

**Aus der Klinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Ein neuer Kreuzbandersatz - Tissue Engineering

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Meike van Staa
Tierärztin aus Dortmund**

**Berlin 2019
Journal-Nr.: 4148**

**Aus der Klinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Ein neuer Kreuzbandersatz -
Tissue Engineering**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Meike van Staa
Tierärztin
aus Dortmund**

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4148

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnberg
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Frank Buttgereit
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Kurtz

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dogs, anterior cruciate ligament (MeSH), posterior cruciate ligament (MeSH),
flow cytometry, tendons, ELISA, immunohistochemistry, cell culture, tissue culture

Tag der Promotion: 08.07.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-002-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

- **insbesondere meiner Mutter**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Anatomie des Kniegelenkes.....	3
2.2 Anatomie der Achillessehne des Hundes	5
2.3 Histologie des Kreuzbandes.....	5
2.4 Biomechanik des Kniegelenkes und Funktion der Kreuzbänder (funktionelle Anatomie).....	7
2.5 Kreuzbandruptur – Ätiologie und Pathogenese der Kreuzbanderkrankung	8
2.6 Therapieoptionen des Kreuzbandrisses	12
2.6.1 Konservativ	12
2.6.2 Operativ	13
Extraartikuläre Kreuzbandersatztechniken	13
Dynamische Stabilisierung - Osteotomieverfahren	14
Intraartikuläre Kreuzbandersatztechniken.....	18
Autografts	19
Allografts und Xenografts	21
Synthetisches	21
2.7 Einflussfaktoren des vorderen Kreuzbandersatzes.....	21
2.7.1 Transplantatwahl	21
2.7.2 Verankerungsverfahren.....	23
2.7.3 Um- und Einbauverhalten.....	24
2.8 Folgen des Kreuzbandrisses (Osteoarthritis).....	27
2.9 Tissue Engineering	28
2.9.1 Trägergerüst.....	29
2.9.2 Zellen	30
3. Material und Methoden.....	32
3.1 Material	32
3.1.1 Sehnen.....	32
3.1.2 Mesenchymale Stromazellen.....	34
3.1.3 Chondrozyten.....	35
3.1.4 Verwendete Materialien	36
3.1.5 Verwendete Reagenzien.....	37
3.1.6 Verwendete Antikörper.....	40
3.1.7 Verwendete ELISA und KITS.....	41
3.1.8 Verwendete Geräte und Software mit Hersteller und Firmensitz	42

3.2 Methoden.....	43
3.2.1 Dezellularisierung caniner, equiner und boviner Sehnen	43
Histologie und Immunfluoreszenz	43
DNA-Gehalt.....	44
Glykosaminoglykangehalt.....	44
Kollagengehalt	44
3.2.2 Isolierung caniner adipogener mesenchymaler Stromazellen	45
Monolayerkultivierung und Passagieren.....	45
Kryokonservierung und Revitalisierung	46
3.2.3 Differenzierung caniner adipogener mesenchymaler Stromazellen.....	46
Osteogenese	46
Adipogenese	47
Chondrogenese.....	48
3.2.4 Charakterisierung caniner adipogener mesenchymaler Stromazellen	48
Immunhistochemie und Durchflusszytometrie	48
3.2.5 Rezellularisierung caniner und equiner Sehnen mit ASCs.....	52
3.2.6 Untersuchung der Biokompatibilität caniner und equiner Sehnen	53
3.2.7 Untersuchung der Immunogenität caniner, equiner und boviner Sehnen im Vollblutassay	54
ELISA.....	55
3.2.8 Co-Kultivierung von caninen Chondrozyten und ASCs.....	56
Isolation caniner Chondrozyten.....	56
Titration der Zellzahlen und der Stimulation mit IL-1 β und TNF α	56
Co-Kultivierung	56
RNA-Isolation und cDNA-Synthese	57
3.2.9 Statistische Auswertung	58
4. Ergebnisse	59
4.1 Optimierung der Dezellularisierung von caninen und equinen Sehnen	59
4.1.1 Dezellularisierte Sehnen sind histologisch frei von Zellen	59
4.1.2 Dezellularisierte Sehnen weisen nur einen geringen DNA-Gehalt auf.....	60
4.1.3 Dezellularisierte Sehnen weisen einen vergleichbaren Glykosaminglykan- und Kollagengehalt auf wie native Sehnen – die extrazelluläre Matrix wird aufrechterhalten.....	62
4.1.4 Testung der Immunogenität von caninen und equinen dezellularisierten Sehnen.....	63
4.2 Isolation und Charakterisierung von caninen ASCs	65
4.2.1 Canine ASCs zeigen Plastikadhärenz und positives Proliferationsverhalten	65

4.2.2 Canine ASCs zeigen Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Linie	66
4.2.3 Canine ASCs weisen charakteristische Oberflächenmarker auf	67
4.2.4 Untersuchung des antiinflammatorischen Potentials von caninen ASC – Erste Vorversuche	69
4.3 Rezellularisierung equiner und caniner Sehnen mit caninen ASCs.....	72
4.3.1 Viabilität in Co-Kultur	72
4.3.2 Canine und equine Sehnen lassen sich mit caninen ASCs rezellularisieren	72
4.3.3 Immunogenität der rezellularisierten Sehnen.....	76
5. Diskussion.....	77
5.1 Optimierung der Dezellularisierung von caninen und equinen Sehnen	77
5.1.1 Material	77
5.1.2 Methoden	78
5.1.3 Ergebnisse.....	80
GAG	81
Kollagen.....	81
Biokompatibilität	82
5.2 Isolation und Charakterisierung von caninen ASCs	82
5.2.1 Differenzierung	83
5.2.2 Charakterisierung.....	84
5.3 Rezellularisierung equiner und caniner Sehnen mit caninen ASCs.....	84
5.3.1 Methoden	86
5.3.2 Ergebnisse.....	88
5.4 Immunogenität	88
5.5 Osteoarthritis als Sekundärerkrankung und die mögliche Prävention durch ASC-Therapie.....	89
Zusammenfassung.....	91
Summary	94
Literaturverzeichnis.....	97
Anhang	150
Publikationsverzeichnis.....	152
Danksagung.....	153
Selbstständigkeitserklärung	155

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über häufig genutzte extraartikuläre Kreuzbandersatztechniken.....	14
Tabelle 2: Komplikationen und deren Häufigkeit bei TPLO-Operationen.....	16
Tabelle 3: Komplikationen und deren Häufigkeit bei TTA-Operationen.....	17
Tabelle 4: Übersicht über häufig genutzte intraartikulären Kreuzbandersatztechniken.....	20
Tabelle 5: Sehnen Hund.....	33
Tabelle 6: Sehnen Pferd.....	34
Tabelle 7: Sehnen Rind.....	34
Tabelle 8: Zellen Hund.....	35
Tabelle 9: Verwendete Materialien.....	36
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien.....	37
Tabelle 11: Verwendete Antikörper.....	40
Tabelle 12: Verwendete ELISA und KITS.....	41
Tabelle 13: Verwendete Geräte und Software.....	42
Tabelle 14: Verwendete Antikörper, deren Klone und Isotypen.....	50
Tabelle 15: Exzitations- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.....	51
Tabelle 16: Oligonukleotidprimersequenzen.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mesenchymale Stammzellen.....	30
Abbildung 2: Flow Cytometrie. Gatingstrategie.....	52
Abbildung 3: Methode zur Generierung vergleichbarer Flächen an Sehnenmaterial.....	55
Abbildung 4: Repräsentative makroskopische Aufsicht und Querschnitt einer dezellularisierten caninen Sehne.....	59
Abbildung 5: Repräsentative makroskopische Aufsicht auf eine mit Triton X-100 dezellularisierte canine bzw. equine Sehne.....	60
Abbildung 6: Repräsentative histologische mit HE gefärbte Schnitte von 5 µm Dicke von caninen Sehnen.....	60
Abbildung 7: DNA-Gehalt caniner Sehnen nach Dezellularisierung über 24, 48 und 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von (A) Triton X-100 und (B) TnBP.....	61
Abbildung 8: DNA-Gehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten caninen Sehnen.....	61
Abbildung 9: DNA-Gehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten equinen Sehnen.....	61
Abbildung 10: DNA-Gehalt caniner Sehnen nach Dezellularisierung mit und ohne DNase.....	62
Abbildung 11: GAG- und Kollagengehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten caninen Sehnen.....	62
Abbildung 12: GAG- und Kollagengehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten equinen Sehnen.....	63
Abbildung 13: Rindersehne (BS) mit Hundeblood (CB).....	63
Abbildung 14: Gewichte der Sehnen.....	64
Abbildung 15: Vollblutassay mit Hundeblood (CB) und Sehnen vom Pferd (ES) oder Hund (CS).....	64
Abbildung 16: Vollblutassay mit Hundeblood (CB) und Sehnen vom Hund (CS).....	65
Abbildung 17: Mikroskopische Morphologie von caninen ASCs im zeitlichen Verlauf.....	66
Abbildung 18: Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in (A) osteogene (B) adipogene und (C) chondrogene Linie.....	66
Abbildung 19: Osteogenese.....	67
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Charakterisierung der caninen ASCs.....	68
Abbildung 21: Relative cIL-6 Konzentration im Überstand nach Stimulation.....	69

Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von IL6, MMP3, MMP13 und TIMP1 in Chondrozyten und ASCs.....	70
Abbildung 23: Relative mRNA-Expression von IL6, MMP3, MMP13 und TIMP1 in Chondrozyten co-kultiviert mit ASCs.....	71
Abbildung 24: Viabilität von caninen ASCs.....	72
Abbildung 25: Histologie. Hundesehne nativ.....	73
Abbildung 26: mit Triton X-100 dezellularisierte und 7 Tage rezellularisierte Hundesehne.....	74
Abbildung 27: mit TnBP dezellularisierte und 7 Tage rezellularisierte Hundesehne.....	74
Abbildung 28: A) native Pferdesehne HE-Färbung B) native Pferdesehne DAPI-Färbung C) mit Triton X-100 dezellularisierte und mit ASCs 7 Tage rezellularisierte Pferdesehne D) mit TnBP dezellularisierte und mit ASCs 7 Tage rezellularisierte Pferdesehne C3/D3) nach 20 Tagen.....	75
Abbildung 29: Co-kultur von ASCs und Blut bzw. rezellularisierter Sehne (CS) und Blut (CB) über 24 Stunden und Messung von IL-1 im Überstand.....	76
Abbildung 30: Entwicklung eines Bioreaktormodells.....	87

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASC	adipose-derived mesenchymal stromal cells, Fettstromazellen
BS	bovine Sehne
BSA	bovines Serumalbumin
BTB-Transplantate	Bone-Tendon-Bone-Transplantate
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB	canines Blut
CD	Cluster of Differentiation, immunphänotypische Oberflächenmarker
cDNA	komplementäre DNA, wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert
cIL	canines Interleukin
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CS	canine Sehne
d	Tag
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1A	elongation factor 1-alpha
ES	equine Sehne
et al.	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence-activated cell sorting

FBS	fötales bovine Serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
g	Gravitation
GAG	Glykosaminoglykan
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HRP	Enzym Meerrettich-Peroxidase
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-	Interleukin
kg	Kilogramm
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
Lig.	Ligament
Ligg.	Ligamenta
LPS	Lipopolysaccharide
m	männlich
M	molar
M.	Musculus
Mm.	Musculi
mm	Millimeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP3	Matrixmetalloproteasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure; Boten-Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stromazellen
N.	Nervus
Nn.	Nervi
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OA	Osteoarthritis

PBS/BSA/Azid	PBS + 10% bovines Serumalbumin + 0,01% Natriumazid
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS/BSA	PBS + 10% bovines Serumalbumin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-phycoerythrin
pH	Maß für die Aktivität von Protonen einer wässrigen Lösung (Säuregrad)
PHA	Polyhydroxyalkanoate
Post OP	Post operationem
RLT-Puffer	Lysepuffer von Qiagen mit einem hohen Gehalt an Guanidinisothiocyanate
RNA	Ribonukleinsäuren
RPE-Puffer	Waschpuffer von Qiagen zur Entfernung von Salzen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium (Zellkulturmedium)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RW1-Puffer	Waschpuffer von Qiagen mit hoher Konzentration an Guanidinsalz und Ethanol zur Entfernung von Biomolekülen
SD	Standarddeviation; Standardabweichung
SDC	Sodiumdeoxychololat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
TE-Puffer	200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TMB	Tetramethylbenzidin
TnBP	Tri-n-butyl-phosphat
TNF	Tumornekrosefaktor
TPLO	Tibial Plateau Leveling Osteotomie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTA	Tibial Tuberosity Advancement
T-Zellen	T-Lymphozyten
U	Units; Einheiten

u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
v/v	Volumen per Volumen bei prozentualer Konzentrationsangabe
w	weiblich
w/v	Gewicht per Volumen bei prozentualer Konzentrationsangabe
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
<	weniger als
>	mehr als
%	Prozent
°	Grad

1. Einleitung

Die Ruptur des kranialen Kreuzbandes ist eine der häufigsten orthopädischen Erkrankungen des Hundes (HARASEN, 2003) und verursacht 32 % aller Hinterbeinlahmheiten (POWERS et al., 2005). In 54 % der Fälle ist innerhalb von zwei bis drei Jahren auch die kontralaterale Extremität betroffen (MUIR, 2010). Ist das Kreuzband partiell gerissen, kommt es meist innerhalb eines Jahres zum vollständigen Riss (BENNETT et al., 1988). Nach einer Studie von WILKE et al. (2005) werden in den USA jährlich 1,32 Milliarden Dollar mit der Therapie dieses Krankheitskomplexes umgesetzt. Während der Kreuzbandriss beim Menschen meist traumatisch bedingt ist, ist er beim Hund in der Regel degenerativen Ursprungs.

Für den Hund sind über 120 verschiedene Therapieoptionen und -modifikationen beschrieben. In der Humanmedizin gilt der intraartikuläre Kreuzbandersatz mit autologen Hamstringsehnen als Goldstandard, in der Veterinärmedizin aber die Umstellungsosteotomie (TPLO). Begründet ist dieser Unterschied durch mehrere Faktoren: unterschiedliche Ätiologie und Pathogenese (traumatisch vs. degenerativ), differierende physiologische Winkelung und Belastung und daraus resultierende andere Kraftverteilungen sowie das Fehlen eines idealen Transplantats in der Veterinärmedizin. Dieses Transplantat sollte mindestens die gleichen biomechanischen Eigenschaften wie das native Kreuzband haben und immunologisch inert sein. Der Einheilungsprozess müsste aufgrund häufiger Lockerung optimiert werden. Darüber hinaus wäre eine positive Beeinflussung zur Verhinderung des Voranschreitens der Arthrose wünschenswert. Auch wenn in der Tiermedizin mit den Umstellungsosteotomien sehr schnell gute funktionelle Ergebnisse erzielt werden, bleibt das Gelenk häufig instabil (REY et al., 2014; SCHWEDE et al., 2018).

Deswegen erfährt der Ersatz des Kreuzbandes mit xenogenem, allogenen und autologem Material eine Renaissance (SCHEFFLER et al., 2008; OMAE et al., 2012). Dies beachtend liegt hier die Aufgabe vor, eine neue Kreuzbandprothese im Rahmen des Tissue Engineering zu generieren und natives Sehngewebe von Tieren so aufzuarbeiten, dass es gegebenenfalls zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes genutzt werden kann. Dazu soll das Sehngewebe unter Erhalt seiner komplexen dreidimensionalen Struktur und biomechanischen Eigenschaften dezellularisiert werden, so dass es keine immunologischen Reaktionen mehr auslöst. Anschließend soll die so dezellularisierte Matrix mit caninen Stromazellen besiedelt werden. Die Stromazellen haben immunsupprimierende, antiinflammatorische, parakrine und remodeling- und reparaturbeeinflussende Eigenschaften.

Ziel ist das native Kreuzband und sein umgebendes Synovium zu imitieren. Dafür wird nach der Transplantatwahl ein geeignetes Dezellularisierungsprotokoll etabliert und seine Wirkung auf das Transplantatmaterial analysiert. Parallel werden Stromazellen gewonnen und ihre

Eigenschaften untersucht. Das immunologische Profil der dezellularisierten und mit Stromazellen besiedelten Prothesen wird wie die Qualität der Rezellularisierung und des neu entwickelten Transplantats geprüft.

2. Literaturübersicht

2.1 Anatomie des Kniegelenkes

Im Kniegelenk (*Articulatio genus*) sind das Kniescheibengelenk (*Articulatio femoropatellaris*) und das Kniekehlgelenk (*Articulatio femorotibialis*) koordiniert verbunden (NICKEL et al., 1992). Das Kniescheibengelenk setzt sich aus der Patella und der *Trochlea ossis femoris* zusammen und fungiert als Schlittengelenk. Das komplexere Kniekehlgelenk ist ein Spiralgelenk, das die typische Roll-Gleitbewegung ermöglicht und von den bikonvexen, asymmetrischen Kondylen des Femurs und den proximal leicht konkaven, ebenso asymmetrischen Gelenkflächen der Tibia gebildet wird. Insgesamt erlaubt das Kniegelenk über seine sechs *Facies articulares* eine Beweglichkeit in sechs Freiheitsgraden (Extension/Flexion, Abduktion/Adduktion, Innen-/Außenrotation).

Die Inkongruenz der gelenkbildenden Knochen wird durch den medialen und lateralen Meniskus verbessert. Die Menisken sind C-förmige Faserknorpelscheiben. Sie haben abaxial einen dicken, konvexen Rand und axial eine dünne, scharf verlaufende Kante (NICKEL et al., 1992). Menisken dienen der Stoßdämpfung und wandeln axialen Druck in Zugspannung um. Dadurch kommt es zu einer Druckverteilung. Die Menisken sind durch verschiedene Bänder (*Lig. tibiale craniale* bzw. *caudale menisci lateralis* bzw. *medialis*, *Lig. transversum genus*, *Lig. meniscofemorale*) mit dem Femur und vor allem der Tibia verbunden. Eine Verwachsung des medialen Meniskus mit dem medialen Kollateralband und der Gelenkkapsel und die daraus resultierende verminderte Beweglichkeit führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für dessen Läsionen (PAATSAMA, 1952; LOEFFLER, 1964).

Die wichtigsten Führungselemente des Kniegelenkes sind die Kreuzbänder (*Ligg. cruciata genus*). Sie liegen intraartikulär (ARNOCZKY, 1983), aber aufgrund ihrer paraligamentären Membran (Synovialis) extrasynovial (O'DONOGHUE et al., 1971; ALM u. STRÖMBERG, 1974; ARNOCZKY, 1983). Das vordere Kreuzband (*Lig. cruciatum craniale*) entspringt in einer Bandgrube axial am *Condylus lateralis* des Femurs (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; HEFFRON u. CAMPBELL, 1978; ARNOCZKY, 1983). Es nimmt einen diagonalen Verlauf nach kraniomediodistal und inseriert an der Area intercondylaris centralis und cranialis der Tibia (DYCE, 1952; LOEFFLER, 1964; ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; HEFFRON u. CAMPBELL, 1978; BRUNNBERG, 1989b). Der Ansatz wird kranial durch das *Lig. tibiale craniale menisci medialis* und kaudal durch das *Lig. tibiale craniale menisci lateralis* (LOEFFLER, 1964) begrenzt. Die längsovale Querschnittsfläche des Bandes ist im mittleren Bereich am schmalsten und fächert in Richtung der Insertionszonen nach proximal, aber vor allem nach distal auf (SONNENSCHNEIN, 1951; ZAHM, 1964). Das vordere Kreuzband besteht aus einem größeren kaudolateralen

Bündel und einem kleineren kraniomedialen (LOEFFLER, 1964; GEYER, 1966; MÜLLER, 1969; ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; HEFFRON u. CAMPBELL, 1978; BRUNNBERG, 1989a). Die Fasern des kraniomedialen Bündels sind in sich nach außen axial torquiert (SONNENSCHNEIN, 1951; GEYER, 1966; GEYER, 1967; ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977), während die Fasern des kaudolateralen Bündels einen geraden Verlauf nehmen. In Beugstellung ist die Torquierung verstärkt (MÜLLER, 1969; BRUNNBERG, 1989b). Die durchschnittliche Längenangaben des vorderen Kreuzbandes liegen in Abhängigkeit vom Gewicht des Hundes bei etwa 13–19 mm (VASSEUR et al., 1985; WINGFIELD et al., 2000).

Die Blutgefäßversorgung erfolgt v. a. über Äste der *A. genus media* (SCAPINELLI, 1968; MÜLLER, 1969; ARNOCZKY et al., 1979). Zusätzlich sind Äste der *A. genus distalis* und anderer *Aa. genus* an der Versorgung des kranialen und kaudalen Kreuzbandes beteiligt (SCAPINELLI, 1968; MÜLLER, 1969; TIRGARI, 1978; ARNOCZKY et al., 1979). Die Gefäße bilden um das vordere Kreuzband ein Netz, von dem aus Gefäßäste senkrecht in das Band eindringen und mit in Längsrichtung verlaufenden intraligamentären Gefäßen anastomosieren (ALM u. STRÖMBERG, 1974; ARNOCZKY et al., 1979). In der Mitte des Bandes ist die Vaskularisation wesentlich geringer als in den proximalen und distalen Abschnitten (ZAHM, 1964; ALM u. STRÖMBERG, 1974; ARNOCZKY et al., 1979). Die wichtigste Blutgefäßversorgung findet über die Äste aus dem infrapatellaren Fettkörper und der Synovialis statt, die das Kreuzband umgibt.

Die Innervation erfolgt über Nervenäste des *N. tibialis* (ARNOCZKY, 1983) und *N. peroneus communis*, insbesondere aber über feine Abzweigungen des *N. saphenus* (*N. articularis medialis*) (O'CONNOR u. WOODBURY, 1982). Auch das Kreuzband selbst hat sensible Nerven, die sowohl als Schmerz- als auch als Mechanorezeptoren fungieren (ARNOCZKY, 1983; HALATA et al., 1999). Dadurch kann das Kreuzband durch neuronale Rückkopplungsmechanismen und anschließende zentrale Steuerung von Kniegelenksstreckern und -beugern einer unphysiologischen Bewegung entgegenwirken (JOHANSSON et al., 1991; PARK et al., 2005).

Das kaudale Kreuzband (*Lig. cruciatum caudale*) entspringt axial am medialen *Condylus ossis femoris*, verläuft kaudodistal und inseriert an der *Incisura poplitea tibiae*. Es besteht ebenfalls aus zwei Kompartimenten (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977), die jedoch weniger verschieden und untrennbar sind. Insgesamt ist das kaudale Kreuzband länger und breiter als das kraniale und seine kaudolateralen Fasern verlaufen in einer um etwa 90° torquierten Spirale nach innen abaxial.

Zu den Bändern des Kniekehlgelenks gehören auch die beiden Seitenbänder (*Ligg. collateralia*). Diese sind als kräftige Faserbündel zwischen den Bandhöckern von Femur und Tibia bzw. Fibula gespannt (NICKEL et al., 1992). Das *Lig. collaterale mediale* verbindet sich mit dem Meniskus und inseriert am *Condylus medialis* der Tibia. Das *Lig. collaterale laterale* zieht an den Fibulakopf und mit einigen Fasern an den *Condylus lateralis* der Tibia. In seinem Verlauf überkreuzt es die Ursprungssehnen des *M. popliteus* (SALOMON et al., 2005).

2.2 Anatomie der Achillessehne des Hundes

Die Achillessehne des Hundes besteht aus fünf Muskeln und drei Sehnenkomponenten. Die Muskelbäuche des *M. gastrocnemius medialis* und *lateralis* formen distal eine große Sehne, die mit der Sehne des *M. flexor digitalis (pedis) superficialis* und der gemeinsamen Sehne des *M. biceps femoris*, des *M. gracilis* und des *M. semitendinosus* am Calcaneus inseriert (NICKEL et al., 1992). Hauptfunktion ist das Strecken des Tibiotarsalgelenkes sowie das Beugen des Kniegelenkes und der Zehen.

2.3 Histologie des Kreuzbandes

Nach PAUWELS (1960) Theorie der Kausalen Histogenese des Stützgewebes ist die Gewebsausbildung abhängig von mechanischen Kräften, d. h., der sinnvolle strukturelle Aufbau eines Organs wird durch funktionelle Anpassung erreicht. Unter dem Einfluss von Zugkräften entsteht straffes, kollagenfaseriges Bindegewebe, dem Bänder und Sehnen zugeordnet werden. Diese bestehen vor allem aus Kollagenfibrillen, einigen elastischen Fasern und wenigen Zellen. Sie weisen eine Faszikelarchitektur auf: Die gesamte Sehne bzw. das gesamte Band werden vom *Peritendineum externum* umgeben, während deren Primär- und Sekundärbündel vom *Peritendineum internum* umschieden werden.

Obwohl das vordere Kreuzband in seinem Grundaufbau dem anderer Bänder und Sehnen entspricht, weist es einige Besonderheiten auf. Es hat eine multifaszikuläre Struktur, deren Kollagenmoleküle sich über sog. Alphahelices, Tripelhelices und Mikrofibrillen zu den typischen Kollagenfibrillen zusammenlagern. Die Kollagenfibrillen formen als Bündel die Kollagenfasern, die als sog. Primärbündel vom *Endotendineum* umgeben werden (TILLMANN, 1987; LEONHARDT, 1990). Einzelne Bündel bestehen aus acht bis zehn Untereinheiten (HEFFRON u. CAMPBELL, 1978; YAHIA u. DROUIN, 1989) und haben einen Durchmesser von etwa 20 µm (ARNOCZKY, 1983; WEISS, 1991). Mehrere Primärbündel formen Faszikel mit einem Durchmesser von etwa 20-400 µm, die wiederum vom *Epitendineum* umschieden werden (ARNOCZKY, 1983). Alle Kollagenfaserbündel zusammen bilden das Kreuzband

(DANYLCHUK et al., 1978) und sind vom *Paratendineum* überzogen (ARNOCZKY, 1983). Die Architektur ist eine Kombination aus helikal, parallel und torquierten Faszikeln. Die zentralen Fibrillen sind fast gerade orientiert, während die peripheren in helikalen, welligen Mustern angeordnet sind (ZAHM, 1964; ALM u. STRÖMBERG, 1974; YAHIA u. DROUIN, 1989). Diese wellenartigen Kollagenfasern sind primär für das nichtlineare Spannungs-Dehnungs-Verhältnis verantwortlich, dem das Kreuzband initial bei Zugbeanspruchung folgt. Außerdem hilft dieser spezielle Aufbau, extremen Gelenkbewegungen entgegenzuwirken, und ermöglicht, entsprechend der Beanspruchung mehr oder weniger Fasern zu rekrutieren.

Am eigentlich abrupten Übergang vom Band zum Knochen sind die Kollagenfasern des vorderen Kreuzbandes nicht völlig parallel angeordnet und Chondrozyten sind eingelagert (ZAHM, 1964; ALM u. STRÖMBERG, 1974), so dass die Insertionszone eher einem Faserknorpel entsprechenden Aufbau ähnelt (PETERSEN u. TILLMANN, 2002). Es findet ein kontinuierlicher Übergang von Band- in Knochengewebe statt, wodurch eine kontinuierliche Kraftübertragung gewährleistet wird. Dem reinen parallelfaserigen Bindegewebe des intraartikulären Bandes folgen unverkalkter und verkalkter Faserknorpel und letztlich der Knochen (SCHNEIDER, 1956; COOPER u. MISOL, 1970; BENJAMIN et al., 1986; TILLMANN, 1987). So kommt eine stabile Verzahnung beider Gewebe zustande (SCHNEIDER, 1956). Zwischen den Knorpelzellen verlaufen kollagene Fasern vom Knochen bis in das Bandgewebe und übernehmen die Funktion von Umlenkrollen. Durch diesen Aufbau entsteht ein Federungssystem, das Zug- und Scherkräfte effektiv abfängt (SCHNEIDER, 1956; KUSSWETTER u. REFIOR, 1985; BENJAMIN et al., 1986). Die Entstehung von Faserknorpel in straffem Bindegewebe ist eine funktionelle Anpassung an Druck- und Schubbeanspruchung (MARKOLF et al., 1976). Damit weist das vordere Kreuzband eine direkte (chondral apophysäre) Bandinsertion auf (COOPER u. MISOL, 1970; ARNOZKY, 1983; PETERSEN u. TILLMANN, 2002), die keine periostale Abgrenzung und den oben beschriebenen typischen Vierzonenaufbau hat. Direkte Bandinsertionen entwickeln sich überall dort, wo relativ große Kräfte auf eine kleine Fläche wirken. An den Insertionszonen ist vermehrt Kollagen Typ II eingelagert (PETERSEN u. TILLMANN, 2002). Am Berührungspunkt zum kaudalen Kreuzband sind die Kollagenfasern deutlich dichter und tangential zur Oberfläche angeordnet (VASSEUR et al., 1985).

Insgesamt setzt sich die extrazelluläre Matrix des vorderen Kreuzbandes hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III zusammen (PETERSEN u. TILLMANN, 2002). Der Gehalt von Kollagen Typ I ist für die Zugfestigkeit, Dehnungsstärke und Reißfestigkeit verantwortlich. Die viskoelastischen Eigenschaften des Typ-III Kollagen ermöglichen eine der Gelenkstellung entsprechenden Rekrutierung der Faserbündel (PETERSEN u. TILLMANN, 2002).

Proteoglykane binden interzelluläres Wasser und besitzen entscheidenden Einfluss auf die Konsistenz des Gewebes. Sie schützen die auf Zugbelastung ausgerichteten Fibrillen vor Druckbelastung aufgrund ihrer Inkompressibilität und Verformbarkeit und haben Bedeutung

für Stofftransporte im Gewebe (DÄMMRICH u. LOPPNOW, 1990; LEONHARDT, 1990). Glykoproteine, v. a. Fibronectin, sind für Adhäsion zwischen der Zelloberfläche und den benachbarten Matrixstrukturen verantwortlich (DÄMMRICH u. LOPPNOW, 1990). Die wenigen Zellen (Fibrozyten) des Bandes liegen zwischen den einzelnen Faserbündeln. Wie andere Gewebe unterliegt auch das Kreuzband einem Alterungsprozess.

2.4 Biomechanik des Kniegelenkes und Funktion der Kreuzbänder (funktionelle Anatomie)

An der Biomechanik des Kniegelenks sind neben den passiven Stabilisatoren (Kreuzbänder, Seitenbänder, Menisken) auch aktive Stabilisatoren (*M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. biceps femoris*, *quadrizeps femoris* und *gastrocnemius*) beteiligt. Die Muskulatur reagiert auf Belastung des vorderen Kreuzbandes über endoligamentäre Mechanorezeptoren reflektorisch mit einer Kontraktion der Gliedmaßenbeuger und Relaxation des *M. quadrizeps femoris* (SOLOMONOW et al., 1987), so dass die Spannung des Bandes reduziert wird. Über diesen Feedback-Mechanismus wirken die Muskelgruppen entsprechend der aktivierten Mechanorezeptoren synergistisch (agonistisch oder antagonistisch) einer exzessiven Kniegelenksbewegung entgegen. MENSCHIK (1974) hat die für die Stabilität des Kniegelenks verantwortlichen Strukturen als überschlagene Viergelenkskette beschrieben, die aus den *Ligamenta cruciata* und deren Ansatzpunkten an den jeweiligen Knochen besteht.

Die Hauptbewegungen des Kniegelenks sind Flexion und Extension in sagittaler Ebene (etwa 140°) (MANN, 1988). Zusätzlich kann in transversaler Ebene eine Rotationsbewegung der Tibia auf das Femur (etwa 20°) und in frontaler Ebene eine mediale Varus- bzw. laterale Valguswinkelung erfolgen. Wie die GEBRÜDER WEBER bereits 1836 beschrieben, setzt sich die Extensions-Flexions-Bewegung aus einem Rollen und Gleiten des Femurs auf der Tibia zusammen. Die beiden Kollateralbänder stabilisieren das Kniegelenk und limitieren die Rotations- sowie Angulationsbewegungen (MONAHAN et al., 1984). Das vordere Kreuzband beschränkt v. a. die kraniale Tibiatranslation und die Hyperextension (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; HEFFRON u. CAMPBELL, 1978). Durch die Verdrillung der beiden Kreuzbänder wird die Innenrotation limitiert. Eine Begrenzung der Außenrotation durch die Kreuzbänder findet nicht statt (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977). In Extension wird zusätzlich die Varus- und in Flexion sowohl die Varus- als auch die Valgusangulation begrenzt (MONAHAN et al., 1984). Zu jedem Zeitpunkt einer Bewegung des Kniegelenks ist die Distanz zwischen femoraler und tibialer Insertionsstelle gleich groß (Isometrie) (MENSCHIK, 1974; ODENSTEN u. GILLQUIST, 1985). Die Isometrie ist die Determinante für die Kniegelenksstabilität (ARNOCZKY, 1983). Im Laufe einer Bewegung verändern sich jedoch die Spannungszustände des Kreuzbandes bzw. der Kreuzbandbündel. Während die kraniomedialen Fasern des vorderen Kreuzbandes während

des gesamten Bewegungsablaufes angespannt sind (als primärer Schutz gegen die Subluxation), sind die kaudolateralen Fasern in Flexionsstellung leicht gelockert (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; HEFFRON u. CAMPBELL, 1978). Aufgrund der geringeren Spannungsänderungen des kranio-medialen Bündels fungiert dieses als Leitbündel (LOBENHOFFER u. TSCHERNE, 1993). Außerdem kann jeder der einzelnen Faszikel individuell auf Bewegungsabläufe reagieren (WELSH, 1980). In der Synopse hat das gesamte vordere Kreuzband drei wesentliche Funktionen:

1. Es verhindert die Kranialverschiebung der Tibia gegenüber dem Femur (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; HEFFRON u. CAMPBELL, 1978) bzw. die Instabilität des *Os femoris* bei gleichzeitig im Raum stabiler Tibia (REY et al., 2014).
2. Es schränkt die Rotationsbeweglichkeit des Kniegelenkes ein und verhindert insbesondere eine übermäßige Innenrotation (DYCE, 1952; ARNOZKY u. MARSHALL, 1977).
3. Es begrenzt die Streckung des Kniegelenkes und unterbindet eine Hyperextension (DYCE, 1952; ARNOZKY u. MARSHALL, 1977).

Durch Verdrillung beider Kreuzbänder bei Innenrotation und extremer Spannung in Hyperextension nehmen Reißfestigkeit und Dehnung signifikant ab (ALM et al., 1974; ARNOZKY, 1983; ROBINS, 1990). Nach REESE (1995) reißt das kraniale Kreuzband erst nach Dehnung um das 1,5-fache der ursprünglichen Länge komplett. Die Reißfestigkeit ist beim Hund viermal höher als dessen Körpergewicht (GUPTA et al., 1971).

Die Ruptur erfolgt in der Regel in der Mitte des Bandes (ALM et al., 1974; VASSEUR et al., 1985). Bei jungen Hunden kann es auch zum knöchernen Ausriss kommen. Bei der Ruptur des Bandes kommt es zu einer erhöhten Kniegelenkslaxizität (FRIEDERICH u. O'BRIEN, 1993) und es ergeben sich eine „nach kranial gerichtete vermehrte Auslenkung des Unterschenkels gegenüber dem Oberschenkel sowie eine erhöhte Innenrotation“ (SCHEFFLER, 2010). Dadurch kommt es zur Entstehung sekundärer Gelenkschäden, die insbesondere Menisken und Knorpel betreffen (DUNN et al., 2004; SCHEFFLER, 2010).

2.5 Kreuzbandruptur – Ätiologie und Pathogenese der Kreuzbanderkrankung

Die genaue Ätiologie und Pathogenese der Kreuzbanderkrankung sind bisher nicht eindeutig geklärt. Es werden drei Krankheitsszenarien unterschieden:

1. Partielle oder komplette Ruptur aufgrund progressiver Degeneration
2. Akute, traumatische Ruptur durch übermäßige Belastung
3. Traumatische Avulsion der femoralen oder tibialen Insertion

Obwohl durchaus auch die rein traumatischen Rupturen vorkommen, ist der Großteil der Verletzungen multifaktoriell und primär chronisch degenerativ bedingt (PAATSAMA, 1952;

ZAHM, 1964; TIRGARI u. VAUGHAN, 1975; TIRGARI, 1978). Dabei unterliegt das Kreuzband einer partiell fibrocartilaginären Transformation. Geringgradige Formen dieser Veränderungen werden üblicherweise auch in intakten Bändern gefunden. Je nach Studie werden diese Degenerationsanzeichen bei Hunden über 15 kg ab etwa fünf Jahren beobachtet (VASSEUR et al., 1985) und sind durch einen progressiven Verlust an Fibroblasten, Metaplasie der verbliebenen Fibro- zu Chondrozyten und Versagen der Kollagenfaserbündel gekennzeichnet. Initial beginnt die Degeneration im mittleren und v. a. inneren Bereich des Bandes, während in der epiligamentären Region kaum ein Unterschied zum intakten Band besteht. Bei Ruptur des Kreuzbandes können zusätzlich Hyalinisierung, Mineralisierung und vermehrt knorpelartige Zellen auftreten (HAYASHI et al., 2003). Außerdem gehen die hierarchische Faszikelstruktur und die typische wellenartige Form der Fasern verloren. Die genauen Ursachen für diese bisher idiopathische Degeneration sind unbekannt.

Mikrotraumen (PAATSAMA, 1952; LOEFFLER, 1964; DIETZ u. SCHMIDT, 1968) des Bandes durch mechanische Überbeanspruchung könnten eine der Hauptursachen für das Remodeling sein. Auch anatomische Besonderheiten wie eine enge *Fossa intercondylaris femoris* und ein steiles Tibiaplateau führen zu abnormaler Belastung, die Mikrotraumen hervorrufen können (COMERFORD et al., 2006; DUERR et al., 2007). Bei enger *Fossa intercondylaris* kann es zu vermehrter Osteophytenbildung (WADA et al., 1996) kommen, weil die normale Funktion des Kreuzbandes durch die Einengung behindert wird. Dadurch kommt es zur Schädigung (MUNETTA et al., 1997), biomechanischen Beeinträchtigung und fibrocartilaginärem Remodeling des Bandes (GEYER, 1966). In Studien von WILKE et al. (2002) und REIF und PROBST (2003) konnte kein signifikanter Unterschied des Tibiaplateauwinkels zwischen Labrador Retrievern mit und ohne Kreuzbandruptur festgestellt werden.

Typischerweise findet bei Hunden die Ruptur in der Bandmitte statt. Viele Autoren führen dies auf die Minderdurchblutung dieses Bereiches zurück (PAATSAMA, 1952; ZAHM, 1964; GEYER, 1966; TIRGARI, 1978). Hinzu kommt, dass dort auch die Torquierungsstelle der Kreuzbänder in Beugstellung liegt. Daraus resultieren Druckkräfte, die dazu führen, dass das Kreuzband den charakteristischen Aufbau einer Zugsehne in diesem Bereich verliert und Strukturmerkmale einer Gleitsehne bekommt (Hyalinisierung, faserknorpelige Struktur) (REESE, 1995). Gleitsehnen haben eine deutlich geringere Zugfähigkeit. Der proximale und distale Anteil des vorderen Kreuzbandes bleiben unverändert.

Unklar ist weiterhin, ob die mit einer Kreuzbandruptur einhergehende Synovitis Ursache oder Folge der Erkrankung ist. Elektronenmikroskopisch finden sich in der Synovialis viele kleine Löcher, die eine Infiltration des Kreuzbandes mit Synovia erlauben (KOBAYASHI et al., 2006). Bei lokalen Entzündungsprozessen oder durch Traumata können Makromoleküle des Kollagens freigelegt werden und eine immunmedierte Entzündungsreaktion auslösen. Dabei werden Autoantikörper produziert, die Immunkomplexe bilden, die wiederum das

Komplementsystem und Phagozyten aktivieren (BARI et al., 1989; CARTER et al., 1999). Immunkomplexe und Antikollagenantikörper wurden bereits in den 80er Jahren in der Synovia und dem Serum von Hunden mit Kreuzbandruptur nachgewiesen (NIEBAUER u. MENZEL, 1982) und die Hypothese wurde aufgestellt, dass immunologische Mechanismen die Entwicklung einer Ruptur des vorderen Kreuzbandes protegieren. CLEMENTS et al. (2011) haben die Hypothese einer rein immunbedingten Degeneration des vorderen Kreuzbandes zumindest beim Labrador und Golden Retriever widerlegt.

Nach FUJITA et al. (2006) ist die chronische Synovitis und entzündliche Arthritis ein wichtiger Förderer der Degeneration des Kreuzbandes. Die Synovitis ist durch Infiltration der Synovialis mit Entzündungszellen gekennzeichnet, was zu einer vermehrten Vaskularisation und Hyperplasie führt. Sie führt zur Entstehung von Schmerz, Gelenkentzündung und einer fortschreitenden Osteoarthritis (SUTTON et al., 2009). Experimentell haben GOLDBERG et al. (1982) durch Induktion einer immunologischen Synovitis eine signifikante Reduktion der Kreuzbandstärke herbeigeführt, die zu einem strukturellen Versagen und einer Ruptur in der Mitte des Bandes führte. Die ursächliche Ätiopathogenese der Synovitis und ihr genauer Beitrag zur Kreuzbandruptur sind bisher nicht endgültig geklärt. Translokationen von bakteriellem Material in das Kniegelenk sind nicht unüblich (MUIR et al., 2007) und könnten die Entstehung der Kreuzbanderkrankung begründen. Auch werden antigenspezifische Immunantworten als eine wichtige Komponente für den Mechanismus der Krankheitsentstehung angesehen. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei derart erkrankten Hunden viele Lymphozyten im Synovialgewebe gefunden wurden. Der dafür ursächliche Trigger bleibt unklar.

Im Zusammenspiel mit dem Entzündungsgeschehen spielen Matrixmetalloproteasen (MMPs) eine wichtige Rolle in der Matrixdegradierung und dem Remodeling, da sie und ihre Inhibitoren eigentlich die schmale Balance zwischen Remodeling und Synthese kontrollieren (NAGASE et al., 2006). MMPs werden von den Synovialzellen, dem Knorpel, den Ligamentozyten und Leukozyten produziert und sind bei einem gerissenen Kreuzband im Vergleich zum intakten Band signifikant erhöht (MUIR et al., 2005). Außerdem sind sie mit erhöhter Degeneration der extrazellulären Matrix von Knorpel und Bändern sowie Entzündung von Synovialgewebe assoziiert (MUIR et al., 2005). CAO et al. (2000) und SPRENG et al. (2000) haben gezeigt, dass die Ligamentozyten des kranialen Kreuzbandes bei Stimulation im Vergleich zu anderen Bändern signifikant mehr Stickstoffmonoxid produzieren, das die Kollagensynthese inhibiert und eine Heilung des rupturierten Bandes hemmt.

Als weiterer Mechanismus führen hohe Stickoxidkonzentrationen dazu, dass die normale Matrixhomöostase inhibiert wird, wodurch wiederum eine intrinsische Schwäche des Bandes entsteht, so dass in der Synopse ein initiales Ereignis zu einer Entzündungsreaktion des kranialen Kreuzbandes führt (HAYASHI et al., 2003), Ligamentozyten eine Dysregulation der

Matrixhomöostase als Reaktion darauf entwickeln, dadurch die matrixabbauenden Enzyme heraufreguliert werden, die Matrixproduktion herabreguliert wird und Abkömmlinge des NO (Peroxynitrit) die unreifen Ligamentozyten abtöten. BEZERRA et al. (2004) haben gezeigt, dass eine Hemmung des Peroxynitrits zu einer Reduktion der intraartikulären Entzündung und des Knorpelverlustes führt. Jedoch sprechen HANCOCK und RIEGGER-KRUGH (2008) sowie WALLACE et al. (2009) Stickstoffmonoxid eine protektive Wirkung zu, so dass die Rolle von NO bei der Osteoarthritis nicht endgültig geklärt ist.

Sicher ist jedoch, dass es viele extraartikuläre Faktoren gibt, die die biomechanischen Eigenschaften des Kreuzbandes beeinflussen. Ein vermehrtes Risiko besteht bei erhöhtem Körpergewicht und Adipositas (PAATSAMA, 1952; SINGLETON, 1969; VASSEUR et al., 1985; SCHNELL, 1986), bestimmten konstitutionellen oder erworbenen statischen Besonderheiten wie z. B. einer steilen Hinterhandstellung (PAATSAMA, 1952) aber auch Valgus- und Varusdeformitäten sowie Patellaluxationen. Außerdem sind weibliche (BARNES, 1977; DUVAL et al., 1999; WITSBERGER et al., 2008) und kastrierte Tiere (DUVAL et al., 1999) häufiger betroffen. Zusätzlich gibt es Rassen mit deutlich erhöhtem Erkrankungsrisiko, die eine genetische Prädisposition und hereditäre Ursache nicht unwahrscheinlich erscheinen lassen. Diese Rassen sind bei Vorstellung häufig noch sehr jung (< 2 Jahre) und oft bilateral betroffen (z. B. Neufundländer). Außerdem sind häufig Rassen aufgrund regionaler und temporärer Präferenzen vermehrt betroffen (BRUNNBERG, 1990). Hervorzuheben ist, dass Boxer (PAATSAMA, 1952; SCHNELL, 1986; PRIDY et al., 2003), Rottweiler (PAATSAMA, 1952; SCHNELL, 1986; DUVAL et al., 1999; PRIDY et al., 2003) und Labrador Retriever (DUVAL et al., 1999; PRIDY et al., 2003; WITSBERGER et al., 2008) besonders häufig genannt werden. Zum Riss des kontralateralen Bandes kommt es bei 37 % (DOVERSPKIE et al., 1993) bis 48 % (BUOTE et al., 2009) der Hunde im Durchschnitt zwischen 5,5 (BUOTE et al., 2009) und 17 Monaten (DOVERSPKIE et al., 1993) später.

Die rein traumatische Ruptur ist äußerst selten und wird v. a. durch folgende Ereignisse bedingt:

1. Hyperextension des Kniegelenkes (DIETZ u. SCHMIDT, 1968; ARNOCKY u. MARSHALL, 1977; BIRD u. WRIGHT, 1978)
2. Plötzliche Innenrotation der belasteten, im Kniegelenk nur mäßig gebeugten Gliedmaße (HOHN, 1975; HULSE, 1985), weil bei Beugung der Gliedmaße im Kniegelenk schon um 20 bis 50° beide Kreuzbänder torquieren. Wird dabei die Tibia plötzlich innenrotiert, wird das *Ligamentum cruciatum craniale* unter Spannung verwunden, so dass Fasern über dem *Condylus lateralis ossis femoris* gespannt, an der *Eminentia intercondylaris* gequetscht und verletzt werden (HOHN, 1975; HULSE, 1985).

Die Avulsion im Bereich der femoralen oder tibialen Insertion betrifft Junghunde, die ein Trauma erleiden und deren Sharpeyfasern stärker als das unreife Skelett bzw. der Knochen sind.

2.6 Therapieoptionen des Kreuzbandrisses

Seit der erstmaligen Beschreibung des Kreuzbandrisses beim Hund durch CARLIN (1926) sind über 120 verschiedene operative Therapieverfahren und deren Modifikationen beschrieben. Allerdings gibt es bis heute keine allgemein anerkannte Methode, die den Zustand eines kreuzbandgesunden Kniegelenkes wiederherstellt sowie die Osteoarthrose limitiert (CHAUVET et al., 1996; ARAGON u. BUDSBERG, 2005; LAZAR et al., 2005; CASALE u. MCCARTHY, 2009).

