies anatomische Unterschiede zur humanen auf. Der lapine Achillessehnenkomplex bestand dabei aus der medialen und lateralen *M. gastrocnemius* Sehne und der *M. flexor digitorum superficialis* Sehne, welche durch Para- und Peritenon voneinander getrennt vorlagen (Abb. 33). Der Fersenbein-Wadenmuskel Abstand betrug etwa 3- 4 cm.



**Abbildung 33 Lapine Anatomie des freigelegten Achillessehnenkomplexes.** Laterale und mediale *M. gastrocnemius* Sehne und *M. flexor digitorum superficialis* Sehne beim Kaninchen.

## 5.8 Tierversuchsmodell

### 5.8.1 Versuchsdesign

30 Kaninchen wurden in den Versuch miteinbezogen. Anhand von 2 Spendertieren wurden mit allogenen Sehnenzellen die PGA-Transplantate hergestellt.

Vor Beginn des Hauptversuches wurde zusätzlich an 4 Tieren, zwei 6-Wochen- und zwei 12-Wochen-Tiere, das Sehnendefektmodell etabliert.

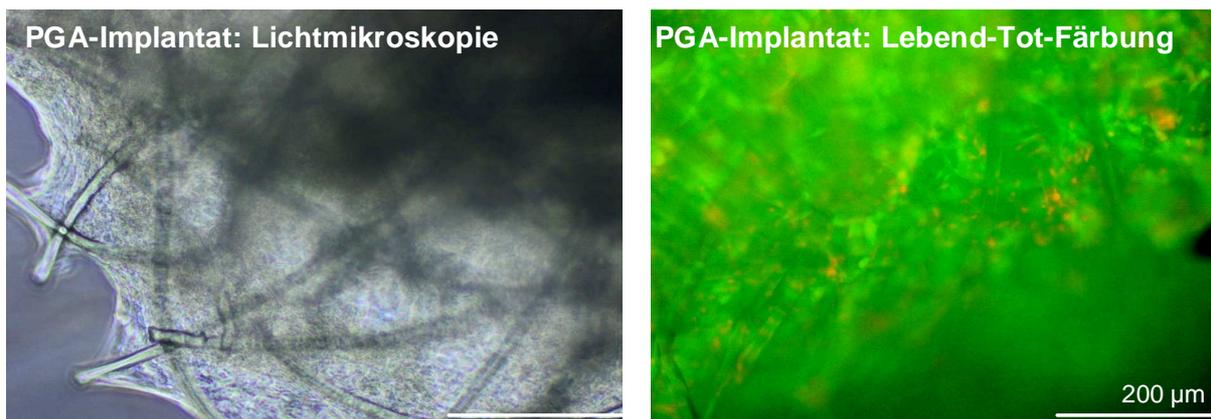
Das mittlere Körpergewicht der Tiere lag bei 3,2 kg (2,7 bis 3,8 kg). Drei verschiedene Versuchsgruppen wurden gewählt und jeweils 4 Tiere pro Zeitpunkt zugeordnet. Der Leerdefekt beinhaltete den unbehandelten 3 mm gestanzten Defekt in der medialen *M. gastrocnemius* Sehne und sollte den Selbst-Heilungsprozess abbilden. Die PGA-Implantation sollte den stabilisierenden Effekt des Biomaterials wie auch den Fibrineffekt erkennen lassen. Das mit lapinen, allogenen Sehnenzellen besiedelte Konstrukt stellte die Hauptgruppe des Tierversuches dar.

### 5.8.2 Qualitätsanalyse des zu implantierenden Konstruktes

Um sicherzustellen, dass nur kompakt besiedelte PGA-Vliese mit vitalen Zellen in die Kaninchensehne implantiert wurden, wurden mikroskopische Analysen und Lebend-Tot-Färbungen der Konstrukte durchgeführt.

Lapine Sehnenzellen wurden über 3 Passagen expandiert und mit Hilfe von Fibrinkleber in der vierten Passage auf dem PGA fixiert.

Nach 7 Tagen *in vitro*-Kultivierung waren ausgeprägte Matrixsegel zwischen den herausragenden Biomaterial-Fasern zu erkennen. Die Zellen wiesen zudem einen spindelförmigen Zellkörper auf (Abb. 34). Die Vitalitätsfärbung offenbarte mehrheitlich grün fluoreszierende, vitale und nur wenige tote Zellen.



**Abbildung 34 Qualitätsanalyse eines Implantates.** PGA-Vlies am Tag der Implantation (7 Tage *in vitro*-Kultivierung) in Lichtmikroskopie und Lebend-Tot-Färbung, Messbalken je 200 µm.

### 5.8.3 Bewertung des Tierversuches mittels makroskopischem Score

Die Heilung des 3 mm großen Sehnendefektes wurde nach 6 und 12 Wochen mit dem Makroscore (Tab. 4) analysiert.

3 Wochen nach der Operation wurde bei jedem Tier begutachtet, ob Lahmheit oder eine tastbare Schwellung der Achillessehne vorlagen. Diese Beobachtung floss in die Bewertung des makroskopischen Scores ein. Es konnten bei keinem Tier Störungen im Bewegungsablauf oder eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens festgestellt werden.

Am Tag der Euthanasie wurden alle weiteren Merkmale mit dem Score bewertet und die Gesamtpunktzahl bestimmt. Die Photographien der rasierten Hinterläufe der Versuchstiere belegten den ersten Eindruck (Abb. 35).

Die Kontrollsehnen (jeweils rechts im Bild) erschienen in allen Gruppen weiß glänzend mit glatter Oberfläche und gegeneinander verschiebbaren, einzelnen Sehnensträngen.

Im Leerdefekt nach 6 Wochen hingegen war meist eine deutliche Schwellung, eine höckerige raue Oberfläche der operierten aber auch der benachbarten *M. gastrocnemius* Sehne zu beobachten. Es traten bei allen Tieren Verwachsungen und Adhäsionen zwischen dem operierten, medialen Sehnenstrang mit dem Paratenon, der Faszie und ggf. der Haut auf.



**Abbildung 35 Lapine Hinterläufe am Tag der Explantation.** Von links nach rechts: Leerdefekt, zellfreies PGA-Fibrin-, und Sehnenzell-PGA-Implantat jeweils (links) operierter Achillessehnenkomplex und (rechts) Kontrolle zum 6-Wochen-Zeitpunkt.

Bei den zellfreien PGA-Implantationen fand man ebenfalls häufig Adhäsionen. Insgesamt konnte bei den eingenähten Biomaterial-Konstrukten ein über dem Niveau der Sehne stehender Defekt erkannt werden.

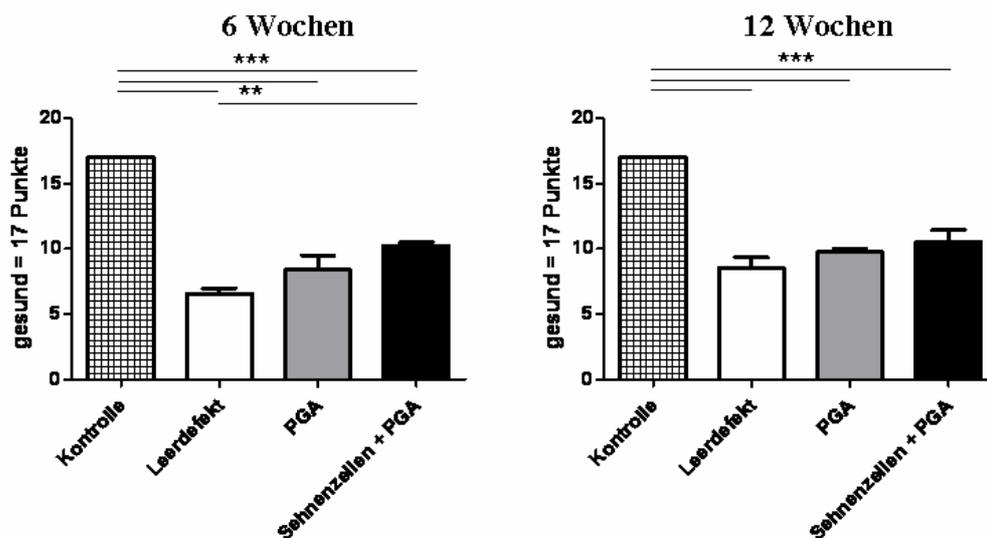
Das mit Achillessehnenzellen besiedelte Implantat nach 6 Wochen hingegen wirkte weniger geschwollen und die Sehne mit dem umgebenden Gewebe weniger verwachsen.

In allen Gruppen war der ursprünglich 3 mm runde Defekt am Tag der Explantation schmaler und verlängert.

Nach 12 Wochen Heilungsphase und mit zunehmender Degradation des Biomaterials lieferte das Sehnenzell-PGA-Vlies die makroskopisch besten Ergebnisse.

Die graphische Darstellung der Scorepunktzahlen aller Tiere nach 6 (Abb. 36 links) und 12 Wochen (Abb. 36 rechts) sind im Folgenden abgebildet.

Als Kontrolle diente die nicht operierte Achillessehne des rechten Hinterlaufes. Sie erreichte die höchste und maximale Punktzahl. Kaninchen, deren Sehnendefekt unbehandelt blieb, erreichten nach 6 Wochen die wenigsten Punkte. Die Implantation des PGA-Fibrin-Konstruktes erhöhte das Score-Ergebnis und durch Einbringen von autologen Sehnenzellen im Konstrukt konnten die meisten Punkte erreicht werden. Die Werte der Sehnenzell-PGA-Gruppe waren außerdem signifikant höher als die des Leerdefektes. Jedoch erlangten alle Gruppen signifikant weniger Scorepunkte als die gesunde Kontrolle ( $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 36 Auswertung des makroskopischen Scores nach 6 und 12 Wochen.** Ergebnisse des makroskopischen Scores nach 6 und 12 Wochen, dargestellt sind Mittelwerte und SEM, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

Die Tendenz, dass das mit Sehnenzellen besiedelte PGA-Vlies der Kontrolle am ähnlichsten war, blieb auch bei den 12-Wochen-Tieren bestehen. Die Punktzahl fiel im Allgemeinen in allen Versuchsgruppen höher aus als nach 6 Wochen, war jedoch weiterhin signifikant geringer als in der Kontrolle.

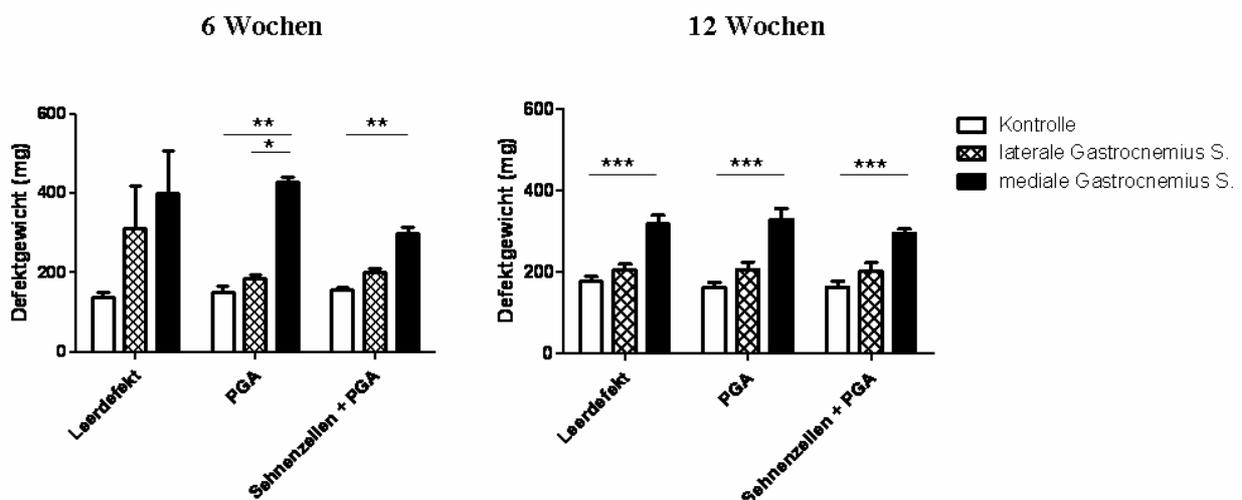
### 5.8.4 Bewertung des Tierversuches mittels der Sehnengewichte

Ein weiteres Beurteilungskriterium für die Sehnenheilung nach der Sehnenoperation war das Gewicht der Sehnen-Explantate. Das Gewebe wurde *post mortem* entnommen, auf genau 3 cm zugeschnitten und gewogen. Abbildung 37 stellt die Sehnengewichte 6 und 12 Wochen nach der Sehnenoperation der einzelnen Versuchsgruppen in mg dar.

Zusätzlich zur operierten medialen *M. gastrocnemius* Sehne des Achillessehnenkomplexes wurde auch das Gewicht der benachbarten, lateralen *M. gastrocnemius* Sehne aufgelistet und ebenfalls mit der rechten Kontrollsehne verglichen.

Während die Kontrollsehnen in allen Gruppen und zu beiden Zeitpunkten annähernd gleich viel wogen, hatten die behandelten medialen Sehnen das größte Gewicht innerhalb der jeweiligen Gruppe.

Besonders in der Leerdefekt-Gruppe zeigte sich nach 6 Wochen eine starke Erhöhung des Gewichtes der nicht-operierten Nachbarsehne. Die Differenz zwischen rechter Kontrolle und implantierter Sehne war beim 6-Wochen-Zeitpunkt am geringsten, wenn ein besiedeltes PGA-Konstrukt implantiert wurde.



**Abbildung 37 Sehnengewichte 6 und 12 Wochen nach der Sehnen-Operation in mg.** Gewichte der operierten, medialen und der benachbarten lateralen *M. gastrocnemius* Sehne sowie der jeweiligen Kontrollsehne, Mittelwert und SEM abgebildet, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ . S.: Sehne.

12 Wochen nach der Sehnenoperation wiesen alle Versuchsgruppen vergleichbare und insgesamt niedrigere Werte auf. Die operierte Sehne war stets signifikant schwerer als die Kontrolle ( $p \leq 0,001$ ).

### 5.8.5 Bewertung des Tierversuches mittels histologischem Score

Der Histoscore basiert auf der Auswertung der HE- und AB-Färbungen (Tab. 5) der paraffinierten Gewebeschnitte.

Die HE-Färbung der intakten Kontrollsehne (Abb. 38) zeigte eine dichte Kollagenmatrix, mit wellenförmig angelegten Kollagenfasern. Zwischen den Fasern lagen in Längsrichtung die Sehnenzellen, erkennbar durch den dunkleren, violetten, länglichen Zellkern. Der Zellgehalt war gering.