2.6.1 Konservativ

Die konservative Therapie besteht aus vier bis acht Wochen Boxenruhe (POND u. CAMPBELL, 1972), Leinenzwang, Analgesie, Antiphlogistika und ggf. Gewichtsreduktion (VASSEUR, 1984; CHAUVET et al., 1996). Eine *restitutio ad integrum* ist nicht möglich (LAROS et al., 1971; NOYES et al., 1974; NOYES, 1977). Bei konsequenter Ruhigstellung entwickelt sich insuffizientes Ersatzgewebe (SINGLETON, 1969; NOYES et al., 1974). Es kommt zu einer relativen Stabilisierung durch Fibrosierung der Gelenkkapsel, Faszie und des periartikulären Gewebes (HARARI, 1996), die bei Hunden unter 10 bis 15 kg zu funktionell befriedigenden Ergebnissen führen kann (VASSEUR, 1984). Es kann aber keine Wiederherstellung der vollständigen Integrität und originären *in situ* Spannung des vorderen Kreuzbandes erreicht werden (MEUFFELS et al., 2009), so dass sekundär die Osteoarthrose weiter voranschreitet (PAATSAMA, 1952). Auch kommt es nach vollständiger Ruptur zur Atrophie der Bandstümpfe und die Lücke wird nicht durch Narbengewebe überbrückt (PAATSAMA, 1952; GEYER, 1966), so dass es zur progredienten Gonarthrose kommt (TIRGARI, 1978). Zudem kann es bei langer Immobilisierung des Kniegelenks zur Schwächung der Gelenkbänder und ihrer Ansatzstellen sowie degenerativen Knorpelveränderungen kommen (PUHL, 1971). Die Instabilität wird in keinem Fall behoben und das kontralaterale Bein wird häufig übermäßig belastet. Die Erfolgsrate eines klinisch zufriedenstellenden Ergebnisses beträgt nach VASSEUR (1984) bei Hunden unter 15 kg 84 % und bei schwereren Patienten 20 %.

2.6.2 Operativ

Ziel der operativen Versorgung ist es, die Gelenkinstabilität zu beheben, so dass sekundäre Gelenkschäden verhindert werden bzw. nicht weiter voranschreiten (POND u. CAMPBELL, 1972; VASSEUR, 1984). Bei den operativen Therapieoptionen kann zwischen extra- und intraartikulärer Kreuzbandersatztechnik und dynamischen Stabilisierungen sowie Methoden mit und ohne Ersatz des *Ligamentum cruciatum craniale* unterschieden werden.

Ein einfaches Zusammennähen der Kreuzbandstümpfe ist aus vielen Gründen ineffektiv:

- wegen degenerativer Veränderung und früher Resorption der Kreuzbandstümpfe (WESTHUES, 1961),
- wegen biologischer Faktoren: Minderdurchblutung (ARNOCZKY, 1983; KOBAYASHI et al., 2006), Umgebung mit Synovia (DARABOS et al., 2009), Zellmängel,
- wegen der Instabilität,
- weil keine Clotformation zwischen den rupturierten Enden (MURRAY et al., 2000) stattfindet – eventuell aufgrund hoher Plasminogenlevel (BROMMER et al., 1992).

Extraartikuläre Kreuzbandersatztechniken

Bei extraartikulären Kreuzbandersatztechniken werden biologische oder synthetische Materialien ggf. mit femoraler und tibialer Fixierung verwandt, um durch Manipulation und Straffung des periartikulären Gewebes eine vorübergehende Stabilisierung des Kniegelenkes zu gewährleisten, bis durch sekundäre Fibrose eine dauerhafte Gelenkstabilität gewährleistet ist (SINGLETON, 1969; MCCURNIN et al., 1971; BRINKER, 1990). Vorteilhaft ist, dass die Methoden relativ einfach, schnell (DEANGELIS u. LAU, 1970; PEARSON, 1971; DIETRICH, 1974) und kostengünstig durchzuführen sind. Außerdem wird wenig spezielles Instrumentarium benötigt und die unphysiologischen Bewegungen werden limitiert. Nachteilig ist, dass es postoperativ durch vorzeitige Lockerung oder durch Reißen des Fadens (FISCHER et al., 2010) zur erneuten Instabilität und Dysfunktion kommen kann. Außerdem werden die Kriterien einer optimalen Biomechanik nicht erfüllt, so dass eine gewisse Instabilität verbleibt. Dadurch besteht ein funktionelles Defizit und es kommt zum frühzeitigen Gelenkverschleiß (ARNOCZKY u. MARSHALL, 1977; GAMBARDELLA, 1981; PAATSAMA, 1981). Es wird zwischen Raffungs- und extraartikulären Zügeltechniken unterschieden. Die gebräuchlichsten Methoden sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1: Übersicht über häufig genutzte extraartikuläre Kreuzbandersatztechniken nach Literaturangaben

Technik	Material	Erfolgsraten
Fibulakopftransposition	autogenes Material	Mit 70–90 % zufriedenstellend, kein normales Gangbild in der computerisierten Ganganalyse, sekundäre Meniskusläsionen von 25–50 % (SMITH u. TORG, 1985; SCHÄFER, 1991; WEISS, 1991; DUPUIS et al., 1994; CHAUVET et al., 1996)
Tightrope®-Technik (Firma Arthrex Vet Systems)	nicht resorbierbarer Faden	92,7 % (CHRISTOPHER et al., 2013)
laterale Faszienraffung	Lembertnähte	Mit 72–84,5 % zufriedenstellend (CHILDERS, 1966; MCCURNIN et al., 1971; PEARSON, 1971; WEISS, 1991)
intra- extraartikuläre Raffung nach Meutstege	autologe Faszie und Kapsel	bei 92 % der Patienten wurde bei der Nachuntersuchung keine Lahmheit festgestellt (ALLGOEWER et al., 2000)
laterale Raffung des Retinakulums	nicht-resorbierbarer Faden	Mit 73–94 % zufriedenstellend (DEANGELIS u. LAU, 1970; DIETRICH, 1974; GAMBARDELLA, 1981; WEISS, 1991)
modifizierte laterale Haltebandtechnik nach FLO	nicht-resorbierbarer Faden	71–95 % zufriedenstellend, kinetische Ganganalyse: 14,9 % physiologisch (FLO, 1975; WEISS, 1991; MOORE u. READ, 1995; CHAUVET et al., 1996; CONZEMIUS et al., 2005)

Dynamische Stabilisierung - Osteotomieverfahren

Aufgrund der nicht immer befriedigenden Ergebnisse, vor allem bei großen Hunden, wurden verschiedene dynamische Stabilisierungstechniken entwickelt. Sie zielen darauf, die Kniegelenksbiomechanik so zu verändern, dass die Funktion des vorderen Kreuzbandes ersetzt wird bzw. nicht mehr notwendig ist und die Instabilität behoben wird. Zwei Verfahren werden derzeit in der Veterinärmedizin bevorzugt:

1. Tibial Plateau Leveling Osteotomie (TPLO) nach Slocum und Devine (SLOCUM u.

DEVINE, 1984)

2. Tibial Tuberosity Advancement (TTA) nach Montavon (MONTAVON, 2002)

Vorteile der TPLO sind die Erhaltung des femoropatellaren Gelenks und der *Tuberositas tibiae* (TALAAT et al., 2006) sowie die Möglichkeit einer zusätzlichen Achsenkorrektur. Bei partiellen Rissen des vorderen Kreuzbandes wird der TPLO ein protektiver Effekt zugeschrieben (HULSE et al., 2010). Außerdem schreitet die Arthrose im Vergleich zu den anderen Operationstechniken langsamer fort (LAZAR et al., 2005). Größter Nachteil ist sicherlich die Invasivität und mögliche Schwere etwaiger Komplikationen (BOUDRIEAU, 2009). KIM et al. (2010) beschreiben außerdem eine verringerte femorotibiale Kontaktfläche und einen nach kaudal verlagerten höchsten Kontaktdruck. Je nach Studie ergibt sich eine Komplikationsrate von 24 bis 14,8 % (PACCHIANA et al., 2003; FITZPATRICK u. SOLANO, 2010). In der Laufbandanalyse konnte 18 Wochen nach der Operation kein signifikanter Unterschied der vertikalen Kraft und des vertikalen Impulses im Vergleich zur nichtoperierten Gliedmaße festgestellt werden (BALLAGAS et al., 2004). Eine objektiv normale Gliedmaßenbelastung wurde nur bei 10,9 % der Patienten beobachtet (CONZEMIUS et al., 2005). Die femorotibiale Subluxation besserte sich, ohne vollständig aufgehoben zu werden.

Die TTA ist weniger invasiv und anspruchsvoll (BOUDRIEAU, 2009). Von Vorteil ist es ggf. auch, eine Patellaluxation mit koinzidenter Kreuzbandruptur gleichzeitig operieren zu können. Klinisch führt die TTA zu befriedigenden Ergebnissen, obwohl häufig eine persistierende Instabilität verbleibt (SKINNER et al., 2013).

Tabelle 2: Komplikationen und deren Häufigkeit bei TPLO-Operationen nach Literaturangaben in Anlehnung an Höpfl (2011)

Art der Komplikation	Häufigkeit	Literaturquelle
allgemein	52/253 113/ 397 46/115 131/696 7/21 34/406 148/1146	PRIDDY et al. (2003) PACCHIANA et al. (2003) BRAHM (2004) STAUFFER et al. (2006) CORR und BROWN (2007) FREY et al. (2010) FITZPATRICK und SOLANO (2010)
Fraktur der Tuberositas tibiae	19/219 17/397 6/253 9/213 5/94 28/696 1/1146	KERGOSIEN et al. (2004) PACCHIANA et al. (2003) PRIDDY et al. (2003) BERGH et al. (2008) CAREY et al. (2005) STAUFFER et al. (2006) FITZPATRICK und SOLANO (2010)
Avulsion der Tuberositas tibiae	2/115	BRAHM (2004)
Schwellung der Patellarsehne	19/94 19/397 29/29 19/696 1/118 3/1146	CAREY et al. (2005) PACCHIANA et al. (2003) MATTERN et al. (2006) STAUFFER et al. (2006) CONKLING et al. (2010) FITZPATRICK und SOLANO (2010)
Komplikationen mit den Implantaten	8/397 7/115 12/253 7/696 2/21 1/118 30/1146	PACCHIANA et al. (2003) BRAHM (2004) PRIDDY et al (2003) STAUFFER et al. (2006) CORR und BROWN (2007) CONKLING et al. (2010) FITZPATRICK et al. (2010)
Infektion	3/397 6/253 5/50 4/115 7/696 2/21 1/118 66/1146	PACCHIANA et al. (2003) PRIDDY et al. (2003) BARNHART (2003) BRAHM (2004) STAUFFER et al. (2006) CORR und BROWN (2007) CONKLING et al. (2010) FITZPATRICK und SOLANO (2010)
Übersehene oder erworbene Meniskusläsionen	16/254 4/397 5/115 2/94 28/1146	THIEMAN et al. (2006) PACCHIANA et al. (2003) BRAHM (2004) CAREY et al. (2005) FITZPATRICK und SOLANO (2010)
Tumorentstehung	1 Osteosarkom 1 histiozytäres Sarkom	BOUDRIEAU et al. (2005) HARASEN und SIMKO (2008)

Osteomyelitis	7/397 14/253	PACCHIANA et al. (2003) PRIDDY et al. (2003)
Fraktur der Fibula	1/397 3/253 1/115 5/696 2/21 9/168 1/118 1/1146	PACCHIANA et al. (2003) PRIDDY et al. (2003) BRAHM (2004) STAUFFER et al. (2006) CORR und BROWN (2007) TUTTLE und MANLEY (2009) CONKLING et al. (2010) FITZPATRICK und SOLANO (2010)
Fraktur der Patella	1/397	PACCHIANA et al. (2003)

Tabelle 3: Komplikationen und deren Häufigkeit bei TTA-Operationen nach Literaturangaben in Anlehnung an Höpfl (2011)

Art der Komplikation	Häufigkeit	Literaturquelle
Summe Σ	38/65 36/114 21/193	HOFFMANN et al. (2006) LAFEVER et al. (2007) STEINBERG et al. (2009)
Fraktur der Tuberositas tibiae	1/65 4/114 3/70 7/54 2/92	HOFFMANN et al. (2006) LAFEVER et al. (2007) STEIN und SCHMOEKEL (2008) CALVO et al. (2010) DYMOND et al. (2010)
Infektion	3/114 3/70 8/92 5/214	LAFEVER et al. (2007) STEIN und SCHMOEKEL (2008) DYMOND et al. (2010) KEMPER et al. (2011)
Fraktur der Tibia	3/114	LAFEVER et al. (2007)
Implantatversagen	4/65 4/114	HOFFMANN et al. (2006) LAFEVER et al. (2007)
Sekundäre Meniskusläsion	3/65 10/114 6/70 65/193 4/92 8/214	HOFFMANN et al. (2006) LAFEVER et al. (2007) STEIN und SCHMOEKEL (2008) STEINBERG et al. (2009) DYMOND et al. (2010) KEMPER et al. (2011)
Verletzung der Sehne des M. extensor digitorum longus	1/65	HOFFMANN et al. (2006)
Komplikationen mit den Implantaten	1/65	HOFFMANN et al. (2006)

Intraartikuläre Kreuzbandersatztechniken

Ziel der intraartikulären Stabilisierung ist die Rekonstruktion des kranialen Kreuzbandes in seinem Verlauf mithilfe unterschiedlicher Materialien (autogen, allogenen, xenogenen oder synthetisch) (ARNOCZKY et al., 1979; HULSE, 1985). Nur durch den direkten Ersatz ist eine Wiederherstellung der komplexen Biomechanik des Kniegelenkes möglich. Obwohl die extraartikulären Kreuzbandersatztechniken und die dynamischen Stabilisierungsverfahren bisher zwar zu funktionell besseren Operationsergebnissen führen, beseitigen sie die Instabilität nicht vollständig und verändern die physiologische Kniegelenksbewegung. Während der intraartikuläre Ersatz in der Veterinärmedizin momentan aufgrund der Studienlage und den vergleichsweise schlechteren Ergebnissen hinter den beiden erstgenannten Methoden zurücksteht, ist es in der Humanmedizin die bevorzugte Methode (MÜLLER et al., 2007; YASTREBOV u. LOBENHOFFER, 2009). Die intraartikulären Ersatztechniken haben ihre Schwachstelle derzeit vor allem im Materialversagen, Nachgeben oder Ausreißen an den Verankerungsstellen und Finden der optimalen Fixierungspunkte (WIRTH et al., 1984; HASSENPFUG et al., 1985). Zudem muss der Prozess der Ligamentisierung und die im Vergleich zum Menschen sofortige Wiederbelastung des Kniegelenks berücksichtigt werden. Durch den intraartikulären Ersatz besteht die einzige Möglichkeit die biologischen und physiologischen Verhältnisse nachzuahmen. WINKELS et al. (2010) sowie BOLIA et al. (2015) haben den Fixationspunkten besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Die Verankerung kann entweder durch einen Bohrtunnel oder Over-the-Top durchgeführt werden. Jedoch gibt es derzeit keine Prothese, die die hohen Anforderungen eines intraartikulären Ersatzbandes erfüllt. Der primäre Vorteil der Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes ist die langfristige Wiederherstellung der Gelenkstabilität, wie in der Humanmedizin in Langzeitstudien gezeigt werden konnte (MEUFFELS et al., 2009). Dadurch kann eine deutliche Senkung von Sekundärschäden erreicht werden (GREGORY u. LANDREAU, 2008; KESSLER et al., 2008; TAYTON et al., 2009).

In der Humanmedizin verglichen CAREY et al. (2009) die Ergebnisse von Autografts im Vergleich zu Allografts in der Kreuzbandchirurgie und stellten fest, dass sich das kurzzeitige Outcome nicht signifikant unterschied. Initiale Beschwerden waren bei den Autografts im Vergleich zu den Allografts erhöht (PETERSON et al., 2001; GORSCHESKY et al., 2005). PRODROMOS et al. kamen 2007 in einer Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass Allografts zu einer signifikant schlechteren Stabilität führen als Autografts. Auch KRAEUTLER et al. (2013) stellen in ihrer Metaanalyse ein schlechteres Abschneiden der Bone-patellar-tendon-bone-Allografts gegenüber den Autografts bezüglich Rupturrate und Knielaxizität fest. KRYCH et al. (2008) kommen zu dem gleichen Ergebnis. Wenn jedoch nur nicht mit Strahlung oder chemischen Prozessen behandelte Allografts verglichen werden, gab es keinen signifikanten Unterschied mehr.

Autografts

Als Autografts stehen besonders die Sehnen der Hamstring- (PAATSAMA, 1952) und Quadrizepsmuskeln und die Patellarsehne (STRANDE 1966, DUELAND 1966, DENNY u. BARR 1984) im Fokus. Die Nachteile autologe ortsständige Sehnentransplantate zu nutzen, sind die Entnahmemorbidität (KARTUS et al., 2001) und die verlängerten Operations- und Rekonvaleszenzzeiten (COLE et al., 2005) sowie der Funktionsausfall der verwendeten Sehnen. Zudem ist der Gebrauch von Autografts invasiver und die Sehnen neigen zum Dehnen und Versagen. Während aus der Transposition von Hamstringsehnen eine eingeschränkte Innenrotationsfähigkeit des Kniegelenkes resultiert und vor allem ein aktiver medialer Stabilisator des Gelenks entfällt (MÜLLER et al., 2007; LÜTZNER u. BOTTESI, 2009), ist die Entnahmemorbidität bei Nutzung der Quadrizepssehnen deutlich höher und hat einen Verlust von etwa 20 % der Oberschenkelstreckfähigkeit zur Folge. Die Verwendung eines Drittels des *Ligamentum patellae* ist zudem nur bei großen Hunderassen möglich. Jedoch verändert es auch bei großen Hunden den Verlauf des Femoropatellargelenks, so dass eine sekundäre *Arthropathia deformans* begünstigt wird. In der Humanmedizin wird zudem von stärkerem postoperativem Schmerz berichtet. Als Komplikation ist das infrapatellare Kontraktursyndrom mit ggf. folgender Fraktur der Kniescheibe beschrieben (LÜTZNER u. BOTTESI, 2009).

Die Verwendung eines Faszienstreifens (*Fascia lata et genus*) ist das älteste Verfahren der Wiederherstellungschirurgie des vorderen Kreuzbandes (GROVES, 1919; PAATSAMA, 1952). Neben den oben genannten Schwierigkeiten kommt hinzu, dass eine Verankerung des Nahtmaterials in der Faszie schwierig ist und es häufig zur frühzeitigen Lockerung kommt (JÄGER, 1970). In der Veterinärmedizin ist der Gebrauch von Faszienewebe die Regel (*Fascia lata* und/oder *genus*), gegebenenfalls mit Verstärkung durch das *Ligamentum patellae* (PAATSAMA, 1952; ARNOCKY et al., 1979; SCHNELL, 1986; BRUNNBERG, 1990). Die Struktur entspricht jedoch nicht der des ursprünglichen Bandes (WEISS, 1991). Alternativ wurden auch Hautstreifen transpositioniert (GIBBENS, 1957; RATHOR, 1960; LEIGHTON, 1961; LOEFFLER, 1964; POND u. CAMPBELL, 1972). Jedes Transplantat unterliegt einem Ein- und Umbauvorgang, der zur biomechanischen Schwächung führt. Dazu wird in der Humanmedizin eine temporäre Immobilisation vorgenommen. Die Dauer sollte so kurz wie möglich gehalten werden, weil es zur Schwächung der Muskeln, Bänder und des Knochens und zu daraus folgenden Funktionsbeeinträchtigungen führen kann (LAROS et al., 1971; NOYES, 1977). Günstig für den Heilungsverlauf ist eine Revaskularisation der Prothese aus dem Kniefettkörper (ALM u. STRÖMBERG, 1974; ARNOCKY et al., 1982).

Zur Lebensfähigkeit transpositionierter autologer Gewebe wurden histologische Untersuchungen durchgeführt und die Lebensfähigkeit als gegeben angenommen (KIRSCHNER 1909, KLEINSCHMIDT 1914, REHN u. MIYAUCHI 1914, SCHWARZ 1922).

Tabelle 4: Übersicht über häufig genutzte intraartikulären Kreuzbandersatztechniken

Operationstechnik	Autor	Material	Erfolgsrate
Over-the-Top	ARNOCZKY et al. (1979)	Faszie sowie ein Stück der Patella und das mediale Drittel des Lig. patellae	Belastbarkeit entspricht nicht dem intakten Kreuzband (BUTLER u. STOUFFER, 1983) Risiko einer Patellafraktur (SHIRES, 1993). Erfolgsrate von 93 % (ARNOCZKY et al., 1979) 15 % der operierten Labradore erreichte Bodenreaktionskräfte, die nach 6 Monaten gesunden Tieren ähnelten (CONZEMIUS et al., 2005) >> 85% der operierten Hunde erlangten ein gutes, klinisches Ergebnis (SCHNELL, 1986; BRUNNBERG, 1990)
Faszientransplantation	PAATSAMA (1952)		Erfolg von 60 % (RAHLFS u. FEHR, 1986)

Allografts und Xenografts

Über die Nutzung von allogenem und/oder xenogenem Material als intraartikulären Kreuzbandersatz wird in der Veterinärmedizin nur in einzelnen Fällen berichtet. LAMPADIUS (1964) nutzte canine Rutensehnen als allogenem, MATIS (1973) humane Dura mater und BRUNNBERG (1987) bovine Endsehnen des *M. flexor digitalis longus* als xenogenem Kreuzbandersatz. Als nachteilig bzw. gefährlich anzusehen ist eine etwaige Krankheitsübertragung oder die Abstoßung des Transplantates. Häufig wird zur Reduktion der Antigenität die Deep-Fresh-Frozen-Methode angewandt. Dadurch werden die MCH-II-Proteine zerstört, die Reißfestigkeit jedoch nicht negativ beeinflusst (NIKOLAOU et al., 1986; JACKSON et al., 1991). Im Vergleich zu Autografts muss vor Implantation zusätzlich eine Sterilisation der Transplantate erfolgen. Aufgrund der unbefriedigenden Langzeitergebnisse und des Mangels an Vergleichsstudien (CHANG et al., 2003) haben sich Allo- und Xenografts bisher nicht durchsetzen können.

SCHEFFLER et al. (2008) haben im Vergleich von Allografts mit Autografts eine verzögerte Revaskularisation, verzögerte Heilung, verminderte strukturelle und mechanische Eigenschaften bei den allogenem Knochen-Sehnentransplantaten (Patellarsehne) festgestellt.

Synthetisches

An synthetischen Materialien werden beispielsweise Nylonfäden oder Kohlefasern verwendet. Insgesamt haben sie aber in der Veterinärmedizin wegen Materialermüdung, Bruchanfälligkeit und chronischer Fremdkörperreaktionen wenig Bedeutung. Außerdem können die bisher verwandten Materialien die Eigenschaften eines nativen Kreuzbandes nicht erfüllen und halten der Belastung nicht stand.

2.7 Einflussfaktoren des vorderen Kreuzbandersatzes

2.7.1 Transplantatwahl

Die optimale Prothese sollte möglichst die biologischen und biomechanischen Eigenschaften eines nativen Kreuzbandes haben und biologisch inert sein. Die biologischen Eigenschaften umfassen den strukturellen Aufbau, den intraartikulären Verlauf und adäquate Wechselwirkungen mit dem Umgebungsmilieu. Bei den biomechanischen Eigenschaften steht die Reißfestigkeit im Mittelpunkt. Für die Humanmedizin haben BRUCHMANN et al. (1987) eine

Mindestreißfestigkeit angegeben, die dem Zweifachen des nativen Bandes entspricht. Bezüglich der anatomischen Rekonstruktion kann zwischen Doppelbündel und Einzelbündeltechnik unterschieden werden. Anatomisch korrekt wäre ein separater Ersatz des anteromedialen und des posterolateralen Bündels. Da diese jedoch *in vivo* nicht auf ganzer Strecke eindeutig identifizier- und trennbar sind und YASTREBOV und LOBENHOFFER (2009) herausfanden, dass in experimentellen Studien zwar eine bessere Rotationsstabilität besteht, es klinisch aber kaum Unterschiede in der objektiven Stabilität und im funktionellen Ergebnis gibt, ist das Risiko-Nutzen-Verhältnis fraglich. Darüber hinaus steigt die Komplikationsrate bei Anwendung der Doppelbündeltechnik, weil sie technisch wesentlich anspruchsvoller ist (YASTREBOV u. LOBENHOFFER, 2009). Der komplexe strukturelle Aufbau des Kreuzbandes wurde bereits ausführlich beschrieben und gerade diesen gilt es nachzubilden. Bänder entsprechen dem Aufbau von Zugsehnen (BARGMANN, 1977). Sie unterscheiden sich lediglich durch eine höhere Stoffwechselaktivität, einen höheren DNA-Gehalt und mehr Kollagen Typ III (AMIEL et al., 1984). Eine Zugsehne als Kreuzbandprothese kommt dem Originalband somit am nächsten. Stimmen die Wirkungsrichtung des Muskels und die Verlaufsrichtung der Sehne nicht überein, entstehen an den druckbelasteten Stellen faserknorpelige Einlagerungen (Gleitsehne). Der mittlere Kreuzbandabschnitt, der meist rupturiert, weist faserknorpelige Strukturmerkmale auf und verliert den Charakter einer Zugsehne. Diese Abweichung ist vermutlich auf die durch die Torquierung um die Längsrichtung auftretenden Druckkräfte zurückzuführen und zeigt, dass eine Umwandlung in die jeweils andere Sehnenart je nach mechanischer Beanspruchung möglich ist (GILLARD et al., 1979). Als Kreuzersatzband sollten jedoch keine Gleitsehnen verwendet werden. In der Humanmedizin werden v. a. BTB-Transplantate (Bone-Tendon-Bone; Patellarsehne) oder freie Sehnen (Hamstring, Quadrizeps) genutzt. Bei beiden Optionen können sowohl Autografts als auch Allografts transplantiert werden.

Von SCHEFFLER et al. (2008) wurden die biomechanischen Eigenschaften und der Umbauprozess von Autografts und Allografts im Schafmodell untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das histologische Erscheinungsbild und die extrazellulären Veränderungen nach einem Jahr fast identisch, die biomechanischen Eigenschaften der Allografts jedoch signifikant unterlegen waren. In frühen postoperativen Kontrolluntersuchungen (sechs bzw. zwölf Wochen *post operationem*) waren die Umbau- und Inkorporationsvorgänge der Allografts im Vergleich zu den Autografts verzögert (SCHEFFLER et al., 2006), die biomechanischen Eigenschaften bezüglich Gelenkstabilität, Ausrisssteifigkeit und Versagenskraft jedoch etwa gleich.

Obwohl die biologischen Umbau- und Einbauvorgänge der frühen Heilungsphasen nach sechs und zwölf Wochen eine zeitliche Verzögerung der allogenen Transplantate im Tiermodell aufwiesen, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wiederherstellung der anterior-

posterioren Gelenkstabilität sowie in der Ausrissteifigkeit und Versagenskraft der Rekonstruktionen mit Auto- und Allograft festgestellt werden (SCHEFFLER et al., 2008). Nicht sterilisierte Spendersehnen als freies Sehnentransplantat zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes zu gebrauchen, zeigt charakteristische Unterschiede zum Einsatz von körpereigenem Gewebe. Hierbei sind sowohl der intraartikuläre Umbau als auch die intraossäre Einheilung der freien Sehnenallografts in den ersten drei Monaten deutlich langsamer. Nach Ablauf eines Jahres kommt es zu einer zunehmenden Angleichung der biologischen Eigenschaften mit einer Anpassung, jedoch keiner Wiederherstellung der Morphologie des vorderen Kreuzbandes. Die frühe verzögerte biologische Einheilung der Allografts führt im Tiermodell erst nach einem Jahr zu verminderter biomechanischer Stabilität des rekonstruierten Kniegelenks. Die biologischen Umbauvorgänge der ossären Einheilung unterscheiden sich substantiell von den intraartikulären Bandveränderungen (WEILER et al., 2002; SCHEFFLER et al., 2008). Es zeigte sich analog zu der Verzögerung des intraartikulären Bandumbaus eine ebenso zeitliche Verzögerung der ossären Transplantatintegration der Allografts (SCHEFFLER, 2010). Biomechanische Konsequenzen im Sinne einer eingeschränkteren Wiederherstellung der strukturellen Eigenschaften des Transplantats und der Gelenkstabilität konnten nach einem Jahr nur für die allogenen im Vergleich zu autologen Rekonstruktionen festgestellt werden.

2.7.2 Verankerungsverfahren

Bei den Verankerungsverfahren wird zwischen gelenkferner (extraartikulär) und gelenknaher (kortikal) sowie zwischen direkter und indirekter Verankerung unterschieden. Die gelenknahe Fixation hat mechanische Vorteile gegenüber der gelenkfernen extrakortikalen (ISHIBASHI et al., 1997; SCHEFFLER et al., 2002). Das native Kreuzband ist in Abhängigkeit vom Gewicht des Hundes maximal 20 mm lang. Bei gelenkferner Verankerung verlängert es sich auf bis zu 10 bis 15 cm, verändert so die Biomechanik und entwickelt aufgrund der Elastizität den sog. ‚Bungee-cord-effekt‘ (WEILER et al., 2000). Dadurch werden zwischen Transplantat und Knochentunnel Scherkräfte wirksam. Zusätzlich kann es durch Transplantatbewegung während der Kniegelenksbewegung zur trichterförmigen Aufweitung am Tunneleingang kommen (windshield wiper effect) (HOHER et al., 1998; NEBELUNG et al., 1998; HOHER et al., 1999) und die knöcherne Integration des Transplantates verhindern. Die direkte Fixierung im Bohrkanal ist gegenüber der indirekten Fixierung über ein Verbindungsmaterial zu bevorzugen (LÜTZNER u. BOTTESI, 2009), da es hier zur Knochenheilung kommt. Dabei bilden Osteoblasten einen zunächst unverkalkten Osteoidsaum, der nach sechs Wochen vollständig mineralisiert ist (LIEBICH, 2010). Die Knochenneubildung kann am Periost, Endost, perivaskulär oder durch

direkte Differenzierung von Knochenzellen aus Bindegewebe (Faserknochenbildung) erfolgen (LIEBICH, 2010) und verläuft in drei Phasen (Entzündung, Reparatur, Remodeling) (CRUESS u. DUMONT, 1975). Die Entzündungsphase dauert etwa zwei bis drei Wochen und beinhaltet die Hämatombildung, die Resorption und den Abbau des zerstörten Knochens. In der darauffolgenden Reparaturphase kommt es zur Organisation des Hämatoms, zur Angiogenese und Knochenproliferation (REMEDIOS, 1999). Während der letzten Phase des Remodelings wird das mineralisierte Knochengewebe in Geflecht- und später Lamellenknochen umgewandelt.

Eine gelenknahe Verankerung z. B. durch Interferenzschrauben führt zur Ausbildung einer direkten Bandinsertion (WEILER et al., 2000; WEILER et al., 2002), die auch das native Kreuzband aufweist (COOPER u. MISOL, 1970; ARNOCKY, 1983; PETERSEN u. TILLMANN, 2002). Eine direkte Bandinsertion ermöglicht durch eine graduelle Versteifung des Bandgewebes über den bereits beschriebenen Vierzonenaufbau die Übertragung großer Kräfte auf ein relativ kleines Insertionsareal. Zahlreiche Studien weisen bei freien Sehnen transplantaten allerdings nur die Entwicklung einer indirekten Bandinsertion nach (RODEO et al., 1993; BLICKENSTAFF et al., 1997; GREIS et al., 2001; TOMITA et al., 2001; YAMAKADO et al., 2003). Eine direkte Bandinsertion wird nur durch die gelenknahe Transplantatbefestigung gewährleistet. Entscheidende Bedeutung für den klinisch erfolgreichen Ersatz des vorderen Kreuzbandes scheinen die Wiederherstellung der exakten Anatomie, im Speziellen der Insertionspunkte und des nicht-isometrischen Dehnungsverhaltens des vorderen Kreuzbandes zu sein (SCHEFFLER, 2010). WINKELS et al. (2010) haben experimentell ein Zielgerät zur arthroskopischen tibialen Verankerung eines intraartikulären Kreuzersatzbandes entwickelt und dieses auch für die femorale Insertion getestet (BOLIA u. BOTTCHEER, 2015).

2.7.3 Um- und Einbauverhalten

Transplantierte Bänder unterliegen einem sog. dreiphasigen Ligamentisierungsprozess (BOSCH u. KASPERCZYK, 1992):

1. Nekrose und Degradation
2. Revitalisierung und Proliferation
3. Remodeling

In der initialen Phase ist die Fixation der schwächste Punkt des Transplantats. Sukzessive kommt es zum biologischen Umbau des Transplantates, der zu Beginn v. a. mit Nekrose und Degradation einhergeht. In dieser Zeit ist das eigentliche Transplantat der Schwachpunkt des Konstrukts (GRANA et al., 1994; GORADIA et al., 2000; PAPAGEORGIU et al., 2001; WEILER et al., 2004). Bei optimaler Verankerung bildet sich im Bereich der Fixation eine direkte

Bandinsertion. Aufgrund der limitierten vaskulären Versorgung des Transplantats kommt es zu den bereits genannten Abbauvorgängen und dadurch zur mechanischen Schwächung. Schon in den 1980er Jahren wurden die zunehmende Hypozellularität und Nekrose insbesondere in der Mitte des Transplantates beschrieben (ARNOCZKY et al., 1982; SHINO et al., 1984; AMIEL et al., 1986; AMIEL et al., 1986; KLEINER et al., 1986; SCHEFFLER et al., 2008). Bereits zwischen der ersten und zweiten Woche kann das Einwandern von Wirtszellen in die Peripherie des neuen Bandes beobachtet werden (KLEINER et al., 1986; KLEINER et al., 1989). Die Zellen stammen aus den Stümpfen des nativen Kreuzbandes, der Synovia oder bei Verwendung von Bohrkanälen aus dem Knochenmark. In dieser frühen Ligamentisierungsphase wird das Transplantat noch nicht revaskularisiert (ARNOCZKY et al., 1982; KLEINER et al., 1989; SHINO u. HORIBE, 1991; JU et al., 2006).

Nach etwa vier Wochen geht der Ligamentisierungsprozess in die Proliferationsphase über. Diese dauert bis circa drei Monate postoperativ und ist durch ausgeprägte extrazelluläre und zelluläre Umbau- und Reparationsvorgänge gekennzeichnet. In dieser Phase ist die Schwächung des Transplantats am massivsten, weil eine verminderte Revaskularisation, ein Verlust an normal orientierten Kollagenfasern und eine zunächst erniedrigte Kollagenfaserdichte mit anschließend durch Neusynthese wesentlich dünneren Kollagenfasern vorliegen (SHINO et al., 1984; BALLOCK et al., 1989; KLEINER et al., 1989; JACKSON et al., 1991; JACKSON et al., 1993; SPINDLER et al., 1996; BLICKENSTAFF et al., 1997; GORADIA et al., 2000; WEILER et al., 2001; TOHYAMA u. YASUDA, 2002; WEILER et al., 2002; WEILER et al., 2004; SCHEFFLER et al., 2008). Durch den Umbau der extrazellulären Matrix kommt es zu fortschreitenden Nekrosen, die zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen. Dadurch wird die Zellmigration und -proliferation, Synthese extrazellulärer Matrix sowie Revaskularisation stimuliert (SHINO et al., 1984; JACKSON et al., 1997; KURODA et al., 2000; KAWAMURA et al., 2005; JU et al., 2006). Die Revaskularisation beginnt etwa vier Wochen postoperativ (ARNOCZKY et al., 1982; WEILER et al., 2001; UNTERHAUSER et al., 2003; SCHEFFLER et al., 2008) in der Peripherie (CLAES et al., 2011) und versorgt das komplette Transplantat etwa zum Ende der Proliferationsphase (UNTERHAUSER et al., 2003; PETERSEN et al., 2004). Sie ist unabdingbar für das Überleben des Transplantats und Grundvoraussetzung für das eigentliche Remodeling. Ihr Ursprung ist nicht vollständig geklärt (CLAES et al., 2011). Nach ARNOZKY (1983) kommt sie aus dem Hoffaschen Fettkörper, während ROUGRAFF et al. (1993) das synoviale Gewebe als Ursprung ansehen. Die zelluläre Aktivität erreicht ihr Maximum und Myofibroblasten treten auf. Am Ende der Proliferationsphase erreicht die Zelldichte fast die eines nativen Kreuzbandes (SHINO et al., 1984; BALLOCK et al., 1989; JACKSON et al., 1993; UNTERHAUSER et al., 2003; WEILER et al., 2004; SCHEFFLER et al., 2008; JANSSEN et al., 2011). Die Zellkerne erscheinen jedoch noch plump und die Kollagenfasern sind unorganisiert und irregulär (CLAES et al., 2011).

In der Phase des Remodelings bzw. der Ligamentisierung kommt es zur Konsolidierung und Reorganisation des Transplantats, bis es die biologischen Eigenschaften des nativen vorderen Kreuzbandes erreicht hat. Dies dauert etwa ein Jahr (WEILER et al., 2001). Im Tiermodell wird die Zelldichte des nativen Bandes zwischen dem dritten und sechsten Monat *post operationem* erreicht (WEILER et al., 2001; SCHEFFLER et al., 2002; UNTERHAUSER et al., 2003; PETERSEN et al., 2004; SCHEFFLER et al., 2008). Es kommt zur Normvaskularität. Die Fibroblasten richten sich longitudinal aus und die Zellkerne sind eher ovoid (CLAES et al., 2011). Ein Indikator des Ligamentisierungsprozesses können gegebenenfalls von UNTERHAUSER et al. (2004) identifizierte Myofibroblasten sein. Sie beeinflussen durch ihre auf die extrazelluläre Matrix wirkende Kontraktionskraft die Art des Remodelings signifikant (WEILER et al., 2002). Die Blutversorgung entspricht etwa nach sechs bis zwölf Monaten der des originären Bandes (ARNOCZKY et al., 1982; WEILER et al., 2001; UNTERHAUSER et al., 2003; SCHEFFLER et al., 2008). Im gleichen Zeitraum gewinnen die Kollagenfibrillen ihre makro- und mikroskopische Organisation wieder (WEILER et al., 2002; SCHEFFLER et al., 2008). Die Kollagenbündel sind wieder dicht gepackt und richten sich parallel aus (CLAES et al., 2011). SCRANTON et al. (1998) stellten bezüglich der Revaskularisation und Ligamentisierung nach sechs Monaten ein Angleichen der Struktur des freien Sehnen transplantats im Schafsmodell gegenüber dem nativen vorderen Kreuzband fest. Nach drei Monaten kam es zur Transformation von chondroiden Zellen an den Insertionszonen. Wie bereits beschrieben, entsteht eine direkte Bandinsertion bei Verwendung eines freien Sehnen transplantats mit fixer Verankerung (WEILER et al., 2002). Nach zahlreichen Studien erreicht das Kreuzbandkonstrukt jedoch nicht mehr als 50 bis 60% der strukturellen Eigenschaften (z. B. Bruchlast, Steifheit des Originalbandes) (BALLOCK et al., 1989; JACKSON et al., 1993; NG et al., 1995; NG et al., 1996; BLICKENSTAFF et al., 1997; GORADIA et al., 2000; PAPAGEORGIOU et al., 2001; WEILER et al., 2002; SCHEFFLER et al., 2008). Der Zeitpunkt, ab dem keine weiteren Veränderungen im remodelten Transplantat stattfinden, kennzeichnet das Ende der Ligamentisierung (CLAES et al., 2011). Nach SÁNCHEZ et al. (2010) beträgt die Gesamtdauer etwa zwei Jahre, während BOSCH UND KASPERCZYK (1992) niemals normale Ligamentcharakteristika bei Autografts nachweisen konnten. JANSSEN et al. (2011) konnten auch nach zwei Jahren noch keinen Abschluss des Ligamentisierungsprozesses feststellen.

2.8 Folgen des Kreuzbandrisses (Osteoarthritis)

Osteoarthritis (OA, degenerative Gelenkerkrankung) wird definiert als eine Gelenkerkrankung, die durch eine Zerstörung des Gelenkknorpels, Osteophytenbildung und Knochenremodeling, pathologische Veränderungen des periartikulären Gewebes einschließlich Synovialmembran, subchondralen Knochen, Muskeln, Sehnen und Bändern sowie durch geringgradige, nicht-eitrige Entzündung variablen Grades charakterisiert ist (FOX u. MILLIS, 2014). Sie gehört zu den häufigsten muskuloskeletalen Erkrankungen (HEGEMANN et al., 2002; EVANS et al., 2004) und ist ein progressiv fortschreitender Prozess.

Nach JOHNSTON et al. (1997) entwickelt sich Osteoarthritis bei veränderter Knorpelstruktur und Homöostase. Sie beginnt am subchondralen Knochen, den Bändern und der Synovialmembran. Die Ursachen der Entstehung sind multifaktoriell. Es wird zwischen primärer (idiopathischer) und sekundärer Arthrose (traumatisch, metabolisch, endokrin, neuropathisch) unterschieden. Prädisponierend für die Entstehung dieses Krankheitskomplexes sind Adipositas (MURPHY et al., 2008; RICHETTE et al., 2011), genetische Veranlagungen (CORNELIS et al., 2011; LOUGHLIN, 2011; VALDES u. SPECTOR, 2011; LEE et al., 2013), Gelenkveränderungen (TANAMAS et al., 2009; HARVEY et al., 2010; SHARMA et al., 2010), Trauma (ROOS et al., 1995; ROOS et al., 1998; LOHMANDER et al., 2004) und das Alter (ZAHM, 1964; NOYES et al., 1974; BRUNNBERG, 1990).

In der Synopse entsteht die sekundäre Osteoarthritis in der Regel aufgrund eines abnormen Gelenks (Dysplasie, Inkongruenz, Entwicklungsstörung) oder einer abnormen Belastung (Trauma, Instabilität, Überbelastung). Es lassen sich vier Schweregrade unterscheiden (BRUNNBERG et al., 2014).

Die Gelenkflächen sind mit hyalinem Knorpel überzogen, der einen dreilagigen Aufbau aufweist: oberflächliche horizontale Schicht, mittlere tangentielle Schicht (typische Arkadenform) und tiefe Schicht (Verbindung zum Knochen). Knorpel besteht aus Chondrozyten, Kollagenfasertyp II und ungeformte Matrix und hat einen hohen Glykosaminoglykangehalt. Er ist gefäß- und innervationslos. Ernährt wird er nur durch Diffusion (bradytroph). Er ist nicht regenerationsfähig.

Bereits in der frühen Geschichte der caninen Kreuzbanderkrankung wurde die *Arthropathia deformans* als Folge der pathologischen Verhältnisse beschrieben (PAATSAMA, 1952; MARSHALL u. OLSSON, 1971; GILBERTSON, 1975). In einem kreuzbanddefizienten Kniegelenk entsteht zwangsläufig Osteoarthritis (POND u. NUKI, 1973). Auch die meisten Hunde, die operativ versorgt wurden, entwickeln degenerative Veränderungen im Kniegelenk (CICUTTINI et al., 1996). Bereits 1978 beschrieben TIRGARI et al., dass eine Gelenkinstabilität zu permanenter Entzündung, Knorpelerosionen, Osteoarthritis und teilweise zu Meniskusläsionen führt (RALPHS u. WHITNEY, 2002; TIVERS et al., 2009; BOTTCHEER et al.,

2010). GILBERTSON (1975) wies nach drei Tagen ein beginnendes Osteophytenwachstum nach. PAATSAMA (1952) und MARSHALL (1969) entdeckten nach 25 Tagen Osteophyten bzw. nach 23 Monaten proliferierende Osteophyten und Fibrosierung der Synovialmembran und *Capsula fibrosa* (MARSHALL u. OLSSON, 1971). In der Synovialmembran synthetisierte präinflammatorische Zytokine verstärken die Kaskade der biologisch aktiven Substanzen, die bei der Gelenkdegeneration mitwirken (DOOM et al., 2008). Durch die Produktion von Stickstoffmonoxid-Synthase der Chondrozyten bei Hunden mit Osteoarthritis in der Superficialzone des Gelenkknorpels kommt es zu einem reflektorischen Anstieg von Stickstoffmonoxid (HAUSELMANN et al., 1998). Stickstoffmonoxid inhibiert die Synthese von Proteoglykanen und Kollagen in Knorpelzellkulturen und reguliert die Synthese von Matrixmetalloproteinasen (MMP) hoch (MCDEVITT u. MUIR, 1976; ADAMS u. BILLINGHAM, 1982). Beides führt zur Zerstörung der extrazellulären Matrix. Der Knorpelabbau wird v. a. durch die zuvor genannten Metalloproteinasen katalysiert. Sie sind eine der Hauptakteure im Zusammenhang mit der Osteoarthritis, da sie normalerweise mit ihren Inhibitoren die Balance zwischen Remodeling und Synthese halten (NAGASE et al., 2006). Zusätzlich vermittelt Stickstoffmonoxid die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (BOILEAU et al., 2002) und zusammen mit anderen Faktoren die Apoptose von Gelenkgewebe (Chondrozyten, Ligamentozyten). Als Folge dieser Erkrankung können Schmerzen und Funktionseinbußen folgen (BENNETT, 1990).

2.9 Tissue Engineering

Beim Tissue Engineering werden Zellen, ein Trägergerüst und bioaktive Moleküle verwendet, um verletztes Gewebe zu reparieren oder zu ersetzen. Dabei sind Zellursprung, Wachstumsfaktoren, mechanische Kräfte, Trägergerüst (Scaffold) und Verhalten der Zellen auf dem Scaffold zu berücksichtigen. Das Trägergerüst stellt die richtige Umgebung für die Zellproliferation und -differenzierung zur Verfügung und stellt einen Rahmen für die Gewebseinwachsung und funktionelle Integration. In verschiedenen Studien wurden bereits mesenchymale Stammzellen *in vitro* auf Scaffolds aufgetragen und implantiert (INGRAM et al., 2007; ZHANG et al., 2009; BADYLAK et al., 2011; MARTINELLO et al., 2014; SCARRITT et al., 2015). Zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (EZM) besteht eine Wechselbeziehung, über die Umbauvorgänge unter physiologischen und pathologischen (Wundheilung, Knochenbruchheilung) Bedingungen reguliert werden.

Es muss ein speziell zugeschnittenes Trägergerüst entwickelt werden, das den biologischen und biomechanischen Eigenschaften (biologische funktionelle extrazelluläre Matrix) der extrazellulären Matrix des nativen Materials entspricht.

Dadurch wird die Möglichkeit geboten, die bisher noch bestehenden Defizite der Allo- und Xenografts zu kompensieren bzw. sogar eine ideale Prothese herzustellen. Ein Band, das sich wie autologes Material verhält und dessen Ligamentisierungsprozess optimiert wurde, so dass es zu keiner die Kniegelenksstabilität beeinträchtigenden biomechanischen Schwächung und zu keinen Problemen der Autografts kommt (Entnahmemorbidity).

Ziel all dieser Studien war es, gut integriertes, neudifferenziertes Gewebe zu erzeugen.