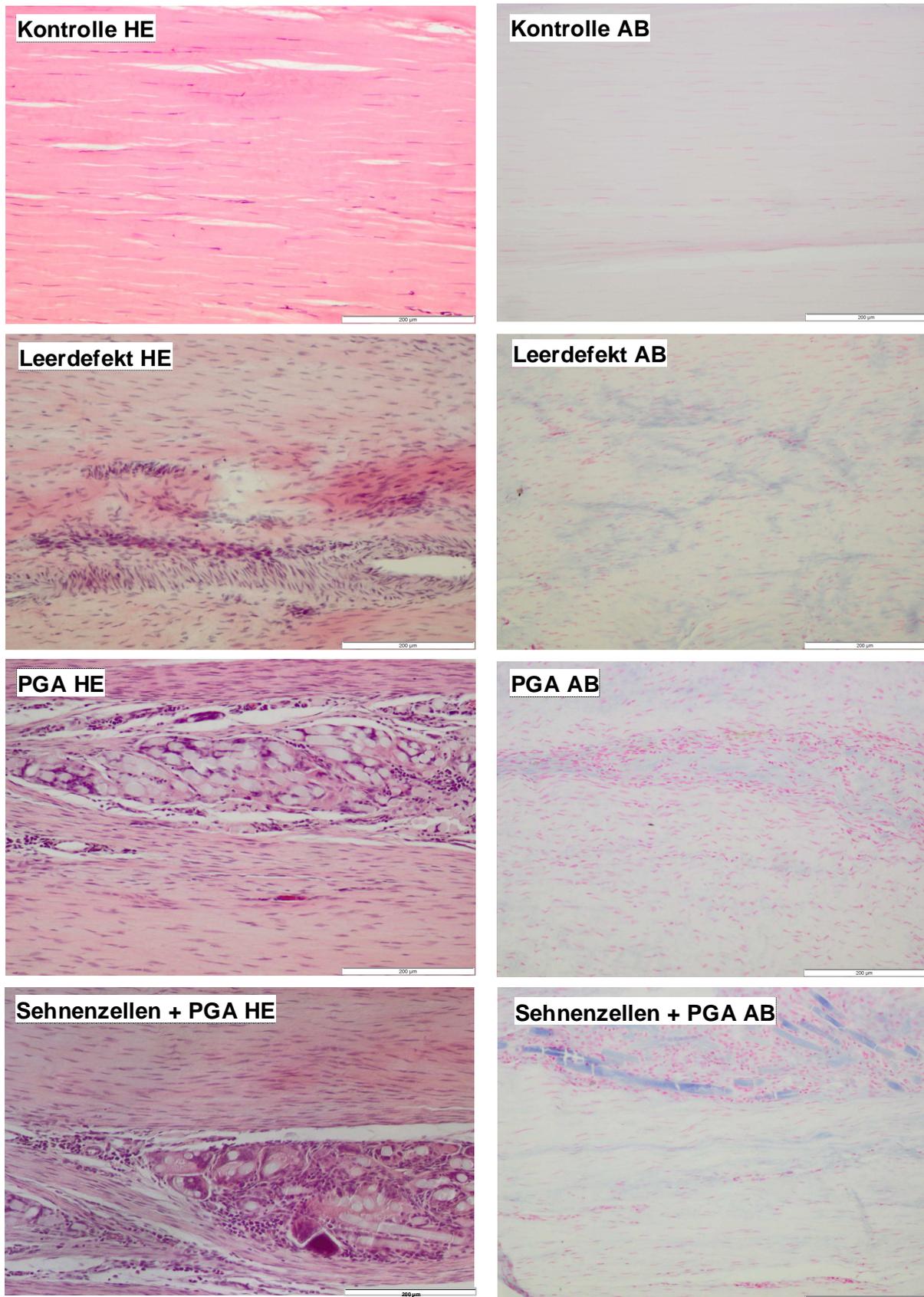
Sehnen, die einen unbehandelten Defekt enthielten, wiesen 6 Wochen nach der Operation eine starke Hyperzellularität auf. Die EZM war stark aufgelockert, teils mit Lücken im Gewebe und ödematisiert, erkennbar an der hellen Eosin-Färbung. Sie beinhaltete zudem zahlreiche größer-lumige Kapillaren.

Die Implantation von stabilisierendem Biomaterial verbesserte generell das Erscheinungsbild der Sehnenmatrix. Zwar konnten auch hier Hyperzellularität und Hypervaskularität im Vergleich zur gesunden Sehne beobachtet werden, die Organisation und Struktur des Gewebes war jedoch deutlich gegenüber dem Leerdefekt verbessert. Ebenfalls in beiden PGA-Gruppen konnten starke Entzündungsreaktionen (z.B. infiltrierende Eosinophile, Fremdkörperriesenzellen) und ein deutlicher Übergang vom PGA zum Sehnenewebe wahrgenommen werden.

12 Wochen nach der Sehnenverletzung waren zwar in den operierten Sehnen noch immer mehr Zellen enthalten, die Defektareale wie auch das implantierte PGA hingegen konnten kaum noch ausgemacht werden.

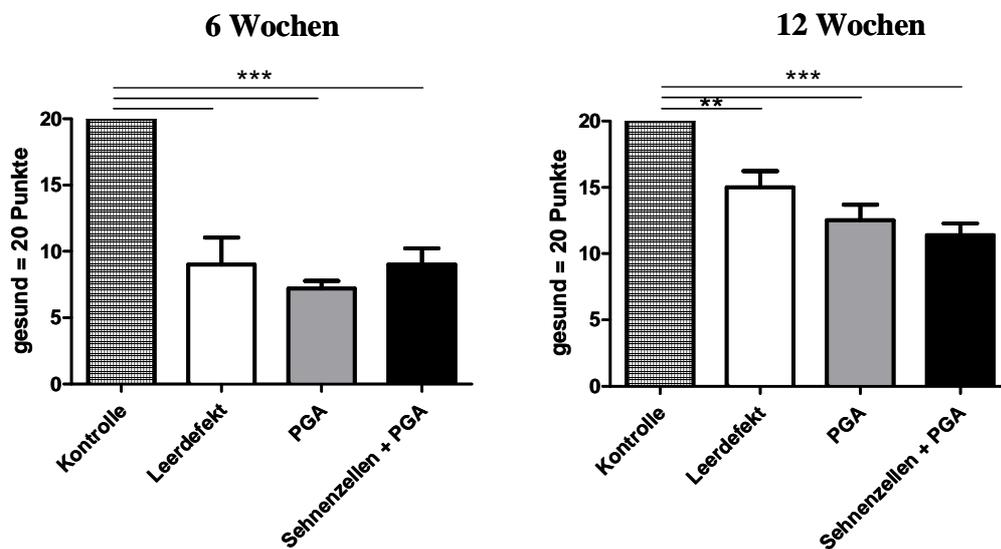
Die Alcianblau-Färbung wurde zusätzlich gewählt, um mögliche Knorpel-Proteoglykan-Bildung nach dem Sehnendefekt zu identifizieren. Die gesunde Sehnenmatrix enthielt kaum sulfatierte Proteoglykane, wurde daher nur leicht gefärbt. Die Erhöhung des Proteoglykangehaltes war im Leerdefekt dagegen deutlich und multifokal. In den Biomaterial-implantierten Gruppen befanden sich nur wenige Proteoglykane, die Blaufärbung der PGA-Fasern galt als unspezifisch.

In den 12-Wochen-Proben konnten Knorpel-spezifische Matrixkomponenten nur noch im Leerdefekt nachgewiesen werden.



**Abbildung 38** Histologische Färbungen der operierten Sehnen zum 6-Wochen-Zeitpunkt. Links: HE-Färbung und rechts: AB-Färbung an 7 µm Paraffinschnitten, erste Reihe: rechte Kontrollsehne, zweite Reihe: Leerdefekt, dritte Reihe: PGA-Fibrin-Konstrukt, vierte Reihe: PGA-Sehnenzell-Implantat, Messbalken 200 µm.

Dargestellt sind in Abb. 39 die Resultate des histologischen Scoresystems nach 6 (links) und 12 Wochen Heilungsphase (rechts).



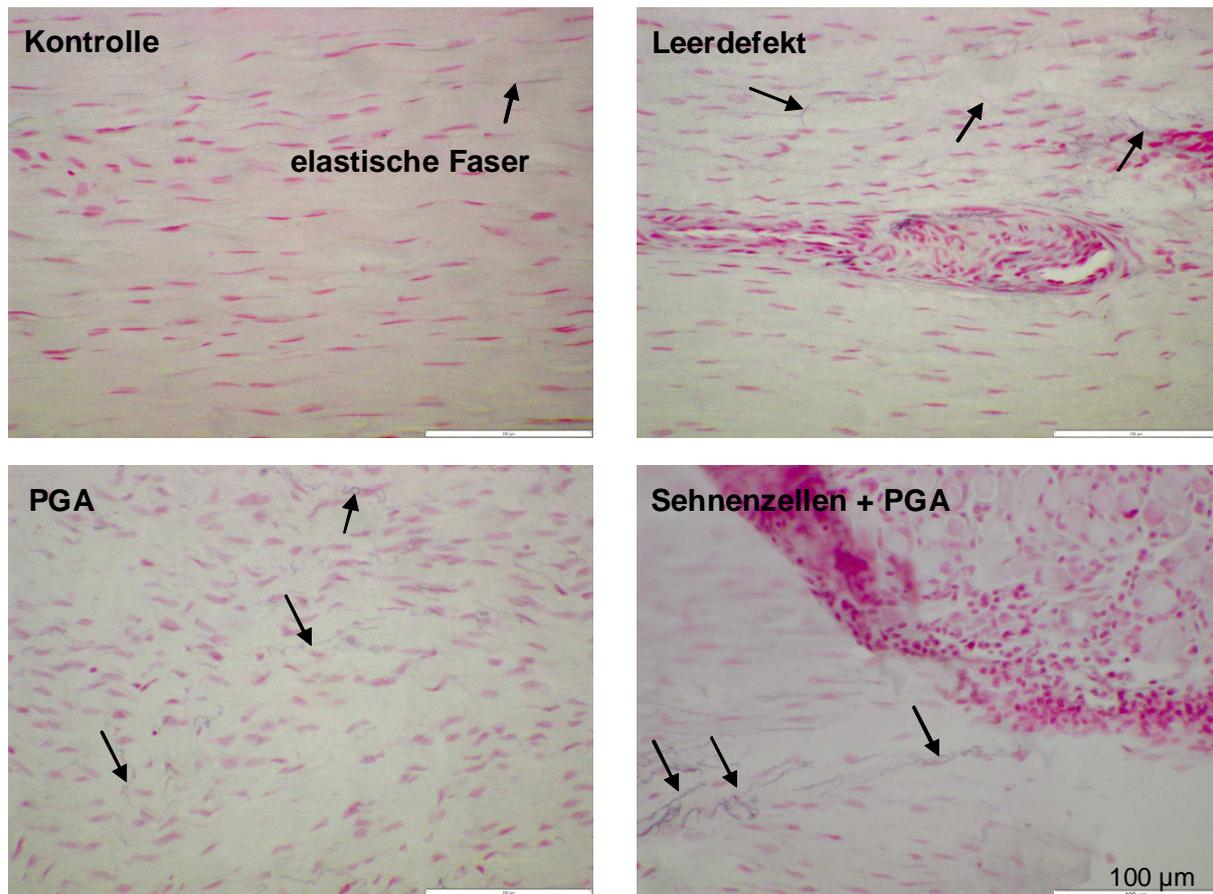
**Abbildung 39 Auswertung des histologischen Scores nach 6 und 12 Wochen.** Ergebnisse des histologischen Scores nach 6 und 12 Wochen, Daten präsentiert als Mittelwert mit SEM, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ .

Die gesunden rechten Achillessehnen bestimmten die maximale Punktzahl, nämlich 20 Punkte. Es fand sich eine signifikante Reduktion der Scorepunktzahl im Vergleich zur Kontrolle in allen Gruppen nach 6 Wochen Heilungsphase ( $p \leq 0,001$ ). Der Leerdefekt erzielte dieselbe Punktzahl wie das Sehnenzell-PGA-Vlies, beim zellfreien PGA-Fibrin-Konstrukt waren hingegen die wenigsten Punkte zu detektieren.

12 Wochen postoperativ hatten die Tiere der Leerdefekt Gruppe die beste Morphologie. Das Sehnenzell-PGA-Implantat war leicht dem PGA-Fibrin-Vlies in der Scorebewertung überlegen.

Zum Nachweis der Knochenmatrixsynthese in den heilenden Sehnen wurden Von Kossa-Färbungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein Knochenpräparat verwendet. Hier war eine Schwarzfärbung des Knochenareals klar zu beobachten. Im Gegensatz dazu war in keiner der Von Kossa-gefärbten Sehnenproben mineralisierte Matrix zu finden. Die Sehne mit und ohne Defekt enthielt folglich keine knöchernen Anteile (nicht gezeigt).

### 5.8.6 Bewertung des Tierversuches mittels Elastischem Faser Score



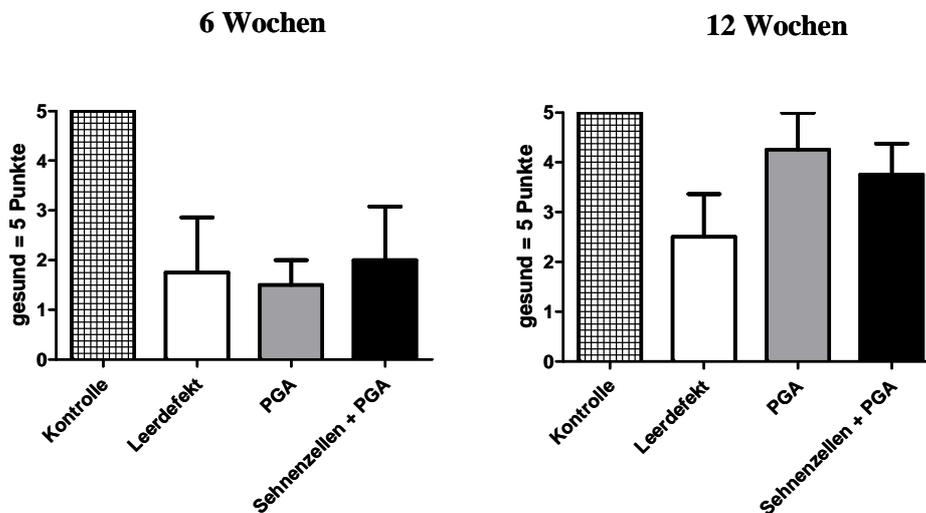
**Abbildung 40** Histologische Begutachtung der elastischen Fasern im Sehngewebe. Resorcin-Fuchsin-Färbung an 7 µm Paraffinschnitten von Kontrollsehne, Leerdefekt, zellfreiem PGA und PGA-Sehnenzell-Implantat 6 Wochen nach dem Sehnendefekt, Pfeile weisen auf elastische Fasern, Messbalken 100 µm.

Die Resorcin-Fuchsin-Färbung lieferte des Weiteren eine Aussage über Gehalt und Verteilung der elastischen Fasern im Sehngewebe. Abgebildet sind Färbungen von Sehnen, welche nach 6 Wochen Heilungszeit entnommen wurden.

In den Kontrollsehnen waren einzelne, parallel zu den Kollagenfasern laufende, elastische Fasern zu erkennen. Alle Tiere mit operierten Sehnen gaben viele parallele und vor allem -anders als in den Kontrollsehnen- zahlreiche quer verlaufende, sowie auch Gefäß-assoziierte elastische Fasern preis (Abb. 40).

12 Wochen nach der Sehnenverletzung wiesen die Leerdefekt-Tiere am ehesten eine Abweichung zur intakten Sehne durch erhöhten Elastinfasergehalt auf.

Der Elastische Faser Score (Tab. 6) half dabei, die Verteilung wie auch den Gehalt an elastischen Fasern innerhalb der Sehne zu beurteilen.