2.9.1 Trägergerüst

Für die Entwicklung einer Gewebeprotese zeichnet sich die extrazelluläre Matrix als elementares Werkzeug ab. Diese sollte einerseits den mesenchymalen Stromazellen eine optimale biologische Nische mit den entsprechenden Umweltbedingungen bereitstellen und andererseits als Transplantat über die notwendigen biomechanischen Eigenschaften verfügen (LUTOLF et al., 2009). Die extrazelluläre Matrix wird von den ortsständigen Zellen gebildet und besteht aus der geformten Interzellulärschubstanz (kollagene, elastische und retikuläre Fasern) und der amorphen Grundsubstanz. Sie ist ein komplexes Netzwerk aus interagierenden Makromolekülen und für die biomechanischen und die die Mikroumgebung beeinflussenden Signalfaktoren verantwortlich (DISCHER et al., 2009). Jedes Gewebe und jedes Organ hat seine individuell zusammengesetzte Matrix (BADYLAK et al., 2009). Eine Vielzahl an Studien hat gezeigt, dass sowohl die mechanischen Eigenschaften als auch der Gerüstaufbau eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulärer Aktivität (Anheften, Morphologie, Proliferation und Differenzierung) spielen (ENGLER et al., 2006; DALBY et al., 2007; GENTLEMAN et al., 2009; CHOWDHURY et al., 2010; MCMURRAY et al., 2011). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass spezielle Verfahren zur Entfernung zellulärer Bestandteile (Dezellularisierung) die histologische Struktur erhalten und gleichzeitig die Immunität deutlich reduzieren (HUDSON et al., 2004). Die meisten der spezifisch in der extrazellulären Matrix von Sehnen vorhandenen Komponenten inklusive der Wachstumsfaktoren scheinen auch nach Bearbeitung (z. B. Dezellularisierung) noch vorhanden zu sein (NING et al., 2012). Somit vereinen dezellularisierte Sehnen die Vorteile der intrinsischen mechanischen Kompetenz mit gleichzeitiger Bereitstellung von tenogenen Stimuli für einwandernde Zellen durch die vorhandenen Wachstumsfaktoren. Nach YIN et al. (2013) fördern tenogen gewonnene extrazelluläre Matrices speziell die Differenzierung in Tenozyten (LITTLE et al., 2010). Im Vergleich zu künstlichen Trägergerüsten haben von Zellen befreite Gewebe den Vorteil einer verbesserten Biokompatibilität, steigern die Möglichkeit der zellulären Repopulation und haben höhere biomechanische Stabilität (LIU et al., 2008), so dass die Verwendung von dezellularisierten Kadaversehnen die physiologischen und mechanischen Eigenschaften sowie Signalfaktoren

für Anhaften, Migrieren und Proliferieren von Zellen erhält (GILBERT et al., 2006). Auf dem aktuellen Wissensstand gibt es kein künstliches Trägermaterial, das der natürlichen Sehne überlegen ist (MARTINELLO et al., 2014). Darüber hinaus berichten NING et al. (2015), dass dezellularisierte Sehnenstücke mit einer Dicke von mindestens 300 µm die gleichen mechanischen Eigenschaften wie intakte Sehnenbündel haben. Das gilt für das Mikroenvironment, die Oberflächenstruktur, die biochemische Zusammensetzung und die Stärke der Sehne.

2.9.2 Zellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen vom Embryo, Fetus oder einem adulten Lebewesen, die unter geeigneten biochemischen, hormonellen und mechanischen Stimuli das einzigartige Potenzial haben in ausgereifte Gewebezellen zu differenzieren (CAPLAN, 1991; CAPLAN u. BRUDER, 2001). Das Binde- und Stützgewebe des Hundes entsteht aus dem Mesenchym (embryonales Bindegewebe). Im Gegensatz zu den embryonalen und fetalen Stammzellen unterliegen die adulten (mesenchymale Stammzellen) weniger ethischen Regelungen (LEE u. HUI, 2006; LEO u. GRANDE, 2006). Mesenchymale Stammzellen sind im Vergleich zu den anderen pluripotenten nur multipotente Progenitorzellen, die sich vielfach teilen können. Sie wurden erstmals 1966 von Friedenstein aus Knochenmark von Ratten isoliert. Die Anzahl der Tochterzellen wird durch viele Faktoren beeinflusst.

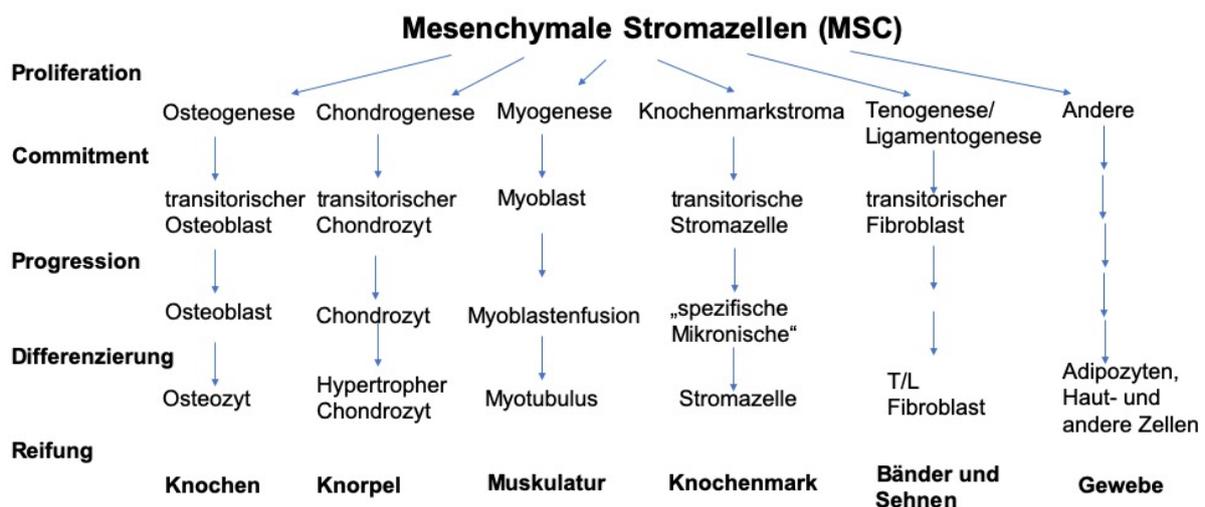


Abbildung 1: In Anlehnung an: Mesenchymale Stammzellen. Der mesengene Prozess wurde erstmals 1988 beschrieben und die Abbildung in dieser Form 1990 erstellt. Die Differenzierungslinien wurden durch verschiedene Autoren in der Zellkultur verifiziert. (CAPLAN, 1991)

Letztlich kontrollieren in- und extrinsische Faktoren auf molekularer und zellulärer Ebene die Entwicklung der Stammzellen in spezifisches Gewebe mit den entsprechenden Funktionen. Stammzellen sind immunprivilegiert, da sie keine Oberflächenmarker exprimieren, die für die Erkennung durch T- und B-Zellen notwendig sind. Deshalb ist auch eine allo- bzw. xenogene

Verwendung möglich. Darüber hinaus können sie Lymphozyten supprimieren (NIEMEYER et al., 2010), sind zum sog. Homing befähigt (BARRY u. MURPHY, 2004) und haben parakrine Eigenschaften (BEYER NARDI u. DA SILVA MEIRELLES, 2006). Das Homing wird speziellen Oberflächenrezeptoren und der inhärenten Fähigkeit, an verletztes Endothel anzuheften, zugeschrieben und ermöglicht den Zellen, zu Verletzungen zu migrieren. Die parakrinen Eigenschaften können vor allem zu antiinflammatorischen Zwecken verwendet werden. Nach der Geburt sind Stammzellen mit den Fähigkeiten zur Teilung und Differenzierung für Reparaturvorgänge im Körper essentiell (CLARKE u. FRISEN, 2001). Da es keine eindeutigen Marker zur Identifizierung von mesenchymalen Stromazellen gibt, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein (JAISWAL et al., 1997; CONGET u. MINGUELL, 1999; DOMINICI et al., 2006):

1. Plastikadhärenz (spindelförmige kolonieformende Zellen) (FRIEDENSTEIN et al., 1970)
2. Differenzierung in Knochen (BRUDER et al., 1997; BRUDER et al., 1998), Osteoblasten (DENNIS u. CAPLAN, 1996), Knorpel (KADIYALA et al., 1997), Knorpelzellen (JOHNSTONE et al., 1998), Sehngewebe (YOUNG et al., 1998), Muskulatur (GALMICHE et al., 1993; FERRARI et al., 1998), Fettgewebe (PROCKOP, 1998; DENNIS et al., 1999)
3. Expression spezifischer Oberflächenmarker (z.B. CD44, CD90 und CD105) bzw. ein Fehlen dieser (CD45, CD34 und CD14 (PITTENGER et al., 1999))

Die Zellen wurden bereits erfolgreich aus verschiedenen Geweben isoliert, z. B. aus Knochenmark und Fettgewebe (ZUK et al., 2001; HUANG et al., 2002). Der Vorteil von aus Fett gewonnenen Stammzellen (ASCs) ist die geringere Donormorbidität, die höhere Zelldichte und die einfachere Isolation (NEUPANE et al., 2008). Mesenchymale Stromazellen können mit Erhalt der Viabilität und des multipotenten Differenzierungspotenzials kryokonserviert werden (KRAUS u. KIRKER-HEAD, 2006), wodurch die Entwicklung einer Stammzellbank ermöglicht wird. Durch die Fähigkeit der ASCs, in verschiedene Gewebe zu differenzieren, sind sie ideal für klinische Gewebsregenerationen und -reparaturen (KADIYALA et al., 1997; RICHARDS et al., 1999) wie z. B. von Bändern und Sehnen (YOUNG et al., 1998) oder Knorpel (JOHNSTONE u. YOO, 1999) geeignet.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Sehnen

Die Achillessehnen von 18 Hunden im Alter von 0,5 bis 14 Jahren (w/m) wurden in die Studie eingeschlossen. Die Hunde wurden aus einem anderen, nicht mit der Studie in Verbindung stehenden Zusammenhang euthanasiert oder tot in die Klinik für kleine Haustiere angeliefert. Keines der Tiere hatte eine bekannte Problematik der Achillessehne oder eine systemische Erkrankung. Die Achillessehnen waren intakt, Hinweise auf Verletzungen, auch alte, waren offensichtlich nicht erkennbar. Die Tiere hatten keine Endokrinopathie (Cushing, Hypothyreose, Diabetes). Tumorerkrankungen konnten nicht festgestellt werden. Die Sehnen wurden nur entnommen, wenn der Tierhalter schriftlich dazu sein Einverständnis gegeben hatte. Zuvor war der Tierhalter aufgeklärt worden, dass die Sehnen für eine wissenschaftliche Studie genutzt werden (Anhang S. 163). Der Tierkörper wurde der Pathologie zur Entsorgung überlassen.

Die Sehnen wurden innerhalb von 24 Stunden nach Eintritt des Todes unter aseptischen Kautelen entnommen. Dazu wurde die Hintergliedmaße distal des Kniegelenkes geschoren, gereinigt und desinfiziert und der geschorene Bereich mit selbstklebender Einmalfolie abgeklebt. Die Haut wurde mit dem Skalpell über die Länge der Achillessehne inzidiert und die Sehne freigelegt. Sie wurde beidseits komplett und ohne Unterteilung in ihre Anteile vom Ursprung an der Muskulatur bis zum Ansatz am Calcaneus chirurgisch steril entnommen. Danach wurden die drei Anteile der Achillessehne (1. *M. gastrocnemius*, 2. *M. semitendinosus*, *M. biceps femoris* und *M. gracilis*, 3. *M. flexor digitalis (pedis) superficialis*) separiert und weitestgehend von Bindegewebe befreit. Sie wurden zur Desinfektion mit Ethanol 70 % benetzt, das sofort mit steriler Kochsalzlösung wieder abgewaschen wurde. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Präparate in Eis eingebettet und bei - 80 °C gelagert.

Tabelle 5: Sehnen Hund: Alter, Geschlecht, Rasse

Tier	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Rasse
Hund a	8	w	Boxer
Hund b	0,5	m	Rottweiler
Hund c	adult	w	Boxer
Hund d	6	m	Labrador Retriever
Hund e	11	w	Labrador Retriever
Hund f	14	w	Rottweiler-Mischling
Hund g	11	mk	Labrador Retriever
Hund h	12	w	Labrador Retriever
Hund i	10	w	Boxer
Hund j	7,5	m	Boxer
Hund k	6	mk	Berner Sennenhund
Hund l	2	m	Labrador Retriever
Hund m	8	mk	Labrador-Mischling
Hund n	9	mk	Rottweiler
Hund o	9	w	Boxer-Mischling
Hund p	7	wk	Deutsche Dogge
Hund q	6	m	Bouvier des Flanderes
Hund r	12	m	Dobermann

m = männlich, w=weiblich, mk= männlich kastriert, wk= weiblich kastriert

Von drei Pferden (m/w) im Alter von vier bis 22 Jahren wurden oberflächliche und tiefe Beugesehnen für die Studie verwandt. Gewonnen wurden die Sehnen entweder unmittelbar nach der Schlachtung oder bei der Sektion im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Die Sehnen wurden nur dann entnommen, wenn der Tierhalter bzw. der Schlachter schriftlich sein Einverständnis dazu gegeben hatte. Zuvor war der Tierhalter bzw. Schlachter aufgeklärt worden, dass die Sehnen für eine wissenschaftliche Studie genutzt werden (Anhang S. 163). Der Tierkörper wurde der Pathologie zur Entsorgung überlassen bzw. verblieb beim

Schlachter. Es wurden jeweils die oberflächliche (*Tendo m. flexoris digitalis superficialis*) und tiefe (*Tendo m. flexoris digitalis profundus* bestehend aus den *Mm. tibialis caudalis, flexor digitorum lateralis, flexor digitorum medialis*) Beugesehnen der Hinter- als auch die der Vordergliedmaße entnommen. Die Präparate wurden kurzzeitig oberflächlich mit Ethanol desinfiziert und sofort wieder mit steriler Kochsalzlösung abgewaschen. Die Sehnen wurden auf Eis transportiert und bei minus 80 °C gelagert.

Tabelle 6: Sehnen Pferd: Alter, Geschlecht, Rasse

Tier	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Rasse
Pferd a	4	w	Deutsches Reitpony
Pferd b	22	w	Schweres Warmblut
Pferd c	9	m	Percheron

m = männlich, w= weiblich

Von zwei männlichen Schlachtrindern im Alter von zwei Jahren wurden die oberflächliche (*Tendo m. flexoris digitalis superficialis*) und tiefe (*Tendo m. flexoris digitalis profundus*) Beugesehne der Vorder- und Hintergliedmaße unmittelbar nach der Schlachtung für die Studie gewonnen. Der Schlachter wurde über die Nutzung der Sehnen für eine wissenschaftliche Studie aufgeklärt. Wie bei Hund und Pferd wurden die Präparate mit Ethanol besprüht, das sodann mit steriler Kochsalzlösung abgewaschen wurde. Die Sehnen wurden auf Eis transportiert und bei minus 80 °C zwischengelagert.

Tabelle 7: Sehnen Rind: Alter, Geschlecht, Rasse

Tier	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Rasse
Rind a	2	m	Fleischrind x Fleischrind
Rind b	2	m	Fleischrind x Fleischrind

m = männlich

3.1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen wurden von neun Hunden im Alter von 0,5 bis 14 Jahren aus dem Unterhautfettgewebe gewonnen (ASCs). Das Fett wurde in Absprache mit den Tierhaltern bei elektiven orthopädischen Eingriffen oder unmittelbar nach der Euthanasie eines Hundes entnommen. Zuvor war der Tierhalter aufgeklärt worden, dass das Fett für eine wissenschaftliche Studie genutzt wird (Anhang S. 164). Es wurden jeweils fünf Gramm

Fettgewebe steril unter aseptischen Operationsbedingungen gewonnen. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Aufbereitung bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme isoliert.

Tabelle 8: Zellen Hund: Alter, Geschlecht, Rasse

Tier	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Rasse
Hund 1	2	m	Berner Sennenhund
Hund 2	9	m	Labrador Retriever
Hund 3	3	mk	Labrador Retriever
Hund 4	1,5	w	Labrador Retriever
Hund 5	8	wk	Boxer
Hund 6	7	m	Rottweiler
Hund 7	14	mk	Beagle
Hund 8	0,5	w	Mischling
Hund 9	3	m	Englische Bulldogge

m = männlich, w=weiblich, mk= männlich kastriert, wk= weiblich kastriert

3.1.3 Chondrozyten

Es wurden Chondrozyten aus den Kniegelenken von einem Labrador Retriever (m, 9 Jahre) in die Studie gewonnen. Der Hund wurden in einem anderen, nicht mit der Studie in Verbindung stehenden Zusammenhang euthanasiert die Klinik für kleine Haustiere gebracht. Das Tier hatte keine bekannte Problematik des Kniegelenks oder eine systemische Erkrankung. Die Kniegelenke wurden nach Einverständnis und Aufklärung der Tierhalter über die Verwendung für eine wissenschaftliche Studie entnommen (Anhang S. 164). Der Tierkörper wurde der Pathologie zur Entsorgung überlassen.

Die Kniegelenke wurden innerhalb von 24 Stunden nach Eintritt des Todes entnommen. Dazu wurde nach den aseptischen Kautelen gearbeitet und die distale Hintergliedmaße geschoren, gereinigt und desinfiziert. Anschließend wurde die Haut mit dem Skalpell inzidiert und das Kniegelenk freipräpariert. Femur, Tibia und Fibula wurden knapp proximal bzw. distal des Kniegelenks osteotomiert und das Kniegelenk *in toto* entnommen. Es erfolgte zusätzlich eine Desinfektion durch Benetzung mit Ethanol 70 %, das unmittelbar mit steriler Kochsalzlösung wieder abgewaschen wurde. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Aufbereitung bei 4 °C in PBS-getränkten Tüchern.

3.1.4 Verwendete Materialien

Tabelle 9: Verwendete Materialien mit Hersteller und Firmensitz

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Cell strainers 100 µm	BD	Heidelberg, Deutschland
Cell scalpel, No.21, disposable	Fisher Sci	Schwerte, Deutschland
24-well multiwell plate, TC treated	Corning	Corning, NY, USA
NUNC-Platten	NUNC	Wiesbaden, Deutschland
Cell Culture Flask, 175 cm ²	BD	Heidelberg, Deutschland
12-well multiwell plate, clear PS, TC treated	BD	Heidelberg, Deutschland
ELISA Plates 96-well flat bottom	NUNC	Wiesbaden, Deutschland
Spinner flasks	Wheaton, Science Products	Millville, NJ, USA
Sterile Filter (0.22 µm)	Merck Millipore	Billerica, MA, USA
Real-Time PCR 96-well plates	Bio-Rad Laboratories	München, Germany
Eppendorfgefäßen	Fisher Sci	Schwerte, Deutschland

3.1.5 Verwendete Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien mit Hersteller und Firmensitz

Reagenzien	Hersteller	Firmensitz
IST+1 liquid media supplement	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
L-Proline	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
BMP6 growth factor	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
TGF beta3 growth factor	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Immunioselect Mounting Medium DAPI	Dianova	Hamburg, Deutschland
DMEM+Glutamax glucose 1g/dl	Gibco	Waltham, MA, USA
FBS	Biochom	Berlin, Deutschland
Pen/Strep(10,000U/10,000µg)	Invitrogen	Kalifornien, USA
Dexamethasone 25mg	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Insulin solution human	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Trypsin/EDTA, 0.05%/0,02%	Biochrom	Berlin, Deutschland
Alcian Blue	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthine	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
TGF beta 1	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
DMSO	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Collagenase	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland

Trypan Blue Solution, 0.4%,	Thermo Scientific	Karlsruhe, Germany
LPS (<i>E.coli</i> 055:B5)	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
3,3',5,5' tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
H2O2 2N H2SO4	Merck Millipore	Billerica, MA, USA
PBS	Biochrom	Berlin, Deutschland
Amphotercin B	Biochrom	Berlin, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Tri-n-butyl-phosphat (TnBP)	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Thermofisher	Schwerte, Deutschland
TRIS-Puffer	Thermofisher	Schwerte, Deutschland
DNase I	Roche	Basel, Schweiz
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
SDC (Natriumdeoxycholot)	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
phosphatgepufferter Formalaldehydlösung	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Hämatoxylin und Eosin (HE)	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Papain	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Alizarin Red S Pulver	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland

β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Ascorbic-acid-2-phosphat	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Indomethacin	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
ChondrogenesemEDIUM	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd 10%	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Erythrozyten-Lyse-Puffer	eigene Herstellung	10 mM KHCO ₃ ; 0,155 M NH ₄ Cl; 0,1 mM EDTA; H ₂ O, pH 7,5
Flebogamma	DRFZ	Berlin, Deutschland
PBS/BSA/Azid	eigene Herstellung	0,05 % (v/v) NaN ₃ in PBS/BSA
RPMI medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
LPS	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Bovine serum albumin	Sigmaaldrich	Hamburg, Deutschland

3.1.6 Verwendete Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper mit Hersteller und Firmensitz

Antikörper	Hersteller	Firmensitz
CD14	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD29	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD34	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD44	Bio-rad Laboratories, Inc.	Kalifornien, USA
CD45	Bio-rad Laboratories, Inc.	Kalifornien, USA
CD90	Bio-rad Laboratories, Inc.	Kalifornien, USA
CD105	Abcam	Cambridge, UK
MHCII	Bio-rad Laboratories, Inc.	Kalifornien, USA

3.1.7 Verwendete ELISA und KITS

Tabelle 12: Verwendete ELISA und KITS mit Hersteller und Firmensitz

ELISA/ KITS	Hersteller	Firmensitz
quantiPicoGreen® dsDNA-Assay	ThermoFisher	Schwerte, Deutschland
Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay	Biocolor	Carrickfergus, UK
QuickZyme Total Collagen Assay	Quickzyme	CK Leiden, Niederlande
LIVE/DEAD™ Viability/ Cytotoxicity Assay	ThermoFisher	Schwerte, Deutschland
PrestoBlue®-Assay	ThermoFisher	Schwerte, Deutschland
caniner IL-1 ELISA	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
TNFα DuoSet® ELISA	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Leipzig, Deutschland
Sensiscript RT Kit	Qiagen	Leipzig, Deutschland
RNase Free DNase Set	Qiagen	Leipzig, Deutschland
DyNAmo Flash SYBR Green qPCR	ThermoFisher	Schwerte, Deutschland

3.1.8 Verwendete Geräte und Software mit Hersteller und Firmensitz

Tabelle 13: Verwendete Geräte und Software mit Hersteller und Firmensitz

Geräte/ Software	Hersteller	Firmensitz
Mikroskop (Axio Observer Z1)	Carl Zeiss	Oberkochen, Germany
Vakuumkonzentrator	ThermoFisher	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Mikroplattenleser (Mithras LB 940)	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
Spektra Max 340C	Molecular Devices	San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten
MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec	Deutschland
FlowJo	TreeStar	Ashland, US
Nano-Drop Spektrophotometer	ThermoFisher	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Stratagene Mx3000P	ThermoFisher	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

3.2 Methoden

3.2.1 Dezellularisierung caniner, equiner und boviner Sehnen

Die von Bindegewebe befreiten Achillessehnenkomponenten (1. *M. gastrocnemius*, 2. *M. semitendinosus*, *M. biceps femoris* und *M. gracilis*, 3. *M. flexor digitalis (pedis) superficialis*) hatten eine Länge von etwa 4 cm und einen Durchmesser von 0,5 cm. Den Rassen entsprechend wurden die Komponenten ausgewogen und den Gruppen mit den verschiedenen Dezellularisierungsprotokollen randomisiert zugeteilt. Die Sehnen wurden bei - 80 °C gelagert und vor dem Dezellularisierungsprozess für 24 Stunden in destilliertem Wasser bei 4 °C gewaschen. Nach etwa sechs Stunden wurde das destillierte Wasser gewechselt. Danach wurden die Sehnen in fünf Zyklen eingefroren und aufgetaut. Dazu wurden sie in 15ml-Zentrifugenröhrchen abwechselnd zwei Minuten in flüssigem Stickstoff (- 196 °C) tiefgefroren und zehn Minuten bei 37 °C in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) ohne Magnesium, Kalzium und Phenolred aufgetaut.

Nach dem Gefrier-Auftau-Zyklus wurde die Zellmembran der Tenozyten für 24, 48 oder 72 Stunden in 1 %, 2 % oder 3 % (v/v) Triton X-100 oder 1 %, 2 % oder 3 % (v/v) Tri-n-butylphosphat (TnBP) bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Bewegung (40 rpm) aufgelöst. Das Medium wurde erstmals nach acht Stunden gewechselt und danach alle 48 Stunden.

Danach wurden die Sehnen in TRIS-Puffer (pH 7,4) supplementiert mit 100 U ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) dreimal 15 Minuten, und über Nacht gewaschen und 12 Stunden bei 37 °C mit DNase I (350U ml⁻¹) inkubiert.

Abschließend wurden die Sehnen dreimal in TRIS-Puffer supplementiert mit Penicillin und Streptomycin sowie 2,5 mg ml⁻¹ Amphotericin B gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C gelagert.

In Vorversuchen wurden zusätzlich zu Triton und TnBP auch die Standarddetergenzien SDS (Natriumdodecylsulfat) 1 % (w/v) und SDC (Natriumdeoxycholat) 1 % (w/v) getestet.

Histologie und Immunfluoreszenz

Für diese Untersuchungen wurden native und dezellularisierte Sehnen für 24 Stunden in 4%iger phosphatgepufferter Formalaldehydlösung bei 4 °C fixiert. Die fixierten Sehnen wurden paraffinisiert und in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Präparate wurden deparaffinisiert und rehydratisiert. Zur histologischen Untersuchung wurden sie mit Hämatoxylin und Eosin (HE) oder mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000) gefärbt und mikroskopisch am Axio Observer Z1 ausgewertet.

DNA-Gehalt

Für die Quantifizierung der noch enthaltenen DNA wurden die dezellularisierten Proben schockgefroren und mit einem Mörser pulverisiert. Etwa 50 mg des Pulvers wurden in vorher austarierten Eppendorfgefäßen in einem Vakuumkonzentrator für drei Stunden bei 45 °C getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichts wurde Papain in einer Konzentration von 0,125 mg ml⁻¹ hinzugegeben und für 24 Stunden bei 60 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der noch enthaltenen DNA mit dem PicoGreen® dsDNA-Quantifizierungsassay. PicoGreen®-Reagent ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sensitiv an doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet und schon kleinste Mengen (25 bzw. 50 pg ml⁻¹) DNA erkennt. Dadurch wird die Messung im Vergleich zur oft durchgeführten Absorptionsmessung nicht durch Nukleotide und Ribonukleinsäuren (RNA) und andere Kontaminanten beeinflusst. Für die Durchführung wurden 10 µl der DNA enthaltenden Lösung auf ein Finalvolumen von 100 µl mit TE-Puffer verdünnt und anschließend mit dem gleichen Volumen an Quanti-iT™ PicoGreen-Lösung gefärbt. Für den DNA-Standard wurde die 2 µg ml⁻¹ Stammlösung nach Angaben des Herstellers für die High-Range-Kurve vorbereitet. Die Fluoreszenzmessung der Proben und des DNA-Standards wurde bei 480 nm Exzitation und 520 nm Emission im Mikroplattenleser (Mithras LB 940) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der DNA-Standardkurve.

Glykosaminoglykangehalt

Der Glykosaminoglykangehalt (GAG) wurde bei den nativen und den dezellularisierten Sehnenproben mit dem Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay bestimmt. Der Test ist eine quantitative Methode, um über die Bindung des Farbstoffs Dimethylenblau den Gehalt an sulfatierten Proteo- und Glykosaminoglykanen in gelösten Proben zu messen. Dazu wurden etwa 50 mg der pulverisierten Sehnen zunächst im Vakuumkonzentrator getrocknet und dann mit 0,125 mg ml⁻¹ Papainlösung über Nacht bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln verdaut und anschließend bei 10.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Für das Protokoll wurde der Überstand verwendet. Der Glykosaminoglykanstandard und die Proben wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll vorbereitet. Durch das Blyscan Färbungsreagenz werden die Glykosaminoglykan-Färbungskomplexe gebildet und ausgefällt. Nach Zentrifugation (12.000 rpm, 10 Minuten) und Abgießen des Überstandes wird der gebundene Farbstoff durch das Dissoziationsreagenz wieder gelöst und die Absorption von 200 µl der Probe bei 656 nm (Spektra Max 340C) gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der Standardkurve.

Kollagengehalt

Der Kollagengehalt wurde mit dem QuickZyme Total Collagen Assay bestimmt. Dieser basiert auf der Detektion von Hydroxyprolin, das die Tripelhelix von Kollagen stabilisiert. Der Hydroxyprolinrückstand wird hierbei durch eine Modifikation der Methode nach PROCKOP und

UDENFRIEND (1998) bestimmt. Dazu wurden die Proben und der Standard nach Angaben des Herstellers aufbereitet und gefärbt. 50 mg des Sehnenprobenpulvers wurde 20 Stunden bei 95 °C in 6 M Salzsäure hydrolysiert. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben zentrifugiert (13.000 g, 10 Minuten) und auf 4 M HCl verdünnt. Aufgrund des hohen Kollagengehalts waren weitere Verdünnungsschritte notwendig. Dann wurden 35 µl der Proben und des Standards mit jeweils 75 µl Puffer 20 Minuten bei Raumtemperatur durch kontinuierliche Schüttelbewegungen vermischt und anschließend mit dem Nachweisreagenz für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Zum Schluss wurde die Absorption bei 570 nm (Spektra Max 340C) gemessen und die Proben anhand der Standardkurve ausgewertet.

3.2.2 Isolierung caniner adipogener mesenchymaler Stromazellen

Zur Isolierung der mesenchymalen Stromazellen (ASCs) wurde das gewonnene Fettgewebe innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme entsprechend aufbereitet. Zuerst fanden mehrere Waschvorgänge mit DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) mit Kalzium- (CaCl_2) und Magnesiumchlorid (MgCl_2) in der Zentrifuge (350 x g, fünf Minuten) statt. Anschließend wurde Kollagenase ($0,2 \text{ U ml}^{-1}$) hinzugegeben und das die Zellen enthaltende Fettgewebe über 45 Minuten bei 37 °C unter regelmäßigem Schwenken verdaut. Nach dem Inkubieren wurde die Suspension mit PBS (ohne $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$) zehn Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Fettüberstand wurde verworfen und mit dem sich am Boden abgesetzten Zellpellet weitergearbeitet. Dieses wurde mit PBS resuspendiert und die Zellen von Geweberesten durch ein 70 µm großes Zellsieb isoliert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und zentrifugiert (300 x g, fünf Minuten). Zum Schluss wurde das Zellpellet in Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplementiert mit 10 % fötalem bovinen Serum (FBS) und 1 % Pen/Strep ($10.000 \text{ U Penicillin ml}^{-1}$; $10.000 \text{ µg Streptomycin ml}^{-1}$), als Kultivierungsmedium aufgenommen und in T-175-Zellkulturflaschen kultiviert. Nach 24 Stunden und danach alle drei Tage wurde das Medium gewechselt.

Monolayerkultivierung und Passagieren

Die Kultivierung der Zellen wurde von der Isolation bis zur maximal 9. Passage durchgeführt. Es wurde sowohl unter proliferierenden als auch unter differenzierenden Bedingungen kultiviert. Bei Erreichen von etwa 80%iger Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die adhären Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 % in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{+}) gelöst. Nach Zentrifugation (350 g, fünf Minuten) und Lösen des Zellpellets in neuem Medium wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau versetzt und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer mit folgender Formel ermittelt:

Gesamtzellzahl = (ermittelte Zellzahl/4) x 10⁴ x Verdünnungsfaktor

Zur weiteren Kultivierung wurden 3x10⁵ Zellen in eine T-175-Zellkulturflasche gesät und mit etwa 30 ml Nährmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Zellinkubator kultiviert.

Kryokonservierung und Revitalisierung

Zellen der Passagen 1 bis 6 wurden zur längerfristigen Aufbewahrung kryokonserviert. Dazu wurden sie, wie zuvor beschrieben, mit Trypsin-EDTA abgelöst und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Dann wurden die Zellen bei 350 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet im Einfriermedium (DMEM (v/v) mit 20% FBS (v/v) und 10 % Dimethylsulfonamid (DMSO)) resuspendiert. Jeweils 1x10⁶ Zellen ml⁻¹ wurden in Einfrierföhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden in einem Einfriergefäß (mit Isopropanol befüllt und Schaumstoff ausgekleidet), das die Zellen mit etwa 1°C min⁻¹ langsam runterkühlt, bei -80 °C für 48 Stunden gelagert. Danach konnten die Aliquots bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Um beim Auftauen Kristallbildung und somit ein Absterben der Zellen zu vermeiden, muss die Auftaudauer möglichst kurzgehalten werden. Dazu wurde das Nährmedium auf 37 °C vorgewärmt und etwa 10 ml Medium in 15 ml Falconröhrchen für jedes Aliquot vorbereitet. Anschließend wurden die kryokonservierten Zellen im vorgekühlten Einfriergefäß transportiert und unmittelbar warmes Nährmedium wurde zupipettiert. Während es Auftauvorganges wurde immer wieder warmes Medium zupipettiert und aufgetaute Zellsuspension in das 15 ml Falconröhrchen überführt. Danach wurde das Kulturmedium-Einfriermedium-Zellgemisch fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert, um das restliche Einfriermedium zu eliminieren. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen, wie bereits beschrieben, in T-175-Zellkulturflasche kultiviert. Nach 24 Stunden fand der erste Mediumwechsel statt, um tote Zellen zu entfernen. Danach wurde das Medium alle drei Tage gewechselt.

3.2.3 Differenzierung caniner adipogener mesenchymaler Stromazellen

Osteogenese

Zur osteogenen Differenzierung der ASCs wurde dem Nährmedium β -Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbic-acid-2-phosphat als Stimulus für die Knochenbildung zugesetzt. Die Osteogenese verläuft in drei Phasen: Proliferation, Matrixmaturation und Mineralisation. Es wurden 1,2 x 10⁵ Zellen der 3. Passage/well in dreifachem Ansatz und einer Kontrollgruppe über einen Zeitraum von 10, 15, 20 und 25 Tagen in einer 24-Well-Platte angezüchtet. Sie wurden unter oben beschriebenen Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Der erste

Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden und anschließend alle drei Tage. Bei Erreichen der Konfluenz wurde nach zweifachem Waschen der Zellen mit PBS zur Induktion der Differenzierung Osteogenesemedium (exklusive der Kontrollgruppe) hinzugeben. Dieses bestand aus mit β -Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbic-acid-2-phosphat supplementiertem Wachstumsmedium. Der Mediumwechsel erfolgte zunächst nach 24 Stunden und dann alle drei Tage. Nach Ablauf des entsprechenden Zeitraums wurden die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und danach mit 70%igem Ethanol für eine Stunde bei 4 °C fixiert. Anschließend erfolgte erneut ein zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser und dann die Zugabe von Alizarin Red (200 mg Alizarin Red S Pulver (in 40 ml Aqua dest. gelöst, pH 4,0-4,3)) für 10 Minuten. Nach abschließendem fünfmaligem Auswaschen des überständigen Alizarin Reds mit destilliertem Wasser wurden zur Auswertung Fotos angefertigt. Zur Quantifizierung des gebildeten Kalziumoxalats wurde das gebundene Alizarin Red mit 10%igem Cetylpyridiniumchlorid über 15 Minuten gelöst und jeweils 100 μ l in eine 96-Well-Platte transferiert. Die Auswertung erfolgte mittels Absorptionsspektroskopie bei 562 nm.

Adipogenese

Für die Adipogenese wurden ASCs der 3. Passage jedes Tieres in einer Dichte von 8×10^4 Zellen/well in einer 12-Well-Platte in dreifachem Ansatz und einer Kontrollgruppe ausgesät und zunächst mit normalem Wachstumsmedium kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden, anschließend alle drei Tage. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte nach zweimaliger Waschung der Zellen mit PBS die Induktion mittels Adipogenesemedium (Wachstumsmedium supplementiert mit 1 μ M Dexamethason, 10 μ g ml^{-1} Insulin, 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin und 0,2 mM Indomethacin) über 21 Tage mit Mediumwechseln nach 24 Stunden und dann alle drei Tage. Bei den Mediumwechseln erfolgten regelmäßige mikroskopische Kontrollen der Zellpopulation. Nach 21 Tagen wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und dann mit 10 % Formaldehydlösung über 10 Minuten fixiert. Es folgte eine Waschung mit 60%igem Isopropanol. Nachdem die Zellen vollständig getrocknet waren, wurden sie für zehn Minuten mit Oil Red O Arbeitslösung gefärbt. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 2 g Oil Red O in 200 ml 100%igem Isopropanol gelöst und nach 48 Stunden bei 4 °C filtriert. Sechs Teile dieser Stammlösung wurden mit vier Teilen destilliertem Wasser gemischt und nach 20 Minuten erneut filtriert. Diese Arbeitslösung wurde für zehn Minuten den Proben zugegeben. Nach Auswaschung des Überstandes unter fließendem Leitungswasser wurden die Ergebnisse mikroskopisch ausgewertet und dokumentiert.

Chondrogenese

Es wurden ASCs der 3. Passage nach Kultivierung durch Trypsin-EDTA gelöst und das Trypsin anschließend mit 10 ml Kulturmedium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei 15ml-Falconröhrchen aufgeteilt und für fünf Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand von beiden Röhrchen entfernt und das am Boden entstandene Zellpellet in Chondrogenesemedium (Chondrogenic Differentiation Medium) bzw. in normalem Wachstumsmedium gelöst. Um erneut ein Pellet zu erzeugen, wurden die Zellsuspensionen 10 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in den Röhrchen unter Standardbedingungen kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte erstmals nach 24 Stunden, dann alle drei Tage behutsam, um das Pellet nicht zu zerstören. Nach 21 Tagen wurden sowohl die Kontrollpellets als auch die induzierten Pellets zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und dann mit 4 % Formaldehydlösung bei 4 °C über zwei Stunden fixiert. Die fixierten Pellets wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann der alkoholischen Entwässerungsreihe zur Paraffineinbettung zugeführt. Nach Anfertigen und Schneiden der 5 µm dicken histologischen Schnitte folgte die Färbung mit Alcian Blue (Sigma Aldrich).

Parallel zu der dreidimensionalen Kultivierung und Differenzierung wurden 1×10^4 Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz mit Chondrogenesemedium zur Umwandlung in Knorpelzellen stimuliert. Gleichzeitig wurde eine Kontrollgruppe mit normalem Wachstumsmedium mitgeführt. Der Mediumwechsel folgte zunächst nach 24 Stunden, dann alle drei Tage. Nach 21 Tagen wurde die Differenzierung nach Waschen mit PBS gestoppt und die Zellen mit Paraformaldehyd 10 % über 20 Minuten fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit destilliertem Wasser und anschließend die Färbung mit Alcian Blue (1 % Alcian Blue 8GX in 3 % Essigsäure; pH 2,5) über 30 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen erst mit 3%iger Essigsäure und dann zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zum Schluss wurde der Überstand erneut dekantiert und je Well 100 µl PBS zugegeben. Die Auswertungen erfolgten mikroskopisch.

3.2.4 Charakterisierung caniner adipogener mesenchymaler Stromazellen

Immunhistochemie und Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der isolierten ASCs wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen spezifischer Oberflächenmarker untersucht. Die ‚International Society for Cellular Therapy‘ hat Richtlinien für negative und positive MSC-Marker humaner Stammzellen herausgegeben (DOMINICI et al., 2006). Beim Hund gibt es zum Teil divergierende Angaben zum Vorhandensein und Fehlen spezifischer Marker. Größter Konsens herrscht darüber, dass canine MSCs CD29, CD44, CD105, und CD90 positiv (ZUK et al., 2002; TSAI et al., 2004; IWATA et al., 2010; ORCIANI et al., 2010; VIEIRA et al., 2010) sowie CD14, CD34 und CD45 negativ

sind (DOMINICI et al., 2006; JUNG et al., 2009; MOUSAVI NIRI et al., 2009; WONGCHUENSOONTORN et al., 2009). Deshalb wurde ein Panel aus diesen Markern und deren Isotypen zusammengestellt sowie als Kontrollgruppe PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus Vollblut gewonnen.

Vorbereitend wurden ASCs jeden Hundes der 3. und 4. Passage in T-175-Zellkulturflaschen bis zur 80%igen Konfluenz kultiviert. Die ASCs wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA über fünf Minuten im Inkubator (37 °C) gelöst. Das Trypsin wurde mit Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in PBS gelöst und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Parallel wurde am Tag der Durchführung der FACS-Analyse EDTA-Blut von einem gesunden Labrador Retriever im Rahmen einer routinemäßigen Blutabnahme gewonnen. Das Blut wurde bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb weniger Stunden für die Untersuchung aufbereitet. Zur Isolierung der PBMCs wurde ein Anteil Vollblut mit vier Anteilen Erythrozyten-Lyse-Puffer (10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄Cl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) sechs Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde bei 4 °C für zehn Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den enthaltenden PBMCs erneut in 5 ml Lysepuffer aufgelöst, sechs Minuten auf Eis inkubiert und mit 45 ml PBS/BSA (PBS + 10% bovines Serumalbumin; w/v) abgestoppt. Das Rinderserumalbumin dient als Blockierungsmittel und reduziert die Hintergrundinterferenz beim FACS. Nach erneuter Waschung bei 4 °C für zehn Minuten bei 300 g und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in PBS/BSA resuspendiert und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Um unspezifische Fc-vermittelte Interaktionen der Antikörper zu vermeiden, wurde das Zellgemisch zum Blockieren des Fc-Teils der PBMCs mit Flebogamma abgesättigt.

Es wurden jeweils 10⁶ ACSs und PBMCs in 100 µl PBS in eine 96-Well-Platte (round bottom) für die spätere Messung am MACSQuant Analyzer überführt. Anschließend wurde ausschließlich lichtgeschützt gearbeitet und die Antikörper in den in Vorversuchen austitrierten Verdünnungen wurden zugeben und zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Für die Färbung der extrazellulären Epitope wurden die folgenden an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelte monoklonale Antikörper und deren Isotypen verwendet.

Tabelle 14: Verwendete Antikörper, deren Klone und Isotypen, die verwendet wurden inklusive optimaler Konzentration, konjugiertem Fluorochrom und Hersteller

Epitop	Klon	Isotyp	Konzentration	Fluorochrom	Hersteller
CD14	M5E2	Mouse IgG2a, Kappa	1:20	PE*	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD29	MAR4	Mouse BALB/c IgG1, Kappa	1:20	PE*	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD34	1H6	Mouse BALB/c IgG1, Kappa	1:200	PE*	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD44	YKIX337.8.7	IgG2a	1:200	Alexa Fluor® 488	Bio-rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
CD45	YKIX716.13	Rat igG2b	1:50	APC**	Bio-rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
CD90	YKIX337.217	Rat IgG2b	1:100	APC**	Bio-rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
CD105	OT18A1	IgG2b	1:5	FITC***	Abcam, Cambridge, UK
MHCII	YKIX334.2	Rat IgG2a	1:20	FITC***	Bio-rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA

*PE = R-phycoerythrin; **APC = Allophycocyanin; ***FITC = Fluorescein isothiocyanate

Tabelle 15: Exzitations- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Exzitation (max)	Emission (max)
Alexa 488	495 nm	519 nm
APC	650 nm	660 nm
FITC	494 nm	520 nm
PE	496 nm	578 nm

PE = R-phycoerythrin; APC = Allophycocyanin; FITC = Fluorescein isothiocyanate

Die 96-Well-Platte wurde anschließend zweimal bei 300 x g für drei Minuten zentrifugiert, der Überstand invertiert und die Zellen in 100 µl PBS/BSA/Azid resuspendiert. Dann wurde die Messung mittels Durchflusszytometrie im MACSQuant Analyzer durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo. Für die Durchflusszytometrie wurden mindestens 1×10^5 ASCs jeden Hundes und die PBMCs eingelesen. Bei der Auswertung wurde ein Gate um den Dichteplot gelegt und der Debris ausgeschlossen. Bei den PBMCs wurden für den CD14-Marker die Monozyten und für den CD45-Marker die Lymphozyten als Subpopulation ausgewählt. Die so gegateten Zellen wurden auf ihre Fluoreszenzintensität im entsprechenden Fluoreszenzkanal (Alexa, APC, FITC, PE) analysiert.

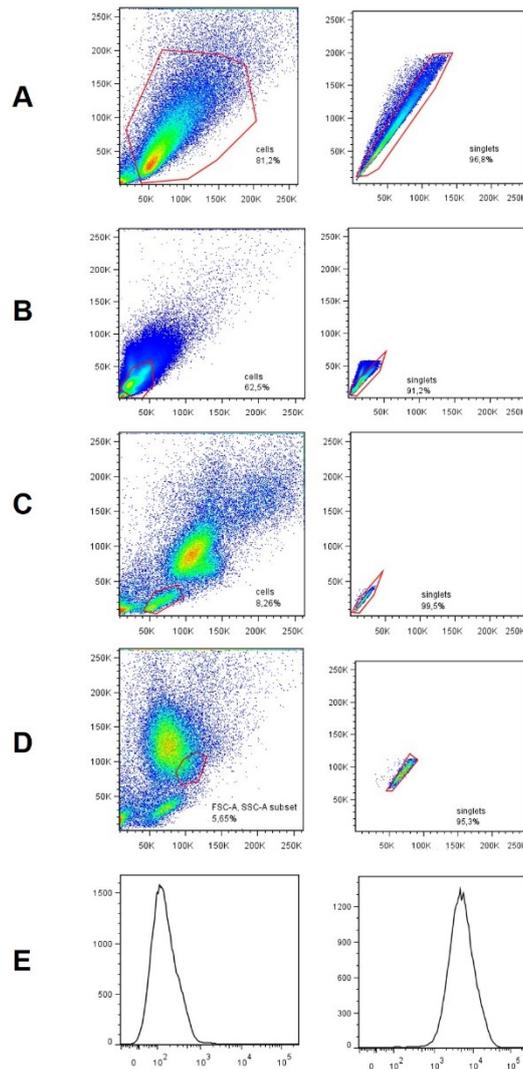


Abbildung 2: Flow Cytometrie. Gatingstrategie A) von den Positivmarkern CD29, CD44, CD90, CD105 auf ASCs B) von CD45 auf Blut C) von MHC II auf Blut D) von CD14 auf Blut E) ein Beispielergebnis eines Positivmarkers (Antikörper und Isotyp)

3.2.5 Rezellularisierung caniner und equiner Sehnen mit ASCs

Die Sehnen wurden über Nacht in PBS mit 100 Units ml⁻¹ Penicillin, 100 µl ml⁻¹ Streptomycin und 0,25 µl ml⁻¹ Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X) bei 4 °C und kontinuierlichen Rollbewegungen und einem Mediumwechsel nach vier Stunden aufgetaut. Dann wurde das PBS für zwölf Stunden durch ein Kulturmedium (DMEM, supplementiert mit FBS, Gibco™ Antibiotic-Antimycotic) ersetzt. Anschließend wurden die Sehnen während der Aufbereitung der ASCs auf einer sterilen Kompresse gelagert, um überschüssige Flüssigkeit zu entziehen. Die ASCs, die in T-175-Zellkulturflaschen im Inkubator angezüchtet wurden, wurden über vier Minuten mit 3 ml Trypsin-EDTA im Inkubator abgelöst, das Trypsin mit 10 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen, die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Danach wurde die Zellen erneut abzentrifugiert (350 x g, fünf Minuten) und das Zellpellet hochkonzentriert so in neuem Medium gelöst, dass anschließend 1×10^5 Zellen pro cm^2 Sehne aufgebracht werden konnten. Dazu wurde die Sehne in eine sterile Petrischale gelegt und jeweils 20 μl pro $0,5 \text{ cm}^2$ injiziert. Anschließend wurde die Sehne oberflächlich mit 150 μl Zellsuspension bedeckt und für 1,5 Stunden inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen zu ermöglichen. Die Sehne wurde gewendet und auf der anderen Seite gleich verfahren. Nach erneuten 1,5 Stunden Inkubation wurden 20 ml Kulturmedium zugegeben und die Sehnen im Inkubator unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel, dann alle drei Tage. Der Rezellularisierungserfolg sowie die Sehnenstruktur wurden histologisch nach 24 Stunden, 7 und 20 Tagen untersucht. Die rezellularisierten Sehnen wurden für 24 Stunden in 4%iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fixiert. Die fixierten Sehnen wurden entwässert, paraffinisiert und in $5 \mu\text{m}$ Schnitte geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte deparaffinisiert, rehydratisiert und HE- und DAPI-Färbungen durchgeführt.