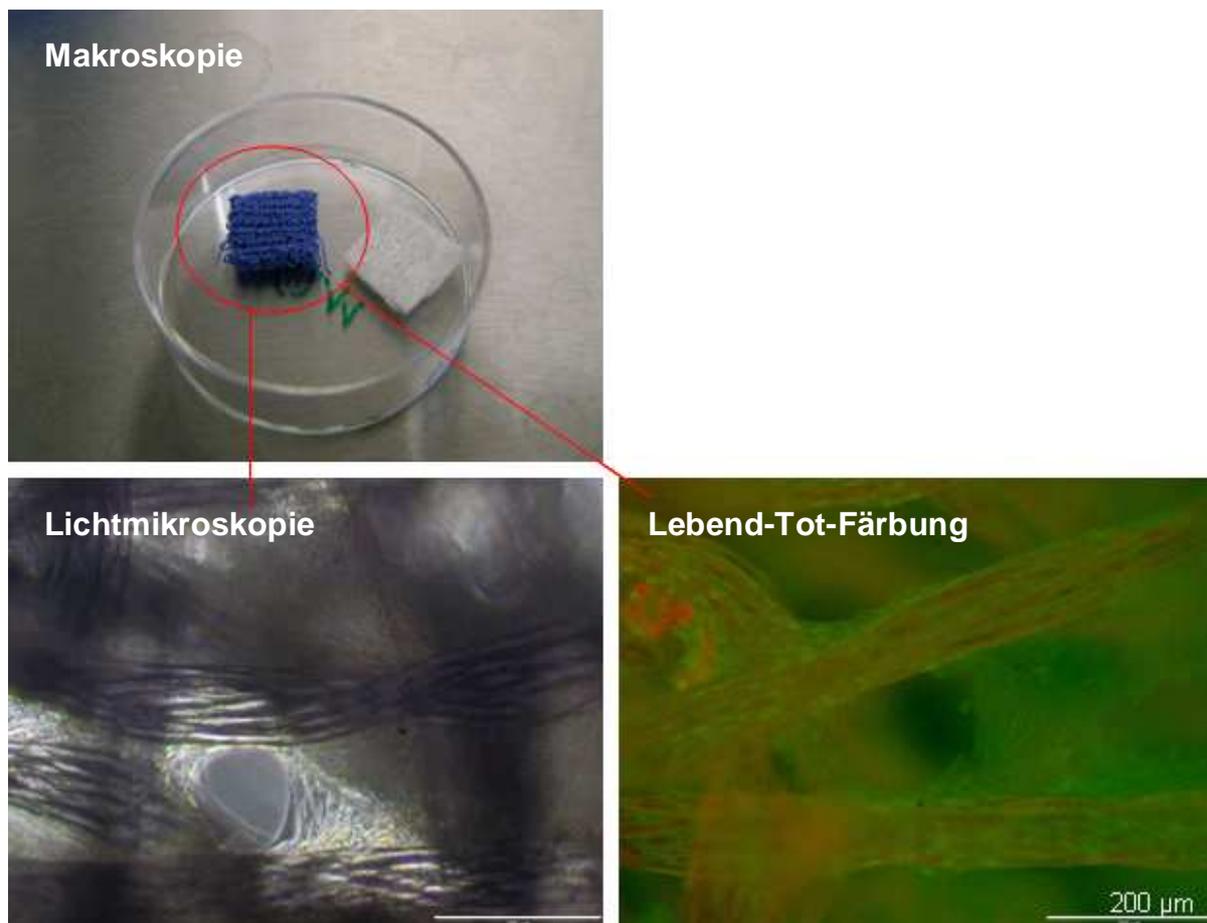
**Abbildung 41 Auswertung des Elastischen Faser Scores nach 6 und 12 Wochen.** Ergebnisse des Elastischen Faser Scores nach 6 und 12 Wochen, Daten präsentiert als Mittelwert mit SEM, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ .

Nach einer sechswöchigen Heilungsphase konnte das Sehnenzell-Implantat das beste Ergebnis erzielen (Abb. 41).

Während nicht stabilisierte Sehnen der Leerdefekt-Tiere die größte Differenz zur Kontrolle nach 12 Wochen aufwiesen, konnten mehr Scorepunkte von PGA allein und von besiedelten PGA im Elastischen Faser Score erreicht werden.

## 5.9 Variation der PGA-Biomaterial-Geometrie

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes war es möglich, in einem Pioniersversuch PGA-Vliese, mit einer definierten Topologie für die Anwendung mit Sehnenzellen zu testen. PGA-Fäden der Stärke 8.0 wurden am Institut für Polymerforschung Dresden in der Abteilung für Verbundwerkstoffe von Frau Breier mittels bestimmter Sticktechnik verarbeitet.



**Abbildung 42 Darstellung des gestickten PGA-Vlieses.** Oben: Makroskopische Photographie von gestickten (links) und ungewobenem PGA (rechts), unten: lichtmikroskopische Aufnahme und Lebend-Tot-Färbung eines 28 Tage alten, mit lapinen Achillessehnenzellen besiedelten gestickten PGA-Fibrin-Konstruktes, Messbalken 200 µm.

Durch die Geometrie der Fadenablage wie auch durch das Fadenmaterial selbst bestand dabei die Möglichkeit, je nach Erfordernis, biomechanische Kennwerte und Degradationszeiten des Vlieses zu variieren. Abb. 42 zeigt den makroskopischen Vergleich des gestickten PGAs mit dem ungewobenen kommerziell erhältlichen PGA in einer Petrischale. Das gestickte PGA wurde mittels Spinnerflaschenkultur, Zentrifugationskultur und Fibrinkultur mit lapinen Achillessehnenzellen besiedelt.

Analog zum kommerziellen, ungewobenen PGA der Firma Alpha Research zeigte die Fibrinkultur auch hier beste Ergebnisse. In der lichtmikroskopischen Aufnahme des besiedelten PGA-Fibrin-Konstruktes erkannte man nach 28 Tagen Kulturdauer lang gestreckte Zellkörper und eine ausgeprägte EZM, die die Poren des Biomaterials fast vollständig ausfüllt. In der Lebend-Tot-Färbung war diese Matrixbildung um die Fasern und an den PGA-Fasern, synthetisiert durch eine Vielzahl vitaler Zellen, ebenfalls zu detektieren.

## 6. Diskussion

Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM) der Sehne entweder durch Überlastung, durch Krankheiten oder den Alterungsprozess sind prädisponierend für Sehnenverletzungen (Sharma and Maffulli 2005). Sie können in Verbindung mit starken mechanischen Belastungen den Riss der Sehne verursachen. Die natürliche Heilung der Sehne geschieht langsam, dauert Monate bis Jahre. Problematisch dabei ist die Synthese von Narbengewebe (James, Kesturu et al. 2008). Dieses weist eine ungeordnete EZM auf und ist in seinen biomechanischen Eigenschaften gegenüber dem Sehnengewebe verändert. Es resultieren Funktionseinschränkungen oder Instabilitäten im Bewegungsablauf.

Selbst bei Patienten mit medizinisch versorgten Sehnenverletzungen treten diese Narbengewebe auf. Zudem existiert derzeit keine Behandlungsstrategie, die die biomechanischen und morphologischen Gegebenheiten einer gesunden Sehne nach Verletzung vollständig wiederherstellen kann und damit eine Regeneration ermöglicht (Tozer and Duprez 2005).

Die *ex vivo* Gewebezucht (Tissue Engineering) bemüht sich unter anderem um die Nutzbarmachung von Biomaterial-unterstützten Implantaten zur Verbesserung der Gewebeheilung. Dem Patienten werden körpereigene Zellen entnommen, in der Zellkultur expandiert und zusammen mit einem biomechanisch definierten, biokompatiblen und biodegradierbaren Trägermaterial als Implantat zurück in den Patienten gebracht. Dieses Konstrukt besitzt idealerweise die Fähigkeit, Sehnenmatrix selbstständig aufzubauen und die Heilungsphase zu verkürzen (Bagnaninchi, Yang et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine dreidimensionale Sehnenzell-Trägermaterial-Verbindung konstruiert und etabliert, die die natürliche Sehne im Hinblick auf Morphologie und Expressionsprofil imitieren sollte. Nach der *in vitro*-Optimierung wurde der *in vivo*-Einsatz im Achillessehnendefekt des Kaninchens getestet. Zur reproduzierbaren Analyse der Biomaterial-unterstützten Sehnenheilung im Tiermodell wurden drei umfassende Scoresysteme etabliert: der makroskopische, der histologische und der Elastische Faser Score.

## **6.1 Etablierung einer geeigneten 3D-Besiedlungsstrategie für Polyglykolsäure (PGA)**

Zur Etablierung einer Methode für die Fixierung von Sehnenzellen auf dem PGA-Trägermaterial, wurden sechs Strategien hinsichtlich Vitalität der Zellen, Morphologie und Histologie miteinander verglichen.

Die Adhäsionskultur wurde über eine 30minütige Adhäsionsphase der Sehnenzellen auf das Biomaterial hergestellt. Dieses Kultursystem ist häufig in der Literatur zur Biomaterialbesiedelung mit Sehnenzellen beschrieben worden (Qin, Yang et al. 2005; Deng, Liu et al. 2009; Moffat, Kwei et al. 2009). Die dabei jeweils durchgeführte Adhäsionszeit wurde mit 30 min bis 4 h angegeben. Die Dauer der Adhäsion einer Zelle ist abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit und muss auf jeden Zelltyp und jedes Biomaterial abgestimmt werden. Für ungewobenes PGA scheint eine Adhäsionszeit von 30 min nicht ausreichend gewesen zu sein und resultierte in einer geringen Besiedlungsrate. Nicht adhärente Zellen wurden durch zu frühe Zugabe des Zellkulturmediums gewegewaschen.

Die Transwellkultur bestand aus einem Sehnenzell-Pellet, welches über die Transwellmembran mit Nährmedium versorgt wurde. In der Lebend-Tot-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass es innerhalb der Kultur mehr vitale Zellen auf der Transwellmembranseite als auf der Membran-abgewandten Seite gab. Die gleichmäßige Versorgung der Zellen mit Nährmedium über das gesamte PGA-Vlies war demzufolge nicht geglückt. Der Einsatz von Adhäsions- und Transwellkultur zur gleichmäßigen und über der Versuchszeit konstanten Zellbesiedelung eines Trägermaterials konnte in der vorliegenden Arbeit für Sehnenzellen nur als bedingt geeignet beurteilt werden. In der Lichtmikroskopie, Vitalfärbung sowie den histologisch gefärbten Gefrierschnitten waren bereits nach 14 Tagen Kulturdauer nur noch wenige Zellen auf dem PGA-Vlies zu erkennen.

Dies könnte eine Folge der Oberflächenbeschaffenheit des PGA-Fadens sein. In einer Übersichtsarbeit von Liu und Mitarbeitern wurde der hydrophobe Charakter der Polyesteroberfläche - inklusive PGA- als Hindernis für die Zelladhäsion benannt und die Notwendigkeit zur Oberflächenbeschichtung abgeleitet (Liu, Ramanath et al. 2008).

In beiden Kultursystemen war ein Zellverlust über die Kulturdauer zu erkennen, der durch Zelltod oder Abwanderung der Zellen aus dem Vlies auf den Kulturgefäßboden erklärt werden kann. Um die Migration zu reduzieren, bietet sich eine Beschichtung der Kulturschalenoberfläche an, die den Zellen keine ausreichende Adhäsion erlaubt. Normale Zellkulturplastik (Polystyrol) besitzt eine negativ geladene hydrophile Oberfläche und unterstützt die Zelladhäsion. Hydrogele hingegen sind neutral geladen und halten als Beschichtung Zellen in der Suspension.

Sie sind für Gase und Nährstoffe zugänglich, Zellen aber können die Hydrogele nicht passieren (Ghidoni, Chlapanidas et al. 2008). Erst nach Kopplung des Alginat-Hydrogels mit dem Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv konnten Knorpelzellen in der Arbeit von Jeon et al. an das Alginatgel adhären (Jeon, Powell et al. 2010).

Auf der Beschichtung des Zellkultur-Plattenbodens, aus 2,5 % polymerisierten Alginat, auf dem die Konstrukte kultiviert wurden, fand eine ungewünschte Zelladhäsion und Proliferation der Sehnenzellen nach dem 7. Tag statt, welche zur Minderung der Zellzahl auf dem PGA über die Versuchszeit führte. Neben dem Alginat, welches ursprünglich in der Natur die Zellwände von Braunalgen und einiger Bakterien stabilisiert, kam als Platten-Beschichtung auch Agarose zum Einsatz. Agarose, Bestandteil der Rotalgen, zeigte in dieser Arbeit weniger Zellverträglichkeit im Vergleich zum Alginat. Nach Kontakt der Zellen auf dem 3D-Fibrin-Konstrukt mit der Agarose erschienen sie kleiner und abgerundet. Die verwendete steril-filtrierte Agarose besaß jedoch keine hochreine Zellkultur-Qualität und war möglicherweise Endotoxin-belastet. Daher wurden Alginat-beschichtete Platten für die Kultivierung der 3D-Konstrukte gewählt und die Beschichtung in regelmäßigen Abständen erneuert. Während der Degradation des PGAs kam es zur Ansäuerung des Wachstumsmediums durch saure Metabolite (Athanasίου, Niederauer et al. 1996), welche die Migration der Zellen vom Trägermaterial auf den Plattenboden möglicherweise unterstützte und das Vorkommen toter Zellen erklärt.

Die Zentrifugationskultur, bei der die Sehnenzellen in die Poren des ungewobenen Vlieses direkt auf die Fasern zentrifugiert wurden, offenbarte nach 14 Tagen eine ungleichmäßige Besiedelung mit Zellkonglomeraten aus jedoch vitalen Zellen. In der Histologie konnten nur wenige adhären Zellen auf den PGA-Fasern detektiert werden. Die Zellen aus den Clustern waren jedoch nach der Zentrifugation noch in der Lage, sich zu teilen. Demzufolge erschien das Vlies nach 28 Tagen dichter mit Zellen bewachsen und mit extrazellulärer Matrix bedeckt. Godbey et al. verglichen die Zellbesiedelung von PGA-Vliesen mit Muskelzellen mittels Zentrifugation- und Spinnerflaschenkultur und bewerteten die Zentrifugationskultur wegen eines höheren Proteingehaltes wie einer erhöhten Zellaktivität auf den Vliesen als effizientere Methode (Godbey, Hindy et al. 2004).

Der Fibrinkleber zur Fixierung der Sehnenzellen auf dem Trägermaterial war in der Lage, Zellen gleichmäßig über die gesamte Konstruktfläche zu verteilen und die Abwanderung aus dem Konstrukt zu reduzieren. In allen Analysen wies die Fibrinkultur eine gleichmäßige Zellverteilung, geringe Abwanderung, eine ausgeprägte EZM sowie raschere Zellvermehrung im Vlies auf.

Der als Medizinprodukt anerkannte Fibrinkleber findet Anwendung als Wundverschluss und zur Blutstillung. Er enthält neben den Komponenten Fibrinogen und Thrombin weitere Blutplasmabestandteile wie z.B. Wachstumsfaktoren, die als Stimulus für die Zellen wirken könnten (Virchenko, Aspenberg et al. 2008).

Anitua et al. beschrieben eine verstärkte Kollagen Typ I-Synthese und vermehrte Proliferation von Sehnenzellen, wenn sie in Kontakt mit Fibrin standen (Anitua, Sanchez et al. 2006). Fibrin ist eine körpereigene Substanz zum Wundverschluss und kann daher problemlos degradiert werden. *In vitro* konnte dieser Abbauprozess in dieser Arbeit innerhalb der 28 Tage Kulturdauer ebenfalls beobachtet werden. Die künstliche Matrix des Fibrins, welches die Sehnenzellen umgab, kann ebenfalls als positive Stimulanz auf die Zellen wirken. Es ist bekannt, dass Sehnenzellen neben den Zell-Zellkontakten auch ausgeprägte Zell-Matrix-Kontakte besitzen. Die Kontaktstelle zwischen Zelle und Matrix sind die Integrine (Chiquet, Renedo et al. 2003). Eine Änderung der Integrin-Expression auf der Zelloberfläche resultiert außerdem in einem geänderten Adhäsionsverhalten (Heino 2000). Durch Bindung bestimmter Kombinationen aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit des Integrins der Zelle können unterschiedliche intrazelluläre Signalwege angestoßen werden. Fokale Adhäsionsstellen resultieren in der Aktivierung eines bestimmten Signalweges, welcher sich von der Kaskade, die durch eine 3D-Umgebung induziert wird, unterscheidet. Die Sehnenzelle ist so in der Lage, die Qualität ihrer Umgebung wahrzunehmen (Berrier and Yamada 2007) und die Proteinsynthese nach den aktuellen Erfordernissen zu steuern. So ließe sich unter anderem die verbesserte Vitalität und Morphologie der Fibrinkultur gegenüber den anderen matrixfreien Systemen erklären.

Mit dynamischen Kultivierungstechniken sollte das Ziel einer besseren Adhäsion und eines optimierten Stoffaustausches verfolgt werden. Die angewandten Kulturen, Rollerkultur und Spinnerflaschenkultur, unterschieden sich in Rührgeschwindigkeit, Lage, Fixierung und Beweglichkeit des Biomaterials in der erzeugten Strömung.

Die dynamische Besiedelung der PGA-Konstrukte aus der Spinnerflasche und dem Bioreaktorröhrchen wurde jeweils für 72 h zur Adhäsion der Zellen durchgeführt. Mit Hilfe der Strömung sollten die Zellen gleichmäßig auf das PGA-Konstrukt aufgetragen und die Nährstoffversorgung optimiert werden (Vunjak-Novakovic, Obradovic et al. 1998; Burg, Holder et al. 2000). Die danach folgende Kultivierung erfolgte statisch auf einer Alginate-beschichteten Platte. Die Rollerkultur, welche im Bioreaktorröhrchen durchgeführt wurde, zeigte nach 14 Tagen eine große Menge an toten Zellen, die locker an den PGA-Fasern hingen.

Diese wurden während des Waschprozesses bei der Lebend-Tot- wie auch den HE-Färbung abgelöst. Es konnten daher in den gefärbten Präparaten der Rollerkultur nur wenige vitale, adhärente Sehnenzellen sichtbar gemacht werden.

Die Sehnenzellen, die in der Spinnerflasche durch die Strömung der Zellsuspension auf das Vlies aufgetragen wurden, waren in der Lage, EZM insbesondere ab 14 Tage Kultivierung auszubilden.

Das histologische Präparat wies ebenfalls sichtbare Matrixneubildung nach. Nur die Lebend-Tot-Färbung ließ viele tote, rot gefärbte Zellen erkennen. Trotz bekanntem Zusammenhang von Sehnenzellvitalität und mechanischer Stimulation, konnten durch diese dynamischen Kultursysteme keine günstigen Besiedelungen der Trägermaterialien erzielt werden. Möglicherweise waren die Scherkräfte, die in der Spinnerflasche und im Bioreaktorröhrchen wirkten, nicht den physiologischen mechanischen Einflüssen *in vivo* gleichzusetzen. Zellen können durch zu starke biomechanische Belastung Apoptose einleiten. Eine Verminderung der Drehzahl sowohl in der Roller- als auch in der Spinnerflaschenkultur könnte gegebenenfalls Vorteile bringen. Lin et al. gelang es im Gegensatz dazu, Kreuzbandzellen auf Dexonfäden mittels einer dynamischen Besiedelung in einem Orbitalschüttler mit 60 rpm für 24 h effizient aufzubringen. Hier folgte ebenfalls eine unbewegte, statische Kultivierung (Lin, Lee et al. 1999).

Die Degradation des PGA-Fadens war ab 21 Tagen Kulturdauer in allen Kultursystemen an Faserbruchstücken und einer unspezifischen Anfärbung der Fasern durch den FDA- oder Hämatoxylin-Farbstoff zu erkennen.

Anhand der Auswertung dieser drei Analysen zur Morphologie, Vitalität und Histologie wurde die Fibrinkultur in dieser Arbeit als das für Sehnenzellen effektivste System bestimmt. In der Literatur lassen ebenfalls Beispiele zur Anwendung des Fibrinkultursystems zur Besiedelung eines Biomaterials ausmachen (Sahoo, Ouyang et al. 2006).

## **6.2 Genexpression der Sehnenzellen in der 2D-Kultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer**

Aufgrund der Zellarmut des Sehnen Gewebes war es nötig, die Zellen nach der Isolation aus dem Gewebe in der Zellkultur bis zur gewünschten Zellzahl zu vermehren. Diese Expansion fand als Monolayer (2D-Kultur) statt. Zum Besiedeln eines Trägermaterials waren meist sechs bis acht Passagen nötig. Es war dabei eine leichte Veränderung der Morphologie in den höheren Passagen (ab Passage acht) zu beobachten.

Es sollten im Verlauf der Kulturdauer im Monolayer mittels real-time RT PCR Veränderungen im Expressionsprofil für wichtige Matrix-Komponenten untersucht werden. Die Genexpression von in den Passagen 3, 6, 7, 8 und 12 befindlichen Zellen wurde für Kollagen Typ I und III, Decorin als charakteristische Matrixbestandteile der Sehne und Scleraxis als Transkriptionsfaktor der Sehnen-Embryonalentwicklung untersucht. Um auch mögliche Hinweise auf eine Transdifferenzierung der Sehnenzellen in Richtung Knorpel zu erhalten, wurden die Knorpelkomponenten Aggrecan und der Knorpel-typische Transkriptionsfaktor Sox9 herangezogen. Eine Transdifferenzierung wird definiert als Umwandlung eines Zelltyps in einen anderen. Clegg und Kollegen erörterten die Heraufregulation von Sox9, Kollagen Typ II und Aggrecan als fibrochondrogene Differenzierung und Charakteristikum in chronisch verletzten Sehnen (Clegg, Strassburg et al. 2007). Zwar zeigte Sox9 in der 6. gegenüber der 3. Passage eine Erhöhung der Genexpression, diese wurde aber in Passage 7- 12 negiert und verblieb auf einem einheitlichen Level wie in der Passage 3. Somit konnten in den Untersuchungen keine deutlich unterschiedlichen Ergebnisse der untersuchten Gene nachgewiesen werden. Sehnenzellen der Passage 6- 8 wurden demnach für die Besiedelung der Trägermaterialien verwendet. Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, Aggrecan und Scleraxis (ab der sechsten Passage) wurde in den höheren Passagen geringer exprimiert. Yao et al. veröffentlichten 2006 eine Studie, die im Laufe der *in vitro*-Kulturzeit über 8 Passagen für Sehnenzellen einen „phänotypischen Drift“ belegte. Eine Verminderung der Decorin Expression, ein Änderung des Verhältnisses der Kollagen Typ III zu I Synthese und eine zunehmend abgerundete Sehnenzell-Morphologie wurden von mehreren Arbeitsgruppen ebenfalls beschrieben (Bernard-Beaubois, Hecquet et al. 1997; Yao, Bestwick et al. 2006; Almarza, Augustine et al. 2008).

### **6.3 Primer-Effizienz und Bestimmung der RNA-Qualität in nativen Geweben gegenüber *in vitro*- kultivierten Zellen**

Zunächst galt es, aus allen Sehnen-Proben hochwertige, nicht-degradierte Ribonukleinsäure (RNA) mit einem RIN-Wert größer 7 zu gewinnen. In der Literatur gelten RIN-Werte über 5 als empfehlenswert für PCR-Analysen (Pfaffl 2001).

Die Isolierung aus dem Sehnenewebe erwies sich schwierig. Während bei der RNA-Isolierung aus *in vitro*-kultivierten Proben, wie den 3D-Konstrukten oder der 2D-Kultur, fast ausschließlich RIN-Werte über 7 erreicht werden konnten, waren die Qualitäten der Gewebe-RNA geringer.

Erklärend kann hierfür die Zellarmut des Gewebes und damit verbunden der geringe RNA-Gehalt sowie Art und Menge der EZM betrachtet werden. Ebenfalls zu berücksichtigen ist die Kompaktheit der Kollagenmatrix inklusiver der zahlreichen Quervernetzungen. Im Rahmen der Phenol-Chloroform-Extraktion ist es denkbar, dass neben der negativ geladenen RNA auch negativ geladene Bestandteile der extrazellulären Sehnenmatrix mit aufgereinigt wurden. Für Aggrecan ist die Inhibition der PCR-Reaktion bereits beschrieben worden (McKenna, Gehrsitz et al. 2000). Große Matrixfragmente können RNA binden und bei der Zentrifugation sedimentieren, kleinere Polysaccharidfragmente können zudem während der Aufreinigung in Lösung gehen und die RNA präzipitieren (Wang and Stegemann 2010).

Ebenfalls spielten das Alter und Vorerkrankungen der humanen Spender eine Rolle. Die Zeit von der Entnahme der Sehne aus dem Menschen bis zur Aufarbeitung und das verwendete Puffersystem, in dem die Sehne transportiert wurde, waren außerdem von großer Bedeutung und logistisch schwer beeinflussbar. RNA ließ sich in guter Qualität aus Sehnen isolieren, wenn sie sofort nach der Präparation in RNA-stabilisierenden Puffer (RNAlater) oder in flüssigen Stickstoff gelegt wurden.

In der Effizienzbestimmung und der Agarose-Gelelektrophorese wurde die Güte der verwendeten PCR-Primer betrachtet. Eine Effizienz von 2 entspricht einer Verdopplung der cDNA pro PCR-Zyklus. Mit den PCR-Primern dieser Arbeit wurden Werte von 1,82 bis 2,11 erzielt. Werte über zwei und unter 1,8 rühren von Störfaktoren und Kontaminationen her. In der Literatur werden aber Primer-Effizienzen zwischen 1,8 bis 2,1 als ausreichend akzeptiert (Ramakers, Ruijter et al. 2003).

Auffallend waren zudem die unterschiedlichen Effizienzen eines PCR-Primers jeweils für Sehnenewebe und *in vitro*-kultivierte Sehnenzellen. Dabei kommt dasselbe Phänomen zum Tragen wie bei der RNA-Qualität. Die extrazelluläre Sehnenmatrix enthält eine Vielzahl an Komponenten, die mögliche Inhibitoren der PCR-Reaktion darstellen.

#### **6.4. Genexpression der Sehnenzellen in Abhängigkeit vom Kultursystem**

Die 3D-Kultivierung könnte hilfreich sein, den stabilen Differenzierungsgrad der Sehnenzellen während der *ex vivo*-Phase aufrecht zu erhalten. Die Genexpression der unterschiedlichen Kultursysteme (2D- und 3D-Kulturen) sollte im direkten Vergleich mit intaktem Gewebe mittels real-time-RT PCR untersucht werden. Analysiert wurden dabei die Sehne, die Monolayerkultur (2D) und die beiden 3D-Kulturen, Massenzellkultur und PLGA-assoziierte Kultur zu 2 und 4 Wochen.

Das synthetische Co-Polymer aus Glykolsäure und Milchsäure (PLGA) wurde zu diesen Versuchen aufgrund seiner längeren Degradationsphase im Vergleich zu PGA herangezogen. Die Kombination von PLGA mit einem Fibringel als Zellvehikel konnte von Sha`ban et al. für Knorpelzellen bereits erfolgreich präsentiert werden (Sha'ban, Kim et al. 2008). Ein weiteres PLGA-Gelsystem wurde von Vaquette et al. beschrieben. Die *in vitro*-Degradation des mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Alginat-PLGA-Konstruktes wurde mit 7 Wochen angegeben und via Verlust der Biomechanik beobachtet (Vaquette, Slimani et al. 2010).

Die Massenzellkultur bestand aus einem Zellpellet, das über einen Membranfilter mit Zellkulturmedium versorgt wurde. Dieses Biomaterial-freie Kultursystem ist der Transwellkultur vergleichbar und diente der grundlegenden Charakterisierung der Zellen in 3D-Umgebung (Schulze-Tanzil, Mobasheri et al. 2004).

Betrachtet man die Genexpression der Hauptmatrixkomponente Kollagen Typ I fällt auf, dass die Expression im Gegensatz zur 2D-Kultur und der Massenzellkultur in der PLGA-Kultur nach 28 Tagen auf einem ähnlichen Level lag wie in der Sehne. Bei jedem Passagieren in der Zellkultur entfernt man deren EZM durch den Einsatz des Enzyms Trypsin und regt so möglicherweise die Transkription der Hauptmatrixbestandteile an. Durch die Langzeitkultivierung auf einem Biomaterial reguliert sich diese Produktion im Laufe der Zeit. Dieselbe Tendenz konnte auch bei Kollagen Typ III in der 2D- und 3D-Massenzellkultur detektiert werden. Die PLGA-Kultur hingegen enthielt wiederum sowohl nach 14 als auch nach 28 Tagen vergleichbar viel Kollagen Typ III wie die Sehne.

Decorin, COMP, Aggrecan und Scleraxis wurden im Gegensatz zu den Kollagenen in der 2D-Kultur geringer exprimiert als in der Sehne. Gerade die Reduktion von Decorin diskutierten Yao et al. und Bernard-Beaubois als Indiz für die Dedifferenzierung von Sehnenzellen (Bernard-Beaubois, Hecquet et al. 1997; Yao, Bestwick et al. 2006). Die Steigerung der Genexpression von Kollagen Typ I sowie die Reduktion von Scleraxis innerhalb eines 3D-Sehnenzell-Kollagengels im Vergleich zur equinen Sehne wurde von Taylor ebenfalls beschrieben (Taylor, Vaughan-Thomas et al. 2009).

Eine Transdifferenzierung der Sehnenzellen zu Knorpel-ähnlichen Zellen konnte durch die Analyse von Aggrecan und COMP ausgeschlossen werden. Es kam in der PLGA-Kultur nicht zu einer Steigerung der mRNA-Menge über das Sehnenniveau, im Gegensatz zur Massenzellkultur. COMP erfüllt *in vivo* die Funktion des Kompressionschutzes, wird besonders in Regionen erhöhten Druckes bereitgestellt. Dies könnte die Erhöhung der COMP-Expression in der Massenzellkultur durch den Druck der oberen auf die unteren Zelllagen erklären.

Eine mögliche Redifferenzierung der Sehnenzellen durch Einbringen in eine 3 dimensionale Umgebung konnte scheinbar anhand der Steigerung der Expression der Proteoglykane Decorin und Aggrecan sowie des Glykoproteins COMP im Vergleich zur 2D-Kultur erreicht werden. Ebenfalls konnte im Gegensatz zu der 2D-Kultur beobachtet werden, dass die Genexpression von Kollagen Typ I und III in der Biomaterial-Kultur nach 28 Tagen auf Sehnenniveau lag.

### **6.5 Proteinexpression und Histologie von Sehnenzellen in Abhängigkeit vom Kultursystem**

Das charakteristische Erscheinungsbild der Sehne mit wellig angelegten Kollagenfasern als wesentliche Gewebekomponente und den in Reihe liegenden spindelförmigen Sehnenzellen konnte histologisch dargestellt werden. Im Gegensatz zu den vergrößerten und nicht ausgerichteten Zellen der 2D-Kultur waren in der Massenzellkultur nach 28 Tagen die Zellen der unteren, zum Membranfilter gewandten, Zellschicht in Längsausrichtung zu finden.