3.2.6 Untersuchung der Biokompatibilität caniner und equiner Sehnen

Zur Evaluation der Biokompatibilität erfolgte *in vitro* eine Besiedlung und Kultivierung der dezellularisierten Sehnen mit mesenchymalen Stromazellen. Es wurden histologische und immunhistochemische Untersuchungen vorgenommen. Außerdem wurden Viabilitätstests gemacht, um die Toxizität der eingesetzten Substanzen auf die Vitalität der Zellkulturen zu bestimmen.

1. PrestoBlue®-Assay: PrestoBlue® ist eine membrangängige Resazurin-basierte Lösung (Redoxfarbstoff), die infolge der Reduktionskraft lebender Zellen (Atmungskette) in einen fluoreszierenden Farbstoff (Resorufin) umgesetzt wird. Sterbende Zellen verlieren diese metabolische Aktivität. Der Nachweis kann durch Fluoreszenz- und Absorptionsmessung erfolgen und das gemessene Signal ist proportional zur Vitalität der Zellen, so dass der Test zur quantitativen Messung der Zellproliferation verwendet werden kann. Vorteil von PrestoBlue® ist die Schnelligkeit des Farbumschlages auch bei geringer Zellzahl und die Möglichkeit der Anwendung als Lebendzell-Assay.

Dieser Test wurde angewandt, um einen potenziell zytotoxischen Effekt der Detergenzien des Dezellularisierungsprozesses auszuschließen. Dazu wurden in jedes Well ein etwa $0,2 \text{ cm}^3$ großes Stück Sehne gelegt und anschließend 5×10^3 Zellen/well aufgebracht. Die Kontrollwells wurden lediglich mit Zellen, nicht aber mit Sehnen bestückt.

Der PrestoBlue®-Assay erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach ein und drei Tagen wurde PrestoBlue® in einer 1:10-Verdünnung zum Kulturmedium hinzugegeben. Die Fluoreszenz (535 nm Extension, 610 nm Emission) wurde nach 10 Minuten, 30 Minuten, 1 und 2 Stunden mit einem Mikroplattenleser (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland; Spektra Max 340C) gemessen.

2. LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Assay: Das LIVE/DEAD™-Kit basiert auf den beiden fluoreszierenden Farbstoffen Calcein-AM und Ethidium-Homodimer-1 und dient zur Bestimmung der Viabilität einer Zellpopulation. Lebende Zellen haben eine intrazelluläre Esterase-Aktivität, die durch das grün fluoreszierende Calcein-AM nachgewiesen wird, während bei toten Zellen der Verlust der Integrität der Plasmamembran durch das rot fluoreszierende Ethidium-Homodimer-1 aufgezeigt wird. Die Auswertung kann mit der Fluoreszenzmikroskopie oder Absorptionsmessung durchgeführt werden. Vorteilhaft ist die hohe Sensitivität.

Für den LIVE/DEAD™-Assay wurden die dezellularisierten Sehnen rezellularisiert. Zur Repopulation wurden 1×10^5 ASCs pro cm^2 auf die Sehne gesät und bei 37°C , 5 % CO_2 inkubiert. Nach 1,5 Stunden Anheftungszeit wurde Kulturmedium hinzugegeben. Das Medium wurde nach 24 Stunden, und dann alle drei Tage gewechselt.

Dieser Test wurde angewandt, um die Zellviabilität der caninen ASCs, mit denen die Sehnen wiederbesiedelt wurden, zu überprüfen. Er wurde nach Anweisungen des Herstellers vorgenommen. Nach ein-, drei-, sieben- und 21-tägiger Wiederbesiedlungsdauer wurden die rezellularisierten und als Kontrollgruppen auch dezellularisierten Sehnen nach Waschung mit Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mikroskopisch analysiert.

3.2.7 Untersuchung der Immunogenität caniner, equiner und boviner Sehnen im Vollblutassay

Zur Evaluierung der potenziellen Immunogenität der dezellularisierten Sehnen wurde ein Vollblutassay durchgeführt. Dazu wurde Vollblut (EDTA) von verschiedenen Hunderassen im Rahmen von Routineblutabnahmen gewonnen und bei Raumtemperatur gelagert. Währenddessen wurden dezellularisierte Sehnen so vorbereitet, dass immer eine vergleichbar große Fläche mit dem Blut exponiert werden konnte. Plastik-Pasteurpipetten (Vehikel) wurden auf eine Länge von 50 mm zugeschnitten und das Sehnenmaterial hineintransferiert. Der Durchmesser betrug 3,5 mm und die Gesamtfläche der Exposition $19,24 \text{ mm}^2$. Die Sehnen wurden mehrfach mit PBS gewaschen, abgetupft und dann für den Assay verwendet.

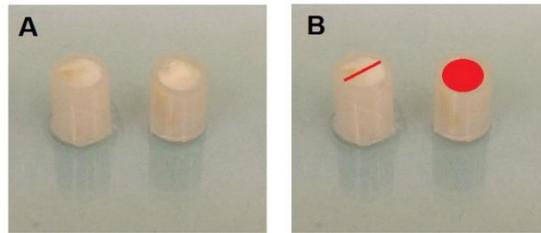


Abbildung 3: Methode zur Generierung vergleichbarer Flächen an Sehnenmaterial für den Vollblut-Assay mit Hilfe von Plastik-Pasteurpipetten (A). Der Durchmesser und die Fläche (Ober- und Unterseite) konnten damit standardisiert werden (B).

Der Vollblutassay wurde in einer 96-Well-Platte (round-bottom) durchgeführt. Sowohl Negativkontrollen (nur Blut mit RPMI) als auch Positivkontrollen (Blut mit RPMI und LPS) wurden mitgeführt. Für die Durchführung des Assays wurden 75 µl Vollblut in die entsprechenden Wells und die Sehnen hinzugegeben. Dann wurden 75 µl RPMI hinzugegeben (Positivkontrolle: vorher mit LPS angesetzt; ohne Sehne) und die Platte für 24 Stunden im Inkubator (37 °C) inkubiert. Danach folgte die Zentrifugation mit 1500 rpm für drei Minuten, die Überstände wurden abpipettiert und bei - 20 °C gelagert. Die anschließende Analyse der gewonnenen Überstände erfolgte mittels caninem IL-1 ELISA in Doppelbestimmungen.

ELISA

Zum Nachweis wurde für die beiden Zytokine IL-1 ein Sandwich-ELISA ohne Sekundärantikörper verwendet. Dabei bindet ein an der Platte gebundener Fängerantikörper das zu detektierende Antigen und wird anschließend wiederum über einen Detektions-Antikörper gebunden.

Der ELISA (Canine IL-1 β/IL-1F2 DuoSet ELISA) wurden nach Herstellerangaben in doppeltem Ansatz vorgenommen. Es wurde eine 7-Stufen Standardverdünnungsreihe mit zweifacher Serienverdünnung angefertigt. 96-Well-Platten mit flachem Boden wurden mit 100 µl in PBS gelöstem Capture-Antikörper (Fängerantikörper) über Nacht bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0.05 % (v/v) Tween® 20 in PBS) wurden die Platten mit 300 µl Reagenz (1 % (w/v) BSA in PBS, pH 7.2-7.4) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und anschließend erneut gewaschen. Die Standards wurden zusammen mit den Proben für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden 100 µl des Detektions-Antikörpers mit normalem Serum in PBS für eine Stunde angewendet. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit 100 µl Streptavidin-HRP (Enzym Meerrettich-Peroxidase), da die verwendeten Antikörper an Biotin gebunden waren, das selbst keinen Farbumschlag verursacht. Deshalb wurde nach Bindung an Streptavidin-HRP 100 µl eine Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB)) zugesetzt und dadurch eine

Farbreaktion nach 20-minütiger Inkubation sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten mit 50 µl 2N H₂SO₄ (Schwefelsäure) gestoppt und die Platte bei 450 nm und 540 nm (zur Wellenlängenkorrektur) ausgelesen.

3.2.8 Co-Kultivierung von caninen Chondrozyten und ASCs

Isolation caniner Chondrozyten

Der Knorpel wurde mit einem Skalpell vom Knochen geschält, in PBS aufgenommen, mehrfach gewaschen und in 2 mm große Stücke geschnitten. Die Knorpelstücke wurden mit DMEM, 1 % Pen/Strep und 4 mg ml⁻¹ Collagenase für 24 Stunden im Inkubator bei 37 °C verdaut. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in DMEM, 10 % FCS und 1 % Pen/Strep aufgenommen und in T-175-Flaschen ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte wöchentlich und die Passagierung bei einer Konfluenz von 90 %. In Passage 3 wurden Zellen kryokonserviert. Chondrozyten wurden bis Passage 5 verwendet.

Titration der Zellzahlen und der Stimulation mit IL-1β und TNFα

In einem ersten Schritt wurde die Zellzahl sowohl für die Chondrozyten als auch die ASCs in einer 24-Well-Platte titriert und mittels Konfluenzbestimmung am Lichtmikroskop nach 24 Stunden beurteilt. Dabei wurden folgende Zellkonzentrationen als optimal bewertet: 0,25 x 10⁵ ASCs/well und 0,5 x 10⁵ Chondrozyten/well. In einem nächsten Schritt wurden verschiedene Konzentrationen an rekombinantem caninen IL-1β und TNFα zu den Einzelkulturen gegeben und der Überstand nach 24, 48 und 72 Stunden mittels IL-6 ELISA (Protokoll siehe 3.2.7) analysiert.

Co-Kultivierung

Um den Effekt der ASCs auf stimulierte Chondrozyten zu evaluieren, wurden zwei verschiedene Ansätze in Vorversuchen getestet. Im ersten Ansatz wurden 0,25 x 10⁵ ASCs pro 24-Well ausgesät und über 24 Stunden kultiviert. Parallel wurden 0,5 x 10⁵ Chondrozyten pro 24-Well ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Transfer des Mediums der ASCs auf die Chondrozyten und eine Stimulation mit 10 ng ml⁻¹ IL-1β und 5 ng ml⁻¹ TNFα für 24 Stunden. Es wurden jeweils unstimulierte und stimulierte Kontrollen mitgeführt. Im nächsten Versuch wurden Chondrozyten in 24-Wells ausgesät und ASCs in Hanging inserts. Nach 24 Stunden wurden die Hanging inserts in die mit Chondrozyten besiedelten 24-Well-Platten überführt und mit 10 ng ml⁻¹ IL-1β und 5 ng ml⁻¹ TNFα für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Chondrozyten abgelöst und für die spätere RNA-Analyse gelagert.

RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Für die RNA-Isolation wurde das Rneasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden nach der Kultivierung nach Herstellerangaben mit Trypsin/EDTA eluiert, mit PBS gewaschen und in RLT-Puffer (supplementiert mit 1 % β -Mercaptoethanol) bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der RLT-Puffer enthält Guanidin Isothiocyanat in hoher Konzentration, wodurch eine Bindung der RNA an die Silicamembran unterstützt wird. Vor Verwendung wurde dem Puffer β -Mercaptoethanol zugesetzt, um eine effektive Inaktivierung der RNasen zu gewährleisten. Anschließend wurde das Lysat zur schnellen Homogenisierung auf die QIA-Shredder-Säule gegeben und zentrifugiert. Es wurde 70%iges Ethanol ergänzt und die Suspension bis zum Verschwinden der Schlieren vermischt. Dann wurde die Probe auf die Rneasy Mini-Säulen pipettiert und zentrifugiert. Es folgen mehrere Waschschrte mit verschiedenen Puffern (RW1-, RPE-Puffer) und zum Schluss die Elution der RNA mithilfe von Wasser. Die DNA-Kontamination wurde durch einen weiteren Digestionsschritt entfernt. Nach Beendigung der Isolation wurde die RNA-Konzentration mit dem Nano-Drop-Spektrophotometer gemessen und bei - 80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Da die gewonnene RNA nicht als Vorlage für die PCR verwendet werden kann, muss sie durch die reverse Transkriptase in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit dem Sensiscript RT Kit nach der Anleitung des Herstellers. Für die anschließende Umschreibung zu cDNA wurde das Sensiscript-Kit verwendet. Die Analyse der qRT-PCR erfolgte mittels DyNAmo Flash SYBR Green qPCR.

Die mRNA-Expression wurde mit dem DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit am Stratagene Mx3000P entsprechend des Standardprotokolls analysiert. SybrGreen lagert sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA an. Die initiale Denaturierung erfolgte über sieben Minuten bei 95 °C. Es folgten fünf Denaturierungszyklen über jeweils fünf Sekunden bei 95 °C und das Primer-Annealing (Ankopplung zweier synthetischer Oligonukleotide) für sieben Sekunden bei 60 °C. Danach fand die Elongation für neun Sekunden bei 72 °C statt. Die Temperatur wurde schrittweise alle 30 Sekunden von 50 °C auf 98 °C (Schmelzkurve) erhöht. Die Primer wurden von TIB Molbio gekauft und vor der Anwendung umfangreich getestet und etabliert – inklusive Gelkontrolle und Sequenzierung.

Die Daten wurden mittels Δ Ct-Methode zum Referenz-Gen *EF1A* normalisiert.

Tabelle 16: Oligonukleotidprimersequenzen, die für die qRT-PCR verwendet wurden

Gen	Vorwärts	Rückwärts
<i>IL-6</i>	GGCTACTGCTTTCCCTACCC	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT
<i>MMP3</i>	CATTTATGGAGATGCCCACT	GTCAGCCGAGTGAAAGAGAC
<i>MMP13</i>	TTGGTCAGATGTGACACCTC	ATCGGGAAGCATAAAGTGGC
<i>TIMP</i>	GGACGGACACTTGCAGATCA	TGCAGGGGATGGATGAACAG
<i>EF1A</i>	GTTGATATGGTTCCTGGCAAAC	TTGCCAGCTCCAGCTGCCT

IL-6 = Interleukin-6; MMP3 = Matrixmetalloprotease-3; TIMP = Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; EF1A = Elongation factor 1-alpha

3.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad-Prism-V.7-Software durchgeführt. Aufgrund der kleinen Fallzahl wurden nichtparametrische Tests verwendet. Die Daten wurden bei unabhängigen Ergebnissen mit dem Mann-Whitney-U-Test und bei abhängigen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert. Es wird ein Signifikanzniveau von 0.05 ($\alpha = 5\%$) angesetzt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Chance, ein signifikantes Ergebnis zu erreichen, steigt bei gleichem Unterschied mit zunehmendem Stichprobenumfang. In einigen Fällen wurden auch statistische Trends angezeigt, wenn sie eine entsprechende Relevanz hatten.

4. Ergebnisse

4.1 Optimierung der Dezellularisierung von caninen und equinen Sehnen

4.1.1 Dezellularisierte Sehnen sind histologisch frei von Zellen

Zu Beginn der Untersuchungen wurden zwei verschiedene gängige Protokolle TnBP vs. Triton X-100 zur Dezellularisierung von Sehnen getestet.

Sowohl in der HE- als auch in der DAPI-Färbung konnte histologisch eine deutliche Reduktion der zellulären Bestandteile der dezellularisierten Sehne (TnBP/ Triton X-100) im Vergleich zur nativen Sehne nachgewiesen werden. Auch die in Vorversuchen durchgeführte Dezellularisierung mit SDS und SDC war effektiv, führte jedoch zu massiven strukturellen Veränderung des Sehnenmaterials. In Abbildung 6 sind repräsentative histologische Aufnahmen caniner Sehnen nach 24-stündiger Dezellularisierung mit Triton X-100 (1%) und TnBP (1%) dargestellt. Lediglich im Peritendineum konnte vereinzelt Zelldebris nachgewiesen werden. Die makroskopische (Abb. 4, 5) und mikroskopische Struktur (Abb. 6) der Sehnen war erhalten. Sowohl die Sehnenenden als auch die Sehnenränder ließen keine Schädigung des kollagenen Gerüsts erkennen. Ein geringer artifizieller struktureller Verlust der Kollagenbündel erfolgte beim Schneiden der dünnen Paraffinschnitte, da es sich um sehr kompaktes Gewebe handelt. Diese Veränderung war jedoch bei den nativen und den dezellularisierten Sehnen zu befunden. Es zeigte sich, dass eine längere als 24-stündige Dezellularisierung sowohl mit Triton X-100 als auch mit TnBP zu keinem besseren Dezellularisierungserfolg führte, jedoch die Struktur der Sehnen mehr beeinflusste. Denselben Effekt hatte eine Erhöhung der Konzentration des Detergenz. Deshalb wurde anschließend nur mit Sehnen, die über 24 Stunden mit 1%igem Triton X-100 oder 1%igem TnBP behandelt wurden, weitergearbeitet. Zwischen diesen Sehnen gab es nach dem Dezellularisierungsprozess keinen signifikanten Unterschied.



Abbildung 4: Repräsentative makroskopische Aufsicht und Querschnitt einer dezellularisierten caninen Sehne

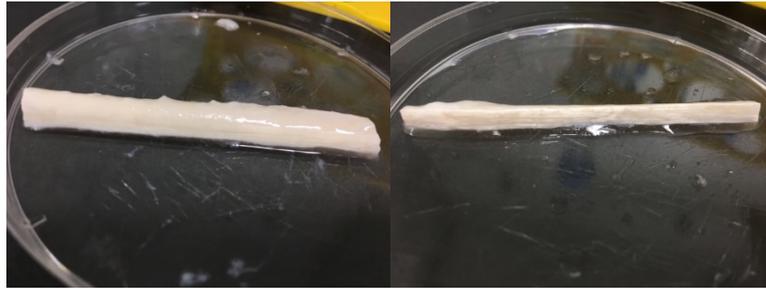


Abbildung 5: Repräsentative makroskopische Aufsicht auf eine mit Triton X-100 dezellularisierte canine (links) bzw. equine (rechts) Sehne

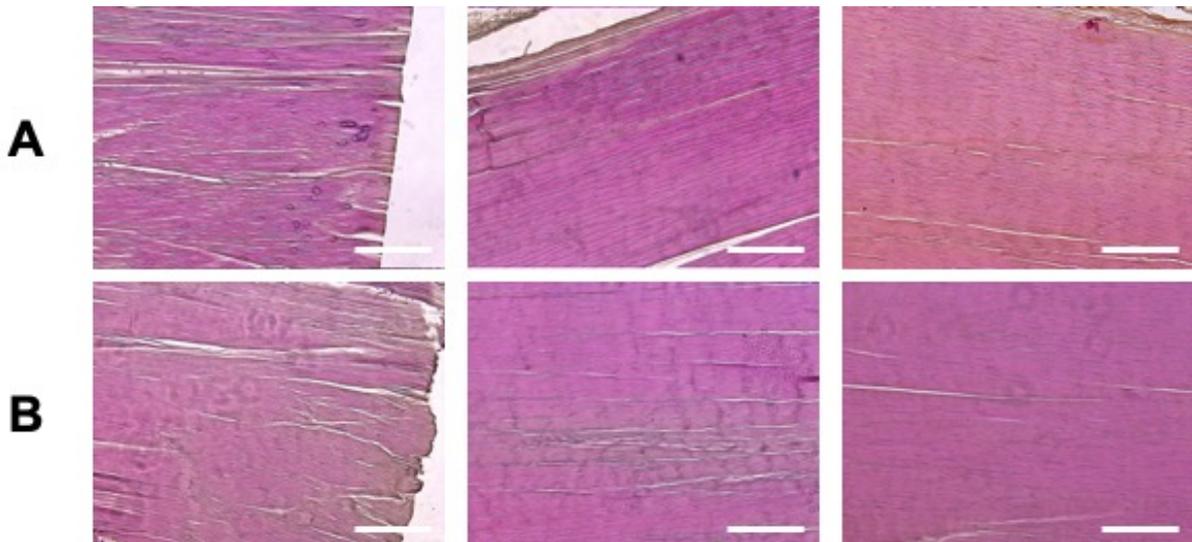


Abbildung 6: Repräsentative histologische mit HE gefärbte Schnitte (5 µm Dicke; Längsschnitt) caniner Sehnen, die mit (A) Triton X-100 (1%) und (B) TnBP (1%) dezellularisiert wurden; Maßstabsleiste = 500µm

4.1.2 Dezellularisierte Sehnen weisen nur einen geringen DNA-Gehalt auf

In Vorversuchen wurden mit einer kleinen Anzahl an caninen Achillessehnen (n=2 in doppeltem Ansatz) verschiedene Konzentrationen von Triton X-100 und TnBP über unterschiedliche Zeiträume getestet (Abb. 7). Da weder eine Verlängerung der chemischen Dezellularisierung noch eine Erhöhung der Konzentration von TnBP und Triton X-100 den DNA-Gehalt weiter reduzierte, wurde anschließend nur noch mit 1%igen Konzentrationen über 24 Stunden gearbeitet. Der DNA-Gehalt konnte durch beide Dezellularisierungsprotokolle signifikant reduziert (jeweils $p < 0.001$) werden, ohne dass es zwischen den Protokollen einen signifikanten Unterschied gab ($p = 0,432$) (Abb. 8, 9). In Vorversuchen zeigte sich, dass die Verwendung von DNase bei der quantitativen Bestimmung des DNA-Gehaltes im Vergleich zur histologischen Beurteilung einen wichtigen Aspekt darstellte ($p < 0.001$) (Abb. 10).

Anschließend wurde die Gleichmäßigkeit der Dezellularisierung kontrolliert. Dazu wurde jeweils der DNA-Gehalt in Enden und Mittelstücken der dezellularisierten Sehnen (n=4) bestimmt. Es konnte weder bei den caninen noch bei den equinen Sehnen ein großer Unterschied gefunden werden (Abb. 8, 9). Die Untersuchung der Pferdesehnen kann aufgrund der kleinen Probenzahl (n=2) nur einen Trend zeigen.

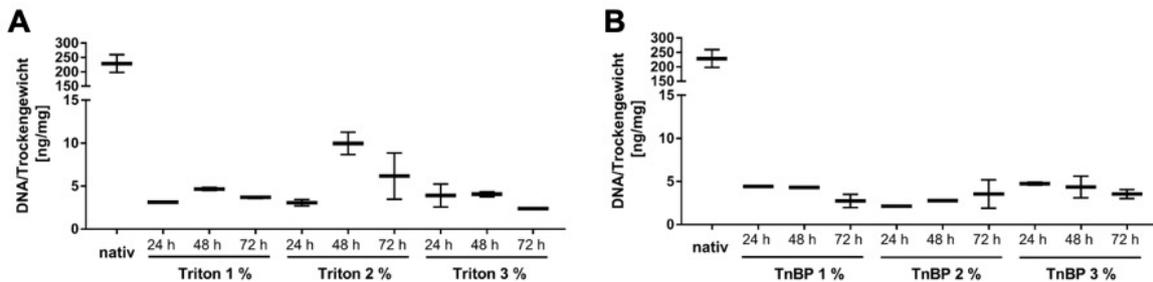


Abbildung 7: DNA-Gehalt caniner Sehnen nach Dezellularisierung über 24, 48 und 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von (A) Triton X-100 und (B) TnBP. Dargestellt als Boxplot Min-Max. Aufgrund der geringen Probenzahl (n=2) ohne statistische Auswertung.

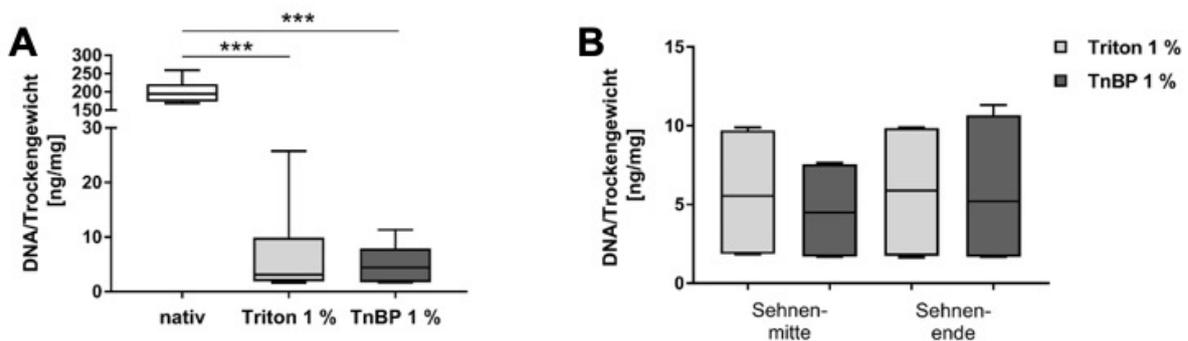


Abbildung 8: DNA-Gehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten caninen Sehnen. (A) im Vergleich zur nativen Sehne. Sternchen (*) zeigen eine hohe Signifikanz; *** $p < 0.001$ berechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test. (B) vergleichender DNA-Gehalt in der Mitte und am Ende der Sehne nach Dezellularisierung. Jeweils dargestellt als Boxplot Min-Max.

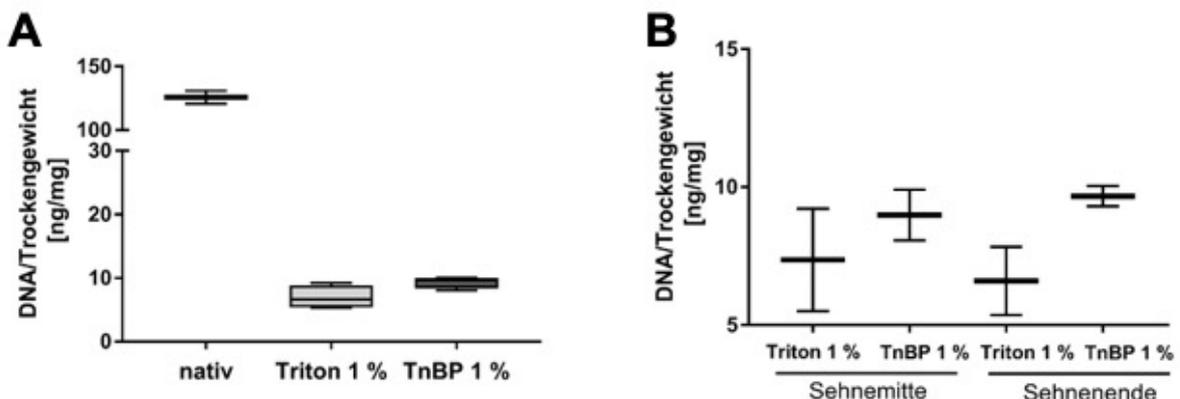


Abbildung 9: DNA-Gehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten equinen Sehnen. (A) im Vergleich zur nativen Sehne. (B) vergleichender DNA-Gehalt in der Mitte und am Ende der Sehne nach Dezellularisierung. Jeweils dargestellt als Boxplot Min-Max.

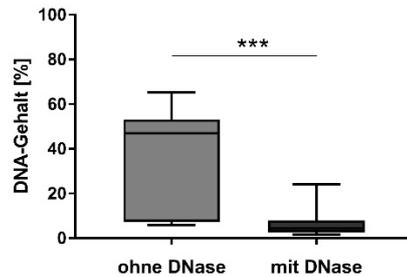


Abbildung 10: DNA-Gehalt caniner Sehnen nach Dezellularisierung mit und ohne DNase dargestellt als Boxplot Min-Max; Mann-Whitney-U-Test; *** $p < 0.001$

4.1.3 Dezellularisierte Sehnen weisen einen vergleichbaren Glykosaminglykan- und Kollagengehalt auf wie native Sehnen – die extrazelluläre Matrix wird aufrechterhalten

Zur weiteren Beurteilung der durch den Dezellularisierungsprozess entstandenen strukturellen Veränderung der caninen und equinen Sehnen wurde der Gehalt von Glukosaminoglykan und Kollagen an einer kleinen Probenzahl bestimmt. Es zeigte sich eine geringgradige Reduktion des GAG-Gehalts (Abb. 11, 12). Der Kollagengehalt veränderte sich durch die Dezellularisierung nicht (Abb. 11, 12). Es bestand kein Unterschied zwischen den beiden Protokollen. Bei den equinen Sehnen war im Vergleich zu den caninen Sehnen ein Trend zur GAG-Verminderung nach Dezellularisierung zu sehen. Das müsste jedoch in einer größeren Fallzahl verifiziert werden.

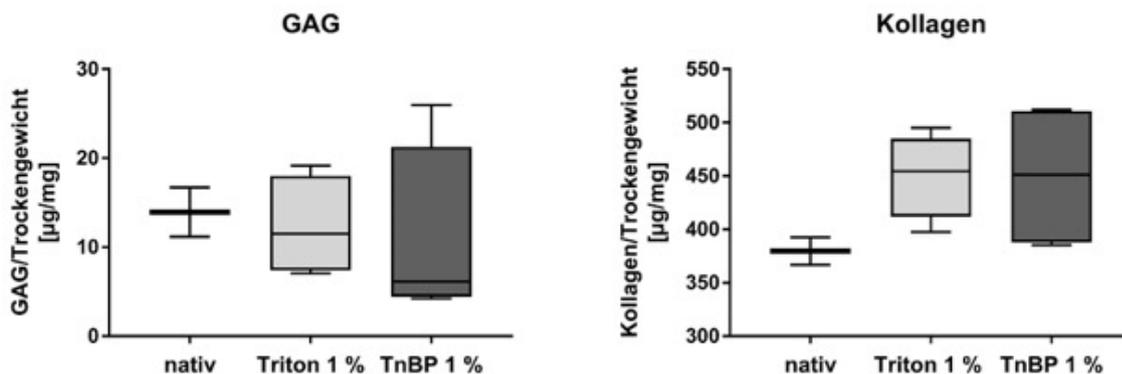


Abbildung 11: GAG- und Kollagengehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellularisierten caninen Sehnen im Vergleich zu nativen Sehnen (n=2)

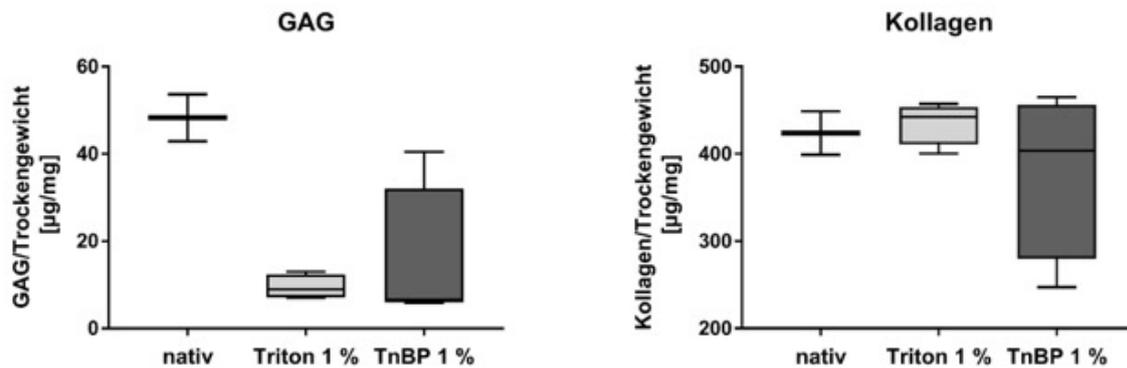


Abbildung 12: GAG- und Kollagengehalt von mit Triton X-100 bzw. TnBP dezellulierten equinen Sehnen im Vergleich zu nativen Sehnen (n=2)

4.1.4 Testung der Immunogenität von caninen und equinen dezellulierten Sehnen

In ersten Vorversuchen wurden die caninen, equinen und zunächst auch bovinen dezellulierten Sehnen mit caninem Vollblut co-kultiviert, um eine potentielle Immunogenität der dezellulierten Sehnen festzustellen. Dabei zeigte sich gleich zu Beginn bei Co-kultivierung von bovinen Sehnen mit caninem Blut eine massive Hämolyse (Abb. 13). Deshalb wurde im weiteren Verlauf nur mit equinen und caninen Sehnen weitergearbeitet.



Abbildung 13: Rindersehne (BS) mit Hundeblood (CB) – Hämolyse

Um eine Vergleichbarkeit zwischen dem Sehnenmaterial zu gewährleisten, wurde das Sehnenmaterial in gleich große Vehikel transferiert. Zur Überprüfung der Standardisierung wurde das Gewicht der Sehnen im Vehikel ermittelt. Dabei gab es sowohl zwischen den caninen Sehnen als auch zwischen den equinen Sehnen kaum Schwankungen des Gewichts. Im Vergleich der beiden Populationen miteinander waren die equinen Sehnen jedoch deutlich leichter.

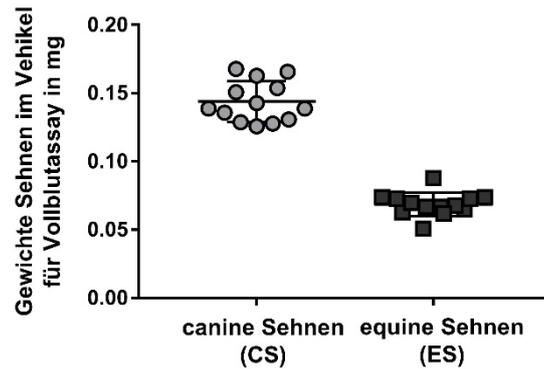


Abbildung 14: Gewichte der Sehnen (ohne Vehikel), die im Vollblutassay getestet wurden. Vergleich canine equine – Boxplot Mittelwert \pm SD

Im nächsten Schritt wurden canine und equine Sehnen mit Hundevollblut co-kultiviert. Als Negativkontrolle wurde canines Vollblut nur mit RPMI und als Positivkontrolle Vollblut mit RPMI supplementiert mit LPS verwendet. Nach 24h Inkubation wurde jeweils der Überstand abgenommen und die Immunantwort durch IL-1-Bestimmung untersucht. Im ersten Versuch war ein signifikanter Anstieg der Interleukin-Konzentration festzustellen (Abb. 15).

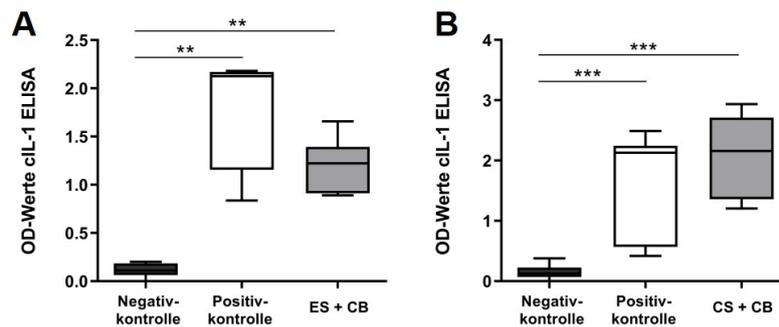


Abbildung 15: Vollblutassay mit Hundeblood (CB) und Sehnen vom Pferd (ES) oder Hund (CS) dargestellt als Boxplot ($n=3$ oder $n=6$); cIL-1 im Überstand nach 24 h Co-Kultur; Negativkontrolle = CB ohne alles nur RPMI; Positivkontrolle = CB + LPS; Mann-Whitney-U-Test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Daraufhin wurde das Waschprotokoll nach dem Dezellarisierungsprozess für die Hundesehnen optimiert, da der Verdacht bestand, dass es sich um Wechselwirkungen mit den Detergenzien und der DNase handelt. Die Ergebnisse nach der Optimierung sind in der folgenden Abbildung (Abb.16) dargestellt.

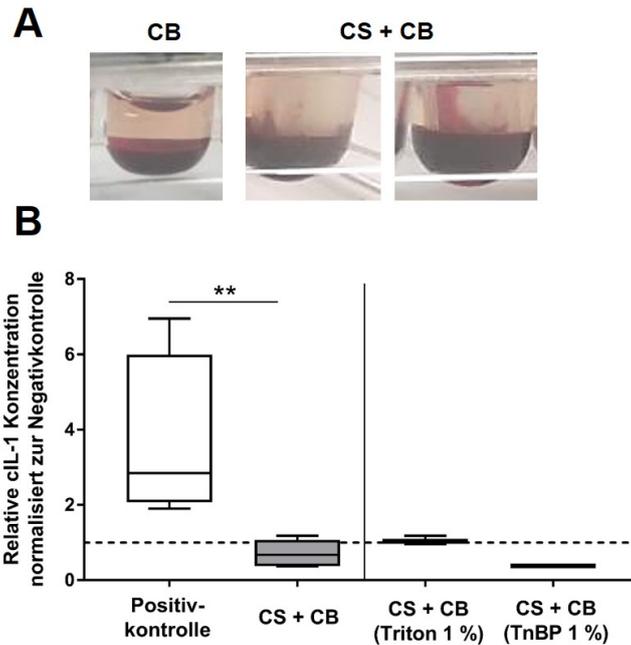


Abbildung 16: Vollblutassay mit Hundeblood (CB) und Sehnen vom Hund (CS) nach Optimierung der Waschprotokolle dargestellt als Boxplot ($n=3$); cIL-1 im Überstand nach 24 h Co-Kultur; Negativkontrolle = CB ohne alles nur RPMI; Positivkontrolle = CB + LPS; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zum hypothetischem Wert von 1; $**p<0.01$

Nach der Dezellularisierung konnten keine signifikanten Interleukin-Anstiege im Vergleich zur Negativkontrollgruppe festgestellt werden. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der IL-1-Anstieg im Vergleich zur Positivkontrollgruppe signifikant ($p<0.01$) reduziert war. Wenn die Dezellularisierungsgruppe in die beiden Protokolle aufgeteilt wurde, gab es kaum einen Unterschied zwischen Triton X-100 und TnBP.

4.2 Isolation und Charakterisierung von caninen ASCs

4.2.1 Canine ASCs zeigen Plastikadhärenz und positives Proliferationsverhalten

Aus dem Fettgewebe von Hunden konnten ASCs problemlos isoliert werden. Die Zellen waren morphologisch fibroblastenähnlich. Koloniebildung konnte nach drei bis fünf Tagen in Kultur beobachtet werden. Die Zellen waren plastikadhärent und vital, wie das rege Proliferationsverhalten zeigte. Die aus dem Fett isolierten caninen Stammzellen erreichten erstmals nach sechs bis acht Tagen eine 80%ige Konfluenz und wurden passagiert. Die nächsten Passagen konnten jeweils nach wenigen Tagen durchgeführt werden. Es folgte eine problemlose Passagierung bis zur 9. Passage. Eine Verlangsamung des Zellwachstums setzte ab der 7. Passage ein.

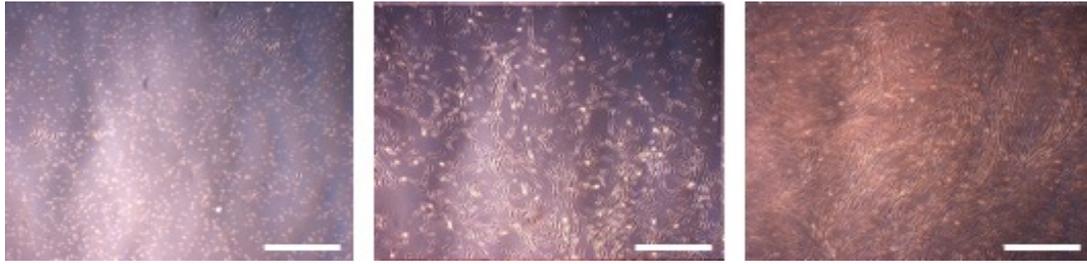


Abbildung 17: Mikroskopische Morphologie von caninen ASCs im zeitlichen Verlauf. Die Zellen wurden aus Fettgewebe isoliert und anschließend kultiviert. Hier sind beispielhaft canine ASCs nach der Isolierung am 1., 4. und 6. Tag abgebildet. Maßstabsleiste = 200 μ m

Eine Kryokonservierung war über mehrere Monate ohne Vitalitätsverlust möglich. Das Auftauen verlief unproblematisch. Die Passagierung konnte fortgesetzt werden.

4.2.2 Canine ASCs zeigen Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Linie

Alle caninen ASCs konnten eine osteogene Differenzierung durchlaufen. Nach Erreichen der Konfluenz und Hinzugabe des Osteogenesemediums änderten die Zellen ihre Morphologie. Sie verloren ihre Spindelform, wurden polygonaler und bildeten mineralisierte Zellaggregate, die durch Alizarin Red nachgewiesen werden konnten. Nach zehn Tagen konnte durch die Alizarin-Red-Färbung die Bildung von Kalziumoxalaten und somit die Differenzierung zu Osteoblasten im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 17A). Über den

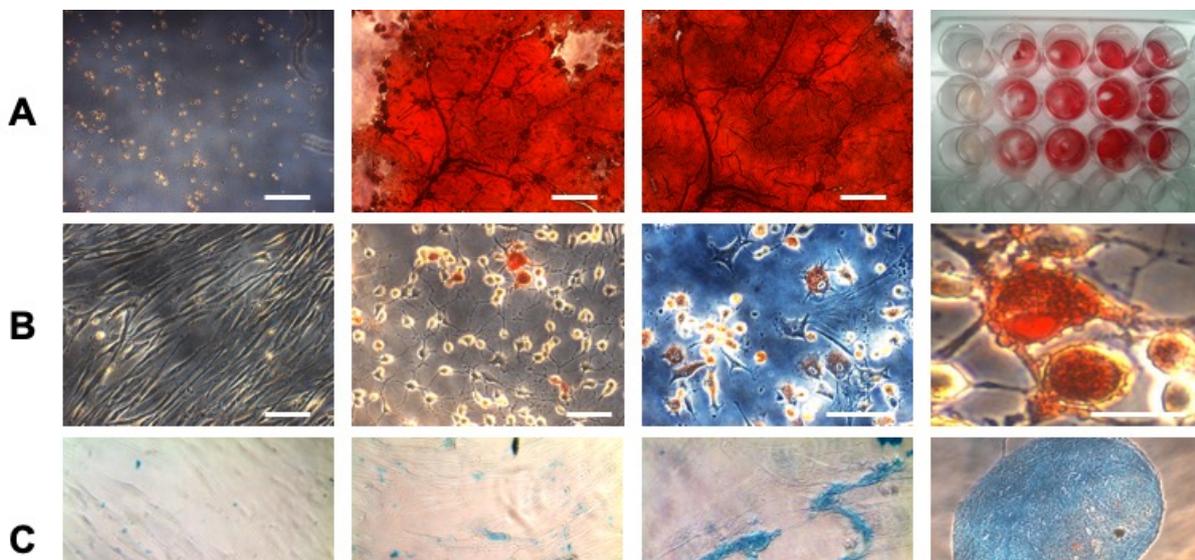


Abbildung 18: Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen – (A) osteogene (B) adipogene und (C) chondrogene Linie im Vergleich zur Kontrolle (jeweils 1. Bild) Maßstab 100 μ m

Zeitraum von 25 Tagen nahm die Intensität der Färbung und somit die Kalziumoxalatbildung signifikant zu (Abb. 18). In der Kontrollgruppe wuchsen die Zellen bis zur Konfluenz, ohne dass es zu einer Änderung der Formation kam und es war keine Anfärbbarkeit zu befunden.

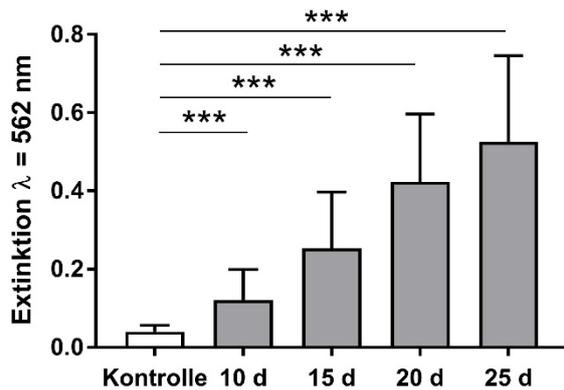


Abbildung 19: Osteogenese. Extinktion nach Färbung mit Alizarin Red und Lösen in Cetylpyridium im zeitlichen Verlauf; dargestellt als Bargraph Mittelwert + SD; *** $p < 0.001$

Bei allen caninen mesenchymalen Stromazellen der 2. bis 4. Passage konnte eine erfolgreiche Adipogenese durchgeführt werden. Nach Erreichen der Konfluenz und Induktion mit Adipogenesemedium veränderten die ASCs ihre Form. Sie wurden größer, rundeten ab und bildeten intrazelluläre Vakuolen, die durch Färbung mit Oil Red O als Fett identifiziert werden konnten (Abb. 17B). Nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen war die Färbung im Vergleich zu den Kontrollen positiv. Bis zum 21. Tag nahm die Intensität der Färbung, also die Menge an gebildeten Fettvakuolen, deutlich zu.

Auch die Chondrogenese konnte bei den ASCs erfolgreich induziert werden. Nach Erreichen der Konfluenz und dem Hinzufügen von Chondrogenesemedium über 21 Tage konnte durch die Anfärbung mit Alcian Blue die vermehrte Bildung von Proteoglykanen als Grundsubstanz von Knorpel nachgewiesen werden (Abb. 17C).

Die Kultivierung des Zellpellets mit anschließender Herstellung histologischer Schnitte und Färbung mit Alcian Blue zeigte ebenfalls eine deutliche blaue Färbung der Proteoglykane.

4.2.3 Canine ASCs weisen charakteristische Oberflächenmarker auf

Der Phänotyp der isolierten ASCs wurde über den Nachweis spezifischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie (FACS=fluorescence-activated cell scanning) identifiziert. In der 3. und 4. Passage waren die Zellen aus dem Fett von allen Spenderhunden, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, positiv gegenüber CD29, CD44, CD90, CD105 und negativ gegenüber CD14, CD45 und MHCII. Während die Zellen eine starke Färbung bei CD29, CD44 und CD90 aufwiesen, war dies bei CD105 weniger eindrücklich. Die Ergebnisse werden in Abbildung 19 in Histogrammen präsentiert. Dabei sind die Bindungsreaktionen mit den Antikörpern im Vergleich zu denen der entsprechenden Isotypen dargestellt.

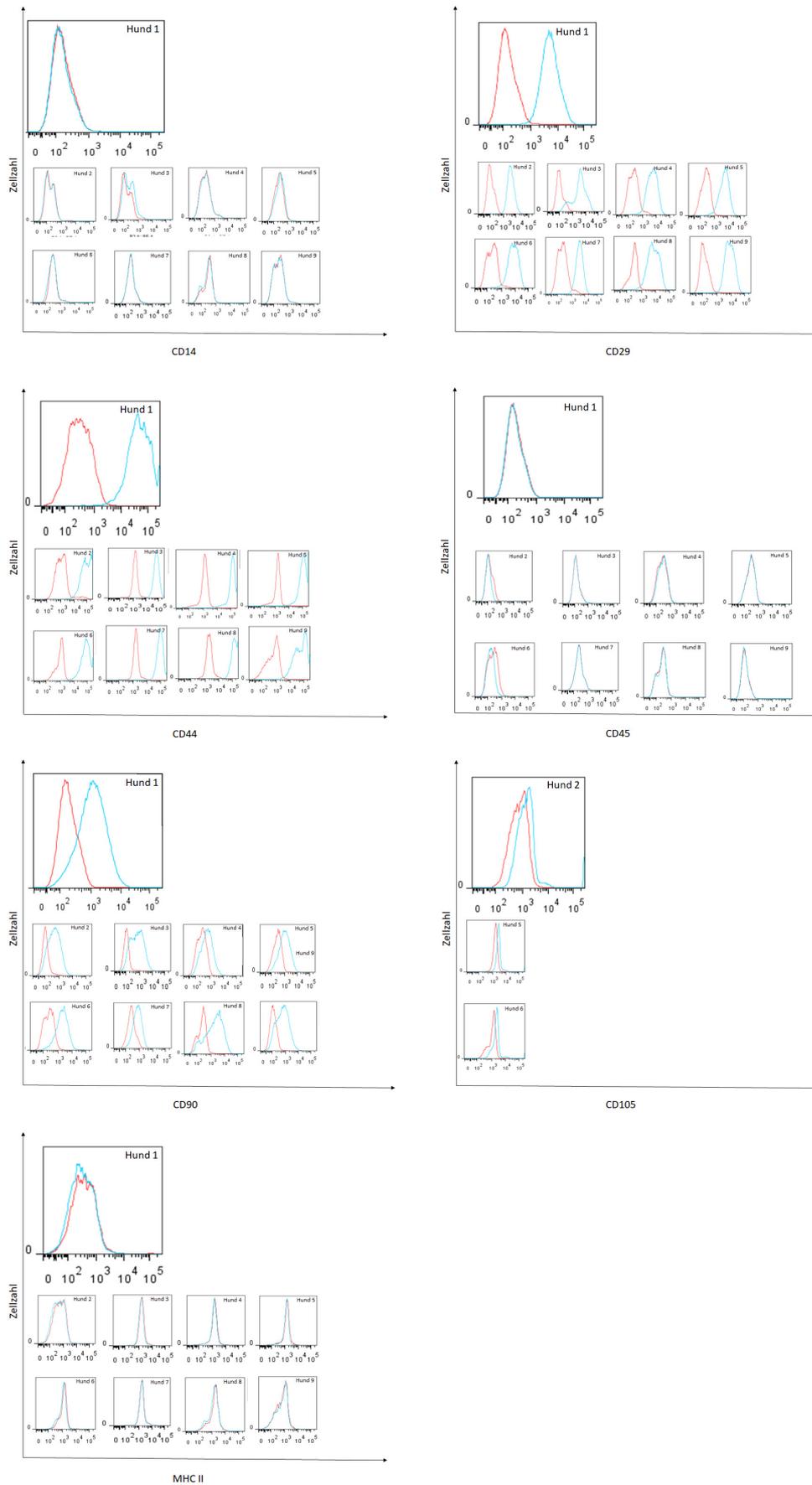


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Charakterisierung der caninen ASCs. Vergleich der Oberflächenproteine CD14, CD29, CD44, CD45, CD90, CD105 und MHC II auf caninen ASCs.

4.2.4 Untersuchung des antiinflammatorischen Potentials von caninen ASCs – Erste Vorversuche

In einem ersten Versuch sollte eine geeignete Konzentration an rekombinantem caninem IL-1 β und TNF α bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mittels IL-6 ELISA aus dem Überstand nach 24, 48 und 72 Stunden. Wie aus Abbildung 20 zu ersehen ist, wird durch alle Konzentrationen vermehrt IL-6 ausgeschüttet außer bei 10ng ml⁻¹ IL-1 β und 5ng ml⁻¹ TNF α nach 24 Stunden. Hier wird eine IL-6 Freisetzung erst nach 48 Stunden erkennbar. Dies deutet daraufhin, dass nach 24 Stunden bereits die Expression von mRNA aktiviert sein sollte, um eine Freisetzung nach 48 Stunden zu ermöglichen. Folglich erscheint diese Konzentration und der entsprechende Zeitpunkt sinnvoll für weitere Testungen, um einen antiinflammatorischen Effekt der ASCs zu evaluieren. Deshalb wurde in weiteren Versuchen eine Konzentration von 10 ng ml⁻¹ IL-1 β und 5 ng ml⁻¹ TNF α verwendet.

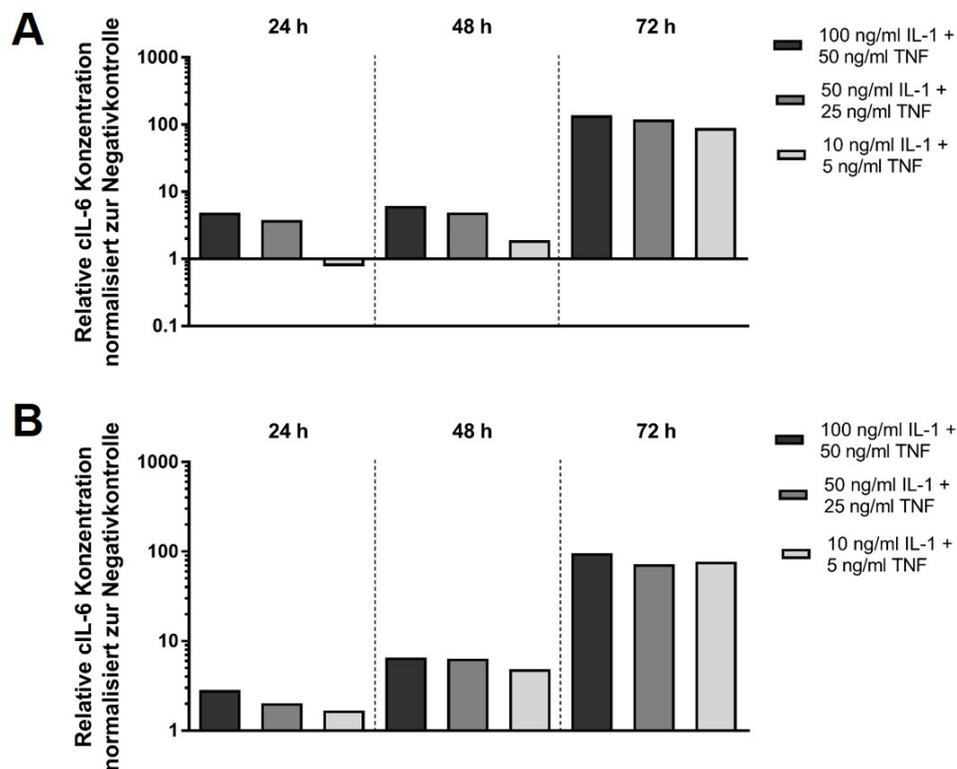


Abbildung 21: Relative cIL-6 Konzentration im Überstand nach Stimulation von (A) Chondrozyten und (B) ASCs mit IL-1 und TNF in verschiedenen Konzentrationen über 24, 48 und 72 h. jeweils n= 1

Die potentielle antiinflammatorische Wirkung der ASCs wurde auf RNA-Ebene untersucht. In einem ersten Versuch wurden Chondrozyten und ASCs unabhängig voneinander für 24 Stunden mit 10 ng ml⁻¹ IL-1 β und 5 ng ml⁻¹ TNF α stimuliert und die RNA isoliert. In einem weiteren Ansatz wurde Überstand von den ASCs auf die stimulierten Chondrozyten gegeben und die RNA nach 24 Stunden analysiert. Sowohl Chondrozyten als auch die ASCs zeigten eine starke Erhöhung der Expression von IL6, MMP und MMP13 nach Stimulation (Abb. 21A, B). Dabei war die Expressionserhöhung der ASCs eine Zehnerpotenz niedriger als bei den

Chondrozyten. TIMP1 war ebenfalls erhöht, vor allem in ASCs höher exprimiert (Median = 16,26; Min–Max = 6,28-25,19) als in Chondrozyten (Median= 2,96; Min-Max= 2,41-3,72). Die Kultivierung von stimulierten Chondrozyten mit dem Überstand von ASCs brachte keine Veränderung in der mRNA-Expression (Abb. 21 C).

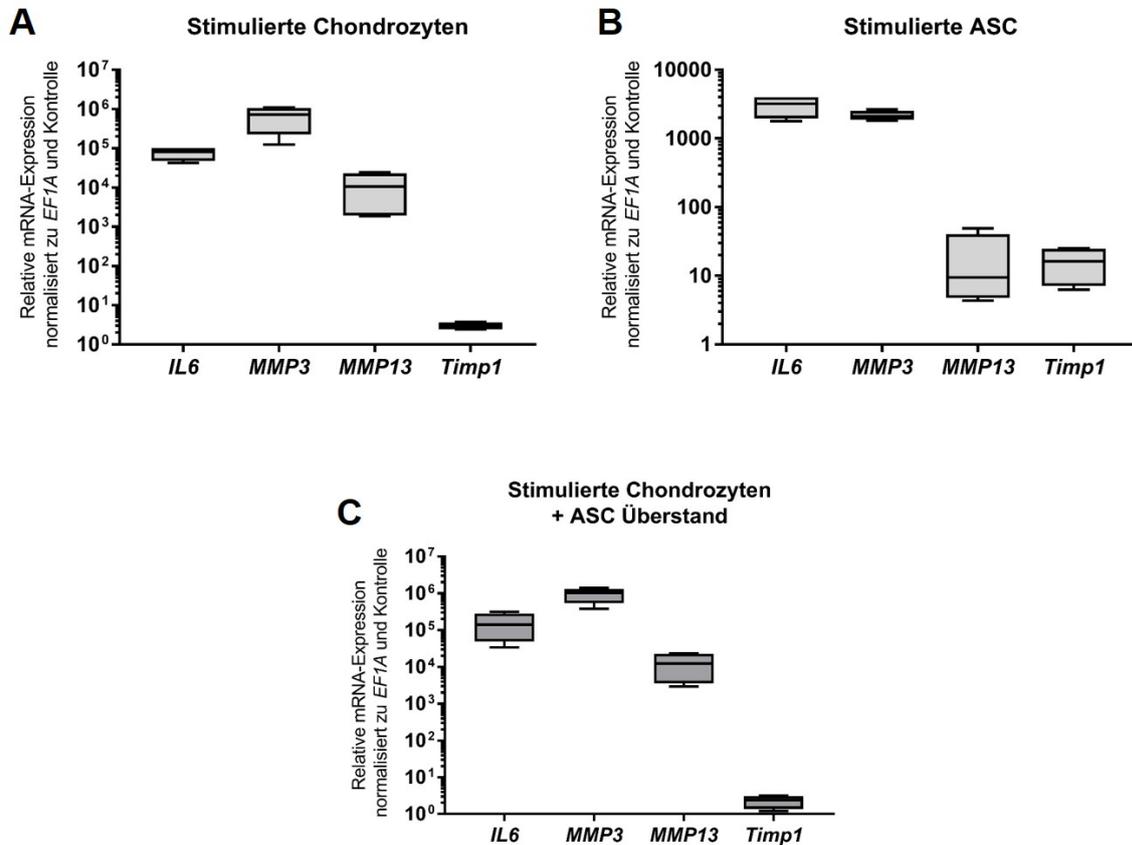


Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von IL6, MMP3, MMP13 und TIMP1 in Chondrozyten und ASCs. Chondrozyten (n= 2), ASCs (n= 1) in Doppelansätzen. Boxplot; keine Statistik; Kontrolle = unstimulierte Chondrozyten oder ASCs = 1

Im nächsten Schritt wurden Chondrozyten stimuliert und für 24 Stunden mit den ASCs co-kultiviert. Die Analyse der mRNA-Expression ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen allein stimulierten Chondrozyten und Chondrozyten co-kultiviert mit ASC (Abb. 22).

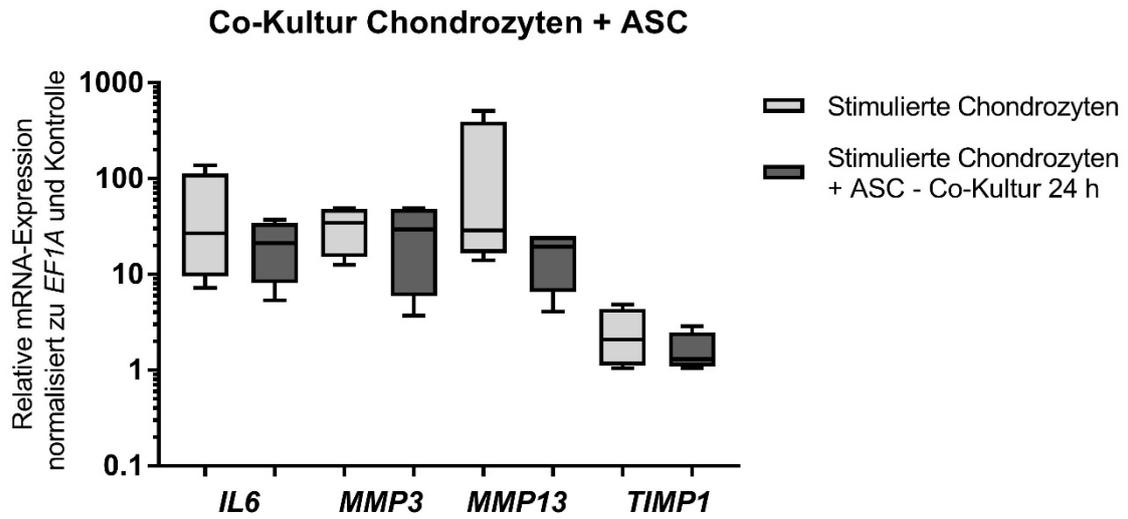


Abbildung 23: Relative mRNA-Expression von IL6, MMP3, MMP13 und TIMP1 in Chondrozyten co-kultiviert mit ASCs. Chondrozyten (n= 2) ASC (n= 1) in Doppelansätzen. Boxplot; keine Statistik; Kontrolle = unstimulierte Chondrozyten

4.3 Rezellularisierung equiner und caniner Sehnen mit caninen ASCs

4.3.1 Viabilität in Co-Kultur

Die Viabilität der caninen ASCs auf equinen und caninen mit Triton X-100 oder TnBP dezellulierten Sehnen war im Vergleich zur Kontrollgruppe besser. Die Behandlung der Sehnen mit TnBP oder Triton X-100 dezellulierten Sehnen hatte keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Viabilität. Auch konnte kein Unterschied von allogenen Hundesehnen zu xenogenen Pferdesehnen auf die Viabilität der Stammzellen gefunden werden.

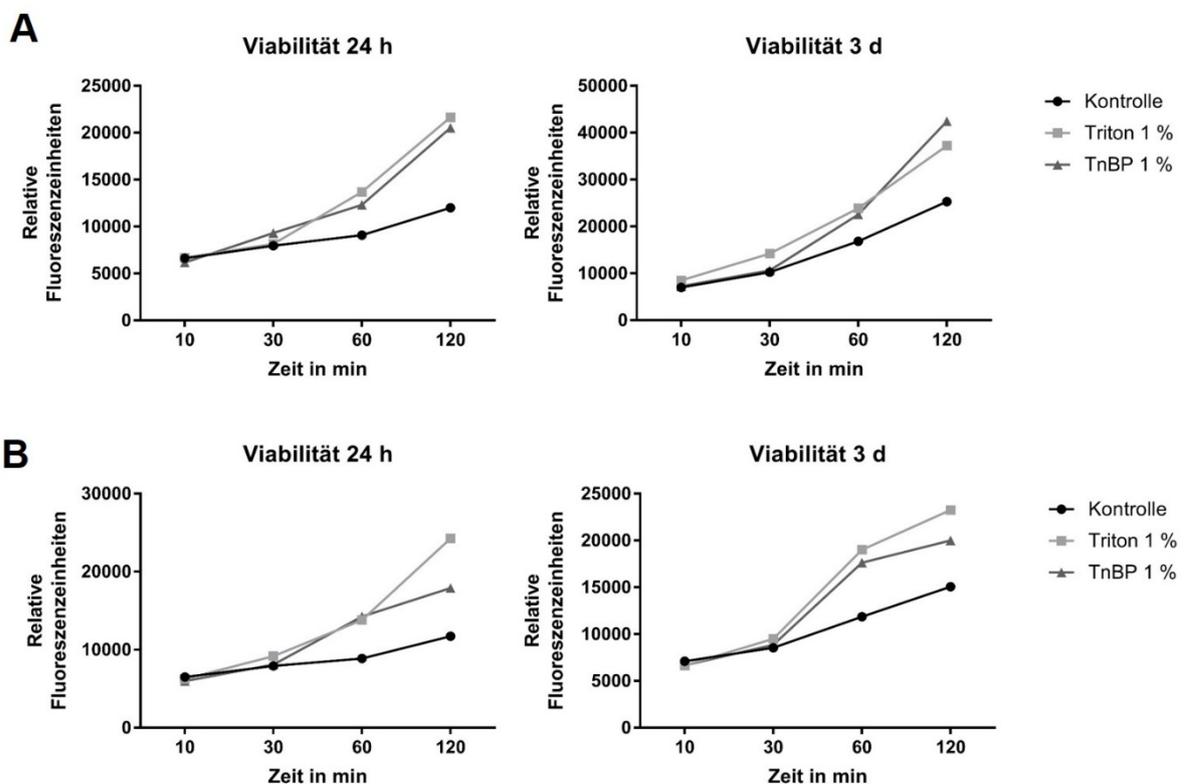


Abbildung 24: Viabilität von caninen ASCs mit Presto Blue gemessen über einen Zeitraum von zwei Stunden (A) auf einer Hundesehne (B) auf einer Pferdesehne im Vergleich zur Kontrolle – Median ohne ranges

4.3.2 Canine und equine Sehnen lassen sich mit caninen ASCs rezellularisieren

Die Rezellularisierung sowohl caniner als auch equiner Sehnen mit caninen mesenchymalen Stromazellen verlief erfolgreich. Histologisch konnten die Rezellularisierung mittels HE-, DAPI- und LIVE/DEAD™-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 24, 25, 26, 27). Es gab kaum einen

Unterschied bei der Rezellularisierung von mit TnBP- oder Triton X-100 dezellularisierten Sehnen.

In der HE-Färbung konnten die Zellen sowohl im Peritendineum als auch zwischen den Kollagenfasern nachgewiesen werden. Die Zellen waren gerade zu Beginn der Rezellularisierung an den Sehnenenden und -seiten deutlich dichter als in der Sehnenmitte. Innerhalb von sieben Tagen färbten sich die Zellen aber im gesamten Sehnenewebe an. Die Verteilung fand jedoch nicht homogen statt. Darüber hinaus war eine variable Zellmorphologie festzustellen. Während sich einige Zellen Tenozyten entsprechend länglich dem Faserverlauf zeigten, waren viele Zellen noch polyedrisch.

Die DAPI-Färbung ergab, dass die Zellen sich besonders außen an den Rändern und Enden homogen und dicht anlagerten, so dass ein durchgängiger Zellmantel die Sehne umgab. Die Zellen konnten darüber hinaus auch zwischen den Kollagenfasern detektiert werden.

In der LIVE/DEAD™-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass fast alle Zellen vital waren. Die Orientierung passte sich dem Sehnenkonstrukt im Laufe der Zeit an. Sie wandelten sich in longitudinale, an den Kollagenfibrillen orientierte Zellen. Die Dichte der Zellen nahm über einen Zeitraum von 20 Tagen stetig zu und die Verteilung der Zellen wurde gleichmäßiger.

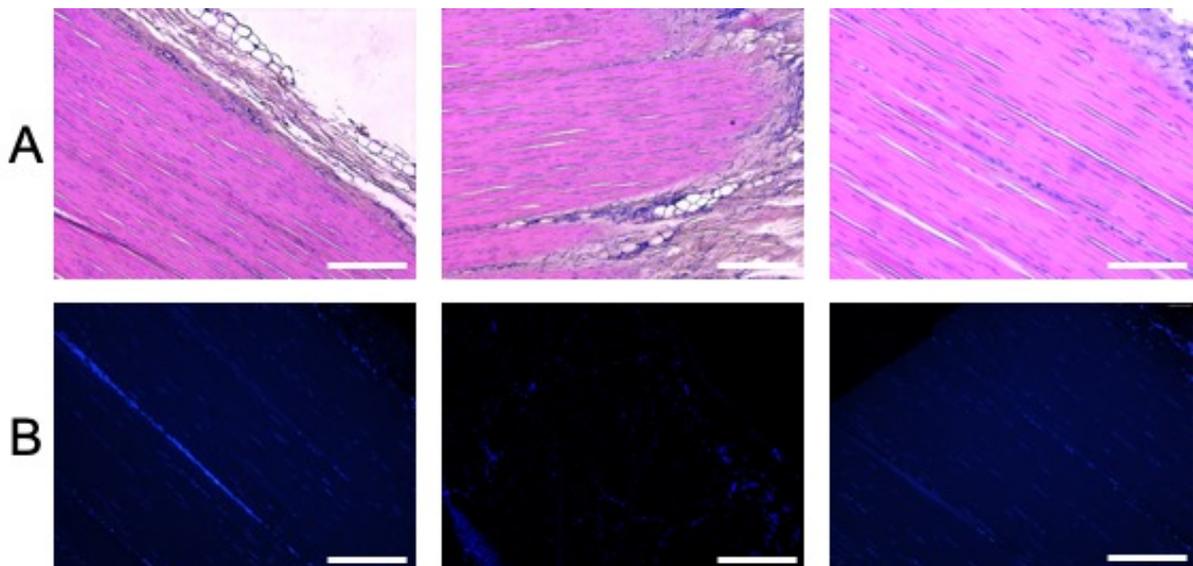


Abbildung 25: Histologie. Hundesehne nativ A) HE-Färbung; B) DAPI-Färbung. Maßstab 200 µm

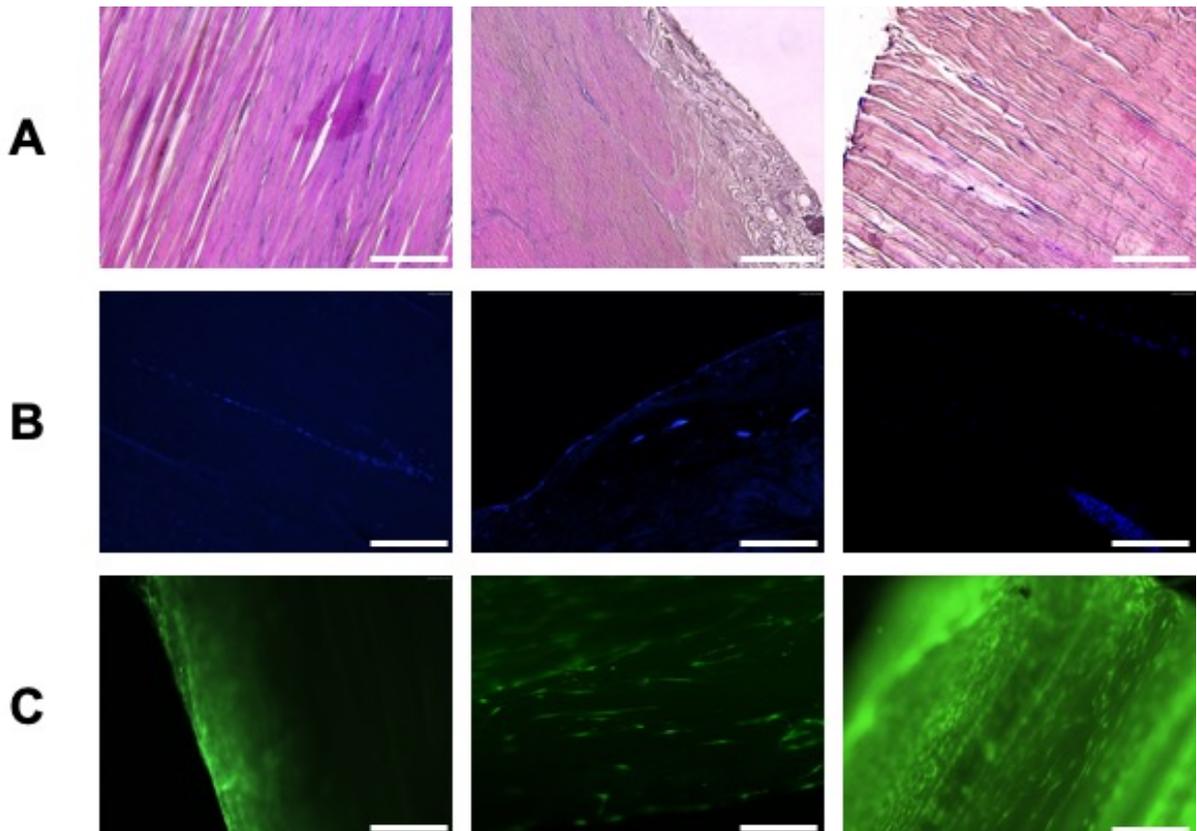


Abbildung 26: mit Triton X-100 dezellularisierte und 7 Tage rezellularisierte Hundesehne A) HE-Färbung B) DAPI-Färbung C) LIVE/DEAD-Färbung; letztes Bild nach 20 Tagen. Maßstab 200 μ m

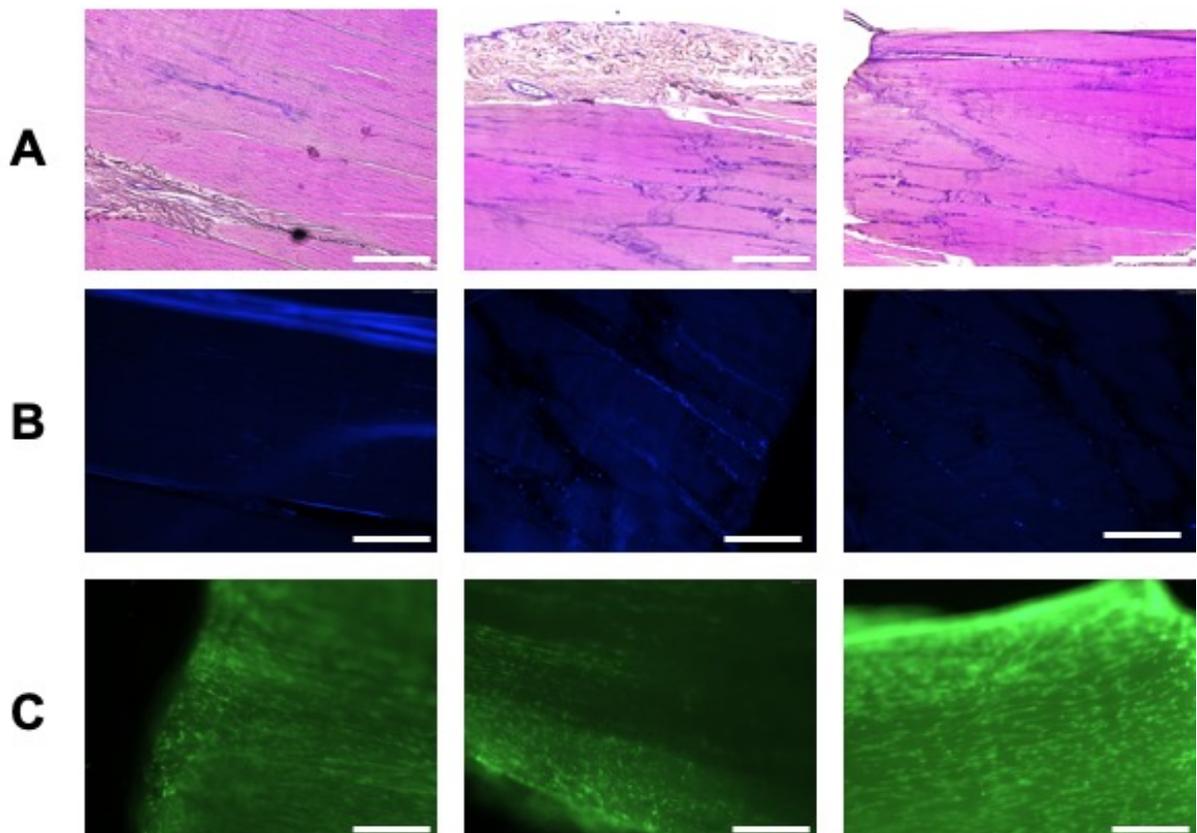


Abbildung 27: mit TnBP dezellularisierte und 7 Tage rezellularisierte Hundesehne A) HE-Färbung B) DAPI-Färbung C) LIVE/DEAD-Färbung; letztes Bild nach 20 Tagen. Maßstab 200 μ m

Auch die Rezellularisierung von Pferdesehnen mit caninen mesenchymalen Stammzellen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die LIVE/DEAD™-Färbung ergab im zeitlichen Verlauf, dass die Zellen sich zunächst an den Sehnenrändern anlagerten und dem Sehnenkonstrukt entsprechend orientierten. Im weiteren Verlauf bildete sich aus einzelnen intratendinösen Zellinseln eine zunehmend homogene Verteilung der Zellen innerhalb der gesamten Sehne, wobei die Zelldichte an den Enden und Rändern stets höher war. Histologisch war mit der LIVE/DEAD™-Färbung kein Unterschied von caninen Stromazellen auf allogenen Hunde- oder xenogenen Pferdesehnen auszumachen.

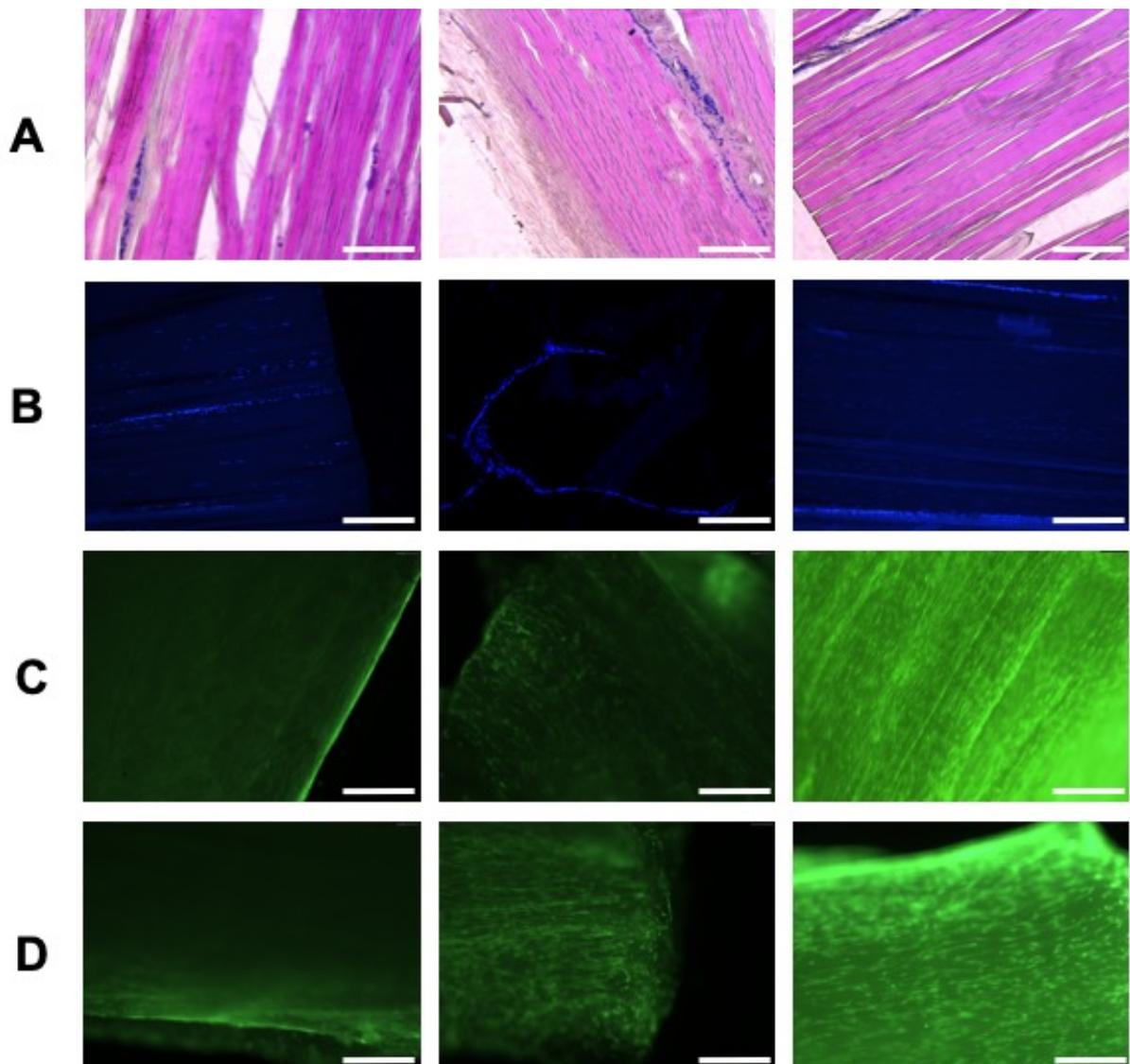


Abbildung 28: A) native Pferdesehne HE-Färbung B) native Pferdesehne DAPI-Färbung C) mit Triton X-100 dezellularisierte und mit ASCs 7 Tage rezellularisierte Pferdesehne D) mit TnBP dezellularisierte und mit ASCs 7 Tage rezellularisierte Pferdesehne C3/D3) nach 20 Tagen. Maßstab 200 μm

4.3.3 Immunogenität der rezellularisierten Sehnen

Im Anschluss wurden die rezellularisierten caninen Sehnen erneut mit Hundevollblut co-kultiviert. Als Negativkontrolle galt Vollblut mit RPMI und als Positivkontrolle Vollblut mit RPMI supplementiert mit LPS. Dabei wurden nur ASCs in Ko-Kultivierung mit Vollblut als weitere Kontrollgruppe mitgeführt. Nach 24 Stunden im Inkubator wurde der Überstand abgenommen und die IL-1-Konzentration im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Es kann ein leichter Anstieg des Interleukins festgestellt werden. Dieser liegt jedoch deutlich unter dem der Positivkontrolle.

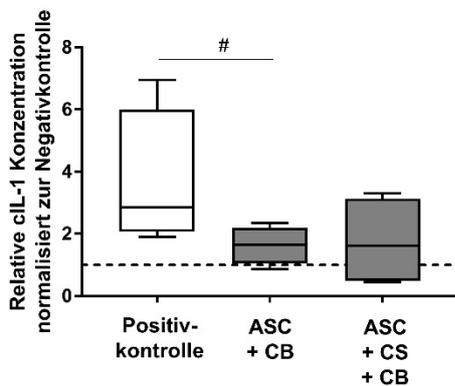


Abbildung 29: Co-Kultur von ASCs und Blut bzw. rezellularisierter Sehne (CS) und Blut (CB) über 24 Stunden und Messung von IL-1 im Überstand; Negativkontrolle = Blut nur mit RPMI; Positivkontrolle = Blut mit LPS stimuliert; dargestellt als Boxplot; Mann-Whitney-U-Test; $p = 0.057$

5. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, die Basis für die Entwicklung eines neuen, optimierten Kreuzbandersatzes zu erstellen, dass die Vorteile der aktuellen Technik zum Ersatz eines Kreuzbandes aufgreift und die Defizite beseitigt. Die aktuellen Fortschritte im Bereich des Tissue Engineering machen dies möglich. Es wurde ein auf das Endprodukt abgestimmtes Dezellularisierungsprotokoll etabliert und die dezellularisierten Sehnen wurden auf ihre strukturellen Veränderungen und Biokompatibilität untersucht. Adipogene mesenchymale Stromazellen (ASCs) wurden von Hunden isoliert, differenziert, charakterisiert und ihr Verhalten bei Besiedlung von caninen und equinen dezellularisierten Sehnen getestet. Das Ziel dieser Untersuchung war es zu überprüfen, ob allogenes und xenogenes Sehnenmaterial über einen Dezellularisierungsprozess soweit in seiner Immunogenität herabgesetzt werden kann, dass es bei Transplantation keine Abstoßungsreaktion hervorruft. Gleichzeitig war eine möglichst minimale Beeinflussung der Zusammensetzung und des Aufbaus der Sehnen zu gewährleisten. In einem zweiten Schritt sollten als ASCs identifizierte Zellen auf das dezellularisierte Konstrukt aufgebracht werden. Die Arbeitsthese war, dadurch die Immunogenität weiter herabzusetzen und vor allem nach Transplantation den Einheilungsprozess zu optimieren und der mit einem Kreuzbandriss einhergehenden Osteoarthritis entgegenzuwirken. Bei den Untersuchungen sollte möglichst auf Tierversuche verzichtet werden. Parallel wurde die immunologische Inertie und die Beeinflussung eines osteoarthritischen Milieus durch ASCs in ersten kleineren Vorversuchen beurteilt. Die Ergebnisse sollen die Grundlage für die weitere Entwicklung darstellen. Die biomechanischen Eigenschaften, die laut vielen Studien erhalten bleiben (WOODS u. GRATZER, 2005; ZHANG et al., 2009; PRIDGEN et al., 2011; NING et al., 2012; BALOGH et al., 2016), wurden parallel im Vergleich zu nativen Kreuzbändern und Sehnen in einer weiteren Dissertation untersucht.

5.1 Optimierung der Dezellularisierung von caninen und equinen Sehnen

5.1.1 Material

Die komplexen Anforderungen an das Grundkonstrukt sind bereits unter dem Punkt Transplantatwahl in der Literatur ausführlich beschrieben. Es muss einerseits eine optimale Nische für die Entwicklung der mesenchymalen Stromazellen geschaffen werden, andererseits sollte das Trägergerüst in seinen physiologischen, mechanischen und funktionellen Eigenschaften möglichst denen des Kreuzbandes entsprechen. Der Grundaufbau von Sehnen und Bändern ist vor allem von der Funktion abhängig und weniger von der Tierart, d. h., in der

Physiologie, Biomechanik und Heilung sind kaum Differenzen zu erwarten. Sehnen und Bänder sind beide bradytrophe und hypovaskuläre Gewebe mit parallel angeordnetem dichten Kollagen und wenig elastischen Fasern. Die Moleküle, die die EZM formen, sind größtenteils zwischen den verschiedenen Spezies identisch und deshalb werden auch xenogene Transplantationen nach Dezellularisierung gut toleriert (BERNARD et al., 1983; BERNARD et al., 1983; CONSTANTINO U. JIMENEZ, 1991; EXPOSITO et al., 1992). Es liegen bereits verschiedene Studien vor, die die Verwendung xenogener extrazellulärer Matrix in der klinischen Praxis getestet haben (DERWIN et al., 2010; FINI et al., 2012; RICCHETTI et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden Sehnen von Hunden und Pferden verwendet, die dezellularisiert und anschließend mit mesenchymalen Stromazellen rezellularisiert wurden. Der Grund dafür waren die Vorteile der extrazellulären Matrix. Die EZM beeinflusst die Zellmitose (BORNSTEIN u. SAGE, 2002; VOROTNIKOVA et al., 2010) und Chemotaxis sowie die Zelldifferenzierung (ALLEN et al., 2010; BARKAN et al., 2010; CORTIELLA et al., 2010) und induziert eine konstruktive Remodelingantwort. Einerseits werden hierbei die intrinsischen biomechanischen Eigenschaften und andererseits die enthaltenen Wachstumsfaktoren und Zytokine genutzt.

Es wurden Achillessehnen von Hunden und Beugesehnen von Pferden und Rindern für das Konstrukt des Kreuzbandes verwendet. Die Achillessehnen wurden ausgewählt, da sie beim Hund in entsprechend benötigter Länge und Dicke vorliegen. Beugesehnen als Zugsehnen wurden gewählt, weil sie in ihrem Aufbau dem von Bändern vergleichbar sind und wegen ihrer biomechanischen Eigenschaften als Kreuzbandersatz besser geeignet sind als Strecksehnen. Parallel zu den Hundesehnen wurden auch xenogene Sehnen untersucht, da diese eine bessere Verfügbarkeit aufweisen. Das Rind als Spender wäre in Bezug auf die Verfügbarkeit ein optimaler Kandidat, weil die Sehnen im Schlachtprozess als Abfallprodukt in großer Zahl anfallen. Aufgrund hoher immunologischer Abstoßungsreaktionen – Hämolyse des caninen Blutes zu Beginn der Studie – musste dieser Ansatz verworfen werden. Parallel wurde bereits mit Pferdesehnen gearbeitet, die ebenso im Rahmen des Schlachtprozesses gewonnen werden können und deutlich bessere Ergebnisse bezüglich der Immunogenität lieferten.

Das Kreuzband wurde nicht unmittelbar als Ausgangskonstrukt verwendet, da es einerseits nur in limitierter Länge und Menge vorhanden ist und andererseits wegen seines speziellen Aufbaus nicht individuell auf jedes Kniegelenk angepasst werden kann.

5.1.2 Methoden

Das Ziel der Dezellularisierung ist die Entfernung aller zellulären Bestandteile ohne nachteilige Effekte auf den Aufbau, die biologische Aktivität und die mechanische Integrität der

dreidimensionalen Matrix. KEANE et. al (2012) haben nachgewiesen, wie wichtig eine effektive Dezellularisierung für die Verwendung von EZM als dreidimensionaler Scaffold ist. Je nachdem ob das Transplantat vermehrt über proinflammatorische Makrophagen (M1) eine Th1-Antwort (MOSSER, 2003; GORDON u. TAYLOR, 2005; VERRECK et al., 2006) oder über antiinflammatorische Makrophagen (M2) eine Th2-Antwort hervorruft, kommt es zu Entzündung oder Remodeling und Regeneration. Das heißt, dass der M1-M2-Shift die Immunantwort des Empfängers bestimmt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass azelluläre, auf ECM-basierte Scaffolds vor allem eine M2-Antwort auslösen und somit ein konstruktives Remodeling des Implantats ermöglichen (BADYLAK u. GILBERT, 2008; BROWN u. BOUSSIOTIS, 2008).

Für die Dezellularisierung wurde entsprechend der Dichte des Gewebes, der Zellularität und dem Lipidgehalt ein Protokoll etabliert. In der Regel ist eine Kombination aus enzymatischen, physikalischen und chemischen Verfahren für eine effektive Dezellularisierung notwendig (GILBERT et al., 2006). Chemische Detergenzien lösen die Zellmembran auf und dissoziieren die DNA von den Proteinen. Wegen ihrer Wirkung auf die Proteine können sie aber auch zur Schädigung der extrazellulären Matrix führen. Deshalb spielen die Dezellularisierungsdauer und die Konzentration des Detergenz eine entscheidende Rolle. Gerade Triton X-100 ist für dichtere Gewebe ein geeignetes Mittel (MEYER et al., 2006) und wurde schon erfolgreich zur Dezellularisierung von Sehnen und Bändern eingesetzt (CHONG et al., 2009; VAVKEN et al., 2009; ZHANG et al., 2009; YOSHIDA et al., 2012). Triton X-100 gehört zu den nichtionischen Detergenzien, die die DNA-Protein- und Lipid-Protein-Interaktion stören und zur Denaturierung führen.

SDS ist ein ionisches Detergenz, das die Zellmembran und Kernmembran auflöst und Proteine denaturiert. Ihm wird eine gute Entfernung von Zellen bei Erhalt der biomechanischen Integrität zugeschrieben (LUMPKINS et al., 2008). Negativ ist jedoch der Effekt auf die Ultrastruktur und die Elimination von Wachstumsfaktoren (COURTMAN et al., 1994; KASIMIR et al., 2003; REING et al., 2010). Insgesamt ist es deutlich schädlicher für die EZM als Triton X-100 und wies in Vorversuchen bereits makroskopisch eine Schädigung der EZM auf. Deshalb wurde im weiteren Verlauf nicht mit SDS gearbeitet.

TnBP ist eine Lösung, die chaotrop Wasserstoffbrückenbindungen stört und stabile Komplexe mit Metallen bildet. Es kann Zellen effektiv aus dichtem Gewebe unter Verlust von etwas Kollagen, aber mit wenig Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften, entfernen (CARTMELL u. DUNN, 2000; DEEKEN et al., 2011). Es beseitigt auch behüllte Viren aus Blutprodukten, ohne den Thrombozyten und Proteinen zu schaden. Osmotische oder enzymatische Methoden sind bei der Dezellularisierung von Sehnen allein wenig effektiv, haben aber ergänzend gute Eigenschaften (NING et al., 2012). Die in diesem Protokoll verwendete DNase spaltet Nukleinsäuresequenzen und wird verwendet, um Nukleotide nach Zelllyse zu entfernen

(ELDER et al., 2010; FUNAMOTO et al., 2010; PETERSEN et al., 2010; YANG et al., 2010).

Die Temperaturwechsel während des Gefrierzyklus zerstören die Zellmembran durch die Bildung von Eiskristallen effektiv und reduzieren negative Immunantworten (LEHR et al., 2011). Gefrierzyklen verursachen kleine Unterbrechungen in der Ultrastruktur der EZM (HOPKINSON et al., 2008; PRASERTSUNG et al., 2008) und lockern dadurch das sehr dichte Sehngewebe etwas auf (CARTMELL u. DUNN, 2000). Vorteilhaft sind, dass biomechanische Eigenschaften kaum beeinflusst werden (JACKSON et al., 1988; ELDER et al., 2010), sowie der geringe Proteinverlust (PATEL et al., 2008).

Wie bereits von CRAPO et al. (2011) zusammengefasst, sollte sich die Länge und Komplexität des Dezellularisierungsprotokolls proportional zur geometrischen und biologischen Konservierung des Gewebes nach der Dezellularisierung (z. B. Makrostruktur, Ultrastruktur, Matrix und Basement-Membranproteine, Wachstumsfaktoren) verhalten. Entsprechend wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen der Detergenzien und die Dauer des Dezellularisierungsprozesses getestet, um das optimale Verhältnis von effektiver Dezellularisierung und wenig Beeinflussung der EZM zu gewährleisten.

5.1.3 Ergebnisse

Der Dezellularisierungserfolg sollte nach einer Übersichtsarbeit von CRAPO et al. (2011) auf drei Kriterien überprüft werden:

1. <50 ng dsDNA pro mg Trockengewicht
2. <200 Basenpaare DNA Fragmentlänge
3. kein sichtbares Kernmaterial in histologischen Schnitten, die mit DAPI oder HE gefärbt wurden

Die Kriterien 1 und 3 sind bei dem in dieser Studie durchgeführten Protokoll erfüllt. Die Fragmentlänge der noch enthaltenen DNA wurde nicht ermittelt. Histologisch nachgewiesen wurde einerseits das Fehlen von Zellkernen mit minimalem Zelldebris im Peritendineum. Es ergab sich andererseits ein guter Überblick über die Struktur des Sehngewebes. Die Struktur caniner und equiner Sehnen wurde histologisch kaum beeinflusst und es gab histologisch keinen Unterschied zwischen den strukturellen Auswirkungen des Dezellularisierungsprotokolls auf canine oder equine Sehnen, so dass beide Sehnen identisch behandelt wurden. Zur speziellen Kerndarstellung wurde neben der HE- zusätzlich die DAPI-Färbung vorgenommen. Beide waren negativ. Somit waren sowohl die quantitative Auswertung nach Papainverdau als auch die histologische Auswertung erfolgreich. Die Anwendung von Triton X-100 und TnBP waren bei caninen Sehnen ohne signifikanten Unterschied. Die Verwendung von DNase im Protokoll verbesserte die Dezellularisierung signifikant ($p=0,001$). Dieser Trend war auch bei den Pferdesehnen zu erkennen. Die in

Vorversuchen durchgeführten verschiedenen Konzentrationen der Detergenzien sowie die unterschiedliche Stundenanzahl schienen keinen größeren Einfluss zu nehmen, so dass mit der niedrigsten Konzentration (1 %) über das am kürzesten getestete Intervall (24 Stunden) weitergearbeitet wurde. Für eine statistische Auswertung war die Probenzahl jedoch zu gering. Das gilt auch für den Vergleich des DNA-Gehaltes am Ende und in der Mitte der dezellularisierten Sehnen. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Zu diskutieren ist, dass die Sehnen nur ungefähr die gleichen Maße hatten und der Dezellularisierungserfolg auch in Abhängigkeit zur Schichtdicke steht.

Insgesamt konnte der DNA-Gehalt mit beiden Dezellularisierungsprotokollen bei Hunde- und Pferdesehnen signifikant reduziert werden, ohne dass die biologischen Eigenschaften des Sehnenkonstrukts zu stark beeinflusst wurden.

GAG

Proteoglykane in Form von GAGs werden durch den Dezellularisierungsprozess reduziert (STAPLETON et al., 2008; KHEIR et al., 2011). Normalerweise haben Sehnen weniger als 1 % des Trockengewichts an GAGs (VOGEL u. HEINEGARD, 1985). Der Gehalt an GAG ist durch elektromechanische Kräfte für die Dehnungs- und Kraftverarbeitung von Sehnen verantwortlich.