Möglicherweise beeinflussten sowohl die Drucklast der oberen Zellschichten als auch das bessere Nährstoffangebot die Vitalität der Sehnenzellen. Extrazelluläre Matrix konnte im Interzellularraum detektiert werden. Zellen der oberen Zelllage wirkten durch die schlechtere Nährstoffversorgung nicht vital. In der Biomaterial-assoziierten Kultur fand sich die Matrix ebenfalls nach 28 Tagen zwischen den PLGA-Fasern. Die degradierenden PLGA-Fasern wurden mit der neu-synthetisierten Matrix fester zusammengehalten als nach 14 Tagen.

Die Qualität der extrazellulären Matrix sollte des Weiteren durch die Immunmarkierung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern überprüft werden. In der Kollagen Typ I-Färbung konnte jeweils nach 28 Tagen vergleichend zum 14-Tage-Zeitpunkt ein stärkeres Signal, d.h. mehr Kollagen nachgewiesen werden. Jedoch konnte das Kollagen noch keine Orientierung aufweisen. Dies geht konform mit den Zeiten der Remodellingphase der Sehnenheilung. 4 Tage nach der Sehnenverletzung beginnt die Synthese der Kollagenfibrillen und erst nach 7 Wochen erscheint die kollagene Matrix morphologisch/ histologisch normal und mit einer gesunden Sehne vergleichbar (Jack 1950). Im Gegensatz dazu bemerkten Hannafin und Mitarbeiter schon nach 4wöchiger mechanischer Stimulation unter anderem eine histologisch intakte Gewebestruktur von *in vitro*-kultivierten *M. flexor digitorum profundus* Sehnenzellen (Hannafin, Arnoczky et al. 1995). Lin et al. unterstützten ebenfalls die Ausrichtung der synthetisierten Sehnenmatrix durch mechanische Stimulation.

Bereits 5 Wochen nach dem Besiedeln der Dexonfäden mit Kreuzbandzellen fanden sie lineare Matrixfaserbündel (Lin, Lee et al. 1999).

Des Weiteren gibt es Veröffentlichungen, die belegen, dass parallel ausgerichtete Biomaterial-Fasern die Orientierung der EZM unterstützen (Inui, Kokubu et al.; Moffat, Kwei et al. 2009).

## **6.6 De- und Rezellularisierung einer porcinen Sehnenmatrix zur Verwendung als Trägermaterial**

Neben den synthetischen Polymeren in dieser Arbeit wurde in einigen Pionierversuchen tierische Sehnenmatrix (Achillessehne vom Schwein) als Trägermaterial getestet. Diese Trägersubstanz ist unter anderem interessant zum Überbrücken großer Sehnendefekte und zum Gewährleisten einer sehnenähnlichen Biomechanik aufgrund der vorliegenden spezifischen Faserausrichtung (Saber, Zhang et al. 2010).

Die EZM auch anderer Kollagen Typ I reicher Gewebe wie die Dünndarm-Submukosa, humane Dermis oder Rinderhaut werden bereits schon klinisch zellfrei als Sehnenersatzmaterial eingesetzt (Dourte, Kuntz et al. 2008).

Die Dezellularisierung der Sehnenstücke ließ sich mit Hilfe physikalisch-chemischer Bearbeitung gut durchführen. Die anschließende histologische Färbung zeigte keine Zellen/keine Zellkerne mehr in der kollagenen Matrix. Blieben die ursprünglichen Sehnenzellen erhalten, könnte es bei Implantation der Matrix in einen fremden Organismus zu Entzündung oder Abstoßungsreaktionen oder zu Übertragungen von Krankheiten kommen. Die physikalischen Methoden zum Aufbrechen der Zellmembran und Entfernen der Zellfragmente über Spülschritte sind nicht effizient genug zur Dezellularisierung und werden auch in der Literatur häufig mit Enzymen und/ oder chemischen Detergenzien kombiniert (Gilbert, Sellaro et al. 2006).

Zur Rezellularisierung dieser dezellularisierten Matrix wurden simultan zur PGA-Besiedelung unterschiedliche Methoden evaluiert. Die Sehnenzellen waren zwar in der Lage, an den äußeren Fasern zu haften, jedoch gelang es nicht, die dichte Matrix zu durchdringen. Ingram beschrieb eine Ultraschallbehandlung von 360 W für 1 min als hilfreich zur Rezellularisierung der Sehne (Ingram, Korossis et al. 2007). Die Auflockerung der Sehnenmatrix durch 70 W Ultraschallimpulse für 45 sec in dieser Arbeit resultierte jedoch in einer irreversiblen Denaturierung und der Zerstörung der Faserorientierung. Für den späteren Einsatz als Trägermaterial ist eine intakte, biomechanisch belastbare Matrix jedoch unumgänglich.

Die Bestrahlung mit Ultraschallimpulsen wurde nicht weitergeführt. Es kamen Adhäsions-, Zentrifugations-, Roller- und Fibrinkultur und die Injektion von Sehnenzellen in eine Alginat umhüllte Sehnenmatrix zum Einsatz. Tischer und Kollegen präsentierten in der 2009 publizierte Arbeit mit der Injektion autologer Zellen in die dezellularisierte Sehne viel versprechende Ergebnisse (Tischer, Aryee et al. 2010).

Im Rahmen dieses Versuches konnte bisher mit keiner Strategie eine erfolgreiche, der PGA-Fibrinkultur entsprechende, Besiedelung erzielt werden. In der Veröffentlichung von Kryger 2007 sind Rezellularisierung nach 7 Tagen Kulturdauer gezeigt, die nur die Oberfläche der natürlichen Sehnenmatrix benetzen. Erst nach der Implantation in einen Sehnendefekt konnten Zellen in der Mitte der Sehnenmatrix entdeckt werden (Kryger, Chong et al. 2007).

Nach 14 Tagen *in vitro*-Kulturdauer konnten im Versuch kaum Zellen auf der Sehnenmatrix nachgewiesen werden. Entweder kam es zur Abwanderung der Zellen auf die Plattenbeschichtung oder zum Zelltod. Ursachen hierfür könnten eine zu geringe Zellzahl verbunden mit dem Fehlen der Zell-Zellkontakte sein. Ebenso ist es möglich, dass das artfremde Kollagen negativen Einfluss auf die humanen Sehnenzellen hatte oder sich trotz des finalen Waschprozesses noch toxische Detergenzien in der dichten Kollagenmatrix befanden. Weiterhin denkbar wäre, dass durch den Dezellularisierungsprozess wichtige Komponenten zerstört oder ausgespült wurden. Shea et al. präsentierten eine Studie zum Verhalten von humanen Sehnenzellen gegenüber 7 verschiedenen zellfreien extrazellulären Matrices. Sie gaben an, dass sowohl Proliferation als auch Matrixproduktion bei Adhäsion auf nicht chemisch behandelten (quervernetzten und sterilisierten) Dermis-Matrixen erhöht waren (Shea, McCarthy et al. 2010).

Omae lieferten einen interessanten Vorschlag zur erfolgreichen Rezellularisierung einer zellfreien Sehnenmatrix. Sie siedelten Stammzellen auf 50 µm dicken Längsschnitten dezellularisierter Sehne an und bündelten mehrere besiedelte Längsschnitte zu einem Verband. Dieses Konstrukt zeigte nach Implantation in einen Kaninchen-Patellar-Sehnendefekt in Histologie und Genexpression einen Benefit gegenüber der zellfreien, gebündelten Kontrolle (Omae, Sun et al. 2011). Biomechanische Stimulation ist ebenfalls ein Werkzeug zur erfolgreichen Rezellularisierung und stabilen Differenzierung der Zellen vor Ort. Abousleiman et al. präsentierten eine Gewebematrix der Nabelschnurvene, welche mit Hilfe von Kollagengel mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt wurde. Das Konstrukt wies nicht nur einen Sehnen-ähnlichen Phänotyp auf sondern auch mechanische Kennwerte, die annähernd denen intakter Sehnen entsprachen (Abousleiman, Reyes et al. 2009).

## 6.7 Einfluss eines Sehnenzell-PGA Konstruktes auf die Sehnenheilung im Kaninchenmodell

Nachdem die Biomaterial-Fibrin-Kultur etabliert und charakterisiert werden konnte, sollte im Rahmen dieses Projektes die *in vivo*-Testung erfolgen. Als Modellsehne wurde die Achillessehne als größte Sehne des Organismus gewählt. Zudem ist die klinische Relevanz durch die hohe Verletzungshäufigkeit der Achillessehne belegt (Hess 2009).

Tierversuche sind für komplexe Fragestellung unumgänglich. Die während der Sehnenheilung aktive Kombination und jeweilige Konzentration verschiedenster Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone ist noch nicht hinreichend bekannt und kann demzufolge *in vitro* nicht nachgestellt werden. Des Weiteren können in diesen Versuchen neue chirurgische Techniken evaluiert werden (Gupta and Lee 2007). Zudem wird das Transplantat *in vivo* kontinuierlich mechanisch belastet. Die Biomechanik spielt eine zentrale Rolle bei der Sehnenheilung (Wang 2006). Zwar existiert eine Vielzahl an Literaturstellen zum Thema doch die Varianz der angewandten biomechanischen Stimulation auf kultivierte Sehnenzellen ist enorm. Für die Stimulation dreidimensionaler besiedelter Konstrukte sind z.B. 10 % axialer Zug über 8 Stunden und 0,25 Hz (Webb, Hitchcock et al. 2006), 2,4 % Zug alle 5 min über 8 Stunden (Juncosa-Melvin, Shearn et al. 2006) und 1 % Zug bei 1 Hz und 30 min am Tag (Kuo and Tuan 2008) beschrieben.

Eine weitere Beschränkung der Sehnenheilung *in vitro* ist die Beteiligung unterschiedlicher Zelltypen im Organismus.

Kaninchen sind verbreitete Tiermodelle. Sie zählen zu den größten Kleintieren und relativ kostengünstig in Haltung und Zucht. Im Vergleich zu Maus und Ratte können wegen ihrer Größe chirurgisch komplexe Operationen durchgeführt werden. Sehnendefektmodelle im Kaninchen sind auch vielfältig beschrieben.

Durch die abweichende Anatomie des Kaninchens vom Menschen (Doherty, Koike et al. 2006) wie auch die Unterschiede in der Zellbiologie sind die Daten aus Tierversuchen jedoch nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar.

In der Handhabung der lapinen Sehnenzellen fiel die größere Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu den humanen Sehnenzellen auf. Ebenso zeigten Kaninchenzellen kleinere Zellkörper und kürzere Zellfortsätze. Es sind im Lauf der Entwicklung eines Medizinproduktes weitere Großtiermodelle und auch humane Kohortenstudien notwendig.

Ob das PGA-Fibrin-Implantat für die Sehnenheilung *in vivo*, im Kaninchen, geeignet ist und welche Auswirkungen es auf die Heilung hat, wurde durch Evaluation mittels Scoresystemen ermittelt.

### 6.7.1 Bewertung des Tierversuches mittels makroskopischem Score

6 und 12 Wochen nach der Sehnenoperation wurde die Heilung der verletzten Achillessehne begutachtet. Diese Zeitpunkte werden in vielen Arbeiten verwendet, da sie die wichtige Remodellingphase der Sehnenheilung abdecken, welche 6 Wochen nach der Sehnenverletzung startet (Halici, Karaoglu et al. 2004; Sharma and Maffulli 2005).

Der Tierversuch umfasste zwei Kontrollgruppen und die Hauptgruppe. Zur Beurteilung des Selbstheilungsprozesses blieb der 3 mm große Achillessehnendefekt in der medialen *M. gastrocnemius* Sehne in den Leerdefekt-Tieren unbehandelt. Um den Effekt von PGA und Fibrin zu bestimmen, erhielt die PGA-Gruppe nur diese, ohne Zellen.

Das Potential autologer Sehnenzellen auf dem PGA-Fibrin-Konstrukt die Gewebeheilung durch eigene Matrixproduktion zu unterstützen, konnte durch die Hauptgruppe herausgestellt werden. In der Veröffentlichung von Liu et al. wurde der Benefit eingebrachter Zellen (Sehnen- und Hautzellen) auf ungewobenem PGA-Trägermaterial auf die Sehnenheilung der *M. flexor digitalis superficialis* der Achillessehne von Schweinen belegt. Nach 6, 14 und 26 Wochen wurde festgestellt, dass die Zell-Konstrukte histologisch und mechanisch den Kontrollen (PGA ohne Zellen) überlegen waren (Liu, Chen et al. 2006). Eine verbesserte Sehnenheilung in Gegenwart eines besiedelten Fibringels (Stammzellen des Knochenmarks) im Vergleich zum zellfreien Fibringel in einem kompletten Achillessehnendefekt, welcher mit einer Kessler Naht repariert wurde, konnte auch von Chong und Mitarbeitern in Kaninchen gezeigt werden (Chong, Ang et al. 2007).

Der makroskopische Score enthielt klinische Charakteristika wie Schwellung, Änderung im Bewegungsablauf oder Verhalten, die bereits 3 Wochen nach der Sehnenoperation dokumentiert wurden. Diese konnten bei keinem Tier beobachtet werden, was auf eine verhältnismäßig gute Verträglichkeit des Defektmodells schließen lässt. 6 Wochen nach der Sehnenverletzung wurden weitere Merkmale der Sehnenheilung z.B. Grad der Schwellung, Oberflächenbeschaffenheit, Verwachsungen oder Integration des Biomaterials in die Sehne im Makroscore erfasst. Der unoperierte Achillessehnenkomplex des rechten Hinterlaufes diente als Kontrolle. Im Gegensatz zu den weiß glänzenden und den verschiebbaren einzelnen Sehnensträngen der Kontrolle offenbarten Tiere der Leerdefektgruppe deutlich geschwollene Sehnen. Adhäsionen zwischen den Sehnensträngen, dem Peritendineum und der Haut fanden sich in allen operierten Tieren aller Gruppen, was auf eine extrinsische Heilung schließen lässt. Adhäsionen behindern das physiologische Gleiten der Sehnenstränge und reduzieren deren Funktion.

Es konnte bisher keine Strategie ermittelt werden, diese Formationen zu verhindern. Es sind meist zusätzliche Operationen nötig (Koob 2002). Nur in der Sehnenzell-PGA-Gruppe waren diese Adhäsionen weniger ausgeprägt.

Mit Hilfe des Scores konnte dieses verbesserte Erscheinungsbild in der Hauptgruppe (PGA+ Sehnenzellen) gegenüber den Versuchskontrollen herausgearbeitet werden. Jedoch konnte nach 6 Wochen noch keine lückenlose Integration des Biomaterials in das umgebende Sehngewebe beobachtet werden.

Konform dazu beschreiben auch Ouyang und Young im Achillessehnendefekt diese makroskopische Auffälligkeit (Young, Butler et al. 1998; Ouyang, Goh et al. 2003).

12 Wochen post OP kann dieser Trend ebenfalls gezeigt werden. In allen Gruppen erhöhen sich die Score-Punktzahlen im Vergleich zu 6 Wochen. Die gesunde, rechte Kontrolle blieb jedoch unerreicht. Eine Schwellung und Entzündung konnte nach 12 Wochen nicht mehr erfasst werden. Philamäki et al. beschrieben einen kompletten Achillessehnendefekt, in dem die die Sehnenstümpfe adaptierende Naht mit einer PGA-Membran umhüllt wurde. Hierbei konnte im Kaninchen ebenfalls eine nachlassende Schwellung von 3, 6 Wochen und 12 Wochen in allen Versuchsgruppen beobachtet werden (Pihlajamäki, Tynnininen et al. 2008).

### 6.7.2 Bewertung des Tierversuches mittels der Sehngewichte

Zu den Versuchszeitpunkten, 6 und 12 Wochen, wurde ein 3 cm langes Sehnen-PGA-Explantat gewonnen, das Gewicht ermittelt und mit der gesunden Sehne des rechten Beines verglichen. Die gesunden Kontrollen hatten in allen Tieren in etwa dasselbe Gewicht, was auf eine genaue Sektion deutet. Die Zunahme des Gewichtes nach der Verletzung korreliert dabei vermutlich mit Wassereinlagerung und Schwellung des Gewebes. Für die Wasserbindung in der Sehne sind die Proteoglykane von herausragender Bedeutung (Yoon and Halper 2005). Die Steigerung des Gehaltes an Glykosaminoglykanen (Riley, Harrall et al. 1996) wie auch an Proteoglykanen (Riley, Harrall et al. 1994) konnte bereits in heilender *M. supraspinatus* Sehne des Menschen nachgewiesen werden. Im Kaninchen-Tierversuch 15 Tage nach induziertem Achillessehnenriss wurde von Reddy et al. ein erhöhter Wassergehalt gegenüber der Kontrolle nachgewiesen (Reddy, Stehno-Bittel et al. 1999).

Ebenso kann die Gewichtszunahme durch die massive Synthese von Kallusgewebe verursacht worden sein.

Sowohl die operierte mediale als auch die laterale *M. gastrocnemius* Sehne hatten größere Gewichte als die Kontrollen, wobei die Defektsehnen (mediale *M. gastrocnemius* Sehne) am schwersten waren.

Das Gewicht war nach 6 Wochen in der Sehnenzell-PGA-Gruppe der gesunden Kontrolle am nächsten. Nach zwölf Wochen spiegelten alle Versuchsgruppen ähnliche Werte wider.

Das Gewicht der lateralen *M. gastrocnemius* Sehne ist insbesondere in den Leerdefekt-Tieren gegenüber der gesunden Kontrolle erhöht. Hier übernahm kein Biomaterial die Zuglast, daher kam es in den Leerdefekt-Tieren vermutlich zu Überlastung der Nachbarsehne ähnlich der operierten Sehne. Überlastungen resultieren in Degeneration der EZM und wiederum zum Anstieg der Proteoglykan-Expression und Ödematisierung des Gewebes.

### 6.7.3 Bewertung des Tierversuches mittels histologischem Score

Die histologische Begutachtung der Sehnenheilung anhand von histochemisch gefärbten Gewebeschnitten wird von einem Großteil der wissenschaftlichen Arbeiten nur über wenige Parameter durchgeführt. Es finden sich nur wenige Veröffentlichungen, die mehrere Charakteristika in einem Scoresystem zusammenfassen. Jokoya und Mitarbeiter publizierten 2008 einen Sehnenscore für einen Kaninchen-Rotatorenmanschetten-(Schultersehnen)-Defekt, der Merkmale wie Zellularität, Vaskularität, Faserdurchmesser sowie die Ausrichtung von Fasern und Zellen einbezieht (Yokoya, Mochizuki et al. 2008). Movin et al. bewerten neben diesen Merkmalen zusätzlich die Form der Zellkerne der Sehnenzellen (Movin, Gad et al. 1997). Kannus und Mitarbeiter beschreiben einen ovalen ausgestreckten Zellkern als Merkmal einer ausdifferenzierten Sehnenzelle (Kannus 2000). Jedoch ist bisher kein einheitliches, Scoresystem zur Charakterisierung der Biomaterial-unterstützten Sehnenheilung verfügbar.

Im Zuge dieser Arbeit sollte daher ein umfassender, mehr-parametrischer Score aufgestellt werden. Der vorgeschlagene Score basiert dabei auf der Auswertung von HE- und AB-Färbungen. Dies gewährleistet neben der Analyse der Gewebemorphologie auch die Begutachtung der Synthese von Knorpel-spezifischen Komponenten (Proteoglykanen) in der heilenden Sehne. Es ist bekannt, dass Sehnen in stark mechanisch belasteten Arealen Proteoglykane bilden. So zeigte die *M. supraspinatus* Sehne der Rotatorenmanschette in der Schulter aufgrund der hohen Druckbelastung in der Alcianblau-Färbung durch die starke Blau-Färbung (Benjamin and Ralphs 1998) das Vorkommen von Proteoglykanen. In diesem Tierversuch konnte ebenfalls die Proteoglykansynthese während der Sehnenheilung, hauptsächlich jedoch in den Sehnen der Leerdefekt-Tiere, detektiert werden. Der Gehalt dieser Knorpelmatrix-Marker war in den unbesiedelten und besiedelten PGA-Gruppen sichtbar geringer. Die Sehnen-Gewebeschnitte der 12-Wochen-Tiere zeigten nur noch in den Leerdefekten Blau-Färbungen.

Morphologische Parameter wie Dichte und degenerative Veränderungen der kollagenen extrazellulären Matrix, Zellausrichtung, Vaskularisierung waren ebenso Bestandteil des Histocores wie die Integration des Biomaterials in das Sehngewebe, Kallusbildung und Infiltration von Entzündungszellen. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten insbesondere 6 Wochen nach dem Sehndefekt wahrgenommen werden. Im Gegensatz zur dicht gepackten Sehnenmatrix der Kontrolle mit in Reihe liegenden Sehnenzellen war die Sehnenmatrix der Leerdefekte stark aufgelockert, enthielt groß-lumige Blutgefäße und erschien auf ganzer Länge ungeordnet.

Zwar fanden sich in den Sehnen mit PGA-Implantat viele Entzündungszellen, jedoch besaßen sie eine strukturiertere EZM als der Leerdefekt. Young et al. berichteten ebenfalls von Entzündungsprozessen bei der Implantation eines Kollagen-Gels (Young, Butler et al. 1998). Ceonzo et al. schlugen vor, die Entzündung nach PGA-Implantation, welche durch die Abbauprodukte hervorgerufen wird, via Komplement-Hemmung über C5a Blockierung, zu reprimieren (Ceonzo, Gaynor et al. 2006). Hier muss jedoch bedacht werden, dass durch den Entzündungsprozess eine Vielzahl von Zytokinen freigesetzt werden, die wiederum über Chemotaxis weitere Zelltypen rekrutieren können (z.B. Fibroblasten). Einwandernde und ortsständige Fibroblasten sind für die Sehnenheilung essentiell (Sharma and Maffulli 2005).

Ergebnisse der Scorebewertung belegten, dass sich die Versuchsgruppen nach 6 Wochen kaum untereinander unterschieden und signifikant von der gesunden Kontrolle abwichen.

12 Wochen nach dem Sehndefekt waren in der HE-Färbung die Defektareale kaum mehr vom gesunden Sehngewebe zu unterscheiden. Die Versuchsgruppen erzielten höhere Punktzahlen im histologischen Score als nach 6 Wochen, erreichten aber das Kontrollniveau nicht, was vermuten lässt, dass die Sehnenheilung nach 12 Wochen noch nicht abgeschlossen war. Nagasawa und Mitarbeiter beschrieben ebenfalls die verbesserte Histologie der heilenden Achillessehne im Kaninchen 12 Wochen nach dem künstlichen Sehndefekt gegenüber 6 Wochen. Sie fanden longitudinale Ausrichtung der Kollagenfasern jedoch wurden die biomechanischen Kennwerte zu diesem Zeitpunkt der unoperierten Kontroll-Achillessehne ebenfalls nicht erreicht (Nagasawa, Noguchi et al. 2008).

Die Van Kossa-Färbung wurde als Analyse gewählt, um in den Sehnenpräparaten die Calcifizierung der EZM nachzuweisen. Salingcarnboriboon et al. wiesen in Sehnenzelllinien eine Alkalische-Phosphatase-Aktivität an der minimalen Detektionsgrenze nach, jedoch konnte diese Aktivität durch Zugabe von BMP2 induziert werden. Die Möglichkeit zu einer Transdifferenzierung von Sehnenzellen zu Knochenmatrix-exprimierenden Zellen ist daher denkbar (Salingcarnboriboon, Yoshitake et al. 2003).

In keiner der postoperativen Gewebeschnitte konnte jedoch die Synthese einer knochentypischen Matrix dargestellt werden.

#### 6.7.4 Bewertung des Tierversuches mittels Elastischem Faser Score

Das Vorkommen von Elastin bzw. elastischen Fasern in der EZM der Sehne ist in der Literatur mit 1- 2 % angegeben (Kannus 2000).

Elastische Fasern in der Sehne erhöhen die Elastizität des Gewebes und ermöglichen nach einer Zugbelastung die Rückdehnung des Gewebes.

Um diese Fasern in den Gewebeschnitten sichtbar zu machen, wurden Resorcin-Fuchsin-Färbungen durchgeführt. Menge und Verteilung konnten mithilfe eines dritten Scores dokumentiert werden. In den gesunden Kontrollsehnen waren wenige zu den Kollagenfasern parallel verlaufende Fasern in der EZM zu erkennen. In den Leerdefekten nach 6 Wochen waren Fasern zu sehen, die sowohl an den neuen Gefäßen assoziiert schienen als auch parallel und quer zur Matrixausrichtung verliefen. Sie waren zudem nicht nur auf den Defektbereich begrenzt. Für den elastischen Knorpel sind solche quer zur extrazellulären Matrix verlaufenden elastischen Fasern ebenfalls beschrieben (Mithieux and Weiss 2005). Das könnte ebenfalls ein Indiz für die Anpassung der Sehnenmatrix an die gesteigerten biomechanischen Belastungen nach der Sehnenverletzung sein. Die Instabilität des Sehngewebes führte zu einer raschen Synthese (6 Wochen) elastischer Fasern. Der Gehalt an elastischen Fasern war in der Sehnenzell-PGA-Gruppe geringer und ähnlicher zur Kontrolle als in der PGA-Gruppe.

Zytokine und Wachstumsfaktoren haben eine Schlüsselrolle bei der Gewebeheilung (Maffulli, Moller et al. 2002). Aus der Literatur ist bekannt, dass entzündungsfördernde Zytokine wie TNF $\alpha$  (John, Lodka et al. 2010) und IL-1 $\beta$  (Qi, Chi et al. 2006) in kultivierten Sehnenzellen die Genexpression von Elastin beeinflussen. In Gegenwart von Entzündungsprozessen *in vivo* spricht dies für die Beteiligung von Zytokinen am Remodelling der Sehne. Das Vorkommen von TNF $\alpha$  in Synovialflüssigkeit und Il-1 in entzündlichen Gelenken, in der Umgebung von Sehnen, wurde in der Literatur schon belegt (Evans 1999).

Nach 12 Wochen verringerte sich die Menge und es konnten nur noch in den Leerdefekten elastische Fasern gesehen werden.

Dieses Scoresystem, welches auf der Analyse verschiedener Charakteristika der Sehnenheilung beruht, wurde für das Tiermodell erstellt. Beim Menschen sind beim Heilungsprozess Unterschiede denkbar.

So währt die Heilung eines Defektes beim Menschen länger, während das Regenerationspotential beim Kaninchen höher ist. Jedoch sind die Merkmale der heilenden Sehne mit Hypozellularität, verstärkter Angiogenese oder Kallusbildung für den Menschen ebenfalls beschrieben (Moller, Evans et al. 2000).

## 6.8 Variation der PGA-Geometrie

Durch ein Kooperationsprojekt gelang es in dieser Arbeit, PGA-Vliese zu untersuchen, die eine bestimmbare geometrische Ausrichtung der Biomaterial-Fasern aufwiesen. Am Institut für Polymerforschung in Dresden, in der Abteilung für Verbundwerkstoffe, wurden mittels eines Stickverfahrens Trägermaterialien hergestellt. Es sind dabei verschiedenste Stickmuster denkbar. Durch die beeinflussbare Ausrichtung der Biomaterial-Fasern kann die Adhäsion und vor allem die Ausrichtung der neu synthetisierten EZM unterstützt werden. Des Weiteren können verschiedene Fasermaterialien miteinander kombiniert werden. Moffat und Mitarbeiter untersuchen PLGA-Biomaterialien *in vitro* mit Sehnenzellen aus einer Schultersehne. Sie stellten linear ausgerichtetes PLGA ungeordnetem PLGA gegenüber und fanden heraus, dass die Sehnenzellen an beiden Materialgeometrien adhärirten und EZM ebenfalls entlang der Faser-Ausrichtung synthetisierten. Die EZM, die jedoch auf den linearen PLGA-Fasern entstand, wies eine deutlich bessere Biomechanik, selbst nach der Degradation des Biomaterials und über die gesamte Versuchszeit, auf (Moffat, Kwei et al. 2009). Inui publizierte 2009 eine Arbeit mit Poly-L-Laktidsäure-(PLLA)-Trägermaterialien unterschiedlicher Ausrichtung und Oberflächenbeschaffenheit. An dem linearen Material konnte neben einer vermehrten Zelladhäsion auch die Beibehaltung der biomechanischen Kennwerte über die Versuchszeit beobachtet werden (Inui, Kokubu et al. 2010). Auch Shang et al. beschrieben eine verbesserte Adhäsion und höhere Proliferationsrate bei der Kultivierung von Bandzellen des Mundraumes auf PLGA-Fasern, die linear ausgerichtet und quervernetzt wurden (Shang, Yang et al. 2010).

Im Rahmen dieses Projektes wurde das gestickte PGA-Vlies mit verschiedenen Strategien mit Sehnenzellen besiedelt. Dabei kamen die Zentrifugation-, die Spinnerflaschen- und die Fibrinkultur zum Einsatz. Die Zentrifugation konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da die Maschenweite zu groß war und die Sehnenzellen nicht wie beim ungewobenen PGA hängen blieben. Die Zellzahl auf dem Plattenboden nach der Zentrifugation war in den gestickten PGA-Vliesen höher als in den ungewobenen Proben.

Sahoo et al. kombinierte gestickte PLGA-Mikrofasern mit Nanofasern, die die Poren verkleinern halfen und zu einer verbesserten Zellproliferation und zur verstärkten Kollagen Typ I, Decorin und Biglykan Synthese im Vergleich zu den PLGA-Mikrofaser ohne Nanofasern führten (Sahoo, Ouyang et al. 2006).

Die Spinnerflaschenkultur zeigte in den Analysen der Vitalität und der Histologie nur wenige vitale, adhärenzte Zellen. Sie war vergleichbar mit der PGA-Spinnerflaschenkultur. Die Fibrinkultur erwies sich auch für diese Trägermaterial-Variante in den Analysen als effizienteste Besiedelung.

Auch die Kombination der gestickten PGA-Vliese mit anderen Biomaterialien ist möglich und könnte sowohl Adhärenz als auch Matrixausbildung unterstützen.

## 6.9 Ausblick

Um das genaue Schicksal der implantierten Sehnenzellen *in vivo* aufzuklären, wären Versuche mit markierten Zellen sinnvoll. Die Interaktion von Sehnenzellen mit immunkompetenten Zellen ist nur wenig erforscht, stellt aber eine wissenswerte Grundlage zum Verständnis der Sehnenheilung dar.