In dieser Studie führte die Dezellularisierung mit Triton X-100 und TnBP zu einer geringen Reduktion des GAG-Gehalts. Das Maß der Reduktion ist aber in einem vertretbaren Bereich und sollte kaum Auswirkungen auf biomechanische Eigenschaften haben. Aufgrund der geringen Probenzahl erfolgte keine statistische Auswertung und die Daten sollten in weiteren Untersuchungen belegt werden.

Kollagen

Kollagen ist der Hauptbestandteil von Sehnen- und Bandgewebe und essentiell für die biomechanischen Eigenschaften. Es ist für die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix verantwortlich. In Sehngewebe überwiegt Kollagen Typ-I. Der Kollagengehalt bleibt während des Dezellularisierungsprozesses stabil bzw. ist im Vergleich zu nativen Sehnen eher etwas erhöht. Das lässt sich durch den Verlust von anderen Sehnenbestandteilen, wie beispielsweise den Zellen, bei der Dezellularisierung erklären. Eine statistische Auswertung der Daten wurde wegen der geringen Probenzahl nicht durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben aus der Literatur überein, sollten aber mit einer größeren Probenzahl verifiziert werden.

Biokompatibilität

Die Zytotoxizität der dezellularisierten Sehnen, die durch die Detergenzien hervorgerufen werden könnte, wurde mit Presto Blue® in Anlehnung an NING et al. (2012) überprüft. Presto Blue® hat im Vergleich zum damals verwendeten Almar Blue® den Vorteil, dass es schneller metabolisiert wird.

Die Viabilität der caninen ASCs war sowohl auf den caninen als auch auf equinen Sehnen besser als in der Kontrollgruppe. Es wird vermutet, dass die in den dezellularisierten Sehnen noch enthaltenen Proteoglykane und Wachstumsfaktoren dafür verantwortlich sind. Darüber hinaus bietet die dezellularisierte Sehne den ASCs eine optimale Nische zur Proliferation. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Detergenzien keinen negativen Einfluss auf die ASCs haben.

5.2 Isolation und Charakterisierung von caninen ASCs

Stammzellen sind heute aus der Human- und Veterinärmedizin nicht mehr wegzudenken. Mesenchymale Stromazellen werden nach CAPLAN et al. (2005) über drei verschiedene Ansätze eingesetzt:

1. In dreidimensionale Scaffolds inkorporierte ASCs als Ersatz für *in-vivo*-Gewebe
2. Zellersatztherapie zur Heilung genetischer Defekte
3. ASCs als Pumpen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Stimulation der Reparatur oder Inhibition der Degeneration.

Bei der Verwendung von ASCs auf Scaffolds werden drei Methoden unterschieden:

1. Besiedlung des Scaffolds und Implantation nach kurzer Inkubationszeit zum Anheften (DENNIS, 1992; DENNIS, 1998; OHGUSHI u. CAPLAN, 1999; SOLCHAGA et al., 2000)
2. Inkubation des besiedelten Scaffolds mit Induktionsmedium, um die Zellen speziell zur Differenzierung zu stimulieren, und anschließende Implantation (OHGUSHI et al., 1993; OHGUSHI et al., 2005)
3. Implantation des immaturren Scaffolds mit gecoateten Zellen oder Targetzellen (Hydrogele: (KIRKER et al., 2002; PARK et al., 2007)), um dann *in vivo* zu reifen.

Stammzellen vereinigen viele positive Eigenschaften wie die Fähigkeit der Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung in eine heterogene Zellpopulation. Es wurden verschiedene Zelltypen (ASCs, Kreuzbandfibroblasten, Hautfibroblasten) verglichen und die ASCs erwiesen sich als am geeignetsten (VAN EIJK et al., 2004). Sie können autolog, allogon und xenogen gewonnen werden. Während autologe Stammzellen die beste Akzeptanz aufweisen, sind sie nicht überall zu jeder Zeit verfügbar. Allogene oder xenogene Zellen können von einem jungen,

gesunden Individuum gewonnen werden und in entsprechend benötigter Anzahl und ohne Zeitverzögerung verwendet werden.

Bei den Zellen fiel die Entscheidung auf aus Fett gewonnene mesenchymale Stromazellen, weil diese leicht und schnell ohne höhere Morbidität im Rahmen von Routineoperationen bzw. des Schlachtprozesses gewonnen werden können. Sie wurden bereits von verschiedenen Wissenschaftlern charakterisiert (ZUK et al., 2001; QU-PETERSEN et al., 2002; SHI u. GRONTHOS, 2003).

Der ausgewählte Scaffold ist maßgeblich für die weitere Entwicklung der ASCs verantwortlich, da dessen Elastizität entscheidend zur Differenzierung der Zellen beiträgt. Während weichere Gewebe neurogen auf ASCs wirken, sind rigidere Matrices chondro- und osteogen (ENGLER et al., 2006). Ein weiterer Grund dafür ist, dass native, nicht stimulierte Stromazellen im Vergleich zu differenzierten Zellen keine Baseline von spezifischen Marken exprimieren, so dass ihre Antwort auf die Umwelt entsprechend drastischer ausfällt.

5.2.1 Differenzierung

Die Differenzierung mittels induzierter Osteo-, Adipo- und Chondrogenese ist Voraussetzung für die Identifizierung als mesenchymale Stromazelle. CSAKI et al. (2007) sind eine der ersten Arbeitsgruppen, die das multilineare Differenzierungspotenzial caniner ASCs nachgewiesen haben.

Die Osteogenese der mesenchymalen Stromazellen wurde mit den gebräuchlichsten Induktoren (β -Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbic-acid-2-phosphat) induziert (HARADA et al., 1988; RICKARD et al., 1994; BALK et al., 1997; HANADA et al., 1997; LECOEUR u. OUHAYOUN, 1997; ABE et al., 2000; CHEN et al., 2001; DIEFENDERFER et al., 2003; BERNER et al., 2016) und führte, wie bereits von PITTENGER et al. (1999) beschrieben, zu einer morphologischen Veränderung der Zellen und Mineralisierungen. Sie verlief bei allen Proben positiv.

Die Adipogeneseinduktion wurde mit Dexamethason, Insulin, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin und Indomethacin vorgenommen und führt über Insulin/ IGF-1, Glukokortikoid und cAMP Singalwege zur Akkumulation von Fettvakuolen (GREGOIRE et al., 1998; GREGOIRE, 2001). Im Vergleich zu humanen ASCs verläuft die Adipogenese weniger eindrucklich, aber eindeutig positiv.

Die Chondrogenese wurde über die Anfärbbarkeit von knorpelspezifischen Proteoglykanen mit Alzian Blue nachgewiesen. Für die Induktion ist neben Dexamethason auch TGF β essentiell (ZHOU et al., 2004; DONG et al., 2005; CSAKI et al., 2007). Es wurde bereits die wichtige Rolle von TGF β 1 auf die Chondrogenese gezeigt (MOLLOY et al., 2003; LEASK u. ABRAHAM, 2004;

SURESHBABU et al., 2009). Die Kultivierung sollte über mindestens 21 Tage erfolgen, um hyalinen Knorpel nachweisen zu können (SMITH et al., 1995; PAZZANO et al., 2000; DAVISSON et al., 2002). Sowohl bei der Differenzierung in dreidimensionaler Kultur als auch in Monolayerkultur konnte die Bildung von Proteoglykanen histologisch nachgewiesen werden.

5.2.2 Charakterisierung

Die Oberflächenmarkerbestimmung zur Charakterisierung der Stammzellen ist gerade bei nicht humanen ASCs sehr schwierig, da es kein einheitlich vorgeschriebenes Panel gibt. Während die International Society for Cellular Therapy für humane ASCs aufgrund einer Vielzahl von Studien vorgegeben hat, dass ≥ 95 % der ASC Population CD73/5'-Nucleotidase, CD90/Thy1, CD105/Endoglin und ≤ 2 % der ASC Population CD34, CD45, CD11b/Integrin α M oder CD14, CD79 α oder CD19, und MHC II exprimieren muss (DOMINICI et al., 2006), differieren die Angaben bei caninen ASCs stark. Für aus Fettgewebe gewonnene ASCs gibt es verschiedene Studien. Relativ übereinstimmend werden CD29, CD44 und CD90 als Positivmarker angegeben (ZUK et al., 2002; TSAI et al., 2004; IWATA et al., 2010; ORCIANI et al., 2010; VIEIRA et al., 2010; KANG et al., 2012; KISIEL et al., 2012; LEE et al., 2013), häufig auch CD73 und CD105 (DOMINICI et al., 2006). Größter Konsens bei den Negativmarkern herrscht über CD45 (KANG et al., 2012; OCK et al., 2013) und MHC II. Außerdem werden oft CD14 und CD34 genannt (DOMINICI et al., 2006; JUNG et al., 2009; MOUSAVI NIRI et al., 2009; WONGCHUENSOONTORN et al., 2009).

Das Panel wurde so zusammengestellt, dass mindestens drei Positiv- und Negativmarker eingesetzt wurden. Die Zellen waren eindeutig positiv für CD29, CD44, CD90 bzw. negativ für MHCII, CD14 und CD45. Auch der CD105-Marker war positiv, jedoch schwächer als erwartet. Diesbezüglich ist zu diskutieren, dass der Antikörper eigens gelabelt werden musste.

5.3 Rezellularisierung equiner und caniner Sehnen mit caninen ASCs

Heilung kann intrinsisch (Proliferation der Tenozyten) und extrinsisch (Einwandern von Tenozyten aus der Umgebung) erfolgen. Die intrinsische Heilung verläuft mit weniger Narbengewebe und wird bei rezellularisierten Sehnen angestrebt. Die Oberfläche des biologischen Scaffolds besteht größtenteils aus natürlichem Kollagen-Typ-I-Protein, das eine höhere Affinität der Wirtszellen ausmacht und dadurch die zelluläre Adhäsion, Proliferation, Migration und Gewebeinduktion fördert (LONGO et al., 2012). Die Vorherrschaft von Kollagen Typ-I in Sehnen besitzt insbesondere eine sehr niedriges immunologisches Risiko, wenn die Zellen entfernt sind (LYNN et al., 2004).

XU et al. (2009) haben beobachtet, dass rezellularisierte Sehnen besser *in vivo* kolonisiert werden als zellfreie Xenografts. Es wird angenommen, dass die ASCs durch Wachstumsfaktoren eine eigene perizelluläre EZM anordnen und somit die EZM auf die Kolonisierung vorbereiten und durch chemotaktische Signale die Migration von Zellen fördern (dynamische Reziprozität). Besonders in Bezug auf die Entzündungsreaktion, die eine Degradation der Sehne verursachen kann, zeigen viele Studien die positiven Eigenschaften von autologen, allogenen und auch xenogenen ASCs auf (CHONG et al., 2007; GUEST et al., 2008; CARRADE et al., 2011). Darüber hinaus wurde in Studien von ENGLER et al. (2006) nachgewiesen, dass die Differenzierung der ASCs unter einem immensen Einfluss der extrazellulären Matrix und insbesondere deren Steifheit steht

GUNGORMUS et al. (2015) haben in einer sechsmonatigen Studie an rezellularisierten Achillessehnen *in vivo* bei Ratten untersucht, dass die histologischen und biomechanischen Eigenschaften des reparierten Gewebes deutlich verbessert waren, ohne negative Immunantworten zu verursachen. Auch UYSAL et al. (2012) haben die Vorteile von rezellularisierten Sehnen mit einer besseren Faserorganisation, verringerter Entzündung, erhöhtem Kollagen-Typ-1-Gehalt und besseren biomechanischen Eigenschaften dargelegt. Darüber hinaus wurden auch verschiedene Sehnen erfolgreich mit xenogenen Zellen besiedelt (LOHAN et al., 2013).

FAN et al. haben bereits (2008) erste Studien zum Kreuzbandersatz mittels Tissue Engineering gemacht. Sie verwendeten ein Trägergerüst aus Seide und besiedelten dieses mit ASCs. Nach Implantation in Kaninchen bildete sich innerhalb von 24 Wochen eine typische Kreuzband-Knochen-Insertion mit vier Zonen aus (Knochen, mineralisierter Fibroknorpel, Fibroknorpel, Band), wie sie auch beim nativen Band vorhanden ist. Die Zugfestigkeit war denen des nativen Bandes sogar überlegen. Darüber hinaus bildeten die ASCs auf dem künstlichen Trägergerüst Kollagen. Insbesondere die extrazelluläre Matrix ist ausschlaggebend für die Biomechanik und Homöostase. Deshalb sollte der ideale Scaffold die geometrische Struktur und biologische Funktion übernehmen. In den *in-vivo*-Studien stiegen der DNA- und Kollagengehalt kontinuierlich an und die ASCs differenzierten sich ihrem Mikroenvironment entsprechend (XU et al., 2009; GUNGORMUS et al., 2015). Die Zellantworten stehen in enger Beziehung zur 3D-Geometrie des Trägergerüsts. Nach der Implantation muss der Scaffold zunächst die mechanischen Eigenschaften aufweisen, bis das Konstrukt wie im Literaturteil ausführlich beschrieben, eingewachsen und umgebaut ist.

Normalerweise liegen die Tenozyten in Reihen und sind über Connexin (Gap Junction) verbunden und synchronisiert (CHIQUET et al., 2003; WAGGETT et al., 2006; ASUNDI u. REMPEL, 2008). Da kultivierte Tenozyten *in vitro* häufig nicht in Reihen vorliegen, wird vermutet, dass biomechanische Kräfte für das Zellalignment notwendig sind.

5.3.1 Methoden

Für die Besiedlung der dezellularisierten Sehnen sind verschiedene Methoden bekannt. Am einfachsten ist vor allem bei dichtem Sehnenmaterial die Oberflächenbesiedlung (HARRISON u. GRATZER, 2005; BADYLAK et al., 2011; NING et al., 2012; OMAE et al., 2012). Es kann zwischen statischer und dynamischer Kultivierung unterschieden werden. In Abhängigkeit vom Gewebe kann die Rezellularisierung auch *via injectionem*, mit pulsatilem Perfusion, Zentrifugationskräften und Ultraschallbehandlung optimiert werden. Eine homogene Rezellularisierung konnte aber bei keinem der Verfahren erreicht werden (INGRAM et al., 2007; KRYGER et al., 2007; THEVENOT et al., 2008). Aufgrund der Dichte und Kompaktheit des Gewebes ist die Rezellularisierung von Sehnen eine Herausforderung (NING et al., 2012; SCHULZE-TANZIL et al., 2012). Zusätzlich zur Oberflächenbesiedlung wurden ASCs in das kompakte Gewebe injiziert, da in Studien oftmals nur ein Monolayer auf den Scaffoldoberflächen (KRYGER et al., 2007; PRIDGEN et al., 2011) bzw. nur eine sehr geringe Zelldichte im Gewebe nachgewiesen werden konnte (INGRAM et al., 2007). Die Zellzahl für die Rezellularisierung und entsprechende Adhäsionszeiten variieren je nach Studie stark. YOUNGSTROM et al. (2013) haben 250 000 Zellen auf die Oberfläche aufgetragen und für 48 Stunden kultiviert, während MARTINELLO et al. (2014) 1×10^6 Zellen hochkonzentriert mit 200 μ l Medium injiziert haben. Der Rezellularisierungserfolg wird in der Regel (HARRISON u. GRATZER, 2005) histologisch mittels HE- und DAPI-Färbung überprüft, da somit sowohl Aussagen über die Struktur als auch über die eigentliche Rezellularisierung einschließlich Verteilungsmuster getroffen werden können. Für die Vitalität kann das Färbepanel um die LIVE/DEAD™-Färbung ergänzt werden. Dadurch wird es möglich, zwischen toten und vitalen Zellen zu unterscheiden. Entsprechend wurde in dieser Arbeit mit allen drei Färbungen gearbeitet. GILBERT et al. (2007) haben in einem caninen Model mit Achillessehnen und gelabelten Zellen gezeigt, dass nach 30 Tagen etwa 60 % und nach 90 Tagen 100 % der Zellen verschwunden waren. Das sollte bei *in-vivo*-Untersuchungen berücksichtigt werden.

Um eine gleichmäßigere Rezellularisierung, eine bessere Ausrichtung der ASCs sowie Stimulation der Zellen zu ermöglichen, ist die Verwendung eines Bioreaktors notwendig. So werden durch mechanische Stimulation eine höhere Expression von Tendon related Proteinen, eine schnellere Differenzierung in Tenozyten, eine bessere Zellinfiltration und -formation und daraus resultierende verbesserte mechanische Eigenschaften erreicht (QIN et al., 2015).

HODDE et al. (1997) haben an Achillessehnen nachgewiesen, dass eine Immobilisation der Gliedmaße zu einem deutlich schlechteren Outcome führte als eine frühe Belastung. Durch die mechanische Stimulation schritt die Infiltration mit mononukleären Zellen schneller voran und Kollagen des Wirtes ersetzte den Scaffold. Darüber hinaus verbessert der Bioreaktor im

Vergleich zur statischen Kultur die Kollagen-I- und GAG-Produktion. Damit kann die Sehne unter entsprechender biomechanischer Beanspruchung *in vitro* besiedelt und die Zellen auf ihre zukünftige Aufgabe und ihre biologische Nische vorbereitet werden. Ein entsprechendes Modell wurde bereits entwickelt. Alternativ kann das Kniegelenk nach Implantation als natürlicher Bioreaktor fungieren, das Zytokine und biomechanische Stimuli für die Stärke des Bandes und die Differenzierung der Stromazellen liefert (CHEN et al., 2006). Insbesondere in der frühen Phase unterstützt die physiologische, mechanische Belastung das Remodeling und die Differenzierung der EZM und der Zellen (HODDE et al., 1997; BORUCH et al., 2010).

Um einen Bioreaktor optimal nutzen zu können, muss eine Oxygenierung und Perfusion des rezellularisierten Scaffolds gewährleistet werden. Häufig wird mit einer Begasung des Kultivierungsmediums mit entsprechenden Mengen an Sauerstoff (95 %) und Kohlenstoffdioxid (5 %) gearbeitet, so dass der pH-Wert stabil gehalten und ein Sauerstoffpartialdruck von etwa 360 mmHg erreicht wird. Ziel des Bioreaktors ist es, die *in-vivo*-Bedingungen zu imitieren. Dabei muss die Temperatur entsprechend stabil gehalten (normotherm) und ggf. müssen Wachstumsfaktoren ergänzt werden.

Für eine Optimierung des Rezellularisierungsprozesses wurde deshalb ein Modell entwickelt.



Abbildung 30: Entwicklung eines Bioreaktormodells. Die Sehne ist in der ‚Biodynamic Chamber‘ eingespannt und kann sowohl Zug- als auch Rotationskräften ausgesetzt werden. Dunkelgrauer Pfeil = Zugkraft; hellgrauer Pfeil = Rotation; schwarzer Pfeil: Sauerstoffsonde zur Messung der Sauerstoffkonzentration; weißer Pfeil = Temperatursonde zur Messung der Temperatur

5.3.2 Ergebnisse

Einerseits wurde eine Standard-HE-Färbung zur Beurteilung der Zellen und Struktur der Sehnen durchgeführt. Parallel wurden die DAPI- als Kernfärbung und die LIVE/DEAD™-Färbung zur Überprüfung der Vitalität der Zellen und Zytokompatibilität des Trägergerüsts vorgenommen. Es konnte eine erfolgreiche Rezellularisierung nachgewiesen werden. Die Besiedlung nach 24 Stunden, sieben und 20 Tagen wurde untersucht. Die Zellen, die zunächst noch vor allem oberflächlich oder in kleinen Zellgruppen zu finden waren, breiteten sich im Laufe der Zeit über die gesamte Sehne aus und orientierten sich entlang der Kollagenfasern. In der LIVE/DEAD™-Färbung konnte kein Unterschied zwischen der Vorbehandlung mit Triton X-100 und TnBP erkannt werden. Die caninen ASCs wiesen sowohl auf den caninen als auch auf den equinen Sehnen eine gute Vitalität mit kaum Zellverlust und -tod auf.

Positiv war außerdem, dass die ASCs insbesondere um die Ränder einen sehr dichten, geschlossenen Verband bildeten, der der synovialen Ummantelung des nativen Kreuzbandes *in vivo* sehr ähnlich ist.

Die Ergebnisse belegen, dass das gewählte Modell für die Herstellung eines neuen Kreuzbandersatzes vielversprechende Ergebnisse liefert. Eine Optimierung der homogeneren Verteilung und besseren Ausrichtung der Zellen könnte mithilfe der Verwendung eines Bioreaktors erfolgen. Da die Sehnen jedoch wenige Tage nach der Rezellularisierung ins Tier eingebracht werden sollen und somit in einen natürlichen Bioreaktor eingepflanzt werden, besteht keine zwangsläufige Notwendigkeit. Dafür sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.4 Immunogenität

Bezüglich der Immunogenität sollten beide Komponenten betrachtet werden: einerseits die extrazelluläre Matrix und andererseits die mesenchymalen Stromazellen.

Wie bereits bei der Diskussion des Materials und der Methoden der Dezellularisierung angedeutet, sind die Moleküle der EZM von Bändern und Sehnen zwischen den Spezies fast identisch (BERNARD et al., 1983; BERNARD et al., 1983; CONSTANTINO u. JIMENEZ, 1991; EXPOSITO et al., 1992). Immunogen wirken vor allem die zellulären Bestandteile, so dass durch den Dezellularisierungsprozess die Immunantwort des Wirtes stark herabgesetzt werden kann. Bei der Wirtsantwort muss zwischen Th-1-Immunantwort und Th-2-Immunantwort unterschieden werden. Klassisch aktivierte Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine und besitzen die Möglichkeit einer effizienten Antigenpräsentation und induzieren die Th1-Entzündungsantwort (MOSSER, 2003; GORDON u. TAYLOR, 2005; VERRECK et al., 2006). Alternativ aktivierte Makrophagen sind durch minimale Produktion proinflammatorischer

Zytokine charakterisiert und ihre Th-2-Antwort ermöglicht Reparatur und Regeneration. BROWN und BOUSSIOTIS (2008) zeigen auf, dass azelluläre EZM-Scaffolds vor allem eine Th-2-Antwort auslösen und somit nicht zur Abstoßung des Transplantats führen.

In den vorliegenden Untersuchungen zur Immunogenität der dezellularisierten Sehnen konnte das bestätigt werden. Die dezellularisierten Sehnen führten nach Optimierung des Waschprotokolls im Vergleich zur Positivkontrolle zu keiner Erhöhung von IL-1. Vorab kann der Grund der IL-1 Produktion sein, dass noch zelluläre Bestandteile im Gewebe waren oder Reste von Substanzen, die zur Dezellularisierung verwendet wurden.

Die zweite Komponente sind die mesenchymalen Stromazellen. Sie nehmen immunologisch durch das Fehlen spezifischer Oberflächenmarker eine Sonderstellung ein und minimieren durch Inhibieren der TNF α - und INF- γ -Produktion eine T-Zellerkennung. Darüber hinaus können sie Lymphozyten supprimieren (NIEMEYER et al., 2010). Viele Studien zeigen, dass die Verwendung von allogenen ASCs als Therapeutikum möglich ist (CAPLAN, 2005; BLACK et al., 2007; KANAYA et al., 2007; WONGCHUENSOONTORN et al., 2009; CARRADE et al., 2011; JO et al., 2014; GANTENBEIN et al., 2015).

Wenn eine dezellularisierte Sehne mit ASCs kombiniert wird, kann die immunologische Reaktion, die durch ein normales Allograft hervorgerufen wird, deutlich reduziert (OMAE et al., 2012) und das konstruktive Remodeling gefördert werden. Bei Testung der Immunogenität der rezellularisierten Sehnen war ein geringgradiger Anstieg der Interleukin-Produktion in Co-Kultur mit Vollblut zu erkennen. Das Ergebnis ist hinsichtlich mehrerer Aspekte zu diskutieren. Einerseits wurden die Untersuchungen an einer kleinen Probenzahl vorgenommen und andererseits sollte auch hier das Waschprotokoll nach der Rezellularisierung erneut überprüft werden. In der Humanmedizin wurden bereits allogene Stammzellen für die Behandlung von Herzinfarkten, Morbus Crohn, Knorpel- und Meniskusreparaturen und Graft-versus-Host-Reaktionen verwendet (CAPLAN, 2007; KIEFER et al., 2015)

5.5 Osteoarthritis als Sekundärerkrankung und die mögliche Prävention durch ASC-Therapie

Besonders die mesenchymalen Stromazellen als Zytokin- und Wachstumsfaktorquellen können mit ihren parakrinen Eigenschaften bei der Osteoarthritis eine entscheidende Rolle einnehmen. Obwohl sowohl die B-Synoviozyten gesunder als auch osteoarthritischer Gelenke TGF β (chondrogener Wachstumsfaktor) exprimieren (MUSSENER et al., 1997), werden nur in osteoarthritischen Gelenken die entsprechenden Rezeptoren exprimiert (MUSSENER et al., 1997).

In osteoarthritischen Gelenken sind vermehrt Makrophagen im Synovium und diese sondern zusammen mit den Synoviozyten Typ-B eine Fülle von inflammatorischen Mediatoren (TNF α , Interleukine, Prostaglandine und MMPs) ab (FIORITO et al., 2005; BONDESON et al., 2006; SUTTON et al., 2009). Die von den ASCs produzierten bioaktiven Moleküle sind immunsuppressiv, liefern ein regeneratives Mikroenvironment für verletztes Gewebe und sind wertvolle Mediatoren für Gewebereparation und -regeneration. Die Auswirkungen von ASCs auf Osteoarthritis wurden bereits in mehreren Studien dargelegt, welche im Folgenden diskutiert werden.

BLACK et al. (2007) haben nachgewiesen, dass sich bei Hunden mit Coxarthrose nach einmaliger intraartikulärer ASC-Applikation der Lahmheitsscore signifikant besserte, die Schmerzen reduzierten und der *Range of Motion* im Vergleich zur Kontrollgruppe besserte. Dabei handelte es sich um eine randomisierte, doppelt verblindete Multizenterstudie. In den *in-vitro*-Untersuchungen der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass stimulierte ASCs eine deutlich geringere Expression von inflammatorischen Zytokinen produzieren als Chondrozyten. In den ersten folgenden Co-Kultivierungen konnten die ASCs zu keiner positiven Beeinflussung der inflammatorischen Genexpression der stimulierten Chondrozyten führen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Kultivierung lediglich über 24 Stunden mit einer geringen Probenanzahl erfolgte.

In der Literatur wurden mesenchymale Stammzellen bereits bei der Kreuzbanderkrankung in einem Ziegenmodell eingesetzt. Dabei konnten nach Durchtrennung von Kreuzband und Meniskus durch ASC-Injektion Regenerationsanzeichen des Meniskus und neugeformtes Gewebe nachgewiesen werden. Die degenerativen Veränderungen (osteophytäre Zubildungen, Sklerose) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert (MURPHY et al., 2003). GANTENBEIN et al. (2015) haben bereits erste Untersuchungen zur biologischen Heilung eines humanen rupturierten Kreuzbandes mit Hilfe von ASCs erfolgreich durchgeführt. Auch wenn es in den ersten Vorversuchen noch keine signifikanten Unterschiede bei der Co-Kultur von ASCs und Chondrozyten gab, sollten weitere Untersuchungen folgen, die z. B. einen längeren Zeitraum bis 72 Stunden und mehr Spendermaterial einbeziehen, um eine aussagekräftige Schlussfolgerung ziehen zu können.

Zusammenfassung

Meike van Staa: Ein neuer Kreuzbandersatz - Tissue Engineering

Der kraniale Kreuzbandriss des Hundes ist eines der häufigsten orthopädischen Erkrankungen und spielt dementsprechend in der modernen Tiermedizin eine wichtige ökonomische Rolle. In der Literatur sind über 120 unterschiedliche Therapieoptionen und -modifikationen beschrieben. Es wird zwischen intra- und extraartikulären sowie dynamischen Stabilisierungstechniken unterschieden. Während in der Humanmedizin der intraartikuläre Kreuzbandersatz der Goldstandard ist, ist es in der Veterinärmedizin zum aktuellen Zeitpunkt die TPLO – ein dynamisches Osteotomieverfahren. Das differenzierte Vorgehen liegt in der unterschiedlichen Ätiopathogenese und dem postoperativen Management sowie der unterschiedlichen Anatomie und Konfiguration des Kniegelenks bei Mensch und Hund begründet. Ziel ist eine Stabilisierung des Kniegelenkes zur Minimierung weiteren Verschleißes und zur Wiederherstellung der Funktionalität.

In der Veterinärmedizin wurde bisher noch kein Transplantat gefunden, das in der Lage ist, das native Kreuzband zu ersetzen. Idealerweise muss es die identischen biomechanischen und physiofunktionellen Eigenschaften aufweisen und darf während des Einheilungsprozesses keiner Lockerung und Schwächung erfahren. Außerdem muss die immunologische Inertie gewährleistet sein. Fortschritte im Bereich des Tissue Engineering schaffen Möglichkeiten, die bisher existierenden Defizite auszugleichen und einen intraartikulären Ersatz des nativen Bandes zu optimieren.

Beim Tissue Engineering werden Zellen, ein Trägergerüst und bioaktive Moleküle verwendet, um verletztes Gewebe zu reparieren oder ersetzen.

Als Trägergerüst wurden equine und canine Sehnen verwendet, da sie ähnliche biomechanische und physiologische Eigenschaften wie das native Kreuzband aufweisen. Der strukturelle Aufbau unterscheidet sich nur geringfügig und die Immunogenität kann durch Entfernung zellulärer Bestandteile ausreichend reduziert werden.

Dazu wurden die Sehnen über Nacht in destilliertem Wasser gewaschen und dann fünf Gefrier-Auftauzyklen (2 Minuten in flüssigem Stickstoff; 10-minütige Auftauphase im 37 °C warmen Wasserbad) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1%igem Triton bzw. 1%igem TnBP über 24 Stunden. Der Zelldebris wurde durch Zugabe von DNase bei 37 °C über Nacht entfernt. Nach mehreren Waschvorgängen wurden die Sehnen bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Parallel wurden mesenchymale Stromazellen aus caninem Fettgewebe gewonnen und als ASCs charakterisiert. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation, Kollagenaseverdau und Sieben aus dem Fettgewebe isoliert und anschließend kultiviert. Die

ASCs der 3. und 4. Passage wurden durch Zugabe von Differenzierungsmedium in osteo-, adipo- und chondrogene Linie differenziert. Der Nachweis der Osteogenese erfolgte mikroskopisch durch Färbung der gebildeten Kalziumoxalate mit Alizarin Red und quantitativ mittels Absorptionsspektroskopie. Bei der Adipogenese wurden die Fettvakuolen mikroskopisch durch Färbung mit Oil Red O nachgewiesen. Die Chondrogenese wurde in zwei- und dreidimensionaler Kultur durchgeführt und der Nachweis erfolgte histologisch durch die Alcian-Blau-Färbung der gebildeten Proteoglykane. Charakterisiert wurden die ASCs weiterhin durch den Nachweis spezieller Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie. Anschließend wurde eine Co-Kultivierung der ASCs mit den dezellularisierten Sehnen durchgeführt, um die Viabilität zu beurteilen. Zum Schluss fand die Rezellularisierung der Sehnen mit ASCs statt und das immogene und antiinflammatorische Potenzial wurde untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass beide verwendeten Protokolle (Triton X-100 und TnBP) zelluläre Bestandteile effektiv aus dem kompakten Sehnenmaterial entfernen, ohne die native Struktur wesentlich zu schädigen. Histologisch waren die dezellularisierten Sehnen frei von Zellen. Lediglich im Peritendineum ist vereinzelt Zelldebris nachweisbar. Die Sehnen wiesen einen deutlich reduzierten DNA-Gehalt im Vergleich zur nativen Sehne auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Dezellularisierung mit Triton X-100 und TnBP nachgewiesen werden. Weiterhin hatten dezellularisierte Sehnen einen vergleichbaren Glykosaminoglykan- und Kollagengehalt wie native Sehnen.

Bei Testung der Immunogenität konnten nach umfangreicher Optimierung der Dezellularisierung keine signifikanten Interleukin-Anstiege im Vergleich zur Negativkontrollgruppe festgestellt werden. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der IL-1-Anstieg im Vergleich zur Positivkontrollgruppe signifikant reduziert war. Wenn die Dezellularisierungsgruppe in die beiden Protokolle aufgeteilt wurde, gab es kaum einen Unterschied zwischen Triton X-100 und TnBP.

Aus caninem Fettgewebe konnten erfolgreich mesenchymale Stromazellen isoliert und passagiert werden. Die caninen ASCs zeigten Plastikadhärenz und positives Proliferationsverhalten. Sie konnten in osteogene, adipogene und chondrogene Linien differenziert werden und weisen charakteristische Oberflächenmarker auf. Sie sind CD29-, CD44-, CD90- und CD105-positiv und CD14-, CD45- und MHCII-negativ.

Eine Co-Kultivierung von ASCs und dezellularisierten equinen und caninen Sehnen hatte keinen negativen Effekt auf die Viabilität der Zelle, sondern zeigte einen positiven Trend. Histologisch konnte nachgewiesen werden, dass sich equine und canine dezellularisierte Sehnen mit caninen ASCs rezellularisieren lassen. Positiv sticht die Tatsache heraus, dass die Zellen auch einen Zellmantel ähnlich des nativen Synoviums um die dezellularisierte

Sehne formen. Die Immunogenität der rezellularisierten Sehnen lag deutlich unterhalb der Positivkontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass das gewählte Modell für die Herstellung eines neuen Kreuzersatzbandes vielversprechende Ergebnisse liefert. Eine Optimierung der homogeneren Verteilung und besseren Ausrichtung der Zellen könnte mithilfe der Verwendung eines Bioreaktors erfolgen. Da die Sehnen jedoch wenige Tage nach der Rezellularisierung ins Tier eingebracht werden sollen und somit in einen natürlichen Bioreaktor eingepflanzt werden, besteht keine zwangsläufige Notwendigkeit. Dafür sind weitere Untersuchungen notwendig.

Summary

Meike van Staa: A new cruciate ligament replacement – tissue engineering

Cranial cruciate ligament tears are among the most common orthopedic disorders in dogs and they play a significant economic role in veterinary medicine. More than 120 different therapeutic options and modifications have been described in the literature, including intra- and extra-articular as well as dynamic stabilizing techniques. While intra-articular cruciate ligament repairs are currently the accepted standard in human medicine, the TPLO, a dynamic osteotomy-technique, is most commonly recommended in veterinary medicine. This discrepancy is based on differences in etiopathogenesis and post-operative care as well as on the distinct anatomy and configuration of the knee joint in humans and of the stifle joint in dogs. The objective in both species is to stabilize the joint, thereby minimizing further degeneration and restoring function.

So far, in veterinary medicine no transplant material has been found that can replace native cruciate ligaments. Ideally, it should possess identical biomechanical and physiologically functional properties and should not loosen or weaken during graft integration. Such transplants must also be immunologically inert. Advances in tissue engineering offer possibilities to level existing discrepancies and to optimize intra-articular replacement of the native ligament.

Tissue engineering involves using cells, a scaffold and bioactive molecules for the purpose of repairing or replacing injured tissues.

In this study, equine and canine tendons were used as scaffolds because they possess biomechanical and physiological properties similar to those of the native cruciate ligament. They differ only slightly in terms of their structural composition and their immunogenicity can be reduced sufficiently by removing cellular components.

For this purpose, the tendons were washed in distilled water for 12 hours, after which five freezing and thawing cycles (two minutes in liquid nitrogen; a 10-minute thawing phase in a 37°C water bath) were performed. Subsequently, 1% Triton X-100 or 1% TnBP were added for the duration of 24 hours. Cell debris was then removed over night by adding DNase at 37°C. After several washing cycles the tendons were stored at -80°C prior to further processing. Meanwhile, mesenchymal stromal cells (ASCs) were obtained from canine adipose tissue and isolated by a process of centrifugation, collagenase digestion and straining, followed by cultivation. Third and fourth passage ASCs were differentiated into osteo-, adipo-

and chondrogenic lines. Identification of osteogenesis was performed microscopically by staining newly formed calcium oxalates with Alizarin Red as well as quantitatively through absorption spectroscopy. Adipogenesis was identified microscopically by staining the lipid vacuoles with Oli Red O. Chondrogenesis was performed in two- and three-dimensional cell cultures and it was identified histologically after staining newly formed proteoglycans with Alcian Blue. The ASCs were characterized by flow-cytometric detection of specific cell surface markers. Subsequently, the ASCs were co-cultivated with the decellularized tendons so that their viability could be assessed. Finally, the tendons were recellularized and their immunogenic and anti-inflammatory potential was examined.

The results suggest that both protocols used here (Triton X-100 und TnBP) allow for the effective removal of cellular components from compact tendon material without permanently damaging their native structure. Histologically, the decellularized tendons were free from cells. Only the peritendineum contained barely detectible amounts of cell debris. The tendons contained significantly reduced DNA as compared to native tendons. No significant difference was found between decellularization with Triton X-100 and TnBP. Additionally, decellularized tendons possessed similar levels of glycosaminoglycans and collagen to those in native tendons.

In testing for immunogenicity, no evidence of a significant increase in interleukins was found after optimization of the decellularization protocol when compared to the negative control. However, the IL-1 increase was significantly lower as compared to the positive control group. Splitting the decellularization groups by protocol yielded no measurable difference between Triton X-100 and TnBP.

Mesenchymal stromal cells were successfully isolated from canine adipose tissue. Canine ASCs showed plastic adherence and positive proliferation properties. They were able to be differentiated into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lines and were shown to possess characteristic surface markers. They are CD29, CD44, CD90 and CD105 positive and CD14, CD45 and MHCII negative.

Co-cultivation of ASCs and decellularized equine and canine tendons had no negative effect on the viability of the cell, in fact, it showed a positive trend.

Histological evidence showed that decellularized equine and canine tendons can be recellularized with canine ASCs. A particularly encouraging finding was that the cells produced a membrane around the decellularized tendon, similar to that of the native synovium. The immunogenicity of the recellularized tendons was significantly lower as compared to the positive control.

The results suggest that the chosen model for developing a new cruciate ligament replacement is quite promising. An optimization of homogenous distribution and better alignment of the cells may be achieved by using a bioreactor. However, the tendons must be inserted into the animal shortly after recellularization and are therefore already grafted into a natural bioreactor. Therefore, it is debatable whether such a measure is useful and thus requires further studies.

Literaturverzeichnis

ABE, E., YAMAMOTO, M., TAGUCHI, Y., LECKA-CZERNIK, B., O'BRIEN, C. A., ECONOMIDES, A. N., STAHL, N., JILKA, R. L.u. MANOLAGAS, S. C. (2000):

"Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin.", J Bone Miner Res 15(4): 663-673.

ADAMS, M. E.u. BILLINGHAM, M. E. (1982):

"Animal models of degenerative joint disease.", Curr Top Pathol 71: 265-297.

ALLEN, R. A., SELTZ, L. M., JIANG, H., KASICK, R. T., SELLARO, T. L., BADYLAK, S. F.u. OGILVIE, J. B. (2010):

"Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro.", Tissue Eng Part A 16(11): 3363-3374.

ALLGOEWER, I., RICHTER, A., GRÜNING, G., MEUSTEGE, F., WAIBL, H.u. BRUNNBERG, L. (2000):

"Zwei intra-extraartikuläre Stabilisationsverfahren zur Therapie der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale im Vergleich: Methode (mod.) nach Flo und Methode nach Meustege.", Kleintierprax(45): 95-103.

ALM, A., EKSTRÖM, H.u. STRÖMBERG, B. (1974):

"Tensile strength of the anterior cruciate ligament in the dog.", Acta Chir Scand Suppl 445: 15-23.

ALM, A.u. STRÖMBERG, B. (1974):

"Vascular anatomy of the patellar and cruciate ligaments. A microangiographic and histologic investigation in the dog.", Acta Chir Scand Suppl 445: 25-35.

AMIEL, D., FRANK, C., HARWOOD, F., FRONEK, J.u. AKESON, W. (1984):

"Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison.", J Orthop Res 1(3): 257-265.

AMIEL, D., KLEINER, J. B.u. AKESON, W. H. (1986):

"The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin.", Am J Sports Med 14(6): 449-462.

AMIEL, D., KLEINER, J. B., ROUX, R. D., HARWOOD, F. L.u. AKESON, W. H. (1986):

"The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon.", J Orthop Res 4(2): 162-172.

ARAGON, C. L.u. BUDSBERG, S. C. (2005):

"Applications of evidence-based medicine: cranial cruciate ligament injury repair in the dog.", Vet Surg 34(2): 93-98.

ARNOCZKY, S. P. (1983):

"Anatomy of the anterior cruciate ligament.", Clin Orthop Relat Res(172): 19-25.

ARNOCZKY, S. P.u. MARSHALL, J. L. (1977):

"The cruciate ligaments of the canine stifle: an anatomical and functional analysis.", Am J Vet Res 38(11): 1807-1814.

ARNOCZKY, S. P., RUBIN, R. M.u. MARSHALL, J. L. (1979):

"Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs.", J Bone Joint Surg Am 61(8): 1221-1229.

ARNOCZKY, S. P., TARVIN, G. B.u. MARSHALL, J. L. (1982):

"Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog.", J Bone Joint Surg Am 64(2): 217-224.

ARNOCZKY, S. P., TARVIN, G. B., MARSHALL, J. L.u. SALTZMAN, B. (1979):

"The over-the-top procedure: A technique for anterior cruciate ligament substitution in the dog.", J Am Vet Med Assoc 15(3): 283-290.

ASUNDI, K. R.u. REMPEL, D. M. (2008):

"MMP-1, IL-1beta, and COX-2 mRNA expression is modulated by static load in rabbit flexor tendons.", Ann Biomed Eng 36(2): 237-243.

BADYLAK, S. F., FREYTES, D. O.u. GILBERT, T. W. (2009):

"Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function.", Acta Biomater 5(1): 1-13.

BADYLAK, S. F.u. GILBERT, T. W. (2008):

"Immune response to biologic scaffold materials.", Semin Immunol 20(2): 109-116.

BADYLAK, S. F., TAYLOR, D.u. UYGUN, K. (2011):

"Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds.", Annu Rev Biomed Eng 13: 27-53.

BALK, M. L., BRAY, J., DAY, C., EPPERLY, M., GREENBERGER, J., EVANS, C. H.u. NIYIBIZI, C. (1997):

"Effect of rhBMP-2 on the osteogenic potential of bone marrow stromal cells from an osteogenesis imperfecta mouse (oim).", Bone 21(1): 7-15.

BALLAGAS, A. J., MONTGOMERY, R. D., HENDERSON, R. A.u. GILLETTE, R. (2004):

"Pre- and postoperative force plate analysis of dogs with experimentally transected cranial cruciate ligaments treated using tibial plateau leveling osteotomy.", Vet Surg 33(2): 187-190.

BALLOCK, R. T., WOO, S. L., LYON, R. M., HOLLIS, J. M.u. AKESON, W. H. (1989):

"Use of patellar tendon autograft for anterior cruciate ligament reconstruction in the rabbit: a long-term histologic and biomechanical study.", J Orthop Res 7(4): 474-485.

BALOGH, D. G., BISKUP, J. J., O'SULLIVAN, M. G., SCOTT, R. M., GROSCHEIN, D., EVANS, R. B.u. CONZEMIUS, M. G. (2016):

"Biochemical, histologic, and biomechanical characterization of native and decellularized flexor tendon specimens harvested from the pelvic limbs of orthopedically normal dogs.", Am J Vet Res 77(4): 388-394.

BARGMANN, W. (1977):

„Stützgewebe.“, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. George Thieme Verlag, Stuttgart 90-146

BARI, A. S., CARTER, S. D., BELL, S. C., MORGAN, K.u. BENNETT, D. (1989):

"Anti-type II collagen antibody in naturally occurring canine joint diseases.", Br J Rheumatol 28(6): 480-486.

BARKAN, D., GREEN, J. E.u. CHAMBERS, A. F. (2010):

"Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth.", Eur J Cancer 46(7): 1181-1188.

BARNES, A. J. (1977):

"Rupture of the anterior cruciate ligament of the dog: a survey from practices in the Kent region BSAVA.", J Small Anim Pract 18(1): 55-59.

BARNHART, M. D. (2003):

"Results of single-session bilateral tibial plateau leveling osteotomies as a treatment for bilaterally ruptured cranial cruciate ligaments in dogs: 25 cases (2000-2001).", J Am Anim Hosp Assoc 39(6): 573-578.

BARRY, F. P.u. MURPHY, J. M. (2004):

"Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.", Int J Biochem Cell Biol 36(4): 568-584.

BENJAMIN, M., EVANS, E. J.u. COPP, L. (1986):

"The histology of tendon attachments to bone in man.", J Anat 149: 89-100.

BENNETT, D. (1990):

„Joints and joint diseases.“, W. WHITTICK, Canine Orthopedics. Lea&Febiger, Philadelphia 776-778

BENNETT, D., TENNANT, B., LEWIS, D. G., BAUGHAN, J., MAY, C.u. CARTER, S. (1988):

"A reappraisal of anterior cruciate ligament disease in the dog.", J Small Anim Pract 29(5): 275-297.

BERGH, M. S., RAJALA-SCHULTZ, P.u. JOHNSON, K. A. (2008):

"Risk factors for tibial tuberosity fracture after tibial plateau leveling osteotomy in dogs.", Vet Surg 37(4): 374-382.

BERNARD, M. P., CHU, M. L., MYERS, J. C., RAMIREZ, F., EIKENBERRY, E. F.u. PROCKOP, D. J. (1983):

"Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution.", Biochemistry 22(22): 5213-5223.

BERNARD, M. P., MYERS, J. C., CHU, M. L., RAMIREZ, F., EIKENBERRY, E. F.u. PROCKOP, D. J. (1983):

"Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2(I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene.", Biochemistry 22(5): 1139-1145.

BERNER, D., BREHM, W., GERLACH, K., GITTEL, C., OFFHAUS, J., PAEBST, F., SCHARNER, D.u. BURK, J. (2016):

"Longitudinal Cell Tracking and Simultaneous Monitoring of Tissue Regeneration after Cell Treatment of Natural Tendon Disease by Low-Field Magnetic Resonance Imaging.", Stem Cells Int 2016: 1207190.

BEYER NARDI, N.u. DA SILVA MEIRELLES, L. (2006):

"Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization.", Handb Exp Pharmacol(174): 249-282.

BEZERRA, M. M., BRAIN, S. D., GREENACRE, S., JERONIMO, S. M., DE MELO, L. B., KEEBLE, J.u. DA ROCHA, F. A. (2004):

"Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis.", Br J Pharmacol 141(1): 172-182.

BIRD, H. A.u. WRIGHT, V. (1978):

"Joint hypermobility mimicking pauci-articular juvenile polyarthritis.", Br Med J 2(6134): 402-403.

BLACK, L. L., GAYNOR, J., GAHRING, D., ADAMS, C., ARON, D., HARMAN, S., GINGERICH, D. A.u. HARMAN, R. (2007):

"Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial.", Vet Ther 8(4): 272-284.

BLICKENSTAFF, K. R., GRANA, W. A.u. EGGLE, D. (1997):

"Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model.", Am J Sports Med 25(4): 554-559.

BOILEAU, C., MARTEL-PELLETIER, J., MOLDOVAN, F., JOUZEAU, J. Y., NETTER, P., MANNING, P. T.u. PELLETIER, J. P. (2002):

"The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide.", Arthritis Rheum 46(10): 2637-2647.

BOLIA, A.u. BOTTCHER, P. (2015):

"Arthroscopic assisted femoral tunnel drilling for the intra-articular anatomic cranial cruciate ligament reconstruction in dogs.", Tierarztl Prax 43(5): 299-308.

BOLIA, A., WINKELS, P.u. BOTTCHER, P. (2015):

"Radiographic location of the femoral footprint of the cranial cruciate ligament in dogs.", Tierarztl Prax 43(1): 23-30.

BONDESON, J., WAINWRIGHT, S. D., LAUDER, S., AMOS, N.u. HUGHES, C. E. (2006):

"The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis.", Arthritis Res Ther 8(6): R187.

BORNSTEIN, P.u. SAGE, E. H. (2002):

"Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function.", Curr Opin Cell Biol 14(5): 608-616.

BORUCH, A. V., NIEPONICE, A., QURESHI, I. R., GILBERT, T. W.u. BADYLAK, S. F. (2010):

"Constructive remodeling of biologic scaffolds is dependent on early exposure to physiologic bladder filling in a canine partial cystectomy model.", J Surg Res 161(2): 217-225.

BOSCH, U.u. KASPERCZYK, W. J. (1992):

"Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction--a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model.", Am J Sports Med 20(5): 558-566.

BOTTCHER, P., BRUHSCHWEIN, A., WINKELS, P., WERNER, H., LUDEWIG, E., GREVEL, V.u. OECHTERING, G. (2010):

"Value of low-field magnetic resonance imaging in diagnosing meniscal tears in the canine stifle: a prospective study evaluating sensitivity and specificity in naturally occurring cranial cruciate ligament deficiency with arthroscopy as the gold standard.", Vet Surg 39(3): 296-305.

BOUDRIEAU, R. J. (2009):

"Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement?", Vet Surg 38(1): 1-22.

BOUDRIEAU, R. J.u. KOWALESKI, M. P. (2009):

"Risk factors for tibial tuberosity fracture after tibial plateau leveling osteotomy in dogs.", Vet Surg 38(3): 426; author reply 426-427.

BRAHM, T. (2004):

„Umstellungsosteotomie des Tibiaplateaus nach B. Slocum zur Behandlung der vorderen Kreuzbandruptur beim Hund: retrospektive Erhebungen bei 115 Fällen.“, Ludwig-Maximilians-Universität München,

BRINKER, W. (1990):

„Diagnosis and treatment of orthopedic conditions of the hind- limb.“, D. PIERMATTEI u. G. FLO, Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Treatment., Saunders (Verlag), Philadelphia 341-470

BROMMER, E. J., DOOIJEWAAARD, G., DIJKMANS, B. A.u. BREEDVELD, F. C. (1992):

"Plasminogen activators in synovial fluid and plasma from patients with arthritis.", Ann Rheum Dis 51(8): 965-968.

BROWN, J. A.u. BOUSSIOTIS, V. A. (2008):

"Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution.", Clin Immunol 127(3): 286-297.

BRUCHMANN, W., BOLTON, C.u. BAIN, J. (1987):

„Design considerations for cruciate ligament prostheses.“, V. MOSBY, The anterior cruciate deficient knee. New concepts in ligament repair. . Mosby Inc. (Verlag), St. Louis 254-272

BRUDER, S. P., JAISWAL, N.u. HAYNESWORTH, S. E. (1997):

"Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.", J Cell Biochem 64(2): 278-294.

BRUDER, S. P., KURTH, A. A., SHEA, M., HAYES, W. C., JAISWAL, N.u. KADIYALA, S. (1998):

"Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells.", J Orthop Res 16(2): 155-162.

BRUNNBERG, L. (1987):

„Klinische und experimentelle Untersuchungen zu Ätiologie, Pathogenese und Therapie der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale im Kniegelenk des Hundes.“, Habil., Ludwig-Maximilian-Universität. München.

BRUNNBERG, L. (1989a):

"Klinische Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale 1. Mitteilung: Zur Anatomie des Kniegelenkes des Hundes.", Kleintierpraxis 34(34): 111-114.

BRUNNBERG, L. (1989b):

"Klinische Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale beim Hund. 2. Mitteilung: Zur Ätiologie und Diagnose der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale beim Hund.", Kleintierpraxis 34(34): 445-449.

BRUNNBERG, L. (1990):

"Klinische Untersuchungen zu Ätiologie und Pathogenese der Ruptur des Ligamentum cruciatum craniale beim Hund. 3. Mitteilung: Eigene Untersuchungen.", Kleintierpraxis (35): 377-386.

BRUNNBERG, L., WAIBL, H.u. LEHMANN, J. (2014):

„Lahmheit beim Hund.“, Procane Claudio (Verlag), Berlin

BUOTE, N., FUSCO, J.u. RADASCH, R. (2009):

"Age, tibial plateau angle, sex, and weight as risk factors for contralateral rupture of the cranial cruciate ligament in Labradors.", Vet Surg 38(4): 481-489.

BUTLER, D. L.u. STOUFFER, D. C. (1983):

"Tension-torsion characteristics of the canine anterior cruciate ligament--Part II: Experimental observations.", J Biomech Eng 105(2): 160-165.

CALVO, I., AISA, J., CHASE, D., GARCIA-FERNANDEZ, P., SAN ROMAN, F.u. BENNETT, D. (2014):

"Tibial tuberosity fracture as a complication of tibial tuberosity advancement.", Vet Comp Orthop Traumatol 27(2): 148-154.

CAO, M., STEFANOVIC-RACIC, M., GEORGESCU, H. I., FU, F. H.u. EVANS, C. H. (2000):

"Does nitric oxide help explain the differential healing capacity of the anterior cruciate, posterior cruciate, and medial collateral ligaments?", Am J Sports Med 28(2): 176-182.

CAPLAN, A. I. (1991):

"Mesenchymal stem cells.", J Orthop Res 9(5): 641-650.

CAPLAN, A. I. (2005):

"Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics.", Tissue Eng 11(7-8): 1198-1211.

CAPLAN, A. I. (2007):

"Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.", J Cell Physiol 213(2): 341-347.

CAPLAN, A. I.u. BRUDER, S. P. (2001):

"Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century.", Trends Mol Med 7(6): 259-264.

CAREY, J. L., DUNN, W. R., DAHM, D. L., ZEGER, S. L.u. SPINDLER, K. P. (2009). A systematic review of anterior cruciate ligament reconstruction with autograft compared with allograft. J Bone Joint Surg Am. **91**: 2242-2250.

CAREY, K., AIKEN, S. W., DIRESTA, G. R., HERR, L. G.u. MONETTE, S. (2005):

"Radiographic and clinical changes of the patellar tendon after tibial plateau leveling osteotomy 94 cases (2000-2003).", Vet Comp Orthop Traumatol 18(4): 235-242.

CARLIN, I. (1926):

"Ruptur des Ligamentum anterius im Kniegelenk beim Hund.", Arch Wissensch Prakt Tierheilk(54): 420-423.

CARRADE, D. D., OWENS, S. D., GALUPPO, L. D., VIDAL, M. A., FERRARO, G. L., LIBRACH, F., BUERCHLER, S., FRIEDMAN, M. S., WALKER, N. J.u. BORJESSON, D. L. (2011):

"Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.", Cytotherapy 13(4): 419-430.

CARTER, S. D., BARNES, A.u. GILMORE, W. H. (1999):

"Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines.", Vet Immunol Immunopathol 69(2-4): 201-214.

CARTMELL, J. S.u. DUNN, M. G. (2000):

"Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties.", J Biomed Mater Res 49(1): 134-140.

CASALE, S. A.u. MCCARTHY, R. J. (2009):

"Complications associated with lateral fabellotibial suture surgery for cranial cruciate ligament injury in dogs: 363 cases (1997-2005).", J Am Vet Med Assoc 234(2): 229-235.

CHANG, S. K., EGAMI, D. K., SHAIIB, M. D., KAN, D. M.u. RICHARDSON, A. B. (2003):

"Anterior cruciate ligament reconstruction: allograft versus autograft.", Arthroscopy 19(5): 453-462.

CHAUVET, A. E., JOHNSON, A. L., PIJANOWSKI, G. J., HOMCO, L.u. SMITH, R. D. (1996):

"Evaluation of fibular head transposition, lateral fabellar suture, and conservative treatment of cranial cruciate ligament rupture in large dogs: a retrospective study.", J Am Anim Hosp Assoc 32(3): 247-255.

CHEN, J., HORAN, R. L., BRAMONO, D., MOREAU, J. E., WANG, Y., GEUSS, L. R., COLLETTE, A. L., VOLLOCH, V.u. ALTMAN, G. H. (2006):

"Monitoring mesenchymal stromal cell developmental stage to apply on-time mechanical stimulation for ligament tissue engineering.", Tissue Eng 12(11): 3085-3095.

CHEN, T. L., SHEN, W. J.u. KRAEMER, F. B. (2001):

"Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures.", J Cell Biochem 82(2): 187-199.

CHILDERS, H. (1966):

"New methods for cruciate ligament repair: II. Repair by suture technique.", Mod Vet Pract(42): 59-60.

CHIQUET, M., RENEDO, A. S., HUBER, F.u. FLUCK, M. (2003):

"How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?", Matrix Biol 22(1): 73-80.

CHONG, A. K., ANG, A. D., GOH, J. C., HUI, J. H., LIM, A. Y., LEE, E. H.u. LIM, B. H. (2007):

"Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model.", J Bone Joint Surg Am 89(1): 74-81.

CHONG, A. K., RIBOH, J., SMITH, R. L., LINDSEY, D. P., PHAM, H. M.u. CHANG, J. (2009):

"Flexor tendon tissue engineering: acellularized and reseeded tendon constructs.", Plast Reconstr Surg 123(6): 1759-1766.

CHOWDHURY, F., NA, S., LI, D., POH, Y. C., TANAKA, T. S., WANG, F.u. WANG, N. (2010):

"Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells.", Nat Mater 9(1): 82-88.

CHRISTOPHER, S. A., BEETEM, J.u. COOK, J. L. (2013):

"Comparison of long-term outcomes associated with three surgical techniques for treatment of cranial cruciate ligament disease in dogs.", Vet Surg 42(3): 329-334.

CICUTTINI, F. M., BAKER, J., HART, D. J.u. SPECTOR, T. D. (1996):

"Choosing the best method for radiological assessment of patellofemoral osteoarthritis.", Ann Rheum Dis 55(2): 134-136.

CLAES, S., VERDONK, P., FORSYTH, R.u. BELLEMANS, J. (2011):

"The "ligamentization" process in anterior cruciate ligament reconstruction: what happens to the human graft? A systematic review of the literature.", Am J Sports Med 39(11): 2476-2483.

CLARKE, D.u. FRISEN, J. (2001):

"Differentiation potential of adult stem cells.", Curr Opin Genet Dev 11(5): 575-580.

CLEMENTS, D. N., KENNEDY, L. J., SHORT, A. D., BARNES, A., FERGUSON, J.u. OLLIER, W. E. (2011):

"Risk of canine cranial cruciate ligament rupture is not associated with the major histocompatibility complex.", Vet Comp Orthop Traumatol 24(4): 262-265.

COLE, D. W., GINN, T. A., CHEN, G. J., SMITH, B. P., CURL, W. W., MARTIN, D. F.u. POEHLING, G. G. (2005):

"Cost comparison of anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft.", Arthroscopy 21(7): 786-790.

COMERFORD, E. J., TARLTON, J. F., AVERY, N. C., BAILEY, A. J.u. INNES, J. F. (2006):

"Distal femoral intercondylar notch dimensions and their relationship to composition and metabolism of the canine anterior cruciate ligament.", Osteoarthritis Cartilage 14(3): 273-278.

CONGET, P. A.u. MINGUELL, J. J. (1999):

"Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.", J Cell Physiol 181(1): 67-73.

CONKLING, A. L., FAGIN, B.u. DAYE, R. M. (2010):

"Comparison of tibial plateau angle changes after tibial plateau leveling osteotomy fixation with conventional or locking screw technology.", Vet Surg 39(4): 475-481.

CONSTANTINO, C. D.u. JIMENEZ, S. A. (1991):

"Structure of cDNAs encoding the triple-helical domain of murine alpha 2 (VI) collagen chain and comparison to human and chick homologues. Use of polymerase chain reaction and partially degenerate oligonucleotide for generation of novel cDNA clones.", Matrix 11(1): 1-9.

CONZEMIUS, M. G., EVANS, R. B., BESANCON, M. F., GORDON, W. J., HORSTMAN, C. L., HOEFLE, W. D., NIEVES, M. A.u. WAGNER, S. D. (2005):

"Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs.", J Am Vet Med Assoc 226(2): 232-236.

COOPER, R. R.u. MISOL, S. (1970):

"Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study.", J Bone Joint Surg Am 52(1): 1-20.

CORNELIS, F. M., LUYTEN, F. P.u. LORIES, R. J. (2011):

"Functional effects of susceptibility genes in osteoarthritis.", Discov Med 12(63): 129-139.

CORR, S. A.u. BROWN, C. (2007):

"A comparison of outcomes following tibial plateau levelling osteotomy and cranial tibial wedge osteotomy procedures.", Vet Comp Orthop Traumatol 20(4): 312-319.

CORTIELLA, J., NILES, J., CANTU, A., BRETTLER, A., PHAM, A., VARGAS, G., WINSTON, S., WANG, J., WALLS, S.u. NICHOLS, J. E. (2010):

"Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation.", Tissue Eng Part A 16(8): 2565-2580.

COURTMAN, D. W., PEREIRA, C. A., KASHEF, V., MCCOMB, D., LEE, J. M.u. WILSON, G. J. (1994):

"Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction.", J Biomed Mater Res 28(6): 655-666.

CRAPO, P. M., GILBERT, T. W.u. BADYLAK, S. F. (2011):

"An overview of tissue and whole organ decellularization processes.", Biomaterials 32(12): 3233-3243.

CRUESS, R. L.u. DUMONT, J. (1975):

"Fracture healing.", Can J Surg 18(5): 403-413.

CSAKI, C., MATIS, U., MOBASHERI, A., YE, H.u. SHAKIBAEI, M. (2007):

"Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study.", Histochem Cell Biol 128(6): 507-520.

DALBY, M. J., GADEGAARD, N., TARE, R., ANDAR, A., RIEHLE, M. O., HERZYK, P., WILKINSON, C. D.u. OREFFO, R. O. (2007):

"The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder.", Nat Mater 6(12): 997-1003.

DÄMMRICH, K.u. LOPPNOW, H. (1990):

„Stoffwechselstörungen.“, H. STRÜNZIU. E. WEISS, Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Paul Parey (Verlag), Berlin 64-153

DANYLCHUK, K. D., FINLAY, J. B.u. KRCEK, J. P. (1978):

"Microstructural organization of human and bovine cruciate ligaments.", Clin Orthop Relat Res(131): 294-298.

DARABOS, N., HUNDRIC-HASPL, Z., HASPL, M., MARKOTIC, A., DARABOS, A.u. MOSER, C. (2009):

"Correlation between synovial fluid and serum IL-1beta levels after ACL surgery-preliminary report.", Int Orthop 33(2): 413-418.

DAVISSON, T., SAH, R. L.u. RATCLIFFE, A. (2002):

"Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures.", Tissue Eng 8(5): 807-816.

DEANGELIS, M.u. LAU, R. E. (1970):

"A lateral retinacular imbrication technique for the surgical correction of anterior cruciate ligament rupture in the dog.", J Am Vet Med Assoc 157(1): 79-84.

DEEKEN, C. R., WHITE, A. K., BACHMAN, S. L., RAMSHAW, B. J., CLEVELAND, D. S., LOY, T. S.u. GRANT, S. A. (2011):

"Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate.", J Biomed Mater Res B Appl Biomater 96(2): 199-206.

DENNIS, D. A. (1998):

"Repairing minor bone defects: augmentation & autograft.", Orthopedics 21(9): 1036-1038.

DENNIS, J. E.u. CAPLAN, A. I. (1996):

"Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse.", J Cell Physiol 167(3): 523-538.

DENNIS, J. E., MERRIAM, A., AWADALLAH, A., YOO, J. U., JOHNSTONE, B.u. CAPLAN, A. I. (1999):

"A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse.", J Bone Miner Res 14(5): 700-709.

DENNIS, L. W. (1992):

"Tissue-cultured skin grafts.", J Burn Care Rehabil 13(1): 93-94.

DERWIN, K. A., BADYLAK, S. F., STEINMANN, S. P.u. IANNOTTI, J. P. (2010):

"Extracellular matrix scaffold devices for rotator cuff repair.", J Shoulder Elbow Surg 19(3): 467-476.

DIEFENDERFER, D. L., OSYCZKA, A. M., REILLY, G. C.u. LEBOY, P. S. (2003):

"BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells.", Connect Tissue Res 44 Suppl 1: 305-311.

DIETRICH, H. (1974):

"Repair of anterior cruciate ligament rupture using a modified lateral and medial retinacular imbrication technique. .", Vet Med Small Anim Clin(69): 1519-1526.

DIETZ, O.u. SCHMIDT, V. (1968):

"[Occurrence, type and therapy of knee-joint diseases in dogs].", Monatsh Veterinarmed 23(2): 61-67.

DISCHER, D. E., MOONEY, D. J.u. ZANDSTRA, P. W. (2009):

"Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells.", Science 324(5935): 1673-1677.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D.u. HORWITZ, E. (2006):

"Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.", Cytotherapy 8(4): 315-317.

DONG, Y., DRISSI, H., CHEN, M., CHEN, D., ZUSCIK, M. J., SCHWARZ, E. M.u. O'KEEFE, R. J. (2005):

"Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: modulation by TGF-beta.", J Cell Biochem 95(5): 1057-1068.

DOOM, M., DE BRUIN, T., DE ROOSTER, H., VAN BREE, H.u. COX, E. (2008):

"Immunopathological mechanisms in dogs with rupture of the cranial cruciate ligament.", Vet Immunol Immunopathol 125(1-2): 143-161.

DOVERSPKIE, M., VASSEUR, P., HARB, M.u. WALLS, C. (1993):

"Contralateral cranial cruciate ligament rupture: incidence in 114 dogs.", J Am Anim Hosp Assoc(29): 167-170.

DUERR, F. M., DUNCAN, C. G., SAVICKY, R. S., PARK, R. D., EGGER, E. L.u. PALMER, R. H. (2007):

"Risk factors for excessive tibial plateau angle in large-breed dogs with cranial cruciate ligament disease.", J Am Vet Med Assoc 231(11): 1688-1691.

DUNN, W. R., LYMAN, S., LINCOLN, A. E., AMOROSO, P. J., WICKIEWICZ, T.u. MARX, R. G. (2004):

"The effect of anterior cruciate ligament reconstruction on the risk of knee reinjury.", Am J Sports Med 32(8): 1906-1914.

DUPUIS, J., HARARI, J., BLACKKETTER, D. M.u. GALLINA, A. M. (1994):

"Evaluation of the lateral collateral ligament after fibular head transposition in dogs.", Vet Surg 23(6): 456-465.

DUVAL, J. M., BUDSBERG, S. C., FLO, G. L.u. SAMMARCO, J. L. (1999):

"Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs.", J Am Vet Med Assoc 215(6): 811-814.

DYCE, K. M., R.H.A. Merlen u F.J. Wadsworth (1952):

"The clinical anatomy of the stifle of the dog.", Br. Vet. J. 108(108): 346-353.

DYMOND, N. L., GOLDSMID, S. E.u. SIMPSON, D. J. (2010):

"Tibial tuberosity advancement in 92 canine stifles: initial results, clinical outcome and owner evaluation.", Aust Vet J 88(10): 381-385.

ELDER, B. D., KIM, D. H.u. ATHANASIOU, K. A. (2010):

"Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement.", Neurosurgery 66(4): 722-727.

ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L.u. DISCHER, D. E. (2006):

"Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.", Cell 126(4): 677-689.

EVANS, C. H., GOUZE, J. N., GOUZE, E., ROBBINS, P. D.u. GHIVIZZANI, S. C. (2004):

"Osteoarthritis gene therapy.", Gene Ther 11(4): 379-389.

EXPOSITO, J. Y., D'ALESSIO, M., SOLURSH, M.u. RAMIREZ, F. (1992):

"Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen.", J Biol Chem 267(22): 15559-15562.

FAN, H., LIU, H., WONG, E. J., TOH, S. L.u. GOH, J. C. (2008):

"In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold.", Biomaterials 29(23): 3324-3337.

FERRARI, G., CUSELLA-DE ANGELIS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G.u. MAVILIO, F. (1998):

"Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.", Science 279(5356): 1528-1530.

FINI, M., BONDIOLI, E., CASTAGNA, A., TORRICELLI, P., GIAVARESI, G., ROTINI, R., MARINELLI, A., GUERRA, E., ORLANDI, C., CARBONI, A., AITI, A., BENEDETTINI, E., GIARDINO, R.u. MELANDRI, D. (2012):

"Decellularized human dermis to treat massive rotator cuff tears: in vitro evaluations.", Connect Tissue Res 53(4): 298-306.

FIORITO, S., MAGRINI, L., ADREY, J., MAILHE, D.u. BROUTY-BOYE, D. (2005):

"Inflammatory status and cartilage regenerative potential of synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and chondropathy.", Rheumatology (Oxford) 44(2): 164-171.

FISCHER, C., CHERRES, M., GREVEL, V., OECHTERING, G.u. BOTTCHEP, P. (2010):

"Effects of attachment sites and joint angle at the time of lateral suture fixation on tension in the suture for stabilization of the cranial cruciate ligament deficient stifle in dogs.", Vet Surg 39(3): 334-342.

FITZPATRICK, N.u. SOLANO, M. A. (2010):

"Predictive variables for complications after TPLO with stifle inspection by arthrotomy in 1000 consecutive dogs.", Vet Surg 39(4): 460-474.

FLO, G. L. (1975):

"Modification of the lateral imbrication technique for stabilizing cruciate ligament injuries.", J Am Vet Med Assoc(11): 570-576.

FOX, S. M.u. MILLIS, D. (2014):

„Multimodale Schmerztherapie bei caniner Osteoarthritis.“, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Company KG, Hannover

FREY, T. N., HOELZLER, M. G., SCAVELLI, T. D., FULCHER, R. P.u. BASTIAN, R. P. (2010):

"Risk factors for surgical site infection-inflammation in dogs undergoing surgery for rupture of the cranial cruciate ligament: 902 cases (2005-2006).", J Am Vet Med Assoc 236(1): 88-94.

FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K.u. LALYKINA, K. S. (1970):

"The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.", Cell Tissue Kinet 3(4): 393-403.

FRIEDENSTEIN, A. J., PIATETZKY, S., Ily. PETRAKOVA, K. V. (1966):

"Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.", J Embryol Exp Morphol 16(3): 381-390.

FRIEDERICH, N. F.u. O'BRIEN, W. R. (1993):

"[Gonarthrosis after injury of the anterior cruciate ligament: a multicenter, long-term study].", Z Unfallchir Versicherungsmed 86(2): 81-89.

FUJITA, Y., HARA, Y., NEZU, Y., SCHULZ, K. S.u. TAGAWA, M. (2006):

"Proinflammatory cytokine activities, matrix metalloproteinase-3 activity, and sulfated glycosaminoglycan content in synovial fluid of dogs with naturally acquired cranial cruciate ligament rupture.", Vet Surg 35(4): 369-376.

FUNAMOTO, S., NAM, K., KIMURA, T., MURAKOSHI, A., HASHIMOTO, Y., NIWAYA, K., KITAMURA, S., FUJISATO, T.u. KISHIDA, A. (2010):

"The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels.", Biomaterials 31(13): 3590-3595.

GALMICHE, M. C., KOTELIANSKY, V. E., BRIERE, J., HERVE, P.u. CHARBORD, P. (1993):

"Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway.", Blood 82(1): 66-76.

GAMBARDELLA, P. W., LJ, Cassidy, F (1981):

"Lateral suture technique for management of anterior cruciate ligament rupture in dogs: A retrospective study.", J Am Anim Hosp Assoc(17): 33-36.

GANTENBEIN, B., GADHARI, N., CHAN, S. C., KOHL, S.u. AHMAD, S. S. (2015):

"Mesenchymal stem cells and collagen patches for anterior cruciate ligament repair.", World J Stem Cells 7(2): 521-534.

GENTLEMAN, E., SWAIN, R. J., EVANS, N. D., BOONRUNGSIMAN, S., JELL, G., BALL, M. D., SHEAN, T. A., OYEN, M. L., PORTER, A.u. STEVENS, M. M. (2009):

"Comparative materials differences revealed in engineered bone as a function of cell-specific differentiation.", Nat Mater 8(9): 763-770.

GEYER, H. (1966):

„Die Behandlung des Kreuzbandrisses beim Hund.“, Diss Vet. Med., Veterinär-chirurgische Klinik. Zürich.

GEYER, H. (1967):

"Die Behandlung der Kreuzbandrisse beim Hund.", Schweizer Archiv für Tierheilkunde 109(5): 240-251.

GIBBENS, R. (1957):

"Patellectomy and a variation of Paatsama's operation on the anterior cruciate ligament of a dog.", J Am Vet Med Assoc 131(12): 557-558.

GILBERT, T. W., SELLARO, T. L.u. BADYLAK, S. F. (2006):

"Decellularization of tissues and organs.", Biomaterials 27(19): 3675-3683.

GILBERT, T. W., STEWART-AKERS, A. M., SIMMONS-BYRD, A.u. BADYLAK, S. F. (2007):

"Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine Achilles tendon repair.", J Bone Joint Surg Am 89(3): 621-630.

GILBERTSON, E. M. (1975):

"Development of periarticular osteophytes in experimentally induced osteoarthritis in the dog. A study using microradiographic, microangiographic, and fluorescent bone-labelling techniques.", Ann Rheum Dis 34(1): 12-25.

GILLARD, G. C., REILLY, H. C., BELL-BOOTH, P. G.u. FLINT, M. H. (1979):

"The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon.", Connect Tissue Res 7(1): 37-46.

GOLDBERG, V. M., BURSTEIN, A.u. DAWSON, M. (1982):

"The influence of an experimental immune synovitis on the failure mode and strength of the rabbit anterior cruciate ligament.", J Bone Joint Surg Am 64(6): 900-906.

GORADIA, V. K., ROCHAT, M. C., GRANA, W. A., ROHRER, M. D.u. PRASAD, H. S. (2000):

"Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model.", Am J Knee Surg 13(3): 143-151.

GORDON, S.u. TAYLOR, P. R. (2005):

"Monocyte and macrophage heterogeneity.", Nat Rev Immunol 5(12): 953-964.

GORSCHESKY, O., KLAKOW, A., RIECHERT, K., PITZL, M.u. BECKER, R. (2005):

"Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results.", Am J Sports Med 33(8): 1202-1209.

GRANA, W. A., EGLE, D. M., MAHNKEN, R.U. GOODHART, C. W. (1994):

"An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model.", Am J Sports Med 22(3): 344-351.

GREGOIRE, F. M. (2001):

"Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell.", Exp Biol Med (Maywood) 226(11): 997-1002.

GREGOIRE, F. M., SMAS, C. M.u. SUL, H. S. (1998):

"Understanding adipocyte differentiation.", Physiol Rev 78(3): 783-809.

GREGORY, T.u. LANDREAU, P. (2008):

"[Meniscus and cartilaginous lesions. Influence of the delay between ACL injury and ligament reconstruction in 40-year-old patients].", Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot 94(6): 566-572.

GREIS, P. E., BURKS, R. T., BACHUS, K.u. LUKER, M. G. (2001):

"The influence of tendon length and fit on the strength of a tendon-bone tunnel complex. A biomechanical and histologic study in the dog.", Am J Sports Med 29(4): 493-497.

GROVES, E. W. H. (1919):

"The crucial ligaments of the knee-joint: Their function, rupture, and the operative treatment of the same.", British Journal of Surgery 7(28): 505-515.

GUEST, D. J., SMITH, M. R.u. ALLEN, W. R. (2008):

"Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study.", Equine Vet J 40(2): 178-181.

GUNGORMUS, C., KOLANKAYA, D.u. AYDIN, E. (2015):

"Histopathological and biomechanical evaluation of tenocyte seeded allografts on rat Achilles tendon regeneration.", Biomaterials 51: 108-118.

GUPTA, B. N., SUBRAMANIAN, K. N., BRINKER, W. O.u. GUPTA, A. N. (1971):

"Tensile strength of canine cranial cruciate ligaments.", Am J Vet Res 32(1): 183-190.

HALATA, Z., WAGNER, C.u. BAUMANN, K. I. (1999):

"Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (Lig. cruciatum anterius) of sheep.", Anat Rec 254(1): 13-21.

HANADA, K., DENNIS, J. E.u. CAPLAN, A. I. (1997):

"Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.", J Bone Miner Res 12(10): 1606-1614.

HANCOCK, C. M.u. RIEGGER-KRUGH, C. (2008):

"Modulation of pain in osteoarthritis: the role of nitric oxide.", Clin J Pain 24(4): 353-365.

HARADA, K., OIDA, S.u. SASAKI, S. (1988):

"Chondrogenesis and osteogenesis of bone marrow-derived cells by bone-inductive factor.", Bone 9(3): 177-183.

HARARI, J. (1996):

"Cranial cruciate ligament injury.", Compendium 18(11): 1185-1187.

HARASEN, G. (2003):

"Canine cranial cruciate ligament rupture in profile.", Can Vet J 44(10): 845-846.

HARASEN, G. L.u. SIMKO, E. (2008):

"Histiocytic sarcoma of the stifle in a dog with cranial cruciate ligament failure and TPLO treatment.", Vet Comp Orthop Traumatol 21(4): 375-377.

HARRISON, R. D.u. GRATZER, P. F. (2005):

"Effect of extraction protocols and epidermal growth factor on the cellular repopulation of decellularized anterior cruciate ligament allografts.", J Biomed Mater Res A 75(4): 841-854.

HARVEY, W. F., YANG, M., COOKE, T. D., SEGAL, N. A., LANE, N., LEWIS, C. E.u. FELSON, D. T. (2010):

"Association of leg-length inequality with knee osteoarthritis: a cohort study.", Ann Intern Med 152(5): 287-295.

HASSENPFUG, J., BLAETH, W.u. ROSE, D. (1985):

"[Tension characteristics of transplants replacing the anterior cruciate ligament, together with a contribution to the criticism of the "over-the-top" technic].", Unfallchirurg 88(4): 151-158.

HAUSELMANN, H. J., STEFANOVIC-RACIC, M., MICHEL, B. A.u. EVANS, C. H. (1998):

"Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases.", J Immunol 160(3): 1444-1448.

HAYASHI, K., FRANK, J. D., DUBINSKY, C., ZHENGLING, H., MARKEL, M. D., MANLEY, P. A.u. MUIR, P. (2003):

"Histologic changes in ruptured canine cranial cruciate ligament.", Vet Surg 32(3): 269-277.

HEFFRON, L. E.u. CAMPBELL, J. R. (1978):

"Morphology, histology and functional anatomy of the canine cranial cruciate ligament.", Vet Rec 102(13): 280-283.

HEGEMANN, N., KOHN, B., BRUNNBERG, L.u. SCHMIDT, M. F. (2002):

"Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders.", Osteoarthritis Cartilage 10(9): 714-721.

HODDE, J. P., BADYLAK, D. S. F.u. SHELBOURNE, K. D. (1997):

"The Effect of Range of Motion on Remodeling of Small Intestinal Submucosa (SIS) When Used as an Achilles Tendon Repair Material in the Rabbit.", Tissue Engineering 3(1): 27-37.

HOFFMANN, D. E., MILLER, J. M., OBER, C. P., LANZ, O. I., MARTIN, R. A.u. SHIRES, P. K. (2006):

"Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles.", Vet Comp Orthop Traumatol 19(4): 219-227.

HOHER, J., LIVESAY, G. A., MA, C. B., WITHROW, J. D., FU, F. H.u. WOO, S. L. (1999):

"Hamstring graft motion in the femoral bone tunnel when using titanium button/polyester tape fixation.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 7(4): 215-219.

HOHER, J., MOLLER, H. D.u. FU, F. H. (1998):

"Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction: fact or fiction?", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 6(4): 231-240.

HOHN, R. B. N., C.D. (1975):

„Surgical repair of ligamentous structures of the stifle joint. .“, M. J. BJORAB, Current techniques in small animal surgery. Lea & Febiger (Verlag), Philadelphia 470-497

HÖPFL, M. (2011):

„Vergleichende Ergebnisse der Tibia Plateau Leveling Osteotomy (TPLO) und Tibial Tuberosity Advancement (TTA) zur Behandlung der vorderen Kreuzbandruptur beim Hund. Eine Literaturstudie.“, Diss Vet.med., Ludwig-Maximilians-Universität. München.

HOPKINSON, A., SHANMUGANATHAN, V. A., GRAY, T., YEUNG, A. M., LOWE, J., JAMES, D. K.u. DUA, H. S. (2008):

"Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering.“, Tissue Eng Part C Methods 14(4): 371-381.

HUANG, J. I., BEANES, S. R., ZHU, M., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H.u. BENHAIM, P. (2002):

"Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells.“, Plast Reconstr Surg 109(3): 1033-1041.

HUDSON, T. W., ZAWKO, S., DEISTER, C., LUNDY, S., HU, C. Y., LEE, K.u. SCHMIDT, C. E. (2004):

"Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration.“, Tissue Eng 10(11-12): 1641-1651.

HULSE, D., BEALE, B.u. KERWIN, S. (2010):

"Second look arthroscopic findings after tibial plateau leveling osteotomy.“, Vet Surg 39(3): 350-354.

HULSE, D. A. S., D.H. (1985):

„The stifle joint.“, D. SLATTER, Textbook of small animal surgery., Elsevier Saunders (Verlag), Philadelphia 122-150

INGRAM, J. H., KOROSSIS, S., HOWLING, G., FISHER, J.u. INGHAM, E. (2007):

"The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction.“, Tissue Eng 13(7): 1561-1572.

ISHIBASHI, Y., RUDY, T. W., LIVESAY, G. A., STONE, J. D., FU, F. H.u. WOO, S. L. (1997):

"The effect of anterior cruciate ligament graft fixation site at the tibia on knee stability: evaluation using a robotic testing system.", Arthroscopy 13(2): 177-182.

IWATA, T., YAMATO, M., ZHANG, Z., MUKOBATA, S., WASHIO, K., ANDO, T., FEIJEN, J., OKANO, T.u. ISHIKAWA, I. (2010):

"Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use.", J Clin Periodontol 37(12): 1088-1099.

JACKSON, D. W., GROOD, E. S., COHN, B. T., ARNO CZKY, S. P., SIMON, T. M.u. CUMMINGS, J. F. (1991):

"The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats.", J Bone Joint Surg Am 73(2): 201-213.

JACKSON, D. W., GROOD, E. S., GOLDSTEIN, J. D., ROSEN, M. A., KURZWEIL, P. R., CUMMINGS, J. F.u. SIMON, T. M. (1993):

"A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model.", Am J Sports Med 21(2): 176-185.

JACKSON, D. W., GROOD, E. S., WILCOX, P., BUTLER, D. L., SIMON, T. M.u. HOLDEN, J. P. (1988):

"The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone-anterior cruciate ligament-bone allografts. An experimental study in goats.", Am J Sports Med 16(2): 101-105.

JACKSON, J. R., MINTON, J. A., HO, M. L., WEI, N.u. WINKLER, J. D. (1997):

"Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta.", J Rheumatol 24(7): 1253-1259.

JÄGER, M. (1970):

„Homologe Bindegewebs transplantation. Biomechanische Untersuchungen zur Frage der Transplantateignung verschieden strukturierter und konservierter Bindegewebs texturen in der orthopädischen Chirurgie.“, Aktuelle Orthopädie. George Thieme Verlag, Stuttgart

JAISWAL, N., HAYNESWORTH, S. E., CAPLAN, A. I.u. BRUDER, S. P. (1997):

"Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro.", J Cell Biochem 64(2): 295-312.

JANSSEN, R. P., VAN DER WIJK, J., FIEDLER, A., SCHMIDT, T., SALA, H. A.u. SCHEFFLER, S. U. (2011):

"Remodelling of human hamstring autografts after anterior cruciate ligament reconstruction.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 19(8): 1299-1306.

JO, C. H., LEE, Y. G., SHIN, W. H., KIM, H., CHAI, J. W., JEONG, E. C., KIM, J. E., SHIM, H., SHIN, J. S., SHIN, I. S., RA, J. C., OH, S.u. YOON, K. S. (2014):

"Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial.", Stem Cells 32(5): 1254-1266.

JOHANSSON, H., SJOLANDER, P.u. SOJKA, P. (1991):

"Receptors in the knee joint ligaments and their role in the biomechanics of the joint.", Crit Rev Biomed Eng 18(5): 341-368.

JOHNSTON, S. A. (1997):

"Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology.", Vet Clin North Am Small Anim Pract 27(4): 699-723.

JOHNSTONE, B., HERING, T. M., CAPLAN, A. I., GOLDBERG, V. M.u. YOO, J. U. (1998):

"In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.", Exp Cell Res 238(1): 265-272.

JOHNSTONE, B.u. YOO, J. U. (1999):

"Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair.", Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S156-162.

JU, Y. J., TOHYAMA, H., KONDO, E., YOSHIKAWA, T., MUNETA, T., SHINOMIYA, K.u. YASUDA, K. (2006):

"Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament in rabbits.", Am J Sports Med 34(1): 84-91.

JUNG, D. I., HA, J., KANG, B. T., KIM, J. W., QUAN, F. S., LEE, J. H., WOO, E. J.u. PARK, H. M. (2009):

"A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury.", J Neurol Sci 285(1-2): 67-77.

KADIYALA, S., YOUNG, R. G., THIEDE, M. A.u. BRUDER, S. P. (1997):

"Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro.", Cell Transplant 6(2): 125-134.

KANAYA, A., DEIE, M., ADACHI, N., NISHIMORI, M., YANADA, S.u. OCHI, M. (2007):

"Intra-articular injection of mesenchymal stromal cells in partially torn anterior cruciate ligaments in a rat model.", Arthroscopy 23(6): 610-617.

KANG, B. J., RYU, H. H., PARK, S. S., KOYAMA, Y., KIKUCHI, M., WOO, H. M., KIM, W. H.u. KWEON, O. K. (2012):

"Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects.", J Vet Sci 13(3): 299-310.

KARTUS, J., MOVIN, T.u. KARLSSON, J. (2001):

"Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts.", Arthroscopy 17(9): 971-980.

KASIMIR, M. T., RIEDER, E., SEEBACHER, G., SILBERHUMER, G., WOLNER, E., WEIGEL, G.u. SIMON, P. (2003):

"Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves.", Int J Artif Organs 26(5): 421-427.

KAWAMURA, S., YING, L., KIM, H. J., DYNBYL, C.u. RODEO, S. A. (2005):

"Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing.", J Orthop Res 23(6): 1425-1432.

KEANE, T. J., LONDONO, R., TURNER, N. J.u. BADYLAK, S. F. (2012):

"Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response.", Biomaterials 33(6): 1771-1781.

KEMPER, M., KOCH, D., BASS, M.u. INAUEN, N. (2011):

„[Revision operation rate after 214 tibial tuberosity advancements as therapy for anterior cruciate ligament tears in dogs].“,

KERGOSIEN, D. H., BARNHART, M. D., KEES, C. E., DANIELSON, B. G., BROURMAN, J. D., DEHOFF, W. D.u. SCHERTEL, E. R. (2004):

"Radiographic and clinical changes of the tibial tuberosity after tibial plateau leveling osteotomy.", Vet Surg 33(5): 468-474.

KESSLER, M. A., BEHREND, H., HENZ, S., STUTZ, G., RUKAVINA, A.u. KUSTER, M. S. (2008):

"Function, osteoarthritis and activity after ACL-rupture: 11 years follow-up results of conservative versus reconstructive treatment.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 16(5): 442-448.

KHEIR, E., STAPLETON, T., SHAW, D., JIN, Z., FISHER, J.u. INGHAM, E. (2011):

"Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering.", J Biomed Mater Res A 99(2): 283-294.

KIEFER, K. M., O'BRIEN, T. D., PLUHAR, E. G.u. CONZEMIUS, M. (2015):

"Canine adipose-derived stromal cell viability following exposure to synovial fluid from osteoarthritic joints.", Vet Rec Open 2(1): e000063.

KIM, S. E., POZZI, A., BANKS, S. A., CONRAD, B. P.u. LEWIS, D. D. (2010):

"Effect of cranial cruciate ligament deficiency, tibial plateau leveling osteotomy, and tibial tuberosity advancement on contact mechanics and alignment of the stifle in flexion.", Vet Surg 39(3): 363-370.

KIRKER, K. R., LUO, Y., NIELSON, J. H., SHELBY, J.u. PRESTWICH, G. D. (2002):

"Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing.", Biomaterials 23(17): 3661-3671.

KISIEL, A. H., MCDUFFEE, L. A., MASAOUD, E., BAILEY, T. R., ESPARZA GONZALEZ, B. P.u. NINO-FONG, R. (2012):

"Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum.", Am J Vet Res 73(8): 1305-1317.

KLEINER, J. B., AMIEL, D., HARWOOD, F. L.u. AKESON, W. H. (1989):

"Early histologic, metabolic, and vascular assessment of anterior cruciate ligament autografts.", J Orthop Res 7(2): 235-242.

KLEINER, J. B., AMIEL, D., ROUX, R. D.u. AKESON, W. H. (1986):

"Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft.", J Orthop Res 4(4): 466-474.

KOBAYASHI, S., BABA, H., UCHIDA, K., NEGORO, K., SATO, M., MIYAZAKI, T., NOMURA, E., MURAKAMI, K., SHIMIZUBATA, M.u. MEIR, A. (2006):

"Microvascular system of anterior cruciate ligament in dogs.", J Orthop Res 24(7): 1509-1520.

KRAEUTLER, M. J., BRAVMAN, J. T.u. MCCARTY, E. C. (2013):

"Bone-patellar tendon-bone autograft versus allograft in outcomes of anterior cruciate ligament reconstruction: a meta-analysis of 5182 patients.", Am J Sports Med 41(10): 2439-2448.

KRAUS, K. H.u. KIRKER-HEAD, C. (2006):

"Mesenchymal stem cells and bone regeneration.", Vet Surg 35(3): 232-242.

KRYCH, A. J., JACKSON, J. D., HOSKIN, T. L.u. DAHM, D. L. (2008):

"A meta-analysis of patellar tendon autograft versus patellar tendon allograft in anterior cruciate ligament reconstruction.", Arthroscopy 24(3): 292-298.

KRYGER, G. S., CHONG, A. K., COSTA, M., PHAM, H., BATES, S. J.u. CHANG, J. (2007):

"A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering.", J Hand Surg Am 32(5): 597-605.

KURODA, R., KUROSAKA, M., YOSHIYA, S.u. MIZUNO, K. (2000):

"Localization of growth factors in the reconstructed anterior cruciate ligament: immunohistological study in dogs.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 8(2): 120-126.

KUSSWETTER, W.u. REFIOR, H. J. (1985):

"[Comparative light and scanning electron microscopy studies of the morphologic structure of ligament insertions into the bone].", Z Orthop Ihre Grenzgeb 123(5): 876-879.

LAFEVER, S., MILLER, N. A., STUBBS, W. P., TAYLOR, R. A.u. BOUDRIEAU, R. J. (2007):

"Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs.", Vet Surg 36(6): 573-586.

LAMPADIUS, E. W. (1964):

„Vergleichende klinische und histologische Untersuchungen der Heilvorgänge nach Transplantation synthetischer und homioplastischer Bänder bei der Ruptur der Ligg. decussata des Hundes mit der Operationsmethode nach Westhues.“, Diss Vet. Med., Justus-Liebig-Universität. Gießen.

LAROS, G. S., TIPTON, C. M.u. COOPER, R. R. (1971):

"Influence of physical activity on ligament insertions in the knees of dogs.", J Bone Joint Surg Am 53(2): 275-286.

LAZAR, T. P., BERRY, C. R., DEHAAN, J. J., PECK, J. N.u. CORREA, M. (2005):

"Long-term radiographic comparison of tibial plateau leveling osteotomy versus extracapsular stabilization for cranial cruciate ligament rupture in the dog.", Vet Surg 34(2): 133-141.

LEASK, A.u. ABRAHAM, D. J. (2004):

"TGF-beta signaling and the fibrotic response.", FASEB J 18(7): 816-827.

LECOEUR, L.u. OUHAYOUN, J. P. (1997):

"In vitro induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells.", Biomaterials 18(14): 989-993.

LEE, A. S., ELLMAN, M. B., YAN, D., KROIN, J. S., COLE, B. J., VAN WIJNEN, A. J.u. IM, H. J. (2013):

"A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain.", Gene 527(2): 440-447.

LEE, E. H.u. HUI, J. H. (2006):

"The potential of stem cells in orthopaedic surgery.", J Bone Joint Surg Br 88(7): 841-851.

LEE, K. S., NAH, J. J., LEE, B. C., LEE, H. T., LEE, H. S., SO, B. J.u. CHA, S. H. (2013):

"Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion.", Res Vet Sci 94(1): 144-151.

LEHR, E. J., RAYAT, G. R., CHIU, B., CHURCHILL, T., MCGANN, L. E., COE, J. Y.u. ROSS, D. B. (2011):

"Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches.", J Thorac Cardiovasc Surg 141(4): 1056-1062.

LEIGHTON, R. (1961):

"Repair of ruptured cruciate ligament with whole thickness skin.", Small Anim Clin 1: 246.

LEO, A. J.u. GRANDE, D. A. (2006):

"Mesenchymal stem cells in tissue engineering.", Cells Tissues Organs 183(3): 112-122.

LEONHARDT, H. (1990):

„Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.“, Springer (Verlag), New York 45-47

LIEBICH, H. G. (2010):

„Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.“, Schattauer Verlag, Stuttgart

LITTLE, D., GUILAK, F.u. RUCH, D. S. (2010):

"Ligament-derived matrix stimulates a ligamentous phenotype in human adipose-derived stem cells.", Tissue Eng Part A 16(7): 2307-2319.

LIU, Y., RAMANATH, H. S.u. WANG, D. A. (2008):

"Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies.", Trends Biotechnol 26(4): 201-209.

LOBENHOFFER, P.u. TSCHERNE, H. (1993):

"[Rupture of the anterior cruciate ligament. Current status of treatment].", Unfallchirurg 96(3): 150-168.

LOEFFLER, K. (1964):

„Kreuzbandverletzungen im Kniegelenk des Hundes: Anatomie, Klinik und experimentelle Untersuchungen.“, Habil, Tierärztliche Hochschule. Hannover.

LOHAN, A., STOLL, C., ALBRECHT, M., DENNER, A., JOHN, T., KRUGER, K., ERTEL, W.u. SCHULZE-TANZIL, G. (2013):

"Human hamstring tenocytes survive when seeded into a decellularized porcine Achilles tendon extracellular matrix.", Connect Tissue Res 54(4-5): 305-312.

LOHMANDER, L. S., OSTENBERG, A., ENGLUND, M.u. ROOS, H. (2004):

"High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury.", Arthritis Rheum 50(10): 3145-3152.

LONGO, U. G., LAMBERTI, A., PETRILLO, S., MAFFULLI, N.u. DENARO, V. (2012):

"Scaffolds in Tendon Tissue Engineering.", Stem Cells Int. 2012; 2012: 517165.

LOUGHLIN, J. (2011):

"Osteoarthritis year 2010 in review: genetics.", Osteoarthritis Cartilage 19(4): 342-345.

LUMPKINS, S. B., PIERRE, N.u. MCFETRIDGE, P. S. (2008):

"A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc.", Acta Biomater 4(4): 808-816.

LUTOLF, M. P., GILBERT, P. M.u. BLAU, H. M. (2009):

"Designing materials to direct stem-cell fate.", Nature 462(7272): 433-441.

LÜTZNER, J.u. BOTTESI, M. (2009):

"Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes.", Trauma und Berufskrankheit 11(S2): 136-139.

LYNN, A. K., YANNAS, I. V.u. BONFIELD, W. (2004):

"Antigenicity and immunogenicity of collagen.", J Biomed Mater Res B Appl Biomater 71(2): 343-354.

MANN, F. W.-M., C; TANGER, CH (1988):

"Manual goniometric measurement of the canine pelvic limb ", J Am Vet Med Assoc(24): 189.