Im partiellen Defekt blieben die Seitenränder neben dem gestanzten Sehnendefekt erhalten und schwächten die Effekte möglicherweise durch teilweise Entlastung des Implantates ab. Ein kompletter Sehnendefekt z.B. ein Rupturmodell wäre interessant, um die Widerstandskraft des PGA *in vivo* zu testen.

Durch Kenntnis der biomechanischen Kennwerte der Sehne kann eine Biomaterialgeometrie bestimmt werden, die diesen Verhältnissen *in vivo* nahe kommt.

Derzeit versagen Implantate nach Sehnenoperationen oft, da sie sich von der Knochenansatzstelle lösen. Hier wäre eine Co-Kultivierung verschiedener Zelltypen z.B. Knochen- und Sehnenzellen in Kombination mit unterschiedlichen Biomaterialien bzw. unterschiedlicher Materialverarbeitungen eine Möglichkeit, eine Enthese zu konstruieren.

Des Weiteren wären Arbeiten im Sehnen Tissue Engineering mit Verbundwerkstoffen denkbar. Mineralische Fasern haben das Potential, die Ansäuerung des Zellkulturmediums durch die Degradation der synthetischen Polyester zu neutralisieren und folglich die Biokompatibilität zu erhöhen.

Der Einsatz von mechanischer Stimulation *in vitro* auf die 3D-Implantate ist nach dem heutigen Stand zudem unumgänglich für weitere Forschungen zur Sehnenheilung.

Die natürliche Sehnenmatrix konnte zwar bisher nicht mit Erfolg rezellularisiert werden, hat aber das Potential große Sehnendefekte zu überbrücken und die Zuglast ohne Transplantatschäden vor Ort aufzunehmen. Eine Optimierung von Zellzahl und Strategie zur Wiederbesiedelung erscheint demzufolge lohnenswert.

## 7. Zusammenfassung

Die Kombination der steigenden Fallzahlen von Sehnenverletzungen durch den demographischen Wandel sowie der verstärkten Ausübung von Leistungssportarten mit ungenügenden medizinischen Behandlungsmöglichkeiten erklärt den Bedarf an alternativen Lösungen. Das Konstruieren von Sehngewebe außerhalb des Organismus stellt einen viel versprechenden Ansatz hierfür dar. Ziel dieser Arbeit war es, einen implantierbaren Sehnenzell-Biomaterial-Verbund herzustellen und seinen Einfluss auf das Heilungsergebnis zu untersuchen.

Zunächst wurden sechs Strategien zur Besiedelung von Polyglykolsäure (PGA)-Scaffolds mit Sehnenzellen genutzt und das Konstrukt im Hinblick auf Histologie, Morphologie und Vitalität der aufgebrauchten Sehnenzellen untersucht. Es handelte sich um statische Besiedelungsverfahren (Adhäsions-, Transwell-, Zentrifugations-, Fibrinkultur) sowie zwei dynamische Techniken (Roller- und Spinnerflaschenkulturen).

Um den Einfluss des Kultursystems auf das Differenzierungsprofil von Sehnenzellen zu bestimmen, wurden Histomorphologie und Expression typischer Sehnenkomponenten in dreidimensionalen (3D) Polylaktid-Co-Glykolsäure (PLGA) Fibrinkulturen sowie Biomaterial-freien 3D-Massenzellkulturen mit der für die Zellexpansion notwendigen zweidimensionalen (2D) Monolayerkultur und der intakten Sehne verglichen. Das Expressionsprofil wurde außerdem in der Monolayerkultur über 12 Passagen beobachtet. Im partiellen Achillessehnendefekt des Kaninchens wurden schließlich die komplexen biologischen Reaktionen eines Organismus auf ein mit Sehnenzellen besiedeltes oder zellfreies PGA-Fibrin-Konstrukt beleuchtet. Als Kontrolle dienten unbehandelte Sehnendefekte. Zu der Beurteilung der Heilung wurde ein mehrstufiges Scoresystem erstellt.

Beim Vergleich der Besiedelungstechniken wurde der Einsatz der Fibrinkultur für die Arbeit mit Sehnenzellen als effizienteste Strategie ausgewählt. Die Daten gaben Hinweise auf eine Dedifferenzierung der Zellen in der 2D-Kultur im direkten Vergleich zur Sehne. Diese konnten durch Einbringen der Zellen in ein 3D-System reduziert werden. Als Anzeichen einer Redifferenzierung in den 3D-Kulturen synthetisierten die Zellen Sehnenmatrixkomponenten und spezifische Transkriptionsfaktoren auf einem ähnlichen Niveau wie die Sehne, insbesondere nach 4 Wochen Kultivierungsdauer. Beim Vergleich der beiden 3D-Systeme waren jedoch Unterschiede im Expressionsprofil erkennbar.

Über den Beobachtungszeitraum von 3- 12 Passagen zeigten die *in vitro*-expandierten Zellen keine signifikant veränderte Expression der meisten untersuchten Gene, so dass für die Herstellung der Konstrukte Zellen der Passagen 6 - 9 Verwendung fanden.

Das Implantat erwies sich bei der makroskopischen Bewertung der Defektheilung nach 6 und 12 Wochen, beim Vergleich der Sehngewichte sowie bei der histologischen Auswertung nach 6 Wochen als vorteilhaft im Vergleich zu den Kontrollen.

Mit dieser Doktorarbeit konnte erstmals ein umfassender, mehrteiliger Score erstellt werden, der eine Vielzahl der Charakteristika der Sehnenheilung abbildet und übertragbar die Bewertung einer Biomaterial-unterstützten Heilung im Sehnendefekt ermöglicht.

Des Weiteren wurden erste Versuche mit einer dezellularisierten natürlichen Sehnenmatrix und gestickten PGA-Vliesvarianten als weiterführende Alternativen durchgeführt.

## 8. Abstract

The combination of increasing case numbers of tendon injuries induced by demographic change and intensified competitive sports with insufficient medical treatment assert the need of alternative solutions. Engineering of tendon tissue outside the organism constitute a promising strategy. Aim of this study was to produce a tenocyte-biomaterial-composite for further implantation and to analyse its influence on tendon healing.

At first six strategies seeding cells onto polyglycolic acid (PGA) scaffolds were used. The construct was inspected for histology, morphology and vitality of cells. Static seeding procedures (adhesion, transwell, centrifugation and fibringel-culture) and two dynamic seeding procedures (roller and spinnerflask-culture) were compared.

To identify the influence of the culture system to the state of tenocyte differentiation histomorphology and expression of typical tendon components were compared. The investigations included the three-dimensional (3D) poly(lactide-co-glycolide)- (PLGA)-fibringel-culture, the 3D high density culture, the expansion-culture and also healthy tendon.

Additionally, the expression profile was monitored in expansion-culture (2D) over 12 passages. Complex biological reactions *in vivo* to seeded PGA-fibringel-culture and cell free PGA-construct were detected in a partial tendon defect of rabbit Achilles tendon. Untreated defects served as controls. A multi-level score system was designed to monitor tendon healing.

The fibringel-culture was chosen to be the most efficient seeding strategy for the work with tenocytes. Collected data gave indication of de-differentiation of tenocytes cultured in 2D-culture in direct comparison to tendon tissue. Insertion of tenocytes in 3D-cultures reduced the impression of de-differentiation. Indicators of tenocytes re-differentiation in 3D-cultures were expressions of matrix components and transcription factors at a similar level compared with tendon especially after 4 weeks of culture time. Differences in expression profile could be detected when both 3D-systems were compared. The *in vitro* cultured tenocytes showed no change in expression profile in most analysed genes when monitored over 12 passages. Therefore, cells of passage 6–9 could be used for engineering tendon constructs.

The implant offered better macroscopical score after 6 and 12 weeks as well as reduced tendon weight and better histology after 6 weeks compared to the empty defect or PGA alone. A new comprehensive multi-part score was established to display a multitude of characteristics of tendon healing that is transferable to other biomaterial-supported healing of tendon defects. Furthermore, pioneer tests with decellularised natural tendon and embroidered PGA scaffolds were conducted.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	Lsg.	Lösung
µg	Mikrogramm	M	Mol
µm	Mikrometer	M.	Musculus
AB	Alcianblau	mPa	MegaPascal
Abb.	Abbildung	mg	Milligramm
ad	auf	min	Min
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	ml	Milliliter
bp	Basenpaare	mm	Millimeter
BSA	bovines Serumalbumin	mRNA	messenger
cDNA	copy		Ribonukleinsäure
	Desoxyribonukleinsäure	MSC	mesenchymale Stammzellen
cm	Centimeter	ng	Nanogram
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	nm	Nanometer
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	OD	Optische Dichte
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PFA	Paraformaldehyd
d.h.	das heißt	PG	Proteoglykan
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	PGA	Polyglykolsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	PI	Propidiumiodid piperazinyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PLGA	Polylaktid-Co-Gykolid
DNase	Desoxyribonuklease	PLLA	Polylaktidsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	RGD	Arg-Glu-Asp
DTT	Dithiothreitol	RIN	RNA-Integritätsnummer
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	RNA	Ribonukleinsäure
	Ethansulfonsäure	rpm	Umdrehung pro Min
et al.	et alii (♂) et aliae (♀), übersetzt: und andere	RT	Raumtemperatur
EZM	Extrazelluläre Matrix	RT PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
FDA	Fluoresceindiacetat	SCX	Scleraxis
FKS	Fetales Kälberserum	SDS	Natriumdodecylsulfat
<b>g</b>	Erdbeschleunigung	Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9
g	Gramm	Tab.	Tabelle
ggf.	gegebenenfalls	TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
HE	Hämatoxylin-Eosin	TBE	Tris/ Borat/ EDTA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-	TNF	Tumornekrosefaktor
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase	u.a.	unter anderem
IL	Interleukin	UV	Ultraviolette Strahlung
kDa	Kilo Dalton	V	Volt
kg	Kilogramm	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
KG	Körpergewicht	vgl.	vergleichend
		z.B.	zum Beispiel

## 10. Literatur

- AbiEzzi, S. S., D. S. Gesink, et al. (1995). "Increased expression of the beta 1, alpha 5, and alpha v integrin adhesion receptor subunits occurs coincident with remodeling of stress-deprived rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments." J Orthop Res **13**(4): 594-601.
- Abousleiman, R. I., Y. Reyes, et al. (2009). "Tendon tissue engineering using cell-seeded umbilical veins cultured in a mechanical stimulator." Tissue Eng Part A **15**(4): 787-95.
- Almarza, A. J., S. M. Augustine, et al. (2008). "Changes in gene expression of matrix constituents with respect to passage of ligament and tendon fibroblasts." Ann Biomed Eng **36**(12): 1927-33.
- Altman, G. H., R. L. Horan, et al. (2002). "Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments." Biomaterials **23**(20): 4131-41.
- Amlang, M. H. and H. Zwipp (2006). "[Damage to large tendons: Achilles, patellar and quadriceps tendons]." Chirurg **77**(7): 637-49, quiz 649.
- Anitua, E., M. Sanchez, et al. (2006). "Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities." J Biomed Mater Res A **77**(2): 285-93.
- Aspenberg, P. (2007). "Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review." Int Orthop **31**(6): 783-9.
- Asundi, K. R. and D. M. Rempel (2008). "MMP-1, IL-1beta, and COX-2 mRNA expression is modulated by static load in rabbit flexor tendons." Ann Biomed Eng **36**(2): 237-43.
- Athanasίου, K. A., G. G. Niederauer, et al. (1996). "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers." Biomaterials **17**(2): 93-102.
- Bagnaninchi, P. O., Y. Yang, et al. (2007). "Tissue engineering for tendon repair." Br J Sports Med **41**(8): e10; discussion e10.
- Bagnaninchi, P. O., Y. Yang, et al. (2007). "Chitosan microchannel scaffolds for tendon tissue engineering characterized using optical coherence tomography." Tissue Eng **13**(2): 323-31.
- Benjamin, M., E. Kaiser, et al. (2008). "Structure-function relationships in tendons: a review." J Anat **212**(3): 211-28.
- Benjamin, M. and J. R. Ralphs (1998). "Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load." J Anat **193** ( Pt 4): 481-94.
- Bernard-Beaubois, K., C. Hecquet, et al. (1997). "Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes." Cell Biol Toxicol **13**(2): 103-13.
- Berrier, A. L. and K. M. Yamada (2007). "Cell-matrix adhesion." J Cell Physiol **213**(3): 565-73.
- Burg, K. J., W. D. Holder, Jr., et al. (2000). "Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds." J Biomed Mater Res **52**(3): 576.
- Canty, E. G. and K. E. Kadler (2002). "Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **133**(4): 979-85.
- Ceozzo, K., A. Gaynor, et al. (2006). "Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation." Tissue Eng **12**(2): 301-8.
- Cetti, R., J. Junge, et al. (2003). "Spontaneous rupture of the Achilles tendon is preceded by widespread and bilateral tendon damage and ipsilateral inflammation: a clinical and histopathologic study of 60 patients." Acta Orthop Scand **74**(1): 78-84.
- Chen, J. M., C. Willers, et al. (2007). "Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits." Tissue Eng **13**(7): 1479-91.

- Chiquet, M., A. S. Renedo, et al. (2003). "How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?" *Matrix Biol* **22**(1): 73-80.
- Chong, A. K., A. D. Ang, et al. (2007). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model." *J Bone Joint Surg Am* **89**(1): 74-81.
- Clayton, R. A. and C. M. Court-Brown (2008). "The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries." *Injury* **39**(12): 1338-44.
- Clegg, P. D., S. Strassburg, et al. (2007). "Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons." *Int J Exp Pathol* **88**(4): 227-35.
- Curwin, S. L., A. C. Vailas, et al. (1988). "Immature tendon adaptation to strenuous exercise." *J Appl Physiol* **65**(5): 2297-301.
- Deng, D., W. Liu, et al. (2009). "Engineering human neo-tendon tissue in vitro with human dermal fibroblasts under static mechanical strain." *Biomaterials* **30**(35): 6724-30.
- Docheva, D., E. B. Hunziker, et al. (2005). "Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation." *Mol Cell Biol* **25**(2): 699-705.
- Doherty, G. P., Y. Koike, et al. (2006). "Comparative anatomy of rabbit and human achilles tendons with magnetic resonance and ultrasound imaging." *Comp Med* **56**(1): 68-74.
- Dourte, L. M., A. F. Kuntz, et al. (2008). "Twenty-five years of tendon and ligament research." *J Orthop Res* **26**(10): 1297-305.
- Evans, C. H. (1999). "Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons." *Sports Med* **28**(2): 71-6.
- Ghidoni, I., T. Chlapanidas, et al. (2008). "Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine." *Cytotechnology* **58**(1): 49-56.
- Gilbert, T. W., T. L. Sellaro, et al. (2006). "Decellularization of tissues and organs." *Biomaterials* **27**(19): 3675-83.
- Godbey, W. T., S. B. Hindy, et al. (2004). "A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds." *Biomaterials* **25**(14): 2799-805.
- Gupta, R. and T. Q. Lee (2007). "Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology." *J Shoulder Elbow Surg* **16**(5 Suppl): S149-57.
- Halici, M., S. Karaoglu, et al. (2004). "Sodium hyaluronate regulating angiogenesis during Achilles tendon healing." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **12**(6): 562-7.
- Hannafin, J. A., S. P. Arnoczky, et al. (1995). "Effect of stress deprivation and cyclic tensile loading on the material and morphologic properties of canine flexor digitorum profundus tendon: an in vitro study." *J Orthop Res* **13**(6): 907-14.
- Heino, J. (2000). "The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions." *Matrix Biol* **19**(4): 319-23.
- Herbort, M., A. Haber, et al. (2008). "Biomechanical comparison of the primary stability of suturing Achilles tendon rupture: a cadaver study of Bunnell and Kessler techniques under cyclic loading conditions." *Arch Orthop Trauma Surg* **128**(11): 1273-7.
- Hess, G. W. (2009). "Achilles tendon rupture: a review of etiology, population, anatomy, risk factors, and injury prevention." *Foot Ankle Spec* **3**(1): 29-32.
- Hildebrand, K. A., F. Jia, et al. (2002). "Response of donor and recipient cells after transplantation of cells to the ligament and tendon." *Microsc Res Tech* **58**(1): 34-8.
- Hungerford, J. E., M. T. Compton, et al. (1996). "Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis." *J Cell Biol* **135**(5): 1383-90.
- Ide, J., K. Kikukawa, et al. (2009). "The effects of fibroblast growth factor-2 on rotator cuff reconstruction with acellular dermal matrix grafts." *Arthroscopy* **25**(6): 608-16.
- Ingram, J. H., S. Korossis, et al. (2007). "The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction." *Tissue Eng* **13**(7): 1561-72.

- Inui, A., T. Kokubu, et al. "Potency of double-layered poly L-lactic acid scaffold in tissue engineering of tendon tissue." Int Orthop **34**(8): 1327-32.
- Inui, A., T. Kokubu, et al. (2010). "Potency of double-layered poly L-lactic acid scaffold in tissue engineering of tendon tissue." Int Orthop **34**(8): 1327-32.
- Jack, E. A. (1950). "Experimental rupture of the medial collateral ligament of the knee." J Bone Joint Surg Br **32-B**(3): 396-402.
- James, R., G. Kesturu, et al. (2008). "Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options." J Hand Surg Am **33**(1): 102-12.
- Janmey, P. A., J. P. Winer, et al. (2009). "Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications." J R Soc Interface **6**(30): 1-10.
- Jarvinen, M., P. Kannus, et al. (1991). "Macromolecular composition of the myotendinous junction." Exp Mol Pathol **55**(3): 230-7.
- Jeon, O., C. Powell, et al. (2010). "Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorable physical properties and cell adhesivity." Tissue Eng Part A **16**(9): 2915-25.
- John, T., D. Lodka, et al. (2010). "Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes." J Orthop Res **28**(8): 1071-7.
- Johnson, D. S. and R. B. Smith (2001). "Outcome measurement in the ACL deficient knee--what's the score?" Knee **8**(1): 51-7.
- Jozsa, L. and J. Balint (1978). "[Pathology of the spontaneous tendon ruptures (author's transl)]." Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb **21**(3): 176-93.
- Jozsa, L., J. B. Balint, et al. (1979). "Histochemical and ultrastructural study of adult human tendon." Acta Histochem **65**(2): 250-7.
- Jozsa, L., M. Kvist, et al. (1991). "Structure and macromolecular composition of the myotendineal junction. Histochemical, immunohistochemical and electron microscopic study of the rat calf muscles." Acta Morphol Hung **39**(4): 287-97.
- Juncosa-Melvin, N., G. P. Boivin, et al. (2006). "Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs for Achilles tendon repair." Tissue Eng **12**(4): 681-9.
- Juncosa-Melvin, N., J. T. Shearn, et al. (2006). "Effects of mechanical stimulation on the biomechanics and histology of stem cell-collagen sponge constructs for rabbit patellar tendon repair." Tissue Eng **12**(8): 2291-300.
- Kannus, P. (2000). "Structure of the tendon connective tissue." Scand J Med Sci Sports **10**(6): 312-20.
- Kannus, P. and L. Jozsa (1991). "Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients." J Bone Joint Surg Am **73**(10): 1507-25.
- Karpakka, J., P. Virtanen, et al. (1991). "Collagen synthesis in rat skeletal muscle during immobilization and remobilization." J Appl Physiol **70**(4): 1775-80.
- Kartus, J., T. Movin, et al. (2001). "Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts." Arthroscopy **17**(9): 971-80.
- Khan, R. J. and R. L. Carey Smith (2008). "Surgical interventions for treating acute Achilles tendon ruptures." Cochrane Database Syst Rev(9): CD003674.
- Kjaer, M. (2004). "Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading." Physiol Rev **84**(2): 649-98.
- Kleinman, H. K., D. Philp, et al. (2003). "Role of the extracellular matrix in morphogenesis." Curr Opin Biotechnol **14**(5): 526-32.
- Koob, T. J. (2002). "Biomimetic approaches to tendon repair." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **133**(4): 1171-92.
- Koob, T. J. and A. P. Summers (2002). "Tendon--bridging the gap." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **133**(4): 905-9.

- Kryger, G. S., A. K. Chong, et al. (2007). "A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering." *J Hand Surg Am* **32**(5): 597-605.
- Kuo, C. K. and R. S. Tuan (2008). "Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Tissue Eng Part A* **14**(10): 1615-27.
- Lang, J. (1960). "[On the sheath of tendons, muscles, fascia and blood vessels]." *Z Anat Entwicklungsgesch* **122**: 197-231.
- Langberg, H., L. Rosendal, et al. (2001). "Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans." *J Physiol* **534**(Pt 1): 297-302.
- Lejard, V., G. Brideau, et al. (2007). "Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts." *J Biol Chem* **282**(24): 17665-75.
- Lin, V. S., M. C. Lee, et al. (1999). "Ligament tissue engineering using synthetic biodegradable fiber scaffolds." *Tissue Eng* **5**(5): 443-52.
- Liu, S. H., R. S. Yang, et al. (1995). "Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review." *Clin Orthop Relat Res*(318): 265-78.
- Liu, W., B. Chen, et al. (2006). "Repair of tendon defect with dermal fibroblast engineered tendon in a porcine model." *Tissue Eng* **12**(4): 775-88.
- Liu, Y., H. S. Ramanath, et al. (2008). "Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies." *Trends Biotechnol* **26**(4): 201-9.
- Lohrer, H. and T. Nauck (2010). "[Validation of the VISA-A-G questionnaire for German-speaking patients suffering from Haglund's disease]." *Sportverletz Sportschaden* **24**(2): 98-106.
- Longo, U. G., A. Lamberti, et al. (2010). "Tendon augmentation grafts: a systematic review." *Br Med Bull* **94**: 165-88.
- Luck, M., K. F. Pistel, et al. (1998). "Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition." *J Control Release* **55**(2-3): 107-20.
- Maffulli, N., H. D. Moller, et al. (2002). "Tendon healing: can it be optimised?" *Br J Sports Med* **36**(5): 315-6.
- McKenna, L. A., A. Gehrsitz, et al. (2000). "Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage." *Anal Biochem* **286**(1): 80-5.
- Mithieux, S. M. and A. S. Weiss (2005). "Elastin." *Adv Protein Chem* **70**: 437-61.
- Moffat, K. L., A. S. Kwei, et al. (2009). "Novel nanofiber-based scaffold for rotator cuff repair and augmentation." *Tissue Eng Part A* **15**(1): 115-26.
- Moller, H. D., C. H. Evans, et al. (2000). "[Current aspects of tendon healing]." *Orthopade* **29**(3): 182-7.
- Movin, T., A. Gad, et al. (1997). "Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients." *Acta Orthop Scand* **68**(2): 170-5.
- Murchison, N. D., B. A. Price, et al. (2007). "Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons." *Development* **134**(14): 2697-708.
- Nagasawa, K., M. Noguchi, et al. (2008). "Static and dynamic biomechanical properties of the regenerating rabbit Achilles tendon." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* **23**(6): 832-8.
- Nakamura, N., D. A. Hart, et al. (2000). "Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo." *J Orthop Res* **18**(4): 517-23.
- O'Brien, M. (1997). "Structure and metabolism of tendons." *Scand J Med Sci Sports* **7**(2): 55-61.
- Omae, H., Y. L. Sun, et al. (2011). "Engineered tendon with decellularized xenotendon slices and bone marrow stromal cells: an in vivo animal study." *J Tissue Eng Regen Med*.

- Ouyang, H. W., J. C. Goh, et al. (2003). "Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon." *Tissue Eng* **9**(3): 431-9.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Pihlajamaki, H., O. Tynnenen, et al. (2008). "Enveloping bioabsorbable polyglycolide membrane and immobilization in Achilles tendon repair: A comparative experimental study on rabbits." *J Orthop Res* **26**(2): 264-70.
- Pufe, T., B. Kurz, et al. (2005). "The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system." *Ann Anat* **187**(5-6): 461-72.
- Pufe, T., W. J. Petersen, et al. (2005). "The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease." *Scand J Med Sci Sports* **15**(4): 211-22.
- Qi, J., L. Chi, et al. (2006). "Interleukin-1beta increases elasticity of human bioartificial tendons." *Tissue Eng* **12**(10): 2913-25.
- Qin, T. W., Z. M. Yang, et al. (2005). "Adhesion strength of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) substrates." *Biomaterials* **26**(33): 6635-42.
- Ralphs, J. R., M. Benjamin, et al. (1998). "Regional differences in cell shape and gap junction expression in rat Achilles tendon: relation to fibrocartilage differentiation." *J Anat* **193** ( Pt 2): 215-22.
- Ralphs, J. R., A. D. Waggett, et al. (2002). "Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro." *Matrix Biol* **21**(1): 67-74.
- Ramakers, C., J. M. Ruijter, et al. (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." *Neurosci Lett* **339**(1): 62-6.
- Reddy, G. K., L. Stehno-Bittel, et al. (1999). "Matrix remodeling in healing rabbit Achilles tendon." *Wound Repair Regen* **7**(6): 518-27.
- Reed, C. C. and R. V. Iozzo (2002). "The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis." *Glycoconj J* **19**(4-5): 249-55.
- Rees, J. D., A. M. Wilson, et al. (2006). "Current concepts in the management of tendon disorders." *Rheumatology (Oxford)* **45**(5): 508-21.
- Riley, G. P., R. L. Harrall, et al. (1996). "Tenascin-C and human tendon degeneration." *Am J Pathol* **149**(3): 933-43.
- Riley, G. P., R. L. Harrall, et al. (1994). "Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis." *Ann Rheum Dis* **53**(6): 359-66.
- Rosso, F., G. Marino, et al. (2005). "Smart materials as scaffolds for tissue engineering." *J Cell Physiol* **203**(3): 465-70.
- Saber, S., A. Y. Zhang, et al. (2010). "Flexor tendon tissue engineering: bioreactor cyclic strain increases construct strength." *Tissue Eng Part A* **16**(6): 2085-90.
- Sahoo, S., H. Ouyang, et al. (2006). "Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering." *Tissue Eng* **12**(1): 91-9.
- Salingcarnboriboon, R., H. Yoshitake, et al. (2003). "Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property." *Exp Cell Res* **287**(2): 289-300.
- Schulze-Tanzil, G., A. Mobasher, et al. (2004). "Cultivation of human tenocytes in high-density culture." *Histochem Cell Biol* **122**(3): 219-28.
- Schweitzer, R., J. H. Chyung, et al. (2001). "Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments." *Development* **128**(19): 3855-66.
- Scott, J. E. (2003). "Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model." *J Physiol* **553**(Pt 2): 335-43.

- Sendzik, J., M. Shakibaei, et al. (2010). "Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells." *Int J Antimicrob Agents* **35**(4): 366-74.
- September, A. V., M. P. Schweltnus, et al. (2007). "Tendon and ligament injuries: the genetic component." *Br J Sports Med* **41**(4): 241-6; discussion 246.
- Sha'ban, M., S. H. Kim, et al. (2008). "Fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold promotes early chondrogenesis of articular chondrocytes: an in vitro study." *J Orthop Surg Res* **3**: 17.
- Shang, S., F. Yang, et al. (2010). "The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells." *Eur Cell Mater* **19**: 180-92.
- Sharma, P. and N. Maffulli (2005). "Tendon injury and tendinopathy: healing and repair." *J Bone Joint Surg Am* **87**(1): 187-202.
- Shea, K. P., M. B. McCarthy, et al. (2010). "Human tendon cell response to 7 commercially available extracellular matrix materials: an in vitro study." *Arthroscopy* **26**(9): 1181-8.
- Shukunami, C., A. Takimoto, et al. (2006). "Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes." *Dev Biol* **298**(1): 234-47.
- Smith, R. K. and D. Heinegard (2000). "Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid and serum with tendon injury." *Equine Vet J* **32**(1): 52-8.
- Spalazzi, J. P., S. B. Doty, et al. (2006). "Development of controlled matrix heterogeneity on a triphasic scaffold for orthopedic interface tissue engineering." *Tissue Eng* **12**(12): 3497-508.
- Steinbruck, K. (1999). "[Epidemiology of sports injuries--25-year-analysis of sports orthopedic-traumatologic ambulatory care]." *Sportverletz Sportschaden* **13**(2): 38-52.
- Taylor, S. E., A. Vaughan-Thomas, et al. (2009). "Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems." *BMC Musculoskelet Disord* **10**: 27.
- Tischer, T., S. Aryee, et al. (2010). "Tissue engineering of the anterior cruciate ligament--sodium dodecyl sulfate-acellularized and revitalized tendons are inferior to native tendons." *Tissue Eng Part A* **16**(3): 1031-40.
- Tozer, S. and D. Duprez (2005). "Tendon and ligament: development, repair and disease." *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**(3): 226-36.
- Vaquette, C., S. Slimani, et al. (2010). "A poly(lactic-co-glycolic acid) knitted scaffold for tendon tissue engineering: an in vitro and in vivo study." *J Biomater Sci Polym Ed* **21**(13): 1737-60.
- Virchenko, O., P. Aspenberg, et al. (2008). "Low molecular weight heparin impairs tendon repair." *J Bone Joint Surg Br* **90**(3): 388-92.
- Vunjak-Novakovic, G., B. Obradovic, et al. (1998). "Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering." *Biotechnol Prog* **14**(2): 193-202.
- Waggett, A. D., M. Benjamin, et al. (2006). "Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load." *Eur J Cell Biol* **85**(11): 1145-54.
- Wall, M. E. and A. J. Banes (2005). "Early responses to mechanical load in tendon: role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **5**(1): 70-84.
- Wang, J. H. (2006). "Mechanobiology of tendon." *J Biomech* **39**(9): 1563-82.
- Wang, L. and J. P. Stegemann (2010). "Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide." *Biomaterials* **31**(7): 1612-8.
- Webb, K., R. W. Hitchcock, et al. (2006). "Cyclic strain increases fibroblast proliferation, matrix accumulation, and elastic modulus of fibroblast-seeded polyurethane constructs." *J Biomech* **39**(6): 1136-44.
- Woo, S. L. (2009). "Tissue engineering: use of scaffolds for ligament and tendon healing and regeneration." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **17**(6): 559-60.

- Yang, G., R. C. Crawford, et al. (2004). "Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions." J Biomech **37**(10): 1543-50.
- Yao, L., C. S. Bestwick, et al. (2006). "Phenotypic drift in human tenocyte culture." Tissue Eng **12**(7): 1843-9.
- Yokoya, S., Y. Mochizuki, et al. (2008). "Tendon-bone insertion repair and regeneration using polyglycolic acid sheet in the rabbit rotator cuff injury model." Am J Sports Med **36**(7): 1298-309.
- Yoon, J. H. and J. Halper (2005). "Tendon proteoglycans: biochemistry and function." J Musculoskelet Neuronal Interact **5**(1): 22-34.
- Young, R. G., D. L. Butler, et al. (1998). "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair." J Orthop Res **16**(4): 406-13.