MARKOLF, K., MENSCH, J.u. AMSTUTZ, H. (1976):

"Stiffness and laxity of the knee--the contributions of the supporting structures. A quantitative in vitro study.", The Journal of Bone & Joint Surgery 58(5): 583-594.

MARSHALL, J. L. (1969):

"Periarticular osteophytes. Initiation and formation in the knee of the dog.", Clin Orthop Relat Res 62: 37-47.

MARSHALL, J. L.u. OLSSON, S. E. (1971):

"Instability of the knee. A long-term experimental study in dogs.", J Bone Joint Surg Am 53(8): 1561-1570.

MARTINELLO, T., BRONZINI, I., VOLPIN, A., VINDIGNI, V., MACCATROZZO, L., CAPORALE, G., BASSETTO, F.u. PATRUNO, M. (2014):

"Successful recellularization of human tendon scaffolds using adipose-derived mesenchymal stem cells and collagen gel.", J Tissue Eng Regen Med 8(8): 612-619.

MATIS, U.u. SCHAFFER, E. (1973):

"[Lyophilized human dura as a replacement for the crucial ligament in dogs].", Berl Münch Tierarztl Wochenschr 86(13): 245-252.

MCCURNIN, D. M., PEARSON, P. T.u. WASS, W. M. (1971):

"Clinical and pathologic evaluation of ruptured cranial cruciate ligament repair in the dog.", Am J Vet Res 32(10): 1517-1524.

MCDEVITT, C. A.u. MUIR, H. (1976):

"Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog.", J Bone Joint Surg Br 58(1): 94-101.

MCMURRAY, R. J., GADEGAARD, N., TSIMBOURI, P. M., BURGESS, K. V., MCNAMARA, L. E., TARE, R., MURAWSKI, K., KINGHAM, E., OREFFO, R. O.u. DALBY, M. J. (2011):

"Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency.", Nat Mater 10(8): 637-644.

MENSCHIK, A. (1974):

"[Mechanics of the knee-joint. 1 (author's transl)].", Z Orthop Ihre Grenzgeb 112(3): 481-495.

MEUFFELS, D. E., FAVEJEE, M. M., VISSERS, M. M., HEIJBOER, M. P., REIJMAN, M.u. VERHAAR, J. A. (2009):

"Ten year follow-up study comparing conservative versus operative treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A matched-pair analysis of high level athletes.", Br J Sports Med 43(5): 347-351.

MEYER, S. R., CHIU, B., CHURCHILL, T. A., ZHU, L., LAKEY, J. R.u. ROSS, D. B. (2006):

"Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat.", J Biomed Mater Res A 79(2): 254-262.

MOLLOY, T., WANG, Y.u. MURRELL, G. (2003):

"The roles of growth factors in tendon and ligament healing.", Sports Med 33(5): 381-394.

MONAHAN, J. J., GRIGG, P., PAPPAS, A. M., LECLAIR, W. J., MARKS, T., FOWLER, D. P.u. SULLIVAN, T. J. (1984):

"In vivo strain patterns in the four major canine knee ligaments.", J Orthop Res 2(4): 408-418.

MONTAVON, P. D., DM; Tepic, S (2002). Advancement of the tibial tuberosity for the treatment of cranial cruciate ligament deficient stifle. 1st World Orthopaedic Veterinary Congress. Munich, Germany: 152.

MOORE, K. W.u. READ, R. A. (1995):

"Cranial cruciate ligament rupture in the dog--a retrospective study comparing surgical techniques.", Aust Vet J 72(8): 281-285.

MOSSER, D. M. (2003):

"The many faces of macrophage activation.", J Leukoc Biol 73(2): 209-212.

MOUSAVI NIRI, N., JABERIPOUR, M., RAZMKHAH, M., GHADERI, A.u. HABIBAGHI, M. (2009):

"Mesenchymal stem cells do not suppress lymphoblastic leukemic cell line proliferation.", Iran J Immunol 6(4): 186-194.

MUIR, P. (2010):

„Advances in The Canine Cranial Cruciate Ligament.“, Wiley Blackwell (Verlag), New York

MUIR, P., DANOVA, N. A., ARGYLE, D. J., MANLEY, P. A.u. HAO, Z. (2005):

"Collagenolytic protease expression in cranial cruciate ligament and stifle synovial fluid in dogs with cranial cruciate ligament rupture.", Vet Surg 34(5): 482-490.

MUIR, P., OLDENHOFF, W. E., HUDSON, A. P., MANLEY, P. A., SCHAEFER, S. L., MARKEL, M. D.u. HAO, Z. (2007):

"Detection of DNA from a range of bacterial species in the knee joints of dogs with inflammatory knee arthritis and associated degenerative anterior cruciate ligament rupture.", Microb Pathog 42(2-3): 47-55.

MÜLLER, A. (1969):

"Topographisch-anatomische Grundlagen zu den Kniegelenksoperationen des Hundes.", Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A 16(9): 785-807.

MÜLLER, A., SEIDE, K., FUCHS, S., WURM, M.u. JÜRGENS, C. (2007):

"Vordere Kreuzbandersatzplastik.", Trauma und Berufskrankheit 9(2): 122-127.

MUNETTA, T., TAKAKUDA, K.u. YAMAMOTO, H. (1997):

"Intercondylar notch width and its relation to the configuration and cross-sectional area of the anterior cruciate ligament. A cadaveric knee study.", Am J Sports Med 25(1): 69-72.

MURPHY, J. M., FINK, D. J., HUNZIKER, E. B.u. BARRY, F. P. (2003):

"Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis.", Arthritis Rheum 48(12): 3464-3474.

MURPHY, L., SCHWARTZ, T. A., HELMICK, C. G., RENNER, J. B., TUDOR, G., KOCH, G., DRAGOMIR, A., KALSBECK, W. D., LUTA, G.u. JORDAN, J. M. (2008):

"Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis.", Arthritis Rheum 59(9): 1207-1213.

MURRAY, M. M., MARTIN, S. D., MARTIN, T. L.u. SPECTOR, M. (2000):

"Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture.", J Bone Joint Surg Am 82-A(10): 1387-1397.

MUSSENER, A., FUNA, K., KLEINAU, S.u. KLARESKOG, L. (1997):

"Dynamic expression of transforming growth factor-betas (TGF-beta) and their type I and type II receptors in the synovial tissue of arthritic rats.", Clin Exp Immunol 107(1): 112-119.

NAGASE, H., VISSE, R.u. MURPHY, G. (2006):

"Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.", Cardiovasc Res 69(3): 562-573.

NEBELUNG, W., BECKER, R., MERKEL, M.u. ROPKE, M. (1998):

"Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with semitendinosus tendon using Endobutton fixation on the femoral side.", Arthroscopy 14(8): 810-815.

NEUPANE, M., CHANG, C. C., KIUPEL, M.u. YUZBASIYAN-GURKAN, V. (2008):

"Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells.", Tissue Eng Part A 14(6): 1007-1015.

NG, G. Y., OAKES, B. W., DEACON, O. W., MCLEAN, I. D.u. EYRE, D. R. (1996):

"Long-term study of the biochemistry and biomechanics of anterior cruciate ligament-patellar tendon autografts in goats.", J Orthop Res 14(6): 851-856.

NG, G. Y., OAKES, B. W., DEACON, O. W., MCLEAN, I. D.u. LAMPARD, D. (1995):

"Biomechanics of patellar tendon autograft for reconstruction of the anterior cruciate ligament in the goat: three-year study.", J Orthop Res 13(4): 602-608.

NICKEL, R., FREWEIN, J., SCHUMMER, A.u. SEIFERLE, E. (1992):

„Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 1: Bewegungsapparat.“, Paul Parey Verlag, Berlin

NIEBAUER, G. W.u. MENZEL, E. J. (1982):

"Immunological changes in canine cruciate ligament rupture.", Res Vet Sci 32(2): 235-241.

NIEMEYER, P., SZALAY, K., LUGINBUHL, R., SUDKAMP, N. P.u. KASTEN, P. (2010):

"Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model.", Acta Biomater 6(3): 900-908.

NIKOLAOU, P. K., SEABER, A. V., GLISSON, R. R., RIBBECK, B. M.u. BASSETT, F. H., 3rd (1986):

"Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique.", Am J Sports Med 14(5): 348-360.

NING, L. J., ZHANG, Y., CHEN, X. H., LUO, J. C., LI, X. Q., YANG, Z. M.u. QIN, T. W. (2012):

"Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering.", J Biomed Mater Res A 100(6): 1448-1456.

NING, L. J., ZHANG, Y. J., ZHANG, Y., QING, Q., JIANG, Y. L., YANG, J. L., LUO, J. C.u. QIN, T. W. (2015):

"The utilization of decellularized tendon slices to provide an inductive microenvironment for the proliferation and tenogenic differentiation of stem cells.", Biomaterials 52: 539-550.

NOYES, F. R. (1977):

"Functional properties of knee ligaments and alterations induced by immobilization: a correlative biomechanical and histological study in primates.", Clin Orthop Relat Res(123): 210-242.

NOYES, F. R., TORVIK, P. J., HYDE, W. B.u. DELUCAS, J. L. (1974):

"Biomechanics of ligament failure. II. An analysis of immobilization, exercise, and reconditioning effects in primates.", J Bone Joint Surg Am 56(7): 1406-1418.

O'CONNOR, B. L.u. WOODBURY, P. (1982):

"The primary articular nerves to the dog knee.", J Anat 134(Pt 3): 563-572.

O'DONOGHUE, D. H., FRANK, G. R., JETER, G. L., JOHNSON, W., ZEIDERS, J. W.u. KENYON, R. (1971):

"Repair and reconstruction of the anterior cruciate ligament in dogs. Factors influencing long-term results.", J Bone Joint Surg Am 53(4): 710-718.

OCK, S. A., MAENG, G. H., LEE, Y. M., KIM, T. H., KUMAR, B. M., LEE, S. L.u. RHO, G. J. (2013):

"Donor-matched functional and molecular characterization of canine mesenchymal stem cells derived from different origins.", Cell Transplant 22(12): 2311-2321.

ODENSTEN, M.u. GILLQUIST, J. (1985):

"Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction.", J Bone Joint Surg Am 67(2): 257-262.

OHGUSHI, H.u. CAPLAN, A. I. (1999):

"Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering.", J Biomed Mater Res 48(6): 913-927.

OHGUSHI, H., DOHI, Y., TAMAI, S.u. TABATA, S. (1993):

"Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics.", J Biomed Mater Res 27(11): 1401-1407.

OHGUSHI, H., KOTOBUKI, N., FUNAOKA, H., MACHIDA, H., HIROSE, M., TANAKA, Y.u. TAKAKURA, Y. (2005):

"Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis.", Biomaterials 26(22): 4654-4661.

OMAE, H., SUN, Y. L., AN, K. N., AMADIO, P. C.u. ZHAO, C. (2012):

"Engineered tendon with decellularized xenotendon slices and bone marrow stromal cells: an in vivo animal study.", J Tissue Eng Regen Med 6(3): 238-244.

ORCIANI, M., MARIGGIO, M. A., MORABITO, C., DI BENEDETTO, G.u. DI PRIMIO, R. (2010):

"Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skin-derived mesenchymal stem cells.", Skin Pharmacol Physiol 23(3): 124-132.

PAATSAMA, S. (1952):

„Ligament injuries in the canine stifle joint : a clinical and experimental study.“, Thesis. Helsinki.

PAATSAMA, S. (1981):

"Genu valgum, ein Beitrag zur Klinik des Kniegelenkes beim Hund.", Kleintierpraxis(26): 181-186.

PACCHIANA, P. D., MORRIS, E., GILLINGS, S. L., JESSEN, C. R.u. LIPOWITZ, A. J. (2003):

"Surgical and postoperative complications associated with tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 397 cases (1998-2001).", J Am Vet Med Assoc 222(2): 184-193.

PAPAGEORGIU, C. D., MA, C. B., ABRAMOWITZ, S. D., CLINEFF, T. D.u. WOO, S. L. (2001):

"A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model.", Am J Sports Med 29(5): 620-626.

PARK, H. B., KOH, M., CHO, S. H., HUTCHINSON, B.u. LEE, B. (2005):

"Mapping the rat somatosensory pathway from the anterior cruciate ligament nerve endings to the cerebrum.", J Orthop Res 23(6): 1419-1424.

PARK, J. S., WOO, D. G., SUN, B. K., CHUNG, H. M., IM, S. J., CHOI, Y. M., PARK, K., HUH, K. M.u. PARK, K. H. (2007):

"In vitro and in vivo test of PEG/PCL-based hydrogel scaffold for cell delivery application.", J Control Release 124(1-2): 51-59.

PATEL, N., SOLANKI, E., PICCIANI, R., CAVETT, V., CALDWELL-BUSBY, J. A.u. BHATTACHARYA, S. K. (2008):

"Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics.", Proteomics 8(5): 1055-1070.

PAUWELS, F. (1960):

"[A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure].", Z Anat Entwicklungsgesch 121: 478-515.

PAZZANO, D., MERCIER, K. A., MORAN, J. M., FONG, S. S., DIBIASIO, D. D., RULFS, J. X., KOHLES, S. S.u. BONASSAR, L. J. (2000):

"Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture.", Biotechnol Prog 16(5): 893-896.

PEARSON, P. T. (1971):

"Lembert suture technique to surgically correct ruptured cruciate ligaments.", J Am Anim Hosp Assoc(7): 1-13.

PETERSEN, T. H., CALLE, E. A., ZHAO, L., LEE, E. J., GUI, L., RAREDON, M. B., GAVRILOV, K., YI, T., ZHUANG, Z. W., BREUER, C., HERZOG, E.u. NIKLASON, L. E. (2010):

"Tissue-engineered lungs for in vivo implantation.", Science 329(5991): 538-541.

PETERSEN, W.u. TILLMANN, B. (2002):

"[Anatomy and function of the anterior cruciate ligament].", Orthopade 31(8): 710-718.

PETERSEN, W., WILDEMANN, B., PUFER, T., RASCHKE, M.u. SCHMIDMAIER, G. (2004):

"The angiogenic peptide pleiotrophin (PTN/HB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats.", Arch Orthop Trauma Surg 124(9): 603-607.

PETERSON, R. K., SHELTON, W. R.u. BOMBOY, A. L. (2001):

"Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction: A 5-year follow-up.", Arthroscopy 17(1): 9-13.

PITTINGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S.u. MARSHAK, D. R. (1999):

"Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.", Science 284(5411): 143-147.

POND, M. J.u. CAMPBELL, J. R. (1972):

"The canine stifle joint. I. Rupture of the anterior cruciate ligament. An assessment of conservative and surgical treatment.", J Small Anim Pract 13(1): 1-10.

POND, M. J.u. NUKI, G. (1973):

"Experimentally-induced osteoarthritis in the dog.", Ann Rheum Dis 32(4): 387-388.

POWERS, M. Y., MARTINEZ, S. A., LINCOLN, J. D., TEMPLE, C. J.u. ARNAIZ, A. (2005):

"Prevalence of cranial cruciate ligament rupture in a population of dogs with lameness previously attributed to hip dysplasia: 369 cases (1994-2003).", J Am Vet Med Assoc 227(7): 1109-1111.

PRASERTSUNG, I., KANOKPANONT, S., BUNAPRASERT, T., THANAKIT, V.u. DAMRONGSAKKUL, S. (2008):

"Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique.", J Biomed Mater Res B Appl Biomater 85(1): 210-219.

PRIDDY, N. H., TOMLINSON, J. L., DODAM, J. R.u. HORNBOSTEL, J. E. (2003):

"Complications with and owner assessment of the outcome of tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament rupture in dogs: 193 cases (1997-2001).", J Am Vet Med Assoc 222(12): 1726-1732.

PRIDGEN, B. C., WOON, C. Y., KIM, M., THORFINN, J., LINDSEY, D., PHAM, H.u. CHANG, J. (2011):

"Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility.", Tissue Eng Part C Methods 17(8): 819-828.

PROCKOP, D. J. (1998):

"Marrow stromal cells as stem cells for continual renewal of nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene therapy.", J Cell Biochem Suppl 30-31: 284-285.

PRODROMOS, C., JOYCE, B.u. SHI, K. (2007):

"A meta-analysis of stability of autografts compared to allografts after anterior cruciate ligament reconstruction.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 15(7): 851-856.

PUHL, W., Dustmann, H. O., Schulitz, K. P. (1971):

"Knorpelveränderungen bei experimentellen Hämarthros.", Z. Orthop. 109(3): 475.

QIN, T. W., SUN, Y. L., THORESON, A. R., STEINMANN, S. P., AMADIO, P. C., AN, K. N.u. ZHAO, C. (2015):

"Effect of mechanical stimulation on bone marrow stromal cell-seeded tendon slice constructs: a potential engineered tendon patch for rotator cuff repair.", Biomaterials 51: 43-50.

QU-PETERSEN, Z., DEASY, B., JANKOWSKI, R., IKEZAWA, M., CUMMINS, J., PRUCHNIC, R., MYTINGER, J., CAO, B., GATES, C., WERNIG, A.u. HUARD, J. (2002):

"Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration.", J Cell Biol 157(5): 851-864.

RAHLFS, I.u. FEHR, M. (1986):

"Erfolgsbeurteilung von 182 Kreuzbandoperationen beim Hund unter Berücksichtigung der Situation einer Ausbildungsklinik.", Kleintierprax 19: 152-165.

RALPHS, S. C.u. WHITNEY, W. O. (2002):

"Arthroscopic evaluation of menisci in dogs with cranial cruciate ligament injuries: 100 cases (1999-2000).", J Am Vet Med Assoc 221(11): 1601-1604.

RATHOR, S. (1960):

"Experimental studies and tissue transplants for repair of the canine anterior cruciate ligament.", MSU Vet 20:128.

REESE, S. (1995):

„Untersuchungen am intakten und rupturierten Ligamentum cruciatum craniale des Hundes.“, Diss Vet. Med., Freie Universität. Berlin.

REIF, U.u. PROBST, C. W. (2003):

"Comparison of tibial plateau angles in normal and cranial cruciate deficient stifles of Labrador retrievers.", Vet Surg 32(4): 385-389.

REING, J. E., BROWN, B. N., DALY, K. A., FREUND, J. M., GILBERT, T. W., HSIONG, S. X., HUBER, A., KULLAS, K. E., TOTTEY, S., WOLF, M. T.u. BADYLAK, S. F. (2010):

"The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds.", Biomaterials 31(33): 8626-8633.

REMEDIOS, A. (1999):

"Bone and bone healing.", Vet Clin North Am Small Anim Pract 29(5): 1029-1044, v.

REY, J., FISCHER, M. S.u. BOTTCHEP, P. (2014):

"Sagittal joint instability in the cranial cruciate ligament insufficient canine stifle. Caudal slippage of the femur and not cranial tibial subluxation.", Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 42(3): 151-156.

RICCHETTI, E. T., AURORA, A., IANNOTTI, J. P.u. DERWIN, K. A. (2012):

"Scaffold devices for rotator cuff repair.", J Shoulder Elbow Surg 21(2): 251-265.

RICHARDS, M., HUIBREGTSE, B. A., CAPLAN, A. I., GOULET, J. A.u. GOLDSTEIN, S. A. (1999):

"Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction.", J Orthop Res 17(6): 900-908.

RICHETTE, P., POITOU, C., GARNERO, P., VICAUT, E., BOUILLOT, J. L., LACORTE, J. M., BASDEVANT, A., CLEMENT, K., BARDIN, T.u. CHEVALIER, X. (2011):

"Benefits of massive weight loss on symptoms, systemic inflammation and cartilage turnover in obese patients with knee osteoarthritis.", Ann Rheum Dis 70(1): 139-144.

RICKARD, D. J., SULLIVAN, T. A., SHENKER, B. J., LEBOY, P. S.u. KAZHDAN, I. (1994):

"Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2.", Dev Biol 161(1): 218-228.

ROBINS, G. M. (1990):

„The canine stifle joint.“, W. WHITTICK, Canine orthopedics., Lea u. Febiger, Philadelphia 693-760

RODEO, S. A., ARNOCKY, S. P., TORZILLI, P. A., HIDAHA, C.u. WARREN, R. F. (1993):

"Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog.", J Bone Joint Surg Am 75(12): 1795-1803.

ROOS, H., ADALBERTH, T., DAHLBERG, L.u. LOHMANDER, L. S. (1995):

"Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age.", Osteoarthritis Cartilage 3(4): 261-267.

ROOS, H., LAUREN, M., ADALBERTH, T., ROOS, E. M., JONSSON, K.u. LOHMANDER, L. S. (1998):

"Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls.", Arthritis Rheum 41(4): 687-693.

ROUGRAFF, B., SHELBOURNE, K. D., GERTH, P. K.u. WARNER, J. (1993):

"Arthroscopic and histologic analysis of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction.", Am J Sports Med 21(2): 277-284.

SALOMON, F. V., GEYER, H.u. GILLE, U. (2005):

„Anatomie für die Tiermedizin.“, Enke Verlag, Stuttgart

SÁNCHEZ, M., ANITUA, E., AZOFRA, J., PRADO, R., MURUZABAL, F.u. ANDIA, I. (2010):

"Ligamentization of Tendon Grafts Treated With an Endogenous Preparation Rich in Growth Factors: Gross Morphology and Histology.", Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery 26(4): 470-480.

SCAPINELLI, R. (1968):

"Studies on the vasculature of the human knee joint.", Acta Anat (Basel) 70(3): 305-331.

SCARRITT, M. E., PASHOS, N. C.u. BUNNELL, B. A. (2015):

"A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs.", Front Bioeng Biotechnol 3: 43.

SCHÄFER, H. J. (1991):

„Vergleichende Untersuchung zur chirurgischen Behandlung des vorderen Kreuzbandes beim Hund mit der modifizierten Over-the-top und der Fibulakopfversetzungstechnik.“, Diss Vet. Med., Tierärztliche Hochschule Hannover.

SCHEFFLER, S. (2010):

„Der Einfluss allogenen Spendergewebes und deren Sterilisationsverfahren auf die biologischen Umbauprozesse und biomechanischen Eigenschaften von Ersatzplastiken des vorderen Kreuzbandes.“, Habil, Charité-Universitätsmedizin, medizinische Fakultät. Berlin.

SCHEFFLER, S., UNTERHAUSER, F., KEIL, J.u. WEILER, A. (2006). Comparison of tendon-to-bone- healing after soft-tissue autograft and allograft ACL reconstruction in a sheep model. 12th ESSKA 2000 congress, Innsbruck, Austria.

SCHEFFLER, S. U., SCHMIDT, T., GANGEY, I., DUSTMANN, M., UNTERHAUSER, F.u. WEILER, A. (2008):

"Fresh-frozen free-tendon allografts versus autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: delayed remodeling and inferior mechanical function during long-term healing in sheep.", Arthroscopy 24(4): 448-458.

SCHEFFLER, S. U., SUDKAMP, N. P., GOCKENJAN, A., HOFFMANN, R. F.u. WEILER, A. (2002):

"Biomechanical comparison of hamstring and patellar tendon graft anterior cruciate ligament reconstruction techniques: The impact of fixation level and fixation method under cyclic loading.", Arthroscopy 18(3): 304-315.

SCHEFFLER, S. U., UNTERHAUSER, F. N.u. WEILER, A. (2008):

"Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 16(9): 834-842.

SCHNEIDER, H. (1956):

"Zur Struktur der Sehnenansatzzonen.", Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte 119(5): 431-456.

SCHNELL, E. M. (1986):

„Kreuzbandersatz beim Hund mit an der Tuberositas tibiae gestielter Faszie und lateralem Drittel des Ligamentum patellae.“, Diss Vet. Med., Ludwig-Maximilians-Universität München.

SCHULZE-TANZIL, G., AL-SADI, O., ERTEL, W.u. LOHAN, A. (2012):

"Decellularized tendon extracellular matrix-a valuable approach for tendon reconstruction?", Cells 1(4): 1010-1028.

SCHWEDE, M., REY, J.u. BOTTCHEP, P. (2018):

"In vivo fluoroscopic kinematography of cranio-caudal stifle stability after tibial tuberosity advancement (TTA): a retrospective case series of 10 stifles.", Open Vet J 8(3): 295-304.

SCRANTON, P. E., Jr., LANZER, W. L., FERGUSON, M. S., KIRKMAN, T. R.u. PFLASTER, D. S. (1998):

"Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization.", Arthroscopy 14(7): 702-716.

SHARMA, L., SONG, J., DUNLOP, D., FELSON, D., LEWIS, C. E., SEGAL, N., TORNER, J., COOKE, T. D., HIETPAS, J., LYNCH, J.u. NEVITT, M. (2010):

"Varus and valgus alignment and incident and progressive knee osteoarthritis.", Ann Rheum Dis 69(11): 1940-1945.

SHI, S.u. GRONTHOS, S. (2003):

"Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp.", J Bone Miner Res 18(4): 696-704.

SHINO, K.u. HORIBE, S. (1991):

"Experimental ligament reconstruction by allogeneic tendon graft in a canine model.", Acta Orthop Belg 57 Suppl 2: 44-53.

SHINO, K., KAWASAKI, T., HIROSE, H., GOTOH, I., INOUE, M.u. ONO, K. (1984):

"Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog.", J Bone Joint Surg Br 66(5): 672-681.

SHIRES, P. K. (1993):

"Intracapsular repairs for cranial cruciate ligament ruptures.", Vet Clin North Am Small Anim Pract 23(4): 761-776.

SINGLETON, W. B. (1969):

"Observations based upon the surgical repair of 106 cases of anterior cruciate ligament rupture.", J Small Anim Pract 10(5): 269-278.

SKINNER, O. T., KIM, S. E., LEWIS, D. D.u. POZZI, A. (2013):

"In vivo femorotibial subluxation during weight-bearing and clinical outcome following tibial tuberosity advancement for cranial cruciate ligament insufficiency in dogs.", Vet J 196(1): 86-91.

SLOCUM, B.u. DEVINE, T. (1984):

"Cranial tibial wedge osteotomy: a technique for eliminating cranial tibial thrust in cranial cruciate ligament repair.", J Am Vet Med Assoc 184(5): 564-569.

SMITH, G. K.u. TORG, J. S. (1985):

"Fibular head transposition for repair of cruciate-deficient stifle in the dog.", J Am Vet Med Assoc 187(4): 375-383.

SMITH, R. L., DONLON, B. S., GUPTA, M. K., MOHTAI, M., DAS, P., CARTER, D. R., COOKE, J., GIBBONS, G., HUTCHINSON, N.u. SCHURMAN, D. J. (1995):

"Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro.", J Orthop Res 13(6): 824-831.

SOLCHAGA, L. A., YOO, J. U., LUNDBERG, M., DENNIS, J. E., HUIBREGTSE, B. A., GOLDBERG, V. M.u. CAPLAN, A. I. (2000):

"Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects.", J Orthop Res 18(5): 773-780.

SOLOMONOW, M., BARATTA, R., ZHOU, B. H., SHOJI, H., BOSE, W., BECK, C.u. D'AMBROSIA, R. (1987):

"The synergistic action of the anterior cruciate ligament and thigh muscles in maintaining joint stability.", Am J Sports Med 15(3): 207-213.

SONNENSCHNEIN, A. (1951):

"Die Evolution des Kniegelenkes innerhalb der Wirbeltierreihe.", Acta Anat (Basel) 13: 288-328.

SPINDLER, K. P., ANDRISH, J. T., MILLER, R. R., TSUJIMOTO, K.u. DIZ, D. I. (1996):

"Distribution of cellular repopulation and collagen synthesis in a canine anterior cruciate ligament autograft.", J Orthop Res 14(3): 384-389.

SPRENG, D., SIGRIST, N., JUNGI, T., BUSATO, A., LANG, J., PFISTER, H.u. SCHAWALDER, P. (2000):

"Nitric oxide metabolite production in the cranial cruciate ligament, synovial membrane, and articular cartilage of dogs with cranial cruciate ligament rupture.", Am J Vet Res 61(5): 530-536.

STAPLETON, T. W., INGRAM, J., KATTA, J., KNIGHT, R., KOROSSIS, S., FISHER, J.u. INGHAM, E. (2008):

"Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering.", Tissue Eng Part A 14(4): 505-518.

STAUFFER, K. D., TUTTLE, T. A., ELKINS, A. D., WEHRENBURG, A. P.u. CHARACTER, B. J. (2006):

"Complications associated with 696 tibial plateau leveling osteotomies (2001-2003).", J Am Anim Hosp Assoc 42(1): 44-50.

STEIN, S.u. SCHMOECKEL, H. (2008):

"Short-term and eight to 12 months results of a tibial tuberosity advancement as treatment of canine cranial cruciate ligament damage.", J Small Anim Pract 49(8): 398-404.

STEINBERG, E. J., PRATA, R. G., PALAZZINI, K.u. BROWN, D. C. (2011):

"Tibial tuberosity advancement for treatment of CrCL injury: complications and owner satisfaction.", J Am Anim Hosp Assoc 47(4): 250-257.

SURESHBABU, A., OKAJIMA, H., YAMANAKA, D., SHASTRI, S., TONNER, E., RAE, C., SZYMANOWSKA, M., SHAND, J. H., TAKAHASHI, S., BEATTIE, J., ALLAN, G. J.u. FLINT, D. J. (2009):

"IGFBP-5 induces epithelial and fibroblast responses consistent with the fibrotic response.", Biochem Soc Trans 37(Pt 4): 882-885.

SUTTON, S., CLUTTERBUCK, A., HARRIS, P., GENT, T., FREEMAN, S., FOSTER, N., BARRETT-JOLLEY, R.u. MOBASHERI, A. (2009):

"The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis.", Vet J 179(1): 10-24.

TALAAAT, M. B., KOWALESKI, M. P.u. BOUDRIEAU, R. J. (2006):

"Combination tibial plateau leveling osteotomy and cranial closing wedge osteotomy of the tibia for the treatment of cranial cruciate ligament-deficient stifles with excessive tibial plateau angle.", Vet Surg 35(8): 729-739.

TANAMAS, S., HANNA, F. S., CICUTTINI, F. M., WLUKA, A. E., BERRY, P.u. URQUHART, D. M. (2009):

"Does knee malalignment increase the risk of development and progression of knee osteoarthritis? A systematic review.", Arthritis Rheum 61(4): 459-467.

TAYTON, E., VERMA, R., HIGGINS, B.u. GOSAL, H. (2009):

"A correlation of time with meniscal tears in anterior cruciate ligament deficiency: stratifying the risk of surgical delay.", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 17(1): 30-34.

THEVENOT, P., NAIR, A., DEY, J., YANG, J.u. TANG, L. (2008):

"Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds.", Tissue Eng Part C Methods 14(4): 319-331.

THIEMAN, K. M., TOMLINSON, J. L., FOX, D. B., COOK, C.u. COOK, J. L. (2006):

"Effect of meniscal release on rate of subsequent meniscal tears and owner-assessed outcome in dogs with cruciate disease treated with tibial plateau leveling osteotomy.", Vet Surg 35(8): 705-710.

TILLMANN, B. (1987):

„Anatomie des Menschen - Bd. 1, Bewegungsapparat.“, A. RAUBERu. F. H. KOPSCH, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 148-162.

TIRGARI, M. (1978):

"Changes in the canine stifle joint following rupture of the anterior cruciate ligament.", J Small Anim Pract 19(1): 17-26.

TIRGARI, M. (1978):

"The surgical significance of the blood supply of the canine stifle joint.", J Small Anim Pract 19(8): 451-462.

TIRGARI, M.u. VAUGHAN, L. C. (1975):

"Arthritis of the canine stifle joint.", Vet Rec 96(18): 394-399.

TIVERS, M. S., MAHONEY, P. N., BAINES, E. A.u. CORR, S. A. (2009):

"Diagnostic accuracy of positive contrast computed tomography arthrography for the detection of injuries to the medial meniscus in dogs with naturally occurring cranial cruciate ligament insufficiency.", J Small Anim Pract 50(7): 324-332.

TOHYAMA, H.u. YASUDA, K. (2002):

"The effect of increased stress on the patellar tendon.", J Bone Joint Surg Br 84(3): 440-446.

TOMITA, F., YASUDA, K., MIKAMI, S., SAKAI, T., YAMAZAKI, S.u. TOHYAMA, H. (2001):

"Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction.", Arthroscopy 17(5): 461-476.

TSAI, M. S., LEE, J. L., CHANG, Y. J.u. HWANG, S. M. (2004):

"Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol.", Hum Reprod 19(6): 1450-1456.

TUTTLE, T. A.u. MANLEY, P. A. (2009):

"Risk factors associated with fibular fracture after tibial plateau leveling osteotomy.", Vet Surg 38(3): 355-360.

UNTERHAUSER, F. (2004):

„Revaskularisierung und Nachweis von Myofibroblasten im freien Sehnenransplantat nach vorderem Kreuzbandersatz“, Diss. Vet. Med., Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin. Berlin.

UNTERHAUSER, F. N., BAIL, H. J., HOHER, J., HAAS, N. P.u. WEILER, A. (2003):

"Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft.", Clin Orthop Relat Res 414(414): 276-288.

UYSAL, C. A., TOBITA, M., HYAKUSOKU, H.u. MIZUNO, H. (2012):

"Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation.", J Plast Reconstr Aesthet Surg 65(12): 1712-1719.

VALDES, A. M.u. SPECTOR, T. D. (2011):

"Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis.", Nat Rev Rheumatol 7(1): 23-32.

VAN EIJK, F., SARIS, D. B., RIESLE, J., WILLEMS, W. J., VAN BLITTERSWIJK, C. A., VERBOUT, A. J.u. DHERT, W. J. (2004):

"Tissue engineering of ligaments: a comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source.", Tissue Eng 10(5-6): 893-903.

VASSEUR, P. B. (1984):

"Clinical Results Following Nonoperative Management for Rupture of the Cranial Cruciate Ligament in Dogs.", Veterinary Surgery 13(4): 243-246.

VASSEUR, P. B., POOL, R. R., ARNOCKY, S. P.u. LAU, R. E. (1985):

"Correlative biomechanical and histologic study of the cranial cruciate ligament in dogs.", Am J Vet Res 46(9): 1842-1854.

VAVKEN, P., JOSHI, S.u. MURRAY, M. M. (2009):

"TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering.", J Orthop Res 27(12): 1612-1618.

VERRECK, F. A., DE BOER, T., LANGENBERG, D. M., VAN DER ZANDEN, L.u. OTTENHOFF, T. H. (2006):

"Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation.", J Leukoc Biol 79(2): 285-293.

VIEIRA, N. M., BRANDALISE, V., ZUCCONI, E., SECCO, M., STRAUSS, B. E.u. ZATZ, M. (2010):
"Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells.", Cell Transplant 19(3): 279-289.

VOGEL, K. G.u. HEINEGARD, D. (1985):

"Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon.", J Biol Chem 260(16): 9298-9306.

VOROTNIKOVA, E., MCINTOSH, D., DEWILDE, A., ZHANG, J., REING, J. E., ZHANG, L., CORDERO, K., BEDELBAEVA, K., GOUREVITCH, D., HEBER-KATZ, E., BADYLAK, S. F.u. BRAUNHUT, S. J. (2010):

"Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo.", Matrix Biol 29(8): 690-700.

WADA, M., IMURA, S., BABA, H.u. SHIMADA, S. (1996):

"Knee laxity in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.", Br J Rheumatol 35(6): 560-563.

WAGGETT, A. D., BENJAMIN, M.u. RALPHS, J. R. (2006):

"Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load.", Eur J Cell Biol 85(11): 1145-1154.

WALLACE, J. L., VIAPPIANI, S.u. BOLLA, M. (2009):

"Cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donators for osteoarthritis.", Trends Pharmacol Sci 30(3): 112-117.

WEBER, W. E.u. WEBER, E. (1836):

„Mechanik der menschlichen Gehwerkzeuge: eine anatomisch-physiologische Untersuchung.“, Dieterich Verlag, Göttingen

WEILER, A., FORSTER, C., HUNT, P., FALK, R., JUNG, T., UNTERHAUSER, F. N., BERGMANN, V., SCHMIDMAIER, G.u. HAAS, N. P. (2004):

"The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction.", Am J Sports Med 32(4): 881-891.

WEILER, A., HOFFMANN, R. F., BAIL, H. J., REHM, O.u. SUDKAMP, N. P. (2002):

"Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep.", Arthroscopy 18(2): 124-135.

WEILER, A., PETERS, G., MAURER, J., UNTERHAUSER, F. N.u. SUDKAMP, N. P. (2001):

"Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep.", Am J Sports Med 29(6): 751-761.

WEILER, A., SCHEFFLER, S. U.u. SUDKAMP, N. P. (2000):

"[Current aspects of anchoring hamstring tendon transplants in cruciate ligament surgery].", Chirurg 71(9): 1034-1044.

WEILER, A., UNTERHAUSER, F. N., BAIL, H. J., HUNING, M.u. HAAS, N. P. (2002):

"Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling.", J Orthop Res 20(2): 310-317.

WEISS, R. A. (1991):

"Klinische und funktionelle Beurteilung verschiedener Operationstechniken beim vorderen Kreuzbandriss des Hundes.", Kleintierprax(36): 471-486.

WELSH, R. P. (1980):

"Knee joint structure and function.", Clin Orthop Relat Res(147): 7-14.

WESTHUES, M. (1961):

"Die Zerreiung der Ligamenta decussata im Kniegelenk des Hundes.", Ref Mh Tierheilk(13): 25.

WILKE, V. L., CONZEMIUS, M. G., BESANCON, M. F., EVANS, R. B.u. RITTER, M. (2002):

"Comparison of tibial plateau angle between clinically normal Greyhounds and Labrador Retrievers with and without rupture of the cranial cruciate ligament.", J Am Vet Med Assoc 221(10): 1426-1429.

WILKE, V. L., ROBINSON, D. A., EVANS, R. B., ROTHSCHILD, M. F.u. CONZEMIUS, M. G. (2005):

"Estimate of the annual economic impact of treatment of cranial cruciate ligament injury in dogs in the United States.", J Am Vet Med Assoc 227(10): 1604-1607.

WINGFIELD, C., AMIS, A. A., STEAD, A. C.u. LAW, H. T. (2000):

"Cranial cruciate stability in the rottweiler and racing greyhound: an in vitro study.", J Small Anim Pract 41(5): 193-197.

WINKELS, P., GREVEL, V., OECHTERING, G.u. BOTTCHER, P. (2010):

"[Radiographic location of the tibial cranial cruciate ligament attachment in middle- to large breed dogs].", Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 38(5): 277-284.

WINKELS, P., WERNER, H., GREVEL, V., OECHTERING, G.u. BOTTCHER, P. (2010):

"Development and in situ application of an adjustable aiming device to guide extra- to intraarticular tibial tunnel drilling for the insertion of the cranial cruciate ligament in dogs.", Vet Surg 39(3): 324-333.

WIRTH, C.-J., JÄGER, M.u. KOLB, M. (1984):

„Die komplexe vordere Knie-Instabilität.“, George Thieme Verlag, Stuttgart

WITSBERGER, T. H., VILLAMIL, J. A., SCHULTZ, L. G., HAHN, A. W.u. COOK, J. L. (2008):

"Prevalence of and risk factors for hip dysplasia and cranial cruciate ligament deficiency in dogs.", J Am Vet Med Assoc 232(12): 1818-1824.

WONGCHUENSOONTORN, C., LIEBEHENSCHER, N., SCHWARZ, U., SCHMELZEISEN, R., GUTWALD, R., ELLIS, E., 3rdu. SAUERBIER, S. (2009):

"Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible--a case report.", J Craniomaxillofac Surg 37(3): 155-161.

WOODS, T.u. GRATZER, P. F. (2005):

"Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft.", Biomaterials 26(35): 7339-7349.

XU, R., BOUDREAU, A.u. BISSELL, M. J. (2009):

"Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices.", Cancer Metastasis Rev 28(1-2): 167-176.

YAHIA, L. H.u. DROUIN, G. (1989):

"Microscopical investigation of canine anterior cruciate ligament and patellar tendon: collagen fascicle morphology and architecture.", J Orthop Res 7(2): 243-251.

- YAMAKADO, K., KITAOKA, K., YAMADA, H., HASHIBA, K., NAKAMURA, R.u. TOMITA, K. (2003):
"Influence of stability on range of motion after cruciate-retaining TKA.", Arch Orthop Trauma Surg 123(1): 1-4.
- YANG, B., ZHANG, Y., ZHOU, L., SUN, Z., ZHENG, J., CHEN, Y.u. DAI, Y. (2010):
"Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering.", Tissue Eng Part C Methods 16(5): 1201-1211.
- YASTREBOV, O.u. LOBENHOFFER, P. (2009):
"[Treatment of isolated and multiple ligament injuries of the knee: anatomy, biomechanics, diagnosis, indications for repair, surgery].", Orthopade 38(6): 563-580.
- YIN, Z., CHEN, X., ZHU, T., HU, J. J., SONG, H. X., SHEN, W. L., JIANG, L. Y., HENG, B. C., JI, J. F.u. OUYANG, H. W. (2013):
"The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair.", Acta Biomater 9(12): 9317-9329.
- YOSHIDA, R., VAVKEN, P.u. MURRAY, M. M. (2012):
"Decellularization of bovine anterior cruciate ligament tissues minimizes immunogenic reactions to alpha-gal epitopes by human peripheral blood mononuclear cells.", Knee 19(5): 672-675.
- YOUNG, R. G., BUTLER, D. L., WEBER, W., CAPLAN, A. I., GORDON, S. L.u. FINK, D. J. (1998):
"Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.", J Orthop Res 16(4): 406-413.
- YOUNGSTROM, D. W., BARRETT, J. G., JOSE, R. R.u. KAPLAN, D. L. (2013):
"Functional characterization of detergent-decellularized equine tendon extracellular matrix for tissue engineering applications.", PLoS One 8(5): e64151.
- ZAHM, H. (1964):
„Die Ligamenta decussata im gesunden und arthrotischen Kniegelenk des Hundes.“, Diss Vet.med., Ludwig-Maximilians-Universität. München.
- ZHANG, A. Y., BATES, S. J., MORROW, E., PHAM, H., PHAM, B.u. CHANG, J. (2009):
"Tissue-engineered intrasynovial tendons: optimization of acellularization and seeding.", J Rehabil Res Dev 46(4): 489-498.

ZHOU, S., GLOWACKI, J.u. YATES, K. E. (2004):

"Comparison of TGF-beta/BMP pathways signaled by demineralized bone powder and BMP-2 in human dermal fibroblasts.", J Bone Miner Res 19(10): 1732-1741.

ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P.u. HEDRICK, M. H. (2002):

"Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.", Mol Biol Cell 13(12): 4279-4295.

ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P.u. HEDRICK, M. H. (2001):

"Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.", Tissue Eng 7(2): 211-228.

Anhang

Einverständniserklärung

Ich _____ (Name), erkläre hiermit einverstanden, den Tierkörper meines Hundes _____ (Name des Tieres), der am _____ (Datum) in der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität euthanasiert wurde/ gestorben ist, eben dieser Klinik zu Versuchszwecken zu überlassen. Ich weiß, dass das Tier Teil eines Versuchs sein wird, für dessen Durchführung es erforderlich ist die Achillessehne und Unterhautfettgewebe zu entnehmen.

Berlin, den _____

(Unterschrift Besitzer)

(Unterschrift Meike van Staa i.A. von Prof. Dr. Leo Brunberg)

Einverständniserklärung

Ich _____ (Name), erkläre hiermit einverstanden, den Tierkörper meines Pferdes _____ (Name des Tieres), das am _____ (Datum) in der Pferdeklinik der Freien Universität euthanasiert wurde/ gestorben ist, der Klinik für kleine Haustiere zu Versuchszwecken zu überlassen. Ich weiß, dass das Tier Teil eines Versuchs sein wird, für dessen Durchführung es erforderlich ist die Beugesehnen und Unterhautfettgewebe zu entnehmen.

Berlin, den _____

(Unterschrift Besitzer)

(Unterschrift Meike van Staa i.A. von Prof. Dr. Leo Brunberg)

Einverständniserklärung

Ich _____ (Name), erkläre hiermit einverstanden, das Unterhautfettgewebe meines Hundes _____ (Name des Tieres) im Rahmen der geplanten Operation _____ (geplanter Eingriff) am _____ (Datum) in der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin entnommen wird, eben dieser Klinik zu Versuchszwecken zu überlassen.

Berlin, den _____

(Unterschrift Besitzer)

(Unterschrift Meike van Staa i.A. von Prof. Dr. Leo Brunberg)

Einverständniserklärung

Ich _____ (Name), erkläre hiermit einverstanden, das Blut meines Hundes _____ (Name des Tieres) im Rahmen der geplanten Blutentnahme am _____ (Datum) in der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin entnommen wird, eben dieser Klinik zu Versuchszwecken zu überlassen.

Berlin, den _____

(Unterschrift Besitzer)

(Unterschrift Meike van Staa i.A. von Prof. Dr. Leo Brunberg)

Publikationsverzeichnis

VAN STAA, M., KURTZ, A., LANG, A. u. BRUNNBERG, L. (2015). Ein neuer Kreuzbandersatz mithilfe des Tissue Engineering. 61. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin, Berlin.

VAN STAA, M., KURTZ, A., LANG, A. u. BRUNNBERG, L. (2016). Ein neuer Kreuzbandersatz - Tissue Engineering. 8. Leipziger Tierärztekongress, Leipzig.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei vielen Personen bedanken, ohne deren Mithilfe und Unterstützung diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Leo Brunnberg danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Vergabe dieses spannenden Projektes. Darüber hinaus auch für die Unterstützung und Herstellung vieler Kontakte, die dieses Projekt erst möglich gemacht haben.

Ich danke Herrn Prof. Andreas Kurtz für die offene Aufnahme in die AG Kurtz sowie die fachliche Supervision und Unterstützung im Labor bedanken. Ich konnte ihn jederzeit ansprechen und mit ihm die besonderen Ansprüche bei meinem Vorhaben diskutieren. Seine Tipps und die positive Kritik auch seiner Mitarbeiter waren besonders wertvoll. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Manfred Roch, Iris Fischer und Imran Ullah.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annemarie Lang aus der AG Buttgereit (Charité), die mir immer und insbesondere zum Ende mit Rat und Tat zur Seite stand. Mit ihr konnte ich meine Methoden und Ergebnisse kritisch diskutieren. Sie hat mich in die AG Buttgereit eingeführt und zu mancher Problemlösung beigetragen. Dabei möchte ich mich namentlich auch bei Moritz Pfeiffenberg der AG Buttgereit für die tatkräftige Unterstützung bei der Charakterisierung der ACSs bedanken.

Beim Gewinnen und Sammeln der Proben von Material von Hunden, Pferden und Rindern danke ich den jeweiligen Mitarbeitern der Kleintierklinik bzw. Pferde- und Rinderklinik sowie der Pathologie der Freien Universität Berlin.

Rindersehnen durfte ich dankenswerterweise von Schlachttieren von Gut Hesterberg entnehmen.

Frau Prof. Johanna Plendl vom Institut für Anatomie und Histologie hat mich mit Karin Briest Forch bei der Anfertigung und Auswertung der histologischen Schnitte und Färbungen unterstützt.

Danken muss ich Dag Wulsten und PhD Christian Balkovec sowie Prof. Dr. Georg Duda vom Julius Wolff Institut. Sie haben mich mit ihren biomechanischen

Instrumenten arbeiten lassen, sowie viel Geduld aufgebracht den Bioreaktor mitzuentwickeln und zu testen.

Außerdem danke ich meinen Kollegen aus der Kleintierklinik für die Zusammenarbeit während der Doktorandenzeit.

Besonderer Dank gilt auch meiner gesamten Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Geduld.

Zum Schluss möchte ich mich bei Göknil Kalayci für die gute Zusammenarbeit in diesem Projekt und die vielen, auch nächtlichen, gemeinsamen Arbeitsstunden und bei Katharina Gais für die tatkräftige und mentale Unterstützung bedanken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 08.07.2019

Meike van Staa



9 783967 290028

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-002-